

适合大量培养的红球藻藻种的筛选

张宝玉 李夜光 耿亚红 李中奎 胡鸿钧

(中国科学院武汉植物所, 武汉 430074)

摘要: 研究了4个雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)品系在10℃、15℃、20℃、25℃和28℃时的生长速率(μ)、生物量、虾青素含量和产量,从中选出适合于大量培养的品系*H. pluvialis* 26和*H. pluvialis* WZ。2个品系的虾青素含量和产量分别达到2.41%—3.16%, 46.51—54.35mg/L和2.40%—2.59%, 39.84—40.15mg/L。2个品系的温度适应具有互补性:*H. pluvialis* WZ适应于较低温度(10℃—20℃),*H. pluvialis* 26适应于较高温度(20℃—28℃),在低温季节使用*H. pluvialis* WZ,在高温季节使用*H. pluvialis* 26进行生产,可以延长生产期,提高产量。

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 大量培养; 藻种筛选

中图分类号: Q949.29 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0289-05

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* Flotow)是一类生活在淡水中的单细胞绿藻,该藻在它的孢子(Cysts)中能积累一种经济价值很高的虾青素(Astaxanthin)及其酯类^[1-2]。随着研究的深入,虾青素的功能越来越引起人们的兴趣。一方面,由于其优异的着色效果及对鱼、家禽等生长促进作用而被广泛用于饲料添加剂^[3-5]。另一方面,作为优越的天然抗氧化剂,其抗氧化性优于 β -胡萝卜素、维生素E,被称为“超级维生素E”^[6-8],而被广泛开发应用于食品、医药、化妆品等行业的生产。虾青素具有广阔的应用前景,而如何获得大量虾青素已成为国际上研究的热点之一^[9-12]。根据目前的文献报道,虾青素的来源主要有:化学合成^[13];从甲壳类动物中提取;利用真菌生产^[14]及利用微藻生产。研究表明,在自然界中雨生红球藻孢子的虾青素含量最高。

但大规模培养红球藻生产虾青素存在以下几方面技术问题:1. 易被其他微藻、变形虫、原生动物污染^[15];2. 红球藻普遍适应低温,一般超过28℃就抑制其生长;3. 生长较慢;4. 虾青素含量仍然偏低。因此筛选出温度适应范围广,生长快,虾青素含量高的藻种是解决上述问题的关键。作者对4株雨生红球藻进行了筛选,以期选出适合大规模生产的藻种。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养基 *H. pluvialis* 26; *H. pluvialis* 30; *H. pluvialis* 34; *H. pluvialis* WZ用改良的BG-11培养,由本所经济微藻室藻种库提供。

1.2 培养方法 将处于对数生长期的藻液密度调为 $0.5-1 \times 10^4$ 个/mL。50mL的三角瓶放25mL藻液,设置一个重复组,置于摇床上,摇床上设定特定的温度。摇床转速为100r/min。连续光照,光照强度为 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。每隔24h取样,加Lough's固定液固定,用血球计数板在显微镜下计数,每一个样品计数4次,取平均值。共培养5d。

1.3 生长速率(μ)的计算 计算公式:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{T_2 - T_1}$$

N_2 是时间 T_2 时的细胞密度, N_1 是时间 T_1 时的细胞密度。

1.4 生物量(鲜重)的计算 在显微镜下测量细胞原生质体的直径,用球体积公式计算原生质体,根据细胞密度和细胞体积,按细胞比重为1.0计算单位体积藻液中藻的生物量(鲜重)。

1.5 鲜藻中虾青素含量的测定 根据Boussiba等的方法提取和测定虾青素^[16],按消光系数 $A_{1\text{cm}}^{1\%} =$

收稿日期: 2003-05-28; 修订日期: 2003-10-06

基金项目: 国家自然科学基金: 中国孢子植物志、团藻目(I) (编号: 39899400)

作者简介: 张宝玉(1975—)女, 山东诸城人, 硕士

通讯作者: 李夜光, yeguang@rose.whiob.ac.cn

2220 计算虾青素的浓度^[17]。

(1) 用下列公式计算所测溶液中虾青素的浓度:

$$C_1 = \frac{A_{492}}{A_{1cm}^{1\%} \times 100} \text{ (g/mL)} \quad (A_{1cm}^{1\%} = 2220)$$

(2) 用下列公式计算鲜藻中虾青素的含量:

$$C_2 = \frac{C_1 \times v \times n}{W} \times 100\%$$

v ——提取液体积(单位:ml)
n ——稀释倍数
W ——取样质量(单位:g)

2 结果

2.1 4个雨生红球藻品系在不同温度的生长情况

4个雨生红球藻品系在不同温度下培养的生长曲线见图1,生长速率见表1。

H. pluvialis 26 温度适应范围较广。在 15℃—28℃范围内都可以生长,最适生长温度是 20℃。20℃时,不仅生长繁殖快,细胞形态也好,藻液颜色浓绿。28℃时,细胞生长繁殖仍较快,但培养到第4d,部分细胞结团,结团的细胞很快失去鞭毛,成为

静孢子。藻液颜色不象 20℃时那样浓绿,而是淡黄色。10℃时基本不生长。

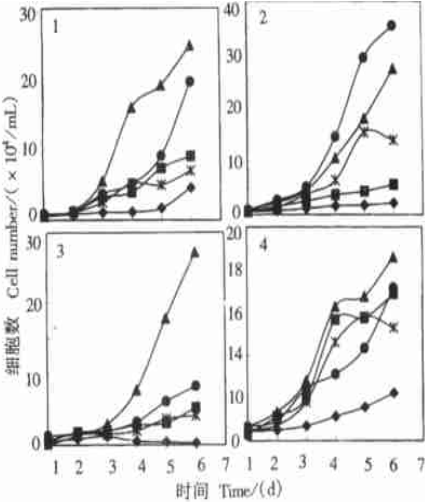


图1 雨生红球藻4个品系的生长曲线
Fig.1 Growth curve of 4 *H. pluvialis* strains under different temperature

◆ 10℃ ■ 15℃ ▲ 20℃ ● 25℃ * 28℃
1. *H. pluvialis* 26; 2. *H. pluvialis* 30 ;3. *H. pluvialis* 34; 4. *H. pluvialis* WZ

表1 雨生红球藻4个品系不同温度时的生长速率(μ)

Tab.1 Growth rate(μ) of 4*H. pluvialis* strains cultured under different temperature

	10℃	15℃	20℃	25℃	28℃
<i>H. pluvialis</i> WZ	0.325	0.618	0.514	0.478	0.471
<i>H. pluvialis</i> 30	0.287	0.484	0.668	0.740	0.665
<i>H. pluvialis</i> 34	-0.220	0.470	0.606	0.368	0.341
<i>H. pluvialis</i> 26	0.100	0.579	0.688	0.622	0.526

H. pluvialis WZ 的温度适应范围最广。10℃—28℃都能生长,最适生长温度是 15℃。10℃—25℃条件下培养,生长繁殖快,细胞形态也好,藻液颜色浓绿。15℃时的生长速率不仅较其他温度快,也比其他3个藻种的生长速率都高。培养温度超过达到25℃,特别是28℃时,细胞易结团,聚集成团的细胞失去鞭毛变成静孢子。

H. Pluvialis 30 在 10℃和 15℃时生长都很慢。温度超过 20℃则生长繁殖速率加快,在 25℃生长最好,生长速率(μ)高达 0.74,比其他3株任何温度的生长速率都高。28℃时细胞数目虽然比 10℃, 15℃多,但培养到第5d,培养液中有许多死亡的细胞。

H. Pluvialis 34 温度适应范围较窄。在 10℃时细胞不仅不生长,甚至出现负增长。20℃时生长较好,温度超过 20℃细胞结团现象非常严重,25℃和28℃生长速率很低。

2.2 4个雨生红球藻品系的生物量

在不同温度下培养4个雨生红球藻品系的生物量见图2。每种藻在其最适温度时的生物量最大。

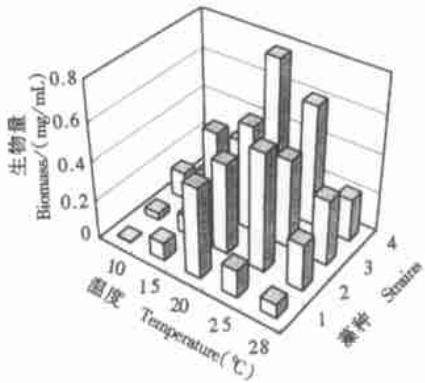


图2 不同温度条件培养4株雨生红球藻生物量的比较
Fig.2 Comparison of biomass of 4 *Haematococcus pluvialis* strains cultured under different temperature
1. *H. pluvialis* 34; 2. *H. pluvialis* 30;
3. *H. pluvialis* WZ; 4. *H. pluvialis* 26

由于 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的细胞(原生质体)只有 *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ 的 1/2, 尽管 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 细胞密度大, 生物量却比 *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ 小。

2.3 4 个雨生红球藻品系的虾青素含量和产量

20℃条件下培养 4 株雨生红球藻, 虾青素含量和产量见表 2。 *H. pluvialis* 26 无论采收的干藻量还是干藻中虾青素的含量都是最高的, 其次是 *H. pluvialis* WZ。 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 虾青素含量和产量都大大低于 *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ。在实验条件下, *H. pluvialis* 26 的虾青素含量分别是 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的 2.4 倍和 1.7 倍; 虾青素产量分别是 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的 4.8 倍和 4.4 倍; *H. pluvialis* WZ 的虾青素含量分别是 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的 2.2 倍和 1.6 倍; 虾青素产量分别是 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的 3.8 倍和 3.5 倍。

表 2 4 个雨生红球藻品系虾青素含量和产量的比较
Tab. 2 Comparison of Astaxanthin content and productivity of four *H. pluvialis* strains

藻种 Strain	干藻(g/L) Dry weight	虾青素含量(g/100g 干藻) Astaxanthin content	虾青素产量(mg/L 藻液) Astaxanthin productivity
<i>H. pluvialis</i> 26	1.72—1.93	2.41—3.16	46.51—54.36
<i>H. pluvialis</i> 30	0.84—0.98	0.94—1.34	7.89—13.13
<i>H. pluvialis</i> 34	0.61—0.67	1.41—1.83	10.53—12.26
<i>H. pluvialis</i> WZ	1.55—1.66	2.40—2.59	39.84—40.15

总的来看, 4 株藻适宜的温度范围是 15℃—25℃, 与已有的报道相同。4 株藻在 10℃时的生长速率都较低, 特别是 *H. pluvialis* 34 出现负增长, 表明红球藻不适应特别低的温度, *H. pluvialis* WZ 的最适温度是 15℃, 与 Harker 等^[18]报道红球藻的最适温度为 14—15℃相同。这 4 株藻对较高温度的适应性与已有的报道大体相符。Lu^[19]报道最适温度为 25—28℃; 当环境温度高于 28℃则其生长受到抑制; Michael 等^[20]认为其生长温度不能超过 28℃否则会促进胶群体细胞和静孢子形成; 殷明焱等^[21]实验结果证明 20℃左右生长比较好, 超过 28℃细胞由游动变为不动。实验中 28℃培养 4 株红球藻, 虽然除了 *H. pluvialis* 34 生长较慢外, 其他 3 株藻的生长速率并不太低, 但是, 藻液变黄, 细胞结团, 游动细胞提前失去鞭毛变为孢子, 严重影响了生物量的累积, 从图 2 可以看出, 与最适温度相比, 28℃时生物量平均减少了 60%—70%。

3 讨论

3.1 4 个雨生红球藻品系的温度适应性

根据 4 株雨生红球藻在 10℃、15℃、20℃、25℃、28℃的生长情况, 可以看出 4 个品系的温度适应性有所不同。 *H. pluvialis* 34 适应的温度范围最窄: 10℃时负增长, 25℃、28℃时生长缓慢, 只有在 15℃、20℃时生长繁殖较快; *H. pluvialis* WZ 是一个适应低温的藻种, 最适生长温度是 15℃, 在 10℃时也能快速生长繁殖, 15℃和 20℃时的生长速率都是 4 株藻中最高的, 温度超过 20℃, 生长速率下降; *H. pluvialis* 26 温度适应范围较宽, 虽然最适生长温度是 20℃, 但在 15℃—28℃范围内都能快速生长繁殖; *H. pluvialis* 30 的温度适应性最好, 10℃时的生长速率仅低于 *H. pluvialis* WZ, 20℃、25℃和 28℃时的生长速率相差不大, 比其他 3 株都高。

3.2 选择适合于大规模培养的藻种

从温度适应性来看, *H. pluvialis* 30 表现最佳, *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ 次之, *H. pluvialis* 34 表现最差。以虾青素含量和产量为指标来判断, *H. pluvialis* 26 最好, *H. pluvialis* WZ 次之。 *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ 不仅虾青素含量高, 可以达到干重的 2.5%—2.8%, 而且产量高, 适合于大规模养殖。 *H. pluvialis* 30 和 *H. pluvialis* 34 的虾青素产量只有 *H. pluvialis* 26 和 *H. pluvialis* WZ 的 20%—30%, 不适合于大规模养殖。

H. pluvialis 26 和 *H. pluvialis* WZ 在温度适应方面具有互补性, *H. pluvialis* WZ 具有耐低温的特点, 在 10℃—20℃生长快; *H. pluvialis* 26 在 10℃时几乎不能生长, 但是在 20℃—28℃范围都能快速生长繁殖。在温度低于 20℃的季节使用 *H. pluvialis* WZ 进行生产, 在温度高于 20℃的季节使用 *H. pluvialis* 26 进行生产, 可以延长培养时间, 提高产量。

参考文献:

- [1] Grung M, D' Souza F M L, Borowitzka M, *et al.* Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters [J]. *J Appl Phycol*, 1992, **4**: 165—171
- [2] Lee Y K, Soh C W. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lenticularis* (Chlorophyta) [J]. *J Phycol*, 1991, **27**: 575—577
- [3] Sommer T R, Potts W T. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture* 1991, **94**: 79—88
- [4] Kranzfelder J A. Carotenoids from microalgae [J]. *J Phycol*, 1992, **28** (suppl.): 11
- [5] Wang Y Q, Li Q S. The studying progress, production and application of natural carotenoids [M]. Beijing: China Medical pharmacy and Science Publishing house 1997 [王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用. 北京: 中国医药科技出版社, 1997]
- [6] Terao J. Antioxidant activity of β -carotene related carotenoids in solution [J]. *Lipids* 1989, **24**: 659—661
- [7] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. *Pure Appl. Chem*, 1991, **63**: 141—146
- [8] Shimidzu N. Carotenoids as single oxygen quenchers in marine organisms [J]. *Fisheries Science* 1996, **62**: 134—137
- [9] Zhuang H R, Shi Q R Q, Lu H S, *et al.* The effect of nutritional stresses on accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2000, **24**(3): 208—212 [庄惠如, 施巧勤, 卢海声, 等. 营养胁迫对雨生红球藻虾青素累积的影响, 水生生物学报, 2000, **24**(3): 208—212]
- [10] Huang F, Lin S Z, Zhang J. The growth of *H. pluvialis* and accumulation of astaxanthin [J]. *J. of Central China Normal University* (Nat. Sci), 1998, **16**(1): 102—105 [黄仿, 林淑注, 张健. 雨水血球藻的生长及虾青素的积累, 广西师范大学学报(自然科学版) 1998, **16**(1): 102—105]
- [11] Zhuang H R, Lu H S, Chen B L, *et al.* Astaxanthin accumulation in vegetative cell of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2001, **25**(4): 376—380 [庄惠如, 卢海声, 陈必链, 等. 雨生红球藻营养细胞的虾青素累积, 水生生物学报 2001, **25**(4): 376—380]
- [12] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiol*. 1991, **323**: 1077—1082
- [13] Mayne S T, Parker R S. Cis-canthaxanthin and other carotenoid like compounds in canthaxanthin preparations [J]. *J. Agri. Food Chem*. 1988, **36**: 478
- [14] Jones A Bon, Timothy D. Leathers. *et al.* Isolation of astaxanthin over producing mutants of *Phaffia rhodozyma* [J]. *Biotechnology letters* 1997, **19**(2): 109—112
- [15] Phang S M, Lee Y K., Borowitzka M. *et al.* Algal Biotechnology in Asia Pacific Region [M]. Kuala Lumpur: University of Malaya. 1994, 130—134
- [16] Boussiba S, Lu fan. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *H. pluvialis* [J]. *Methods in Enzymology* 1993, **213**: 386—391
- [17] Davies B H. "Chemistry and biochemistry of plant pigments" [M]. London: Academic Press, 1976, **2**: 38—165
- [18] Mark Harker, Alex J., Tsavalos Andrew J. Young Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus Pluvialis* [J]. *J. Appl. Phycol*. 1995, **7**: 339—406
- [19] Lu F, Vonshak A, Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus Pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *J. Phycol.*, 1994, **30**: 829—833
- [20] Michael A, Borowitzka. John M, Huisman Ann Osborn. Culture of the astaxanthin producing green alga *Haematococcus Pluvialis* I. Effect of nutrients on growth and cell type. [J]. *J. Appl. Phycol*. 1993, **3**: 295—304
- [21] Yin M Y, Liu J G, Zhang J P, *et al.* The review about *H. pluvialis* and astaxanthin [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology* 1998, **2**: 51—62 [殷明焱, 刘建国, 张京浦等. 雨生红球藻和虾青素研究述评. 海洋湖沼通报, 1998, **2**: 51—62]
- [22] Qiu B S, Lin Q F. An improvement on the Growth Medium for *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 1999, **23**(4): 391—394 [邱保胜, 刘其芳. 雨生红球藻培养基的改良. 水生生物学报, 1999, **23**(4): 391—394]

SELECTION OF *HAEMATOCOCCUS* STRAINS SUITABLE FOR MASS CULTURE

ZHANG Bao-Yu, LI Ye-Guang, GENG Ya-Hong, LI Zhong-Kui and HU Hong-Jun
(Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074)

Abstract: *Haematococcus pluvialis*, a kind of unicellular freshwater green algae, has been proved to be one of the most effective natural sources of astaxanthin. Astaxanthin can be used in aquaculture, food, medical and cosmetical industries etc, thus it has a promising future, due to its anti-oxidation and effective coloration. Aim at the key technological problems for mass culture of the *Haematococcus*, 4 strains of *Haematococcus pluvialis* from our laboratory collection were studied. They were cultured under 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C respectively, and were investigated growth rate, biomass, astaxanthin content and productivity. The results are as follow: 1) : Optimal cultivation temperature of 4 strains were *H. pluvialis* 26: 20 °C; *H. pluvialis* 30: 25 °C; *H. pluvialis* 34: 20 °C; *H. pluvialis* WZ: 15 °C respectively. 2) Astaxanthin content and productivity of 4 strains were *H. pluvialis* 26: 2.41% — 3.16% and 46.51 — 54.35mg/L; *H. pluvialis* 30: 0.94% — 1.34% and 7.89 — 13.13mg/L; *H. pluvialis* 34: 1.41% — 1.83% and 10.53 — 12.26 mg/L; *H. pluvialis* WZ: 2.40% — 2.59% and 37.84 — 40.15mg/L. According to culture temperature, astaxanthin content and productivity, *H. pluvialis* 26 and *H. pluvialis* WZ were selected as strains suitable for mass culture. The temperature adaptation of *H. pluvialis* WZ and *H. pluvialis* 26 are complementary: *H. pluvialis* WZ is adaptable to lower temperature (10 °C — 15 °C), and *H. pluvialis* 26 is adaptable to higher temperature (20 °C — 28 °C). Using *H. pluvialis* WZ in cool season and *H. pluvialis* 26 in warm season respectively for mass culture would extend production duration and thus realize higher productivity.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; Astaxanthin; Mass culture; Strain selection