

# 室内外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组分\*

戴俊彪 吴庆余

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

**提要** 利用现有的螺旋藻培养基地,初步尝试了对海洋单细胞微藻(球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*)的大规模室外培养,研究了藻细胞在室内外不同培养条件下的生长规律,并对其生化成分进行了分析,发现实验藻种对培养条件表现出一定的适应性。在室外条件下,细胞内脂类、蛋白质的含量都有较大的下降,分别从细胞干重的 17.045%和 4.412%下降为 9.746%和 2.254%。与此同时,细胞内糖类含量却大大增加,高达干重的 30.067%,比室内培养增加了 25.08%,且是所有组分中最高的。室外培养细胞内灰分的含量也高于室内。

**关键词** 球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*,大规模培养,环境因子

球等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 具有较高的  $n-3$  多不饱和脂肪酸( $n-3$  PUFA)生产潜力。一系列相应的研究工作已在世界各地展开,如:具有高  $n-3$  PUFA 产率球等鞭金藻菌株的筛选;各种不同环境因子对其生长及脂肪酸含量的影响以及 EPA, DHA 的分离、提取<sup>[1, 2]</sup>等。E. M. Gri ma 等人 1994 年采用户外光反应器对富含 EPA 的球等鞭金藻 ALI4 株进行了培养并获得了 8.2 mg/(L·d) EPA 的高产,并证明了球等鞭金藻 ALI4 株是一个适合室外培养的藻种,为球等鞭金藻的大规模室外培养提供了理论依据。但至今为止,无论是在国外还是在国内,对球等鞭金藻进行室外大规模开放性培养的报道仍然很少,其原因可能在于(1)球等鞭金藻生长条件较为温和,既没有极高的盐度、温度,也没有极端的酸碱度,因而开放式培养容易污染;(2)球等鞭金藻繁殖速度较慢,生长远不如螺旋藻、小球藻迅速;(3)球等鞭金藻产量低,但培养成本却较高,故养殖风险大。

我国近年来在微藻养殖方面的发展很快,到目前为止,微藻养殖基地已广泛地分布于全国各地,而且各基地养殖方式较为一致,大多采用半开放跑道式培养,养殖的藻种也主要限于螺旋藻,仅个别基地养殖小球藻<sup>[3]</sup>。因此,从我国实际出发,尝试球等鞭金藻的开放式大池培养,具有重要的应用价值。本研究利用现有的螺旋藻培养基地,对球等鞭金藻进行了室外大规模培养,并对其生长规律、污染情况以及室内外不

同培养条件下藻细胞的生化组分进行了分析比较,为海洋微藻的开发利用提供了基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

球等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 由吴庆余从日本引入,保存在清华大学生物科学与技术系微藻生物技术实验室。该藻种在“f/2”加富人工海水培养基中,20℃下保存,每 10 d 无菌转接一次新鲜培养基。

### 1.2 培养基的配制

藻细胞培养采用的是添加“f/2”的人工海水培养基,人工海水及“f/2”配方参见文献[4]。室内外培养液的人工海水都没有添加微量元素液。室内培养所使用的是蒸馏水,室外培养则采用经漂白粉消毒后的自来水,并且“f/2”中未添加微量元素液及维生素。室内培养所用药品均为分析纯,室外培养则全部使用工业纯药品。

### 1.3 培养条件

室内无菌培养在 LRH250-G 型光照培养箱中进行,在盛有 300 ml 培养基的 500 ml 三角瓶中,无菌接入球等鞭金藻浓藻液 15 ml 后置于培养箱中连续通气培养。培养条件如下:温度:23±1℃;光照强度:100

\* 国家自然科学基金资助项目 39870064 号。

收稿日期:1999-06-22;修回日期:1999-12-22

$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ; 连续光照; pH: 7.5 ~ 8.5。室外培养于 1998 年 7 月初在山东鲁胜生物技术公司进行, 培养池长 1 m, 宽 1 m, 培养水深 10 cm, 培养过程中的光照、温度等条件均由自然决定, 每日跟踪测定。

### 1.4 生长密度的测定

从接种开始, 利用光密度法每天定时测定藻细胞在 530 nm 处的吸光度值, 然后经吸光度-浓度曲线换算成细胞浓度, 其换算关系为: 细胞浓度 ( $\text{g}/\text{L}$ ) =  $0.676 \times A_{530}$

### 1.5 生化成分分析

取 100 mg 干藻粉, 加入 2 ml 蒸馏水, 超声破碎后离心, 取上清作为蛋白质和糖类抽提液。蛋白质测定参见考马氏亮蓝法, 以牛血清白蛋白为标准。糖类则以葡萄糖为标准, 利用苯酚-硫酸法测定。总脂肪利用氯仿/甲醇/水(1: 2: 0.8)单相体系在 4 °C 下重复 3 次抽提, 离心后合并上清, 补充适量氯仿和水(氯仿/甲醇/水, 1: 1: 0.9), 使成两相体系。吸取下层氯仿溶液, 低温烘干后称重。灰分含量通过称取适量藻粉于 540 °C 恒重后的坩埚中, 同样温度灰化 4 ~ 5 h 后计算残渣重量后获得。

以上测定均采用 3 次重复, 所给出的结果为 3 次测定的平均值。所有吸光度的测定都是在 Pharmacia Ultraspec 2000 紫外-可见分光光度计上进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 室外培养过程中的光照、温度和 pH

图 1a 所显示的是室外培养过程中每天上午 8:00 所测定的 pH、温度和光照变化曲线。在三者之中, 以光照的波动范围最广, 完全受天气的影响。当天气晴朗(如第 4, 9 天)时, 光强可高达  $200 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  以上, 而一旦变为阴雨天气, 光强则可降至近于 0(如第 8 天)。温度和 pH 的变化相对小得多。早上的温度几乎恒定在 28 °C, 一天当中只有少许的浮动, 但都高于其最适温度。pH 基本稳定在 8.6 ~ 8.7, 接近于 Grima 1992 年报道的最适 pH 8.0。

图 1b 是培养过程中某一阴天和晴天的 pH、温度和光照变化曲线。在一天中, 早上的光强都相对较弱, 至中午 11:00 时达到最高, 然后逐渐减弱, 到晚上 20:00 时光强基本为 0。随着光照的变化, 培养液的温度也相应地从早到晚依次升高, 到傍晚 17:00 时达到最高。此后, 温度就开始逐渐回落。在三者当

中, pH 的波动最小, 上下浮动都在 0.1 左右。不同的天气温度和光强的变化较大而 pH 则基本不受影响。

由上述结果可知, 与室内严格人为控制的相比, 室外条件的变化非常大且规律不明显。这样的条件对藻细胞的环境适应能力也提出了很高的要求。

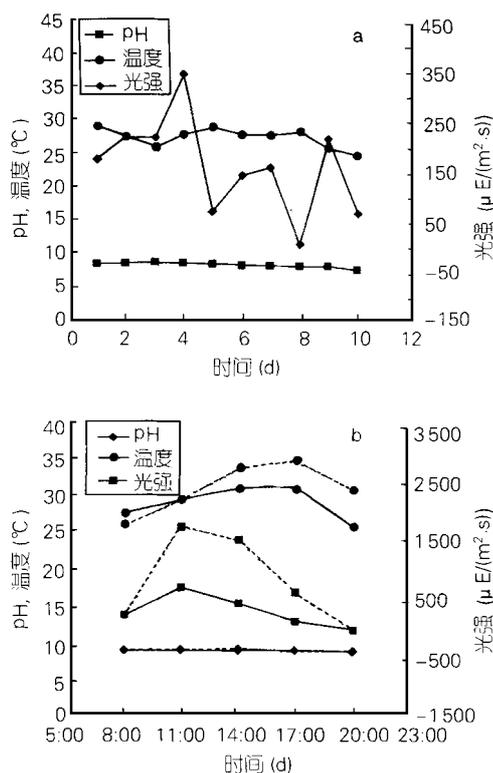


图 1 室外培养条件下的 pH、温度和光强  
(a) 整个培养过程; (b) 某一阴天和晴天 —— 阴天 - - - 晴天  
Fig.1 The pH, temperature and light intensity in outdoor mass culture  
(a) The whole culture time; (b) Some cloudy and sunny days —— cloudy - - - sunny

### 2.2 室内外球等鞭金藻的生长状况

室内外由于不同的培养条件及不同的污染程度, 藻细胞在生长上也表现出截然不同的规律(图 2)。在相同的培养时间内, 室内培养条件下藻细胞最终浓度可达到  $0.563 \text{ g}/\text{L}$ , 而在室外其最高浓度也仅为  $0.245 \text{ g}/\text{L}$ 。藻细胞在室内条件下的生长速率要大大高于室外, 其代时约为 44.5 h, 而室外生长代时则延长至约 91.2 h, 是室内条件下的两倍多。此外, 在培

养的 10 d 时间内,藻细胞在室内条件下始终处于不断的生长阶段,细胞繁殖很快,生命力旺盛,而室外培养在前 3 d 时生长与室内情况下基本相同,生长速度很快,进入第 4 天后速度明显下降,但仍处于缓慢的生长期中。当藻细胞在室外培养到第 8 天时,藻细胞浓度达到最高(0.245 g/L),此后则开始下降。

作为一个富含多不饱和脂肪酸的藻种,以往对球等鞭金藻的研究主要集中在室内无菌条件下,而对其进行室外培养的文献仅见于 Richmond 1993 年和 Gri ma 1994 年的报道,且他们所采用的培养体系都是管道式光反应器。在他们的培养条件下,温度、pH 均可人为控制,培养液也全部进行了过滤灭菌而除去了污染的微生物,唯一无法控制的就是光照强度,这种培养条件与半开放式大池存在很大的不同。在大池培养中,光照强度、温度、pH 及污染情况都无法人为控制,因此藻细胞的生长条件比光反应器要恶劣得多。作者的研究发现,尽管在室外条件下培养液的 pH 变化很小,但温度的变化仍较为明显,最高时可达 35 °C (图 1b),远远超过 Gri ma 1992 年,1994 年报道的球等鞭金藻生长的最适温度 20 °C。作者认为室外情况下温度条件的不适是造成球等鞭金藻生长低于室内条件的主要原因之一。此外作者还发现,随着培养时间的延长,培养液中积累的有机成分增多,从而导致藻液有利于污染物的生长,污染物的种类和数量也大大超过了接种初期,这也可能是导致第 8 天以后藻细胞浓度急剧下降的重要原因。另外,过强的光照(Sukenik, 1991 年报道  $> > 300 \mu E / (m^2 \cdot s)$ ,  $300 \mu E / (m^2 \cdot s)$  为饱和光强)也可能是导致室外培养过程中球等鞭金藻生长缓慢的原因之一。

作为一个对生长环境要求较高、生长速度较慢且从未在室外开放式大池中进行过培养的藻种,球等鞭金藻表现出对室外环境有一定的适应性,虽然其生长并不如室内,但就其生长规律及承受污染的能力表明,通过进一步的驯化,对球等鞭金藻进行大规模室外培养具有一定的可行性。

### 2.3 室内外条件下球等鞭金藻的生化组分

环境因子对藻类的生化组成起着十分重要的作用。从室内严格控制下的无菌培养到室外完全由自然决定的半开放培养,球等鞭金藻的生长环境发生了急剧的变化,其细胞内各种不同的生化组分也发生了相应的变化。图 3 是藻细胞在室内外两种不

同生长条件下的生化组分分析结果。

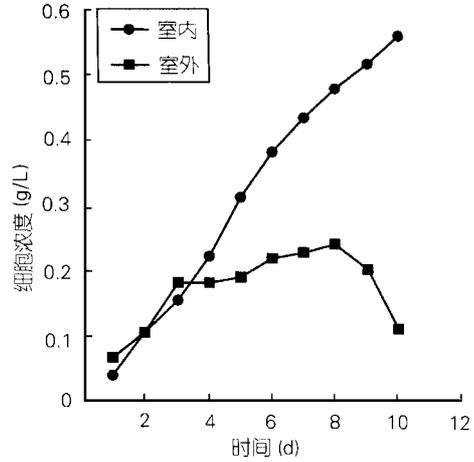


图 2 室内外培养条件下 *Isochrysis galbana* 的生长曲线  
Fig. 2 The growth curves of *I. galbana* in outdoor and indoor mass culture

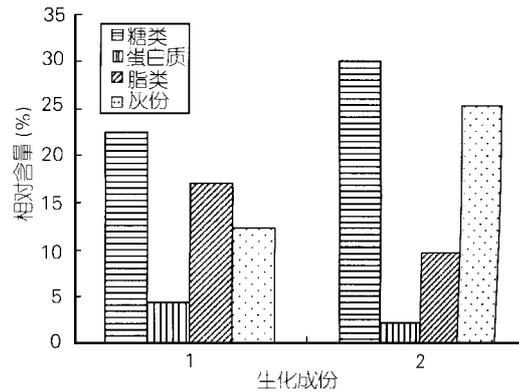


图 3 室内外培养条件下 *Isochrysis galbana* 的生化成分  
1. 室内培养; 2. 室外培养  
Fig. 3 Biochemical quality of *I. galbana* in indoor and outdoor mass culture  
1. Indoor; 2. Outdoor

无论是室内还是室外,试验藻种细胞内脂类的含量与文献相比都较低,分别为 17.045% 和 9.746%,该结果也低于作者在室内不同培养条件下细胞内的脂类含量(50.87%,未发表数据)。从室内到室外,脂类含量下降了 42.82%。据 E. M. Gri ma 等 1992 年报道,当培养中光强处于光饱和范围以内时,藻细胞内

脂类含量约为 30% 左右,而当光强超过饱和值时,细胞内脂类含量就会发生明显的下降。Suke nik, A. 等人 1991 年的研究也获得了类似的结果。室外条件下藻细胞内脂类含量的下降可能源于培养过程中过强的光照。蛋白质含量显示出了和脂类相似的规律,都相对较低,并且从室内到室外发生明显的下降,其下降比例为 51.09%。室外培养的藻细胞中灰分的含量为 25.295%,也大大高过室内培养细胞的 12.358%。

对于球等鞭金藻细胞内糖类的组成及在不同条件下含量的变化,以往的研究鲜有报道。在本研究中却发现,藻细胞内糖类的含量相当高,其所占细胞干重的百分比在所有的生化组分中是最高的,尤其是室外,糖类含量高达 30.076%。该变化与 Suke nik, A. 等 1991 年研究光强对球等鞭金藻生化成分的影响时所获得的结论类似,以往的研究主要集中在球等鞭金藻脂肪酸的组成上,往往忽略了其糖类组成。本研究结果表明在球等鞭金藻细胞内,糖类含量不容忽视。如

何将藻细胞内积累的糖类转化为商业价值较高的脂类(主要是提高 n-3 PUFA 的含量),从而为该藻的应用提供更广阔的前景,将是一个值得研究的课题。

从室内到室外,在 pH、温度和光照三者中,以光照的变化最为剧烈,而藻细胞在生化成分的变化中也显示出了与光强的密切相关性。如果利用不利于螺旋藻生长的较低温度时期(春、秋季)交替进行球等鞭金藻的培养,有可能可以克服夏天这种不利的光照条件,从而提高培养场地使用效率,增加基地收入。

#### 主要参考文献

- 1 Ana Otero *et al.*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1997, **26** (3): 171 ~ 177
- 2 A. Robles Medina, E. Molina Grima, *et al.*. 1995, *JAOCS*, **72**(5): 575 ~ 583
- 3 Yuan Kun Lee. *J. Appl. Phycol.*, 1997, 9: 403 ~ 411
- 4 M. A. Borowitzka *et al.*. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 457 ~ 465

## THE GROWTH AND BIOCHEMICAL QUALITY OF MARINE UNICELLULAR MICROALGA *Isochrysis galbana* IN OUTDOOR AND INDOOR MASS CULTURE

DAI Jur-biao WU Qing-yu

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Received: June, 22, 1999

Key Words: *Isochrysis galbana*, Mass culture, Environmental factors

### Abstract

The primary investigation on outdoor mass culture of marine unicellular microalga *Isochrysis galbana* was carried out in open pool. The results illustrated that this alga showed good adaptation to the growth environments. Compared with those grown indoors, the contents of lipid and protein were all decreased significantly from 17.05% and 4.412% to 9.746% and 2.254% respectively. At the same time, the content of saccharide increase up to 30.067% in dry cells, which is about 25.08% higher than those grown indoors and is the most abundant one among all the biochemical compounds. The quantity of ash was also increased in the cells cultured outdoors.

(本文编辑:张培新)