

# 微藻的异养培养及应用研究

## Heterotrophic culture of microalgae and application

张帆<sup>1,2</sup>, 韩笑天<sup>2</sup>, 李岍然<sup>1</sup>, 冀晓青<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛, 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛, 266071)

中图分类号: Q175

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0117-08

微藻(microalgae)是一大类微观的以个体、链状或群体形式存在的单细胞藻类,大小从几微米到几百微米不等。微藻种类繁多,据估计大约有200 000~800 000种,其中已有记录的有35 000多种<sup>[1]</sup>。自20世纪60年代起,日本首先开始进行商业化大规模的微藻培养<sup>[2]</sup>,至今人们已经能够在保健食品、医药原料、美容、饲料等多种领域实现微藻的商业化生产<sup>[3]</sup>。目前,微藻的大规模商业化培养主要限于在光生物反应器中进行,具有占地面积大、生产周期长、藻类生长密度较低等缺陷,变相增加了生产的成本,限制了微藻培养的发展。寻找一种高密度、低成本培养微藻的方法,对微藻培养产业化的进一步发展极为重要。

1953年, Lewin等<sup>[4]</sup>首先发现了一些藻类能利用有机物作为唯一碳源和能源进行异养生长,由此拉开了微藻异养培养研究的序幕。利用工业发酵方法异养培养微藻,可以节省空间,提高产量,避免杂藻和细菌的污染,且培养条件容易控制,是微藻大规模产业化生产的发展趋势,国内外对此的研究也越来越多。

## 1 微藻的异养方式和机理

### 1.1 微藻的异养生长方式

异养是利用有机碳源作为碳源和能源,进行的需氧发酵生长。微藻的异养方式主要可以分为3类<sup>[5]</sup>:

(1)化能异养生长(chemoheterotrophy)是在完全黑暗条件下利用有机碳进行异养生长。例如,寇氏隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)是一种海洋异养型微藻,培养过程中不需要光照,细胞可利用培养基中的有机物质来进行细胞的生长和分裂<sup>[6]</sup>。异形鱼腥藻

(*Anabaena variabilis* ATCC29413)<sup>[7]</sup>等也可以进行化能异养生长。

(2)光异养生长(Photoheterotrophy)是在光照强度不足以支持光合自生长的低光照下,利用有机碳进行异养生长。例如,微芒藻(*Micratinium pusillum*)能够在 $8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照条件下,利用乙酸钠作为碳源进行异养生长<sup>[8]</sup>。另一种途径是在含有机碳源的培养基中加入一定浓度的二氯苯基二甲基脲(dichlorophenyl dimethylurea, DCMU),此时细胞光系统II的活性被抑制,光和自养生长不再进行,但光系统I仍在起作用,细胞仍可通过环式磷酸化进行ATP的合成,进行异养生长。如隐球藻(*Aphanocapsa* sp.)在浓度为 $10^{-5} \text{ mol/L}$ 的DCMU中,弱光照条件下培养,可以进行异养生长<sup>[9]</sup>。

(3)光激活异养生长(Light-activated heterotrophic growth, LAHG)是对藻细胞每天施以不足以支持其光合自生长的脉冲式短暂光照,此时的光并没有被当做能源利用,而是起到一种调控作用。如集胞藻(*Synechocystis* sp., PCC6803)在每天5~10 min  $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照条件下,能够利用葡萄糖进行异养生长。此时光作为一种环境信号在代谢或基因水平上调控着集胞藻的异养代谢和细胞分裂,而其异养生长的碳源及能源仍然来源于有机物<sup>[10]</sup>。

收稿日期: 2011-06-10; 修回日期: 2011-09-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2011CB200901); 国家自然科学基金项目(30870247); 山东省科技发展计划项目(2011GGF01074); 海洋公益性行业科研专项(200805039)

作者简介: 张帆(1984-),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事海洋微藻的研究, E-mail: 13658696600@163.com; 通信作者, 韩笑天, 副研究员, E-mail: xthan@qdio.ac.cn

## 1.2 限制微藻异养生长的机理

不是所有微藻都可以进行异养生长。导致微藻不能利用有机碳进行异养生长的原因可能有多种,不同微藻之间其异养机理也有所差异。目前关于微藻的异养生长机理的研究还不够深入。Lewin<sup>[4]</sup>最早提出虽然一种藻类可能会拥有代谢某些有机物的能力,但所产生的能量和中间产物并不一定是生长所必需的。Gladue<sup>[11]</sup>针对某些微藻不能异养生长总结了3种假说。Kelly<sup>[12]</sup>, Rittenberg<sup>[13]</sup>等对限制微藻异养生长的原因也分别提出了假说。这些假说主要包括以下方面:

### (1) 缺乏合适的利用有机碳的机制

**通透性障碍:**细胞膜的通透性可以影响有机碳的吸收。小分子可以通过直接扩散进入细胞,但大部分可以作为有异养生长碳源的有机碳分子比较大,需要一定的摄入机制才能进入所培养微藻的细胞内部。一些藻类缺乏吸收某些有机碳的机制,必然导致其无法利用相应的有机碳<sup>[14]</sup>。可以通过选取合适的碳源或者人为改变微藻对特定碳源的吸收能力来解决这一问题。例如,三角褐指藻(*Phaeodactylum tri-cornutum*)是一种只能进行自养培养的微藻,将一种能编码葡萄糖传递蛋白的基因引入到该微藻后,即实现了三角褐指藻的异养培养<sup>[15]</sup>。

**相关酶的缺乏:**与有机碳分解相关的酶系统可以影响有机碳的利用。一些微藻不能进行异养生长的原因即在于缺乏利用某些有机碳的酶,不能分解来合成自身物质<sup>[14]</sup>。例如,在硫杆菌的培养中,由于一些关键酶不能利用,导致三羧酸循环不完整,使其不能进行异养生长<sup>[16]</sup>。微藻利用有机碳的相关酶类可以是自身固有或者是经诱导产生的。缺乏针对利用某一种有机碳的酶类,并不说明该微藻就不能进行异养生长,还可以尝试用其他的有机碳源进行培养。

### (2) 利用有机碳产能及中间产物的影响

**限制性呼吸能力:**微藻生长的能量来自于呼吸作用分解自身储藏物所产生的能。但是,在异养条件下,某些藻类的有机底物氧化与ATP合成不偶联<sup>[17]</sup>,呼吸所产的能量不足以维持其基本的生理功能及生长需要,无法持续地从外界获取有机物质,导致异养生长不能继续。

**代谢产物的影响:**有机碳代谢的产物可以通过多种途径对微藻的异养生长产生影响。某些代谢产

物可以通过转录调控影响与其代谢相关的酶活性,从而影响自身的代谢。在代谢过程中,也可能产生有毒的物质,抑制了微藻的生长,如某些蓝藻在利用甘油进行异养生长的过程中,会产生致死剂量的甲基乙二醛(methyl glyoxal),因此无法进行异养培养<sup>[18]</sup>。

## 2 可异养微藻种类

Lewin<sup>[4]</sup>早在1953年即对42株无菌培养的硅藻进行筛选,并确定有4种13个株系可以进行异养生长。Gladue等<sup>[19]</sup>对可作为水产养殖饲料的部分微藻进行了异养筛选。此外, Van Baalen<sup>[20]</sup>, Mannan等<sup>[7]</sup>也报道了蓝藻中一些可以进行异养生长的种类。至今为止,已经有多个门类几十种微藻被筛选出来,部分种类如小球藻(*Chlorella protothecoides*)<sup>[21]</sup>已经得到较为深入的研究并达到较高产量。表1总结了一些可以进行异养培养的藻种。

## 3 影响微藻异养生长及产物的因素

### 3.1 营养条件对异养生长及产物的影响

碳源是微藻异养生长最为重要的影响因素,是微藻细胞的能量来源和主要组成部分。选择合适的碳源,对能否进行异养培养及培养产量和产物组成起着极为关键的作用。不同藻类对碳源的需求不同,目前应用最广泛的碳源为葡萄糖,新的更加经济的碳源的研究也在不断进行中。刘世名等<sup>[39]</sup>使用6种不同的碳源异养培养小球藻,加入葡萄糖的一组在前期和中期生长速率最高,加入果糖的一组在后期略高于葡萄糖。采用玉米淀粉经双酶法制得的酶解糖异养培养小球藻(*Chlorella vulgaris*),平均生物量可达46.8 g/L,大大超过葡萄糖作为碳源时的产量<sup>[40]</sup>。最新研究表明,酶解的甜高粱浆可以作为碳源异养培养小球藻(*C. protothecoides*),其细胞干质量与含油量可分别达到5.1 g/L和52.5%,细胞干质量比同等条件下使用葡萄糖作为碳源高出35.7%<sup>[41]</sup>。

氮是微藻生长必需的另一基本营养元素,可分为单一氮源和复合氮源两大类。单一氮源包括硝酸盐和尿素等,可以支持部分种类微藻的生长与所需产物合成。复杂氮源包括酵母浸出粉、蛋白胨、玉米浆等,可以支持大部分微藻的异养生长。通常复杂氮源比单一氮源更有利于微藻的异养生长,因为复

表 1 可异养藻种

门	种	作者及参考文献
蓝藻门 Cyanophyta	<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	Van Baalen 等 <sup>[20]</sup>
	<i>Anabaena variabilis</i>	Mannar 等 <sup>[7]</sup>
	<i>Aphanocapsa</i> 6714	Pelroy & Bassham <sup>[22]</sup>
	<i>Cyanothece</i> sp.	Schneegurf 等 <sup>[23]</sup>
	<i>Lyngbya lagerheimii</i>	Van Baalen 等 <sup>[20]</sup>
	<i>Nostoc</i> sp.	Ingram 等 <sup>[24]</sup>
	<i>Spirulina platensis</i>	Marquez 等 <sup>[25]</sup>
	<i>Spirulina</i> sp.	Chojnacka & Andrzej <sup>[26]</sup>
	<i>Brachiomonas submarina</i>	Tsavalos & Day <sup>[27]</sup>
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chen & Johns <sup>[28]</sup>
	<i>Chlamydomonas humicola</i>	Laliberte & Noiie <sup>[29]</sup>
	<i>Chlorella emersonii</i>	Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
	<i>Chlorella protothecoides</i>	Miao & Wu <sup>[21]</sup>
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
	<i>Chlorella regularis</i>	Endo 等 <sup>[30]</sup>
	<i>Chlorella saccharophila</i>	Tan & Johns <sup>[31]</sup>
	绿藻门 Chlorophyta	<i>Chlorella sorokiniana</i>
<i>Chlorella vulgaris</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Dunaliella salina</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Dunaliella tertiolecta</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Haematococcus pluvialis</i>		Kobayashi 等 <sup>[32]</sup>
<i>Micratinium pusillum</i>		Bouarab 等 <sup>[33]</sup>
<i>Nannochloropsis oculata</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Scenedesmus acutus</i>		Ogawa & Aiba <sup>[34]</sup>
<i>Tetraselmis chuii</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Tetraselmis suecica</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Tetraselmis tetrathele</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Tetraselmis verrucosa</i>		Gladue & Maxey <sup>[19]</sup>
<i>Navimla minima</i> Grun		Lewin <sup>[4]</sup>
硅藻门 BacillarioPhyta	<i>Naviculu pelliceclosa</i>	Lewin <sup>[4]</sup>
	<i>Navimla</i> spp.	Lewin <sup>[4]</sup>
	<i>Nitzschia alba</i>	Lewin & Lewin <sup>[35]</sup>
	<i>Nitzschia laevis</i>	Wen & Chen <sup>[36]</sup>
甲藻门 PyrroPhyta	<i>Nitzschia fonticola</i> Grun	Lewin <sup>[4]</sup>
	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Jiang & Chen <sup>[37]</sup>
	<i>Euglena gracilis</i>	Ogbonna 等 <sup>[38]</sup>

杂氮源同时提供氨基酸、维生素、生长因子等。用低氮浓度的培养基培养，可以使微藻内脂质含量增加<sup>[42]</sup>，然而，尽管随硝酸盐浓度的增加，微藻中脂肪酸含量呈下降趋势，但总生物量上升，使得单位水体内的脂肪酸含量还是上升的<sup>[43]</sup>。

海洋浮游生物的 C、N、P 具有一个特定的组成，

即 Redfield 比率，其值为 106C: 16N: 1P，这一比率受到海洋浮游植物和海洋环境相互作用的调节<sup>[44]</sup>。C/N 可以通过控制蛋白质和脂质的转换影响细胞内脂类的含量<sup>[45]</sup>。Chen 等<sup>[46]</sup>发现，在异养培养小球藻(*C. sorokiniana*)的实验中，C/N 比在 20 左右时为氮限制和碳限制的转换点，在此点培养时，细胞内脂质含

量达到最小值, 高于或低于此值, 细胞内脂质含量均增加。张丽君等<sup>[47]</sup>异养培养小球藻(*C. vulgaris*)的最优 C/N 为 4~5, 在此条件下培养, 其蛋白质含量可达 30%, 叶绿素含量为 1.2%。

磷是核酸和细胞膜的重要组分, 在细胞的能量转换中起到重要作用。培养基中的磷源一般以正磷酸盐的形式存在。微藻细胞中的 PUFAs 主要是以极性脂肪酸(如磷脂)的形式存在, 因此其含量受磷含量的影响显著<sup>[48]</sup>。磷对微藻生物量和产物的影响在不同藻类之间变化。在磷不足的情况下, 异养培养雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*), 其生物量为 3.5 g/L, 虾青素(astaxanthin)的产量 15 mg/g, 均达到较高的水平<sup>[49]</sup>。对于三角褐指藻, 培养基中磷酸盐质量浓度大于 0.5 g/L 时, 即不能生长; 0.05~0.5g/L 范围内, 对生物量影响不大; 0.1~0.5g/L 范围内, 其 EPA 达到最佳水平<sup>[50]</sup>。

硅是硅藻生长所需的重要元素。硅藻的细胞壁主要由硅质元素沉积构成。某些海洋硅藻的油脂含量会随着培养基中硅盐的减少而呈增加趋势<sup>[51]</sup>。同样, 当硅成为限制因子时, 菱形藻(*Nitzschia laevis*)中 EPA 的含量也会增加<sup>[42]</sup>。出现此类现象是由于在硅限制的培养中, 硅藻细胞更倾向于改变新陈代谢, 将之前消耗于硅盐的能量转化成油脂储存<sup>[52]</sup>。

金属离子、维生素和其他生长因子对微藻的异养生长也有一定的影响作用。在一定浓度范围内, 随硒浓度的增加, 异养小球藻(*C. vulgaris*)的生物量、蛋白质、叶绿素 a 和类胡萝卜素含量均呈上升趋势, 至 20 mg/L 时达到最大值, 随后开始下降, 而可溶性糖、维生素 C、叶绿素 b 的含量均呈显著下降趋势。当用超过 25 mg/L 的硒浓度去处理异养小球藻时, 各生理指标均表现为大幅度降低<sup>[53]</sup>。质量浓度 0.1~100 mg/L 的  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  均能促进小球藻(*C. vulgaris*)的异养生长, 在 10 mg/L 时达到最大值,  $\text{La}^{3+}$  还能促进其对葡萄糖的吸收, 提高其叶绿素含量<sup>[54]</sup>。当小球藻(*C. vulgaris*)到达指数生长后期时, 向培养基中补加  $\text{Fe}^{3+}$ , 可延长指数生长期, 提高细胞终密度。高浓度的铁对小球藻的生长有轻微的抑制作用, 但却显著地促进其油脂的积累<sup>[55]</sup>。当  $\text{V}_{\text{B}_{12}}$  的加量为  $10^{-5}$ g/L 时, 寇氏隐甲藻(*C. cohnii*)生物量及细胞油脂产量均达到最大, 再增加  $\text{V}_{\text{B}_{12}}$  浓度时, 所受影响不大。而随着生物素添加量的增大, 隐甲藻生物量增大, 但当生物素添加量大于  $10^{-4}$ g/L 时, 其生物量下降; 当生物素添加量为  $10^{-4}$ g/L 时, 隐甲藻油脂的产量达到最大<sup>[6]</sup>。植物

生长物质 PP333, 能抑制异养小球藻生长的同时显著提高其蛋白质含量<sup>[56]</sup>。植物生长抑制剂(+)ABA 及其相似的免疫球蛋白 anti-ABBP Pabs 可以促进小球藻的异养生长, 同时藻体总蛋白含量降低<sup>[57]</sup>。

### 3.2 环境因子对异养生长及产物的影响

温度是控制微藻生长速度及产物组成的重要环境因子。Payer 等<sup>[58]</sup>的调查显示, 在所调查的 34 种藻中, 有些能在很大温度范围内生长, 有些只在特定温度生长。Miao 等<sup>[59]</sup>在  $28^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  异养培养小球藻(*C. protothecoides*)生产生物柴油, 得到较高的产量。通常, 低温会抑制微藻生物量的增加, 但可以促进微藻中一些物质如脂类、多不饱和脂肪酸(PUFAs)、类胡萝卜素等的积累。但并不是所有藻类在这二者上都不一致, 淡色紫球藻(*Porphyridium purpureum*)即在同一温度获得较高生物量和 EPA 含量<sup>[60]</sup>。因此, 对于不同的藻及所需产物, 需要确定不同的培养温度。对于高温生长, 低温累积所需产物的藻类, 可以采取变温的培养方式, 以达到提高产率的目的<sup>[61]</sup>。

盐度可以影响到微藻的生理特性, 调节细胞内外的渗透压。NaCl 会不同程度地抑制小球藻(*C. vulgaris*)的生长, 且浓度越高, 抑制越明显。在浓度为 0.1~0.4mol/L 的 NaCl 培养基中, 藻细胞的生物量减少量不大, 但是脂肪酸含量比未添加 NaCl 的有了明显的提高, 当 NaCl 质量浓度为 0.3 mol/L 时得到最高脂肪酸总产量 1.04 g/L<sup>[62]</sup>。寇氏隐甲藻(*C. cohnii*)在 NaCl 浓度 0.2%~2.3%的范围内, 随着 NaCl 浓度的增大, 其最终的细胞生物量增大, 但在大于 0.9%之后增幅不明显, 细胞中的油脂含量升高, 在大于 1.8%后趋于平稳, 油脂中 DHA 含量先增后减, 在 0.9%时达到最高<sup>[6]</sup>。

pH 在呼吸作用中影响微藻对有机碳源的利用效率, 并影响培养基中微藻细胞对离子的吸收和利用, 以及代谢产物的再利用和毒性<sup>[63]</sup>。不同微藻最适 pH 不同, 有些微藻在培养过程中可以将一定范围的 pH 调整到自己的最适值, 如小球藻(*C. vulgaris*)在初始 pH 为 5.0~9.0 时, 稳定期 pH 与生物量差别不大, 低 pH 时, 脂肪酸总量较大<sup>[62]</sup>。pH6~7 之间, 是其取得高生长率和脂类产率的最适区间<sup>[39,47]</sup>。

溶氧浓度过低, 微藻的生长受到抑制。在小球藻(*C. vulgaris*)的发酵培养中, 通气量为 8vvm 以上时, 微藻生物量得到显著提高<sup>[40]</sup>。溶氧还能影响异养微藻产物及其组成。异养培养小球藻(*C. sorokiniana*)

时, 通气可以明显增加微藻的生长、脂肪酸含量及不饱和脂肪酸的比例, 但细胞的总油脂含量降低<sup>[46]</sup>。而对于隐甲藻来说, 增加溶氧量可以使其细胞生长、油脂和 DHA 积累均呈上升趋势<sup>[6]</sup>。

## 4 微藻异养培养的应用

### 4.1 生物柴油

随着人类对能源日益增加的需求和化石能源的短缺, 寻找一种能替代化石燃料的可再生能源已经成为全人类的共同课题。生物柴油即是一种较为理想的可再生清洁能源。微藻油脂的主要成分为甘油三酸酯, 是制备生物柴油理想原料。目前微藻生物柴油已经成为国内外的研究热点, 相比较由含油作物及动物脂肪中提取的生物柴油, 利用高效微藻生产的第二代生物柴油具有不可比拟的优势: 周期短, 占地少, 可以利用海水及工业废水, 全年均可生产。Miao 等<sup>[21]</sup>提出从培养到提纯的一系列方法, 说明从异养微藻中提取高品质生物柴油是切实可行的。许多研究也表明异养培养可以增加微藻产量及含油量, 如小球藻 (*C. protothecoides*)、寇氏隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 在异养条件下, 其细胞干质量与含油量均有一定程度的上升<sup>[41,6]</sup>。Chisti<sup>[64]</sup>认为, 基于环境、油脂质量、可能产量等多方面因素, 一旦成本降低, 微藻生物柴油可能会成为唯一能满足全球运输需要的可再生能源。异养培养微藻可以进一步提高产量及油脂含量, 与自养培养相结合, 在控制和降低成本的前提下, 可以促进微藻生物柴油的发展。

### 4.2 高附加值产物

多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 对人体机能的调控起着重要的作用, 同时可以防治多种疾病。人体本身缺乏合成 PUFAs 的酶, 只能从外界摄取 PUFAs。EPA 和 DHA 是两种重要的 PUFAs, 研究表明, 利用不同微藻可以分别生产质量稳定, 纯度较高的 EPA 和 DHA, 在合适的异养条件下, 其产率也有所提升<sup>[65-66]</sup>。

类胡萝卜素是一类天然的脂溶性色素, 可以淬灭单线态氧, 清除自由基, 在防治癌症和免疫调节方面也有很高的活性<sup>[67]</sup>。虾青素和叶黄素两类重要的类胡萝卜素, 在国际市场上价格高昂, 开发前景广阔。异养培养小球藻 (*C. zofingiensis*), 虾青素产量可以达到 12.6 mg/L; 而对于小球藻 (*C. pyrenoidosa*) 的

异养化高密度培养, 可以使叶黄素实现 249.4mg/L 的产量和 1.65mg/L/h 的产率<sup>[68]</sup>。

### 4.3 饵料及饲料添加剂

微藻中含有丰富的蛋白质、氨基酸、色素、多不饱和脂肪酸等, 营养全面, 是水产及农业养殖的理想原料。微藻可以作为水产经济动物的饵料, 具有人工饵料不具备的在水体中的良好分散性和保型性。由于微藻中色素含量丰富, 还被用作大马哈鱼培养中的天然食品着色剂<sup>[69]</sup>。微藻用作动物养殖的饲料添加剂, 可以显著改善养殖动物的生理特点和外观<sup>[70]</sup>, 如增强免疫力、增加体重、使皮毛更为健康有光泽等。早在 20 世纪 50 年代, 就有使用小球藻饲养幼小禽类的报道<sup>[71]</sup>。限制微藻在动物养殖方面应用的, 主要是其较低的产量和偏高的价格, 异养培养为解决这一问题提供了可能的方向。

### 4.4 其他应用

微藻可以作为生物反应器, 经过基因工程的改造后生产人们需要的特定高分子产物。利用真核微藻作为反应器, 可以直接获得有活性的蛋白, 而且其培养体系比动物细胞更为廉价和抗污染<sup>[72]</sup>。某些可食用微藻作为反应器, 还为获得蛋白的利用方式提供了一种新思路。通过异养方式培养转基因微藻, 将使微藻作为生物反应器的前景更加明朗。

Aslan 等<sup>[73]</sup>的研究表明, 小球藻 (*C. vulgaris*) 可以有效去除废水中的氮和磷。在异养培养微藻时, 可以加入一定比例的废水作为微藻的氮源和磷源, 可以在降低成本的同时, 达到减少环境污染的目的。微藻中含有促进皮肤紧致和皮肤细胞增殖的活性物质, 可以用于化妆品的开发制造; 一些种类微藻如小椿藻 (*Characium polymorphum*), 绿球藻 (*Chlorococcum oleofacens*) 的油脂成分与植物油类似, 可以替代由于耕地减少等原因价格不断上涨的植物油供人们食用<sup>[74]</sup>。

## 5 总结与展望

关于微藻异养培养的研究方兴未艾。相比传统培养, 异养培养不再受光的限制, 为微藻的大规模高密度培养提供了可能性。迄今为止, 国内外学者已经在机理假说、异养藻种筛选、培养条件优化、产物应用等诸多方面进行了大量研究工作。然而, 由于异养研究相对起步较晚, 各方面还不够成熟, 目前

仍然还有很多方向亟待探索:

(1)关于异养机理包括碳源的吸收利用、异养的调控机制等的进一步研究。目前微藻的异养机理仍不明确,对机理的进一步研究有助于理解微藻的异养模式,为异养藻种的筛选和培养条件的优化选择提供理论依据。

(2)可异养培养藻种的筛选驯化。可以利用的微藻种类众多,但目前只有一小部分种类可以进行异养培养。可以通过扩大筛选规模、改变培养条件、诱变和基因重组等方法获得更多可异养藻株。

(3)降低异养培养的成本。偏高的成本是工业化培养进展缓慢的一大原因,可以通过适当改变培养方法降低成本。如在含有机碳的废水中异养培养微藻,或者吸收含有 CO<sub>2</sub> 的废气结合适当的兼养培养,既能降低成本,对环境治理也有重要意义。

(4)活性产物的开发利用。相比自养、异养培养条件下,微藻的产物及相同产物的产量会有所变化。也可通过基因工程或改变培养条件,人为促进所需产物的累积。

异养培养的探索与开发,将促使微藻在更多领域得到应用。可以预见,随着理论研究的不断深入和培养技术的不断发展完善,微藻异养培养的发展空间将会进一步增加,为人们应对能源、环境、粮食等全球问题提供新的解决思路。

#### 参考文献:

[1] Cheng K C, Ogden K L. Algal Biofuels: The Research [EB/OL]. CEP, www.aiche.org/cep, march 2011, 42-47.

[2] Iwamoto H. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products — major industrial species — *Chlorella* [C]//Richmond A. Handbook of microalgal culture. Blackwell: Oxford, 2004: 255-263.

[3] Spolaore P, Cassan C J, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae [J]. Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(2): 87-96.

[4] LEWIN J C. Heterotrophy in diatoms [J]. Gen Microbiol, 1953, 9: 305-313

[5] 刘晓娟. 三角褐指藻的自养、兼养和异养特性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2008.

[6] 王永华. 隐甲藻高密度发酵培养和油脂改性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2002.

[7] Mannar R M, Pakrasi H B. Dark heterotrophic growth conditions result in an increase in the content of photosystem II units in the filamentous Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413 [J]. Plant Physiology, 1993,

103: 971-977.

[8] Bouarab L, Dauta A, Loudiki M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micratinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration [J]. Water Research, 2004, 38: 2706-2712.

[9] Vartanian M D, Espardellier F J, Astier C. Contributions of respiratory and photosynthetic pathways of a facultative photoautotrophic cyanobacterium, *Aphanocapsa* 6714 [J]. Plant Physiology, 1981, 68: 974-978.

[10] Anderson S L, McIntosh I. Light-activated heterotrophic growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803: a blue-light-requiring process [J]. Bacteriology, 1991, 173: 2761-2767.

[11] Gladue R M. Heterotrophic microalgae production: potential for application to aquaculture feeds [C]//Fulks W, Main K L. Rotifer and Microalgae culture systems. Honolulu: Proceedings of a US-Asia workshop, 1991: 28-31, 275-286.

[12] Kelly D P. Autotrophy: concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism [J]. Annual Review of Microbiology, 1971, 25: 177-210.

[13] Rittenberg S C. The obligate autotroph—the demise of a concept [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1972, 38: 457-478.

[14] Hellbust J A, Lewin J. Heterotrophic nutrition [C]//Werner D. The Biology of the Diatoms. Berkeley: University of California Press, 1977: 169-197.

[15] Zaslavskaja L A, Lippmeier J C, Shin C, et al. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering [J]. Science, 2001, 292: 2073-2075.

[16] Wood A P, Aurikko J P, Kelly D P. A challenge for 21<sup>st</sup> century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy [J]. FEMS Microbiol, 2004, 28: 335-352.

[17] Cox G B, Gibson F, McCann L. Oxidative phosphorylation in *Escherichia coli* K-12. An uncoupled mutant with altered membrane structure [J]. Biochemical Journal, 1974, 138: 211-215.

[18] Freedberg W B, Kistler W S, Line E C. Lethal synthesis of methylglyoxal by *Escherichia coli* during unregulated glycerol metabolism [J]. Bacteriology, 1971, 108: 137-144.

[19] Gladue R M, Maxey J F. Microalgal feeds for aquaculture [J]. Applied Phycology, 1994, 6: 131-141.

- [20] Van Baalen C, Hoare D S, Brandt E. Heterotrophic growth of Blue-Green algae in dim light [J]. *Bacteriology*, 1971, 105(3): 685-689.
- [21] Miao X L, Wu Q Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 841-846.
- [22] Pelroy R A, Bassham J A. Kinetics of glucose incorporation by *Aphanocapsa* 6714 [J]. *Bacteriology*, 1973, 115(3): 943-948.
- [23] Schneegurf M A, Sherman D M, Sherman L A. Growth, physiology, and ultrastructure of a diazotrophic *Cyanotheca* sp. Strain ATCC 51142 in mixotrophic and chemoheterotrophic cultures [J]. *Phycology*, 1997, 33: 632-642.
- [24] Ingram L O, Calder J A, Vanbaalen C, et al. Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria(algae): photoheterotrophic growth of a "heterotrophic" blue-green bacterium [J]. *Bacteriology*, 1973, 114(2): 695-700.
- [25] Marquez F J, Saski K, Kakizono T, et al. Growth characteristic of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. *Fermentation and Bioengineering*, 1973, 76: 408-410.
- [26] Chojnacka K, Andrzej N. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34: 461-465.
- [27] Tsavalos A J, Day J G. Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina* [J]. *Applied Phycology*, 1994, 6: 431-433.
- [28] Chen F, Johns M R. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture [J]. *Process Biochemistry*, 1996, 31: 601-604.
- [29] Laliberte G, Noie J D L. Auto-, hetero- and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate [J]. *Phycology*, 1993, 29: 612-620.
- [30] Endo H, Sansawa H, Nakajima K. Studies on *Chlorella regularis* heterotrophic fast growing strain. II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1977, 18: 199-205.
- [31] Tan C K, Johns M R. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila* [J]. *Hydrobiologia*, 1991, 215: 13-19.
- [32] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, et al. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions [J]. *Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74: 12-20.
- [33] Bouarab L, Dauta A, Loudiki M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration [J]. *Water Research*, 2004, 38: 2706-2712.
- [34] Ogawa T, Aiba S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981, 23: 1121-1132.
- [35] Lewin J C, Lewin R A. Culture and nutrition of some apochlorotic diatoms [J]. *General Microbiology*, 1967. 11: 361-367.
- [36] Wen Z Y, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose [J]. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000, 25: 218-224.
- [37] Jiang Y, Chen F. Effects of medium glucose concentration and PH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii* [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35: 1205-1209.
- [38] Ogbonna J C, Tomiyama S, Tanaka H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of  $\alpha$ -tocopherol [J]. *Applied Phycology*, 1998, 10: 67-74.
- [39] Liu S M, Chen F, Liang S Z. Researches in the Heterotrophic culture of *Chlorella Vulgaris* [J]. *South China University of Technology(Natural Science)*, 1999, 27(4): 111-115.
- [40] 尹建云, 孟海华, 张学松, 等. 酶解糖异养培养微藻发酵条件的优化及生产试验 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(5): 55-57.
- [41] Gao C F, Zhai Y, Ding Y, Wu Q Y. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Applied Energy*, 2010, 87(3): 756-761.
- [42] Illman A M, Scrag A H, Shales S W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27: 631-635.
- [43] 蒋冰飞, 孙颖颖, 王长海. 营养盐对球等边金藻生长和脂肪酸含量及组分的影响 [J]. *海洋通报*, 2007, 26(5): 56-61.
- [44] Redfield A C. On the Proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton [C]//Daniel R J. *James Johnstone Memorial Volume*. Liverpool: University Press of Liverpool, 1934: 177-192.
- [45] Gordillo F J L, Goutx M, Figueroa F L, et al. Effects of light intensity, CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on lipid class

- composition of *Dunaliella viridis* [J]. Appl Phycol, 1998, 10: 135-144.
- [46] Chen F, Johns M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. Appl Phycol, 1991, 3: 203-209.
- [47] 张丽君, 杨汝德, 肖恒. 小球藻的异养生长及培养条件优化[J]. 广西植物, 2001, 21(4): 353-357.
- [48] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 不同营养因子对微藻 3 种培养方式生产 EPA 的影响[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 185-155.
- [49] Brinda B R, Sarada R, Kamath B S, et al. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* --cultural and regulatory aspects [J]. Curr Sci, 2004, 87: 1290-1295.
- [50] Yongmanitchai W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricorutum* under different culture conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 419-425.
- [51] Enright C T, Newkirk G F, Craigie J S, et al. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schutt of varied chemical composition [J]. Exp Mar Biol Ecol, 1986, 96: 15-26.
- [52] Coombs J, Halicki P J, Holm-hansen O, et al. Studies on the biochemistry and fine structure of silicate shell formation in diatoms: II. Changes in concentration of nucleoside triphosphates in silicon-starvation synchrony of *Navicula pelliculosa* (Breb) Hilse [J]. Exp Cell Res, 1967; 47: 315-328.
- [53] 刘少华, 蔡小宁, 陈舒泛, 等. 硒对异养小球藻生长及品质的影响 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1805-1806, 1809.
- [54] 刘世名, 梁世中. La<sup>3+</sup>对小球藻异养生长及叶绿素含量的影响 [J]. 稀土, 1999, 20(3): 51-54.
- [55] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. Biore-source Technology, 2008, 99: 4717-4722.
- [56] 刘世名, 陈靠山, 梁世中. PP333 用于藻类培养影响异养小球藻的生长及蛋白质含量 [J]. 生物技术, 2003, 13(1): 23-25.
- [57] 刘世名, 陈靠山, 梁世中. (+)ABA 及 anti-ABBP Pabs 对小球藻异养生长的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(2): 212-213.
- [58] Payer H D, Chiemvichak Y, Hosakul K, et al. Temperature as an important climate factor during mass production of microscopic algae [C]//Shelef G, Soeder C J. Algae Biomass: Production and Use. New York : Elsevier Biomedical Press, 1980: 389-399.
- [59] Miao X L, Wu Q Y. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides* [J]. Biotechnol, 2004, 110: 85-93.
- [60] Ohta S, Chang T, Aozasa O, et al. Alterations in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors [J]. Bot Mar, 1993, 36: 103-107.
- [61] Jiang Y, Chen F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. Am Oil Chem Soc, 2000, 77: 613- 617.
- [62] 黄冠华, 陈峰. 环境因子对异养小球藻脂肪酸组分含量和脂肪总酸产量的影响 [J]. 可再生能源, 2009, 27(3): 65-69.
- [63] Borowitzka M A, Borowitzka L J. Microalgal Biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [64] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. Biotechnology Advances, 2007, 25: 294-306.
- [65] Wen Z Y, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae [J]. Biotechnol Adv, 2003, 21: 273-294.
- [66] 徐建祥. 利用微藻培养生产 DHA 的进展 [J]. 食品工业科技. 2003, 24(11): 88-90.
- [67] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21, 210-216.
- [68] Wu Z Y, Shi X M. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model [J]. Compliation, 2007, 44: 13-18.
- [69] Todd L R, Cysewski G R. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18: 160-167.
- [70] Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production [J]. Biosci Bioeng, 1999, 87: 1-14.
- [71] Combs G F. Algae(*Chlorella*) as a source of nutrients for the chicks[J]. Science, 1952, 116: 453-454.
- [72] Tara L, Walke R, Purton S, et al. Microalgae as bioreactors [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 629-641.
- [73] Aslan S, Kapdan I K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae [J]. Ecological Engineering, 2006, 28(1): 64-70.
- [74] 缪晓玲, 吴庆余. 微藻生物质可再生能源的开发利用 [J]. 可再生能源, 2003, 3(109): 13-16.

(本文编辑: 张培新)