

葡萄糖和木糖对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养生产虾青素的影响

陈涛¹, 孙妮^{2*}, 王艳³

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;
3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 目的: 以小球藻 *Chlorella zofingiensis* 为研究对象, 以葡萄糖和木糖为混合碳源, 优化混合碳源浓度提高异养培养虾青素产量。方法: 利用 JMP 软件中完全析因设计法考查葡萄糖和木糖浓度对虾青素产量的影响, 并采用 SAS 软件对实验数据进行回归分析。结果: 优化条件下葡萄糖和木糖浓度分别为 26.86 g/L 和 16.92 g/L。结论: 优化后的虾青素产量达到 8.65 mg/L, 比初始条件产量 7.39 mg/L 提高了 17%。

关键词: 小球藻; 葡萄糖; 木糖; 异养; 优化; 虾青素

中图分类号: TQ920.6 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2013.03.0073

Effects of Glucose and Xylose on the Production of Astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* in the Dark

CHEN Tao¹, SUN Ni^{2*}, WANG Yan³

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Objective: Optimization of the concentration of glucose and xylose was carried out to increase astaxanthin yield by *Chlorella zofingiensis* heterotrophically. **Method:** Full Factorial Design by software JMP was used to investigate the effects of glucose and xylose on the production of astaxanthin and the experimental data was analyzed using regression analysis method by software SAS. **Result:** The optimal concentrations of glucose and xylose were 26.86 g/L and 16.92 g/L. **Conclusion:** Astaxanthin yield of *C. zofingiensis* could reach 8.65 mg/L under optimum concentration, which was 17% higher than that achieved under original concentration (7.39 mg/L).

Key words: *Chlorella zofingiensis*; Glucose; Xylose; Heterotrophically; Optimization; Astaxanthin

0 引言

虾青素是一种氧化型天然次生类胡萝卜素, 化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -类胡萝卜素。虾青素具有超强的抗氧化活性和独特的着色能力, 因而在食品添加剂、水产养殖、化妆品、保健品和医药工业方面有广阔的应用前景^[1]。

虾青素的生产方式包括化学合成、从甲壳类动物中提取以及生物合成等。化学合成的虾青素存在安全隐患, 仅被允许用作水产饲料添加剂, 其应用范围有限^[2]; 从甲壳类动物提取的虾青素含量低, 灰分及几丁质含量高, 限制了其应用^[3]。小球藻 *C. zofingiensis* 能够在无光照异养条件下发酵糖类生物合成虾青素, 该藻具有容易培养、生长快速、细胞浓度高等优点, 有较好的商业化前景^[4]。葡萄糖、蔗糖和果糖都是小球藻 *C. zofingiensis* 异养条件下可利用的碳源^[5]。本文研究发现, 小球藻 *C. zofingiensis* 在葡萄糖存在的情况下也能够发酵木糖生成虾青素, 这在国内外文献上还未见报导。

本文以小球藻 *C. zofingiensis* 为研究对象, 以葡萄糖和木糖作为混合碳源, 利用统计软件对葡萄糖和木糖浓度进行优

化, 以期获得适合虾青素生产的葡萄糖和木糖的浓度数据, 从而为小球藻 *C. zofingiensis* 商业化生产虾青素提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

实验用小球藻 *C. zofingiensis* (ATCC 30412), 购自美国国家标准菌种保藏中心 (the American Type Culture Collection, 简称 ATCC)。

1.1.2 试剂

有机溶剂甲醇、乙腈和丙酮购买自美国赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific Inc.), 色谱纯; 虾青素标准品购于美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

Waters 1525 高效液相色谱 (HPLC) 分析仪, 美国 Waters 公司; Waters 2996 光电二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司; Eppendorf 低温高速离心机, Gene Company Limited; PHS-25 型酸度计, 上海雷磁科学仪器公司; GXZ 型智能光照培养箱, 宁波江南仪器厂; ZWF-111 型恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.1.4 培养基

斜面培养基、液体种子培养基和无碳基础培养基^[5]。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

斜面菌种的保藏、摇瓶种子培养和摇瓶培养^[5]。

1.2.2 测定方法

收稿日期: 2013-01-29; 修回日期: 2013-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目“多重极端微藻固定固定燃煤烟气 C_2O 及其生物质能转化研究 (No. 50904051) 资助

作者简介: 陈涛 (1979-), 男, 湖北孝感人, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵工程与食品安全、微藻生物技术, 发表论文 10 篇, 参编普通高等教育“十一五”国家级规划教材 1 部。* 通讯作者: 孙妮 (1977-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 海洋工程与海洋生态、微藻生物技术, Email: 43602963@qq.com。

细胞干重: 采用滤纸片称重法^[4]。

糖浓度的测定: 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定单一木糖、单一葡萄糖和总糖, 蒽酮法测定混合糖中的葡萄糖^[6]。

虾青素提取: 采用液氮研磨丙酮提取法^[4]。

虾青素测定: 参考 Chen Tao 等的 HPLC 方法^[7]。

1.2.3 完全析因设计

主要考察葡萄糖(x_1)、木糖(x_2)二因素组成对小球藻产虾青素的影响, 初始糖浓度设定为葡萄糖 20 g/L, 木糖 15 g/L。利用 JMP(version 7.0) 软件进行完全析因设计(Full Factorial Design, FFD), 实验数据的回归分析采用 SAS(SAS Package, version 8.01)。每一因素的高、中、低实验水平分别以 1、0、-1 进行编码, 各因素的编码及水平如表 1 所示, 其编码值与真实值之间的关系符合方程(1):

$$X_1 = (x_1 - 20) / 10, X_2 = (x_2 - 15) / 5 \quad (1)$$

表 1 完全析因设计试验设计因素与水平

Table 1 Factors and their levels of FFD

编码	X_1 (葡萄糖, g/L)	X_2 (木糖, g/L)
+1	30	20
0	20	15
-1	10	10

按照完全析因设计的实验要求, 共设计了 9 组实验, 各组实验的安排见表 2。每组实验重复 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 小球藻利用葡萄糖及木糖生长曲线

分别添加一定质量的木糖和葡萄糖的混合物、单一葡萄糖、单一木糖到无碳基础培养基中进行摇瓶培养, 使培养基中的碳源浓度分别为 5 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 木糖、5 g/L 葡萄糖、5 g/L 木糖以及 10 g/L 葡萄糖。定时取样测定藻细胞干重, 结果如图 1 所示。

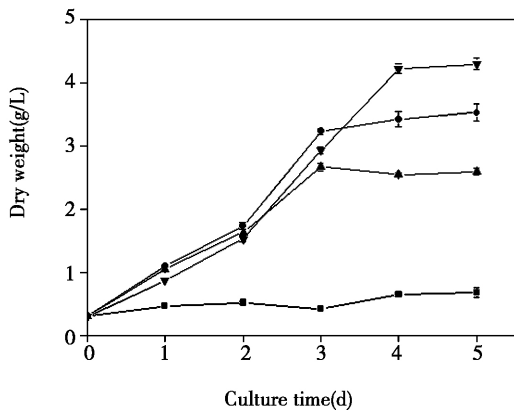


图 1 葡萄糖和木糖对小球藻生长的影响

(○) 10 g/L 葡萄糖; (●) 5 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 木糖; (▲) 5 g/L 葡萄糖; (■) 5 g/L 木糖。

Fig.1 The effects of glucose and xylose on the cell growth of *C. zofingiensis*

(○) 10 g/L glucose; (●) 5 g/L glucose + 5 g/L xylose; (▲) 5 g/L glucose; (■) 5 g/L xylose.

由图 1 可以看出, 以 5 g/L 木糖作为唯一碳源时, 小球藻生长极缓慢, 最终干重只有 0.68 g/L, 小球藻几乎不能利用单

一木糖生长。以 5 g/L 葡萄糖作为唯一碳源时, 小球藻生长较快, 第 5d 时干重达到 2.60 g/L。以 5 g/L 葡萄糖和 5 g/L 木糖作为混合碳源时, 小球藻生长快速, 干重可达到 3.53 g/L, 高于单一葡萄糖作为碳源的干重, 表明以混合糖作为碳源时, 小球藻也能部分地利用木糖作为碳源。以 10 g/L 葡萄糖作为唯一碳源时, 小球藻生长较快, 干重可达到 4.30 g/L, 高于 5 g/L 葡萄糖 + 5 g/L 木糖的混合碳源的干重, 表明小球藻对葡萄糖的利用能力大于木糖, 这与酵母发酵葡萄糖和木糖的研究结果一致^[8]。

2.2 混合碳源中葡萄糖与木糖浓度的优化

培养基中糖的浓度对小球藻生产虾青素的产量起着重要的作用, 研究初始糖浓度对虾青素产量的影响至关重要。本研究设计了两因子完全析因设计实验考查葡萄糖浓度和木糖浓度对虾青素产量的影响。将不同质量的葡萄糖和木糖添加到 CZ-M1 培养基中, 使混合碳源浓度如表 2 所示, 接入小球藻 *C. zofingiensis* 在无光条件下培养 14 d, 取样测定虾青素含量及细胞干重, 计算虾青素产量。实验结果如表 2 所示。初始糖浓度条件下(葡萄糖 20 g/L, 木糖 15 g/L) 虾青素产量为 7.39 mg/L。

表 2 葡萄糖木糖组成完全析因试验设计和结果

Table 2 FFD and results about glucose and xylose composition

列号	X_1 (葡萄糖, g/L)	X_2 (木糖, g/L)	虾青素产量(mg/L)
1	-1	-1	1.22
2	1	-1	5.85
3	1	1	8.35
4	0	1	6.58
5	0	-1	6.33
6	-1	1	4.06
7	-1	0	4.37
8	0	0	7.39
9	1	0	7.85

表 3 完全析因设计多项式回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic polynomial model obtained from FFD

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
一次项	30.83	2	-	19.99	0.0184*
二次项	6.99	2	-	4.53	0.1240
交互项	0.029	1	-	0.04	0.8589
总模型	37.86	5	-	9.82	0.0445
总误差	2.31	3	0.77	-	-

$R^2 = 0.9424$ Adj. $R^2 = 0.8983$

运用 SAS 软件回归拟和表 2 中的实验数据, 可以得到二阶经验模型为:

$$Y = 7.53 + 2.07X_1 + 0.93X_2 - 0.085X_1X_2 - 1.48X_1^2 - 1.138X_2^2 \quad (2)$$

其中 Y 为虾青素产量(g/L), X_1 、 X_2 分别代表葡萄糖和木糖, 方程中 X_1 系数较大, 表明葡萄糖的浓度对虾青素产量有显著性意义, 并且一次项系数为正值, 可以认为一次项主要对虾青素产量起到正作用, 而二次项和交互项则对其起到负作用。

由实验的方差分析结果可知(表 3), 大于 F 值的 P 值为

0.0184 表明该模型可靠性高。该方程的决定系数 $R^2 = 0.9424$, 其校正决定系数 (Adjusted determination coefficient, R^2_{Adj}) 为 0.8983, 表明此模型的拟和优度好, 可以用于虾青素产量的分析与预测。

利用 SAS 软件对模型方程 (2) 进行分析, 得到两个变量的最佳编码值分别为 0.69 和 0.38, 对应的浓度为葡萄糖 26.86 g/L, 木糖 16.92 g/L, 预测的虾青素产量的最大值为 8.41 mg/L。

2.3 模型验证

为了验证虾青素产量 (方程 3) 模型的合适性和有效性, 需要对模型进行验证实验。对于虾青素产量的优化培养基组成为: 葡萄糖 26.86 g/L, 木糖 16.92 g/L。在此条件下 3 次实验结果虾青素产量的均值为 8.65 ± 0.38 mg/L, 基本上与模型的预测值 (8.41 mg/L) 相符。表明此两模型是合适有效的, 并具有一定的实践参考价值。图 2 是优化条件下残糖浓度、细胞生长和虾青素产量随时间变化曲线。

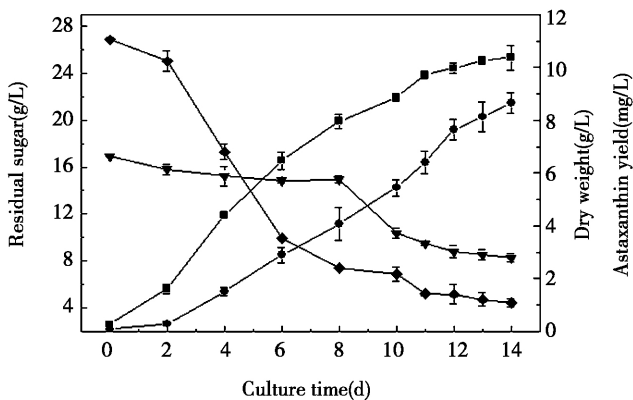


图 2 优化条件下残糖浓度、细胞生长和虾青素产量变化曲线

(◆) 葡萄糖浓度; (□) 木糖浓度; (■) 细胞干重; (●) 虾青素产量。

Fig. 2 Time courses of residual sugar, cell dry weight and astaxanthin yield on optimum condition

(◆) concentration of glucose; (□) concentration of xylose; (■) cell dry weight; (●) astaxanthin yield.

由图 2 可以看出, 在细胞培养起始阶段, 葡萄糖消耗较快, 而木糖浓度降低很慢, 这可能是高浓度的葡萄糖抑制了细胞对木糖的利用。当葡萄糖浓度降低到 8 g/L 以下后, 木糖浓度开始显著降低, 细胞开始利用木糖作为碳源。在培养过程中, 细胞干重先快速增加, 到培养后期缓慢增加, 最终生物量达到 10.38 g/L; 虾青素产量随着培养时间的延长而增加, 培养 14d 产量达到 8.65 mg/L, 比未优化的初始条件下产量 (7.39 mg/L) 提高了 17%。

3 讨论

木质纤维素是世界上最丰富的生物质资源。木质纤维素分步水解可得到以木糖为主的半纤维素水解液和以葡萄糖为主的纤维素水解液, 其中纤维素水解液木糖含量可达总糖的 30%, 对木糖的高效合理利用是实现木质纤维素资源化的关键^[9]。目前对木糖的利用主要集中在生产燃料乙醇、乳酸等工业产品^[10, 11]。利用小球藻 *C. zofingiensis* 无光异养条件下发酵木糖生产虾青素, 国内外还未见报道。

本文研究发现, 在葡萄糖和木糖混合碳源体系中, 小球藻 *C. zofingiensis* 优先利用葡萄糖, 只有当葡萄糖浓度下降到一定浓度 (8 g/L) 后, 才开始利用木糖, 这与粗糙脉孢菌发酵葡萄糖和木糖的情况类似^[12]。为了避免葡萄糖对小球藻利用木糖的抑制作用, 在实际生产中可采用流加木糖的方式, 即生长期用葡萄糖作为唯一碳源使藻细胞快速生长, 在培养后期再添加一定浓度的木糖, 使藻细胞快速合成虾青素。本研究得到的虾青素产量较高的葡萄糖和木糖浓度分别为 26.86 g/L、16.92 g/L, 木糖含量占总糖约为 39%, 与纤维素水解液中的木糖含量 (30%) 比较接近。因此, 纤维素水解液有望成为小球藻 *C. zofingiensis* 异养大规模生产虾青素的碳源, 可以降低虾青素的生产成本, 还可以扩大木质纤维素的利用途径。近期的研究还发现, 小球藻 *C. zofingiensis* 能光照自养或无光异养条件下发酵甘蔗糖蜜积累脂质^[13, 14], 表明该藻有生物能源方面的应用前景。

4 结论

本文研究了葡萄糖和木糖作为混合碳源对小球藻 *C. zofingiensis* 异养生产虾青素的影响。通过完全析因设计及回归分析, 得出优化后的葡萄糖和木糖浓度分别为 26.86 g/L、16.92 g/L, 在此条件下的虾青素产量为 8.65 mg/L, 比未优化的初始条件下产量 (7.39 mg/L) 提高了 17%。

参考文献:

- [1] 才金玲, 欧阳泽瑞, 陈国兴, 等. 光照强度对雨生红球藻细胞生长和虾青素积累的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(1): 17-20.
- [2] 李健, 张学成, 胡鸿钧, 等. 微藻生物技术产业前景和研发策略分析[J]. 科学通报, 2012, 57(1): 23-31.
- [3] 何璞, 闫少辉, 任泽焕. 虾青素的特性及其生产与应用研究[J]. 漯河职业技术学院学报, 2012, 11(2): 70-72.
- [4] Sun Ni, Wang Yan, Li Yantao, et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(11): 1288-1292.
- [5] 陈涛, 向文洲, 何慧, 等. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 56-58.
- [6] 谢秋玲, 郭勇, 林剑. 纳豆激酶产生菌—纳豆菌对木糖和葡萄糖的利用[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 9-12.
- [7] Chen Tao, Wei Dng, Chen Gu, et al. Employment of organic acids to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture [J]. *J Food Process Pres* 2009, 33(2): 271-284.
- [8] 赵党阳, 郭夏丽, 王岩. 木糖与葡萄糖共发酵产燃料乙醇条件的优化研究[J]. 酿酒科技, 2008, 2(164): 49-51.
- [9] 解惠铭. 响应面法优化木糖发酵产乙醇酵母发酵条件的研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2012, (8): 50-53.
- [10] 冯全周, 李十中, 王莉, 等. 一株葡萄糖和木糖共发酵高效产乙醇重组运动发酵单胞菌的性能评价[J]. 生物工程学报, 2012, 28(1): 37-47.
- [11] 潘丽军, 庞锐, 吴学凤, 等. 葡萄糖和木糖共发酵生产 L-乳酸的培养基和培养条件响应面优化[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 140-145.
- [12] 张潇, 朱冬青, 王丹, 等. 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 木糖发酵的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 466-472.
- [13] Feng Pingzhong, Deng Zhongyang, Lu Fan, et al. Lipid accumulation

and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations [J]. *J Biosci Bioeng* 2012, 114(4): 405-410. [14] Liu Jin, Huang Junchao, Jiang Yue et al. Molasses-based growth and

production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* [J]. *Bioresour Technol* 2012, 107(6): 393-398.

改性 Fe₃O₄ 纳米颗粒固定醋酸杆菌及稳定性分析

王兰, 文婕

(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 目的: 优化 Fe₃O₄ 纳米颗粒固定醋酸杆菌的条件, 探讨 Fe₃O₄ 纳米颗粒作为微生物固定化载体的可行性。方法: 以柠檬酸铵处理获得改性的 Fe₃O₄ 纳米颗粒, 分别研究改性和未改性 Fe₃O₄ 纳米颗粒在不同 pH、固定化时间、Fe₃O₄ 和醋酸杆菌的重量比条件下醋酸杆菌的固定化率; 通过多批次使用, 研究固定化菌的操作稳定性。结果: 在 pH 为 4.5, 固定时间 40min, m(醋酸杆菌):m(Fe₃O₄) = 1:1, m(柠檬酸铵)/m(Fe₃O₄) = 3% 的条件下, 改性 Fe₃O₄ 纳米颗粒对醋酸杆菌的固定化效果最好; 当重复试验 10 次后, 固定化菌的固定化率仍保持在 70% 以上。结论: 经柠檬酸铵改性的 Fe₃O₄ 纳米颗粒对醋酸杆菌的固定效果好, 稳定性高, 固定化微生物可以重复利用, 具有较好的实际利用价值。

关键词: Fe₃O₄ 纳米颗粒; 磁性; 改性; 柠檬酸铵; 醋酸杆菌; 固定化; 稳定性

中图分类号: Q814.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2013.03.0074

Acetobacter Immobilized by Modified Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and Analysis of Its Stability

WANG Lan, WEN Jie

(School of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjing 300071, China)

Abstract: Objective: The conditions of immobilized *Acetobacter* by modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were optimized, the feasibility of Fe₃O₄ nanoparticles as immobilized carrier was discussed. **Method:** Using the modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles by Ammonium citrate as immobilized carrier, immobilized rate was studied under different levels of pH, fixed time, the weight ratio of *Acetobacter* to Fe₃O₄. The stability of immobilized *Acetobacter* (modified) was analysed by reusing. **Result:** 4.5 of pH, 40 minutes of fixed time, 1:1 of the weight ratio of *Acetobacter* to Fe₃O₄, 3% of the weight ratio of Ammonium Citrate to Fe₃O₄ were selected as the best immobilized conditions. The fixed rate was still more than 70% reusing ten times. **Conclusion:** The modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles by Ammonium Citrate had a better ability immobilizing *Acetobacter*. The immobilized *Acetobacter* could be reused, so it had a good value in application.

Key words: Fe₃O₄ nanoparticles; Magnetism; Modification; Ammonium citrate; *Acetobacter*; Immobilized; Stability

0 引言

磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒是一种纳米级无机磁性物质, 可以在磁场的作用下移动、分离和定位。由于磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒具有良好的小尺寸效应、表面效应和不同于常规材料的特殊的磁性质^[1,2], 理论上具有能与微生物紧密结合的特性, 并且其本身的磁性为固液分离提供极大便利^[3], 因此, 本研究试图通过研究影响固定化的因素, 寻找出磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒高效率固定微生物的条件, 以提高其生物处理效率和可重复利用性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

巴氏醋酸杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) HK-81, 作者实验室保存。

1.1.2 试剂

胰蛋白胨 (BR)、酵母浸粉 (BR), 北京奥博星生物技术有限公司; 磷酸氢二铵 (AR), 天津市光复科技发展有限公司; 硫

酸镁 (AR), 天津市瑞金特化学品有限公司; 甘油 (AR), 天津市江天化工技术有限公司; 磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒 (平均粒径 20nm), 南京埃普瑞纳米材料有限公司; 磷酸氢二钠 (AR)、柠檬酸铵 (AR), 天津市赢达稀贵化学试剂厂; 磷酸二氢钾 (AR), 天津市科尔通化工销售有限公司。

1.1.3 仪器

磁铁 (稀土钕铁硼 50 × 50 × 10mm), 广州市亨润电子科技有限公司; 迴转式恒温调速摇瓶柜 (YG-II a), 上海欣蕊自动化设备有限公司; 单人净化工作台 (SW-CJ-IG 型), 苏州净化设备有限公司; 高频数控超声波清洗器 (KQ-250TDE 型), 昆山市超声仪器有限公司; 可见分光光度计 (722N), 上海精科仪器有限公司。

1.1.4 培养基

酵母浸粉 5g/L, 胰蛋白胨 5g/L, K₂HPO₄ 2g/L, (NH₄)₂HPO₄ 1g/L, MgSO₄ 0.25g/L, 甘油 60g/L。121℃ 灭菌 20min。

1.2 方法

1.2.1 磁性 Fe₃O₄ 纳米颗粒固定醋酸杆菌 HK-81

1.2.1.1 将 HK-81 培养液离心, 菌体用生理盐水洗涤 3 次, 置于冰箱备用。

1.2.1.2 称取一定质量 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒, 先用一定 pH 磷

收稿日期: 2012-11-13; 修回日期: 2013-01-29

作者简介: 王兰 (1966-), 女, 河南郑州人, 博士, 副教授, 从事环境微生物学研究, 发表论文 40 多篇, 主持省部级科研项目多项, Email: envwangl@nankai.edu.cn。