微藻高密度培养与冷冻保藏的研究进展

吴瑞珊，魏　东

（华南理工大学轻化工研究所，广东 广州　510640）

摘要：微藻作为水产养殖动物的活饵料，在水产养殖育苗中一直有着重要的地位和广泛的应用。传统的饵料藻培养方法存在着生物量低、藻液保藏困难等问题，以至阻碍了其商业化发展。综述了近年来在水产饵料藻高密度培养及冷冻保藏技术领域的研究进展，以期促进国内水产生物饵料产业化的发展。

关键词：饵料藻；高密度培养；冷冻保藏

中图分类号：S963　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－3075(2009)01－0109－05

微藻（Microalgae）作为水产动物的鲜活饵料，其营养成分全面，最接近水产动物在自然状态下的摄食要求、可提高水产动物的存活率、降低育苗成本、满足育苗特殊阶段的营养和生长需要。作为活饵料，即使有残饵也不会污染水质，相反还有净化水质的作用。由此可见，在许多人工育苗过程中，水产饵料藻的地位是无法取代的。

目前，在水产养殖业中最常用的饵料藻有 10 多种，主要包括小球藻、卡德藻、等鞭金藻、巴夫藻、褐指藻、角毛藻、微绿球藻、骨条藻和海链藻（Apt K E & Behrens P W，1999；Michael A，1997），其中以海水种居多，淡水种较少。不同的养殖动物需要的饵料藻种类也不同，通常是几种藻混合使用的效果最佳（Yamaguchi K，1997）。本文综述了近年来在水产饵料藻高密度培养及冷冻保藏（低温/超低温）新技术领域的研究进展，以期促进国内水产生物饵料产业化的发展。

1　饵料微藻的高密度培养

1.1　传统饵料藻培养方法的局限性

传统饵料微藻的培养系统主要是室外开放式（如圆池、方池、环道等），所不同的也只是在混充气、采光方式等方面略有改变。虽然这种培养系统具有投资少、成本低、技术简单等优点，但其最致命的弱点在于它产量低、生产不稳定、容易污染等（孙卫明，2000）。因此，如何实现微藻的高密度培养，从而提高效率、降低生产成本、保证质量，是藻类资源开发利用的关键问题。

1.2　高密度培养新技术

1.2.1　新型封闭式光生物反应器　一般而言，在适宜的温度和营养充分供应的条件下，藻细胞对光能的吸收利用效率将是限制微藻高密度培养的最主要因素，只有在充足而适宜的光照条件下，微藻才能以较快的速度生长，并获得理想的生物量。因此，开发一套可控的光反应器，从而提高光合效率已成为热点。自 20 世纪 50 年代以来，许多研究者就致力于微藻光反应器（封闭系统）的研究开发（孙卫明，2000）。封闭式光生物反应器与传统的开放式系统相比，具有以下主要优点：（1）较高的表面/体积比；（2）生长条件可以得到有效的控制；（3）有效地避免周围环境的污染，提高产量。封闭式反应器可实现微藻的高密度培养，已成为今后的发展方向（Chen F，1996；刘志伟等，2000）。

目前，正在研究开发的光反应器根据光源不同可以分为外置光源式和内置光源式。根据形状可分为管状式、平板式、柱状（罐装）式；根据循环动力的不同可分为泵式循环、气升式循环等（刘志伟等，2000）。在封闭式光生物反应器的各种类型中，管式反应器和板式反应器是最常用、效率最高和培养规模最大的 2 种类型（Toru Sato et al，2006），并已实现了多种饵料藻的高密度培养。近年来，国内外许多学者利用光反应器对饵料藻的培养进行了一系列的研究，并取得了一定的成果（表 1 所示）。

收稿日期：2007－09－14

基金项目：广东省科技攻关计划项目（5006524）；广州市科技计划项（2005Z3－E0331）；广东省自科学基金项目（20052050166）。

通讯作者：魏东，1966 年生，男，副教授。E－mail：fewd304@scut.edu.cn

作者简介：吴瑞珊，1982 年生，女，广东惠州人，硕士研究生，研究方向为微藻生物技术与天然产物研究。E－mail：sansan5202001@yahoo.com.cn

表1 光生物反应器的类型

Tab.1 The cultures of Marine Microalgae in photobioreactor

藻种	光反应器类型	参考文献
紫球藻 *porphyridium cruentum*	内环流气升式反应器	王长海和欧阳藩,2000
绿色巴夫藻 *pavlova viridis*	气升式管道反应器	孙卫明等,2001
三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum*	气升式管道反应器;螺旋式管道反应器	Molina E et al,2001;Hall DO et al,2003
微绿球藻 *Nannochloropsis* sp.	平板式反应器;模块平板反应器;垂直平板式反应器	Ning Zou & Amos Richmond. 1999;Richmond A & Cheng-Wu Z,2001;Zhang CW et al,2001
球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*	经济型气升式光反应器	潘双叶等,2002
牟氏角毛藻 *Chaetoceros muelleri* var. subsalsum 球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*	垂直型平板式反应器	C W Zhang,2003

1.2.2 异养/兼养培养新技术 如果仅仅利用实验室或光反应器来进行藻细胞的培养,则投资过大而且得率不高,并且离工业化生产还有相当大的距离,如何利用现代生化及细胞工程技术来提高藻细胞的生物量是以后研究中的一个十分重要的问题。研究表明,利用工业发酵系统进行的异养化高细胞密度培养技术培养微藻,可以克服光合自养培养的诸多缺陷,是提高微藻产量与产物产率的有效途径(Chen F,1996;Zhang X-W et al,1999)。目前,异养或兼养培养已经成为国内外一种快速、大量培养微藻的有效方法和发展方向(Chen F & Johns M R,1996)。近年来国内外的学者对这项技术进行不断的改革发展,并取得了一定的成果(如表2、表3所示)。

表2 异养培养饵料藻产EPA和DHA的情况

Tab.2 EPA and DHA producitivities of hetertrophic microorganisms

	藻种	培养设备	培养方式	细胞浓度/ $g \cdot L^{-1}$	日产量/ $mg \cdot L^{-1}$	产率/ $mg \cdot L^{-1}$	参考文献
EPA	*Ulkneia* sp.	烧瓶	分批	4.7	6.5	14	Fan KW et al,2001
	Nitzschia laevis	烧瓶	分批	9.0	28.0	280	Wen ZY et al,2001b
	Nitzschia laevis	发酵罐	半连续	22.1	49.7	695	Wen ZY et al, 2002b
	Nitzschia laevis	发酵罐	连续		73.0		Wen ZY,2001a
	Nitzschia laevis	发酵罐	灌注	40.0	74.1	1 112	Wen ZY et al,2002a
DHA	*Crypthecodinium cohnii*	发酵罐	分批	27.7	456.0	1 400	de Swaaf ME et al, 1999
	Crypthecodinium cohnii	发酵罐	半连续	83.0	1 276.4	11 700	de Swaaf ME et al, 2003
	Schizochytrium mangrovei	烧瓶	分批	13.3	1 282.6	2 779	Fan KW et al, 2001

表3 饵料藻异养/兼养情况

Tab.3 Heterotrophic/mixotrophic culture of marine microalgae.

藻种	研究结果	参考文献
卡德藻 *Tetraselmis* sp.	兼养培养的终细胞密度大于自养和异养条件下细胞密度之和,其生长速率是自养的2倍,异养的1.3倍,EPA在自养和兼养培养时的含量较低。	刘晨临等,2002
三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum* 亚心形扁藻 *Platymonas subcordiformis* 等鞭金藻3011 *Isochrysis galbana*	三角褐指藻和等鞭金藻在兼养培养的条件下,其生长速率都不同程度地增加,EPA和DHA含量也明显地显著提高,而亚心形扁藻在兼养的条件下,其生长速度没有改变,EPA的含量极低,并且不含DHA。	孙灵毅等,2004
微绿球藻 *Nannochloropsis* sp.	以30 mM/L的葡萄糖作为碳源,培养8d后发现其生物量干重可达到507mg/L,是自养的1.4倍。	Xu F et al,2004
三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum*	在0.01M/L的尿素下可得到最大的生物量和EPA含量(分别为1.52 g/L·d和43.13 mg/L·d),高于光合自养条件下所获得的产量。	M C Cerón Garcóa et al,2005

1.2.3 异养/兼养培养技术的优势与不足 由于大规模人工生产饵料藻的成本比较高,其中的原因包括培养基配置过程繁琐,所需化学试剂成本要高,能进行规模生产的微藻还很少,高浓度有机物的抑制作用等(张海滨等,2000)。在这里需要指出的是,并不是所有的微藻都能进行异养/兼养培养,Gladue(1991)针对有些藻类不能进行异养生长这一现象总结了3种假说:(1)相关酶类的缺乏;(2)通透性障碍;(3)限制性的呼吸能力。与自养相比,微藻的异养/兼养培养技术起步比较晚,各方面都不是很成熟,这就需要不断完善培养系统、优化各种理化参数,在降低成本的同时增加产量,要解决种质少的

这个问题,一方面要做更多地筛选工作;另一方面,可以在开发选育新的品种,从而提高其生长速度,增加有用成分的含量。

2　微藻的种质及浓缩液保藏方法

2.1　微藻保藏的必要性和重要性

在水产养殖中,通常是直接以鲜藻液投喂养殖对象,因此培养藻的数量和供饵时间都要和育苗需要密切配合,不能有任何差错,否则就很容易由于培养上出现的一些困难,造成饵料供求脱节。目前,面临的问题是大规模培养以后,如果能研制出一套理想的保藏方法,储存一定数量的单胞藻饵料在出现鲜藻液缺乏时使用,这样就能从根本上解决饵料微藻产量不稳定对育苗生产的影响(陈明耀,1995)。

2.2　国内外种质及浓缩液保藏方法

在许多种保藏方法中,冷冻保藏(Cryopreservation)包括低温法和超低温法(液氮法),具有保持基因稳定性、降低变异率和实现长期保藏等多方面的优点(Grout,1995)。

2.2.1　低温保藏研究进展　近年来,许多研究者对微藻的低温保藏技术进行了研究,结果详见表 4 所示。

表 4　微藻低温保藏

Tab. 4　Low temperature preservation of microalgae

藻　种	研　究　结　果	参考文献
小球藻 *chlorella* sp. 球等鞭金藻 3011 *Isochrysis galbana*	加入 DMSO 组并置于 -30℃的效果最好,小球藻和球等鞭金藻的存活率分别为 95% 和 93%。	王培磊等,2001
球等鞭金藻 3011 *Isochrysis galbana*	在 0 ~ 10 ℃的低温下长期(2 个月以上) 保存后,可获得较高的存活率(70 % 以上),并且在恢复生长时保持较高的比生长率。	阎斌伦等,2005
小新月菱形藻 *Nitzschia closterium* 球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*	其浓缩藻液在 1 ~ 4 ℃的低温下并加保护剂 SAMs 保存 3 个月,效果良好,藻类的 EPA 和 DHA 含量变化较少。	曾呈奎等,1998
三角褐指藻 *Pheaodactylum tricornutum* 中肋骨条藻 *Skeletonema costatum*	三角褐指藻在 0 ~ 10℃的低温下长期(2 个月以上)保藏后的存活率达 70% 以上,而中肋骨条藻在 0 ~ 10 ℃的低温下保藏 60 d 的存活率也可达 70 % 以上,并且这 2 种藻在恢复生长时都保持较高的比生长率。	朱明等,2003a; 朱明等,2003b

2.2.2　超低温保藏新技术　超低温法即液氮法的研究起步较晚。目前普遍采用 2 步降温法,即慢速降温进行冷适应,然后投入液氮中保存(Day J G & Fenwick C,1993)。影响 2 步保藏效果的因素除了微藻的种类、年龄和生理状况外,还与预冻温度、预冻时间、降温速度、抗冻保护剂的种类和解冻方法等因素有关(潘克厚和朱葆华,2002)。表 5 所示,为微藻的超低温保藏的研究进展。

表 5　微藻超低温保藏

Tab. 5　Cryopreservation of microalgae

藻　种		结　　果	参考文献
金藻	绿色巴夫藻 *Pavlova viridis* 湛江等鞭金藻 *Isochrysis zhangjianggensis* 球等鞭金藻 3011 *Isochrysis galbana*	降温速率 0.7℃/min,预冻温度和预冻时间分别为 -40℃和 30min 时,可获得较高的存活率,15% DMSO 或 15% DMSO + 10% 蔗糖是良好的抗冻保护剂。	王起华等,1996
硅藻	中肋骨条藻 *Skeletonema costatum*	以甘油为保护剂,其体积分数 10% 时存活率最高(36.80%),以 DMSO 作保护剂,在体积分数为 10% 时,最高存活率为 26. 65%;在 10% 甘油和 10% DMSO 混合保护剂中,其存活率为 23. 88%。	李信书等,2006
	牟氏角刺藻 *Chaetoceros muelleri* 新月菱形藻 *Nitzschia closterium*	对这两种藻分别选用 10% 和 15% DMSO 为抗冻保护剂,预冻至 -40℃并保持 30min 后投入液氮,样品化冻后分别在室温及 0℃采用较慢的稀释速率去除 DMSO,可获得较高的存活率。	王起华等,1999
绿藻	微绿球藻 *Nannochloropsis oculata*	23℃, -40℃, -90℃下,加入 DMSO、甘油、甲醇和比咯氨酸 4 种保护剂,对微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)进行超低温冷冻保藏试验,发现 1.1mol/L 甘油的效果最好。	Jean - Marc Poncet & Benoit Veron,2003

另外,有报道对硅藻、绿藻、蓝藻、甲藻、红藻、定鞭藻及韭绿藻 4 大藻类进行超低温保藏研究(Lesley Rhodes et al,2006),发现使用 15% DMSO 作为保护剂时,保藏效果较好的微藻有:硅藻(*Chaetoceros calcitrans*、*Chaetoceros muelleri*、*Chaetoceros* sp.、*Nitzschia ovalis*),绿藻(*Chlamydomonas coccoides*),红藻(*Porphyridium purpureum*)、韭绿藻(*Tetraselmis chuii*、*Tetraselmis suecica*)和蓝藻(*Raphidiopsis* sp.、*Aphanizomenon Xos - aquae*)。

2.3　超低温保藏技术的存在的问题

超低温保藏虽具有能保持种质遗传稳定性,便于藻种长期保藏,能最大限度地减少污染等方面的优点,但是这项技术还没有得到广泛地应用(潘克厚和朱葆华,2002)。这是因为:①绝大多数细胞的

低温保藏都必须采用保护剂,而不同的细胞要求不同类型的保护剂,对于浓度的要求也有所不同。②低温保存过程中最适的保存温度及适宜的降温和解冻速度尚需进一步研究。③不同藻类其预冻温度、预冻时间对冷冻保存存活率的影响不同。④操作程序复杂、设备要求高。

参考文献:

陈明耀. 1995. 生物饵料培养[M]. 北京:中国农业出版社.

李信书,邵营泽,吴建新,等. 2006. 保护剂对2种微藻超低温保存存活率的影响[J]. 水利渔业, 26(2):22-23.

刘晨临,王秀良,张学成. 2002. 卡德藻自养、异养与兼养培养的比较研究[J]. 青岛海洋大学学报,32(4):579-584.

刘志伟,余若黔,郭勇. 2000. 微藻培养的光生物反应器[J]. 现代化工,20(12):56-58.

潘克厚,朱葆华. 2002. 微藻的保种技术及其应用[J]. 青岛海洋大学学报,32(3):403-408.

潘双叶,陈烨,张华军,等. 2002. 应用光生物反应器高密度培养等鞭藻[J]. 宁波大学学报(理工版), 15 (3):33-38.

孙灵毅,王力勇,赵强. 2004. 3种微藻兼养培养及营养成分的比较[J]. 大连水产学院学报,19(2):146-149.

孙卫明,麦康森,孙世春. 2001. 气升式管状生物光反应器的设计与培养条件优化[J]. 齐鲁渔业,18(3):37-39.

孙卫明. 2000. 微藻的应用与封闭式培养方式[J]. 齐鲁渔业,17(5):22-25.

王长海,欧阳藩. 2000. 紫球藻的光生物反应器培养[J]. 化工冶金,21(1):47-51.

王培磊,宫庆礼,麦康森,等. 2001. 两种海洋单胞藻浓缩与保存效果的研究[J]. 海洋湖沼通报,(4):12-19.

王起华,石若夫,程爱华. 1996. 三种饵料金藻的超低温保藏研究[J]. 中国水产科学, 6(2):89-92

王起华,张恩栋,王冰,等. 1999. 两种海洋饵料硅藻的超低温保存[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版),22(4):310-314.

阎斌伦,朱明,张学成. 2005. 球等鞭金藻3011浓缩细胞低温保存技术的研究[J]. Marine Sciences,29(12):43-46.

曾呈奎,等. 1998. 海洋生物技术[M]. 济南:山东科学技术出版社.

张海滨,孙世春,麦康森,等. 2000. 微藻异养培养技术的研究进展[J]. 海洋湖沼通报,(3):51.

朱明,阎斌伦,滕亚娟,等. 2003a. 三角褐指藻浓缩液长期保存技术研究[J]. 水产科技情报,30(6):246-249.

朱明,阎斌伦,滕亚娟,等. 2003b. 中肋骨条藻的浓缩与长期保存技术的研究[J]. 水产科学,22(6):29-31.

Apt K E & Behrens P W. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology[J]. J Phycol, 35:215-226.

C W Zhang. 2003. High-Yielding outdoor mass cultures of chaetoceros muelleri var. subsalsum and isochrysis galbana in vertical plate reactors[J]. Mar biotechnol, 5:302-310

Chen F & Johns M R. 1996. A strategy for high cell density culture of heterophic microalgae with inhibitory substrats [J]. J Appl Phycol, 7:43-46.

Chen F. 1996. High cell density culture of microalgae in hetertrophic growth[J]. Trends in Biotechnology, 14:421-426.

Day J G & Fenwick C. 1993. Cryopreservation of members of the genus Tetraselm is used in aquaculture [J] . Aquaculture, 118: 151-160.

de Swaaf ME, de Rijk TC, Eggink K, et al. 1999. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Crypthecodinium cohnii*[J]. J Biotechnol, 70:185-192.

de Swaaf ME, Pronk JT, Sijtsma L. 2003. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-production marine alga *Crypthecodinium cohnii*[J]. Biotechnol Bioeng, 81:666-672.

Fan KW, Chen F, Jones EBG, Vrijmoed LLP. 2001. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids[J]. J Ind. Microbiol Biotechnol, 27:199-202.

Gladue R. 1991. Heterotrophic microalgae production: potential for application to aquaculture feeds. In: Fulks W, Main K L (eds), Rotifer and Microalgae Culture Systems. Proceedings of a U. S.-Asia Workshop[J]. Honolulu Hawaii January, 28-31:275-286.

Grout BWWW. 1995. Introduction to in vitro preservation of plant cells, tissues and organs. In Grout BWW(ed.), Genetic Preservation of Plant Cells in vitro[M]. Springer Berlin.

Hall DO, Fernandez FGA, Guerrero EC, et al. 2003. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity[J]. Biotechnol Bioeng, 82 (1):62-73.

Jean-Marc Poncet & Benoit Veron. 2003. Crypoeservation of the unicellular marine algae, Nannochloropsis oculata[J]. Biotechnology Letters, 25:2 017-2 022.

Lesley Rhodes, John Smith, Robin Tervit, et al. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae [J]. Cryobiology, 52: 152-156.

M C Cerón Garcóa, A Sánchez Mirón, J M Fernández Sevilla, et al. 2005. Mixotrophic growth of the microalga Phaeodactylum tricornutum Influence of different nitrogen and organ-

ic carbon sources on productivity and biomass composition [J]. Process Biochemistry,40:297 – 305.

Michael A. 1997. Borowitzka. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints[J]. Journal of Applied Phycology,9:393 – 401.

Molina E, Fernandez J, Acien GG, et al. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures[J]. J Biotechnol,92: 113 – 31.

Ning Zou & Amos Richmond. 1999. Effect of light – path length in outdoor flat plat reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. [J]. Journal of biotechnology, 70:351 – 356.

Richmond A & Cheng – Wu Z. 2001. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors[J]. J Biotechnol, 85:259 – 269.

Toru Sato, Shinsuke Usui, Yoshihiro Tsuchiya, et al. 2006. Invention of outdoor closed type phototbioreactor for microalgae[J]. Energy Conversion and Management, 47: 791 – 799.

Wen ZY & Chen F. 2001b. Application of statistically – based experimental designs for the optimization of eicosapentaenoic adid production by the diatom Nitzschia laevis[J]. Biotechnol Bioeng,75:159 – 169.

Wen ZY & Chen F. 2002a. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom Nitzschia laevis[J]. Enzyme Microb. Technol,29:341 – 347.

Wen ZY. 2001a. A high yield and productivity strategy for eicosapentaenoic acid production by the diatom Nitzschia laevis in heterotrophic culture. PhD Thesis[M]. Hong Kong: The University of Hong Kong.

Wen ZY, Jiang Y, Chen F. 2002b. High cell density culture of the diatom Nitzschia laevis for eicosapentaenoic acid production: fei – batch development[J]. Proc Biochem, 37: 1 447 – 1 453.

Xu F, Hu H, Cong W, et al. 2004. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions[J]. Biotechnol Lett, 26:51 – 53.

Yamaguchi K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review[J]. J Appl Phycol, 8:487 – 502.

Zhang CW, Zmora O, Kopel R, et al. 2001. An industrial – size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [J]. Aquaculture, 195: 35 – 49.

Zhang X – W, Shi X – M, Chen F. 1999. A kinetic model for lutein production by the green microalga Chlorella protothecoides in heterotrophic culture[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 23: 503 – 507.

(责任编辑　万月华)

Research Advances of High-density Culture and Cryopreservation of Marine Microalgae

WU Rui-shan, WEI Dong

(Reasearch Institute of Light and Chemical Industries,
South China University of Technology, Guangzhou　510640, China)

Abstract: As a kind of animal food source, marine microalgal is always important and widely used in aquaculture. There are many problems in traditional culture methods, low biomass and difficult preservation, thus interfere the commercial development of marine microalgae. This paper reviewed the research advances of high-density culture and cryopreservation of marine microalgae in recent years, and the purpose is to promote industial development of internal aquaculture feed.

Key words: Microalgae for mariculture; high-density culture; cryopreservation