

不同浓度 NaCl 和光照强度对杜氏藻体内 β -胡萝卜素含量的影响

康燕玉 谢文玲 高亚辉* 林石明 欧阳丽佳 刘广发

厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建厦门 361005

Effect of Different Concentrations of NaCl and Light Intensities on β -carotene Content in *Dunaliella*

KANG Yan-Yu, XIE Wen-Ling, GAO Ya-Hui*, LIN Shi-Ming, OUYANG Li-Jia, LIU Guang-Fa

Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

提要 以2种杜氏藻即巴氏杜氏藻和盐生杜氏藻为实验材料, 在不同NaCl胁迫和光照(紫外线和高光照强度)进行培养的结果表明, 细胞生长的最适盐度是 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 高产 β -胡萝卜素的最适盐度是 $3.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 紫外线下诱导的藻株环境适应能力较强, β -胡萝卜素含量较高; 高光照强度($1\ 080 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下诱导的杜氏藻 β -胡萝卜素含量高; 二步法培养的 β -胡萝卜素含量比正常培养的提高2倍以上。

关键词 杜氏藻; β -胡萝卜素; 盐度; 光照强度; 二步法

杜氏藻(*Dunaliella*, 又称盐藻)为耐盐的单细胞绿藻。藻体内能合成并积累比其他生物高得多的 β -胡萝卜素, 因此杜氏藻是生产 β -胡萝卜素的良好天然资源, 极具开发应用潜力。作为维生素A的前体和食品着色剂的 β -胡萝卜素还具有可贵的抗氧化、延缓衰老、提高免疫力、降低肿瘤和心血管疾病发生率等的作用(Basu等2000)。盐度和光照在杜氏藻累积 β -胡萝卜素中是最为关键的两种环境因素, 在适宜条件下杜氏藻细胞可积累大量的 β -胡萝卜素, 最高可达干重的14% (刘建国和吴超元1995), 养殖杜氏藻生产 β -胡萝卜素的研究较多。本文于盐胁迫和光照(包括紫外线和高光照度)胁迫条件下用二步法培养诱导藻株, 寻找杜氏藻高生产速率和高 β -胡萝卜素含量之间的矛盾, 以期能获得高产 β -胡萝卜素的杜氏藻藻株。

材料与方 法

巴氏杜氏藻(*Dunaliella bardawil*, MMDL625)、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*, MMDL626)由以色列Ginzburg博士惠赠, 本校生命科学学院微藻工程研究所保藏。用Johnson's改良配方培养基培养并保存(Borowitzka 1988)。

作盐度胁迫处理时, 把生长到指数生长期的藻液接种到6瓶含有 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl培养基中,

培养到指数生长期时, 把其中的5瓶调成含有 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl培养基; 隔天, 把其中的4瓶调成含有 $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl培养基, 依此类推, 最后形成含有 1.5 、 2.0 、 2.5 、 3.0 、 3.5 和 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl培养基变化梯度, 重复2次。

作高光照强度光诱导效应实验时, 根据上述盐度胁迫实验中得到的结果, 确定 $3.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl是杜氏藻 β -胡萝卜素累积的最适盐度, 于是设置这样的实验: 藻株为巴氏杜氏藻(经紫外诱导)、盐生杜氏藻(已经驯化成功和前者作为对照); 高光强: $1\ 080 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光暗(h/h)=16:8; 低光强: $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光暗(h/h)=16:8; $3.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 其余的条件一致, 重复2次。

作杜氏藻的紫外线诱导及初筛时, 把培养到指数生长中期的藻液平铺到平板上, 在黑暗条件下置于30 W紫外灯下15 cm处, 照射50、60、70、80、90、100和110 s后诱导, 暗处理2 d, 在琼脂平板上筛选诱导的藻株(橙黄色细胞), 初筛藻株采用不同的条件(表1)进行培养, 重复2次。

二步法实验采用全封闭式培养箱可自动控制

收稿 2005-10-18 修定 2006-01-19

资助 福建省科技计划重点项目(2003N053)。

* 通讯作者(E-mail: gaoyh@xmu.edu.cn, Tel: 0592-2181386)。

表1 杜氏藻的二步法培养条件

处理阶段	光照强度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	光照周期 (光暗)	温度/ °C	NaCl/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	氮源(KNO_3)/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	磷源(KH_2PO_4)/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	无机碳源(NaHCO_3)/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	pH
第1阶段	540	12 h 12 h	25	2.0	1.5	0.3	15	8.0
第2阶段	1 080	16 h 8 h	32	3.5	0.5	0.1	10	7.5

光照、温度和湿度,第1阶段保证较高的生物量,第2阶段保证高含量的 β -胡萝卜素(表1)。同时用正常条件培养的杜氏藻做对比实验,培养15 d测定。表1是在基础培养基成分上按培养目的适当调整的杜氏藻二步法培养条件(Borowitzka 1988;周世水和姚汝华 1997)。

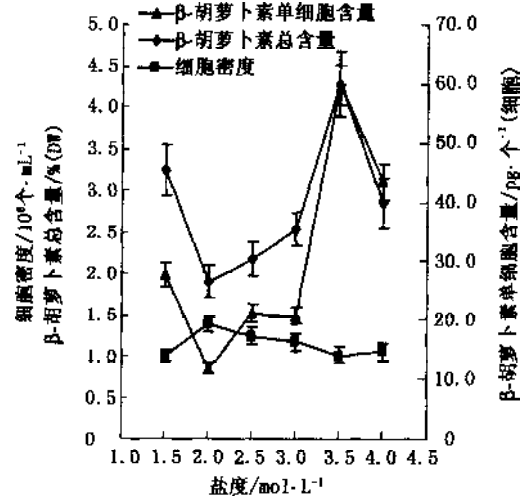
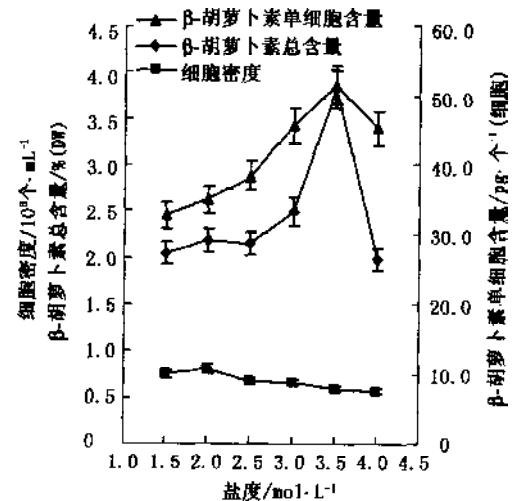
细胞计数用流式细胞仪(EPICS XL Coulter)(陈慈美等 1998)。

测定 β -胡萝卜素时,取50 mL的藻液用有机滤膜过滤,冻干,称重,将带有藻的膜放在15 mL带塞试管中,用90%丙酮萃取24 h,并加入适量的0.1% 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT),混合液超声(100 W, KQ-100DB型数控超声波清洗器)处理15 min,振摇10 min,置于冰箱里隔夜后,多次萃取,直到藻体成白色,合并萃取液,用紫外分光光度计(UNICAM UV300)测定波长为453 nm的OD值。通过标准曲线的换算得出 β -胡萝卜素含量(张凤章 1991;刘广发等 1995)。 β -胡萝卜素对照品系德国MERCCK公司生化试剂, $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{M}=536.89\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$,含量>97.0%,熔点176~182。乙醚、氯仿、甲醇、丙酮均为分析纯。

结果与讨论

1 盐度对杜氏藻和 β -胡萝卜素的效应

盐度对2种杜氏藻的生长和 β -胡萝卜素含量的影响趋势基本上一致(图1、2)。当 $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,有利于杜氏藻的生长;但 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}<\text{NaCl}$ $4.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后就不利于杜氏藻的生长,且细胞密度与盐度成负相关($P<0.05$)。当 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl $3.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,有利于细胞 β -胡萝卜素的累积,且 β -胡萝卜素含量与盐度成正相关($P<0.05$);当 $3.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}<\text{NaCl}$ $4.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (高盐度)时,不仅细胞生长下降,藻细胞内 β -胡萝卜素含量也下降。盐度的影响趋势

图1 盐度对巴氏杜氏藻生长和 β -胡萝卜素含量的影响图2 盐度对盐生杜氏藻生长和 β -胡萝卜素含量的影响

与已有的报道一致(刘建国等 1994; Borowitzka and Borowitzka 1990)。

据图1、2可以认为,巴氏杜氏藻和盐生杜氏藻细胞生长的最适盐度是 $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,生产高含量 β -胡萝卜素的最适盐度是 $3.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl。

2 光诱导效应

我们做了两方面的实验：

(1) 紫外线辐射诱导效应 积累大量 β -胡萝卜素的杜氏藻细胞有很强的抗紫外辐射的能力, 根据这一特性可筛选出高 β -胡萝卜素含量的诱导株。我们在生产 β -胡萝卜素最适条件下对已经过紫外线诱导的巴氏杜氏藻诱导株(DB+UV)和没有经过紫外线诱导的普通株(DB-UV)进行比较。经显微镜观察, 两者均为卵圆形, 但颜色差异明显, 诱导株的藻细胞是橙黄色, 普通株的是黄绿色, 且诱导株藻细胞的直径比普通株的大2倍左右。

诱导株的细胞密度低于普通株的(图3), 但其诱导株的 β -胡萝卜素总含量、 β -胡萝卜素产量、单细胞 β -胡萝卜素含量则比普通株高出许多(表2)。从总体上看, 经过紫外线诱导的藻株和普通

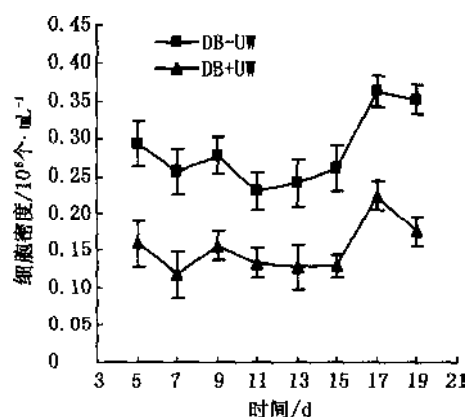


图3 杜氏藻诱导株和普通株的细胞密度比较

株有这样的优势：对环境的适应性较强, 单细胞 β -胡萝卜素含量较高, β -胡萝卜素总含量和 β -胡萝卜素产量也较高, 这和Jahnke (1999)的结果是

表2 杜氏藻诱导株和普通株的 β -胡萝卜素含量比较

不同处理的藻株	β -胡萝卜素总含量/ % (DW)	单细胞 β -胡萝卜素含量/ $\text{pg} \cdot \text{个}^{-1}$ (细胞)	β -胡萝卜素产量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	β -胡萝卜素/叶绿素a ($\text{OD}_{453}/\text{OD}_{664}$)
DB-UV	2.27 \pm 0.15	8.00 \pm 0.42	19.29 \pm 0.95	1.61 \pm 0.08
DB+UV	5.78 \pm 0.28	37.49 \pm 1.87	45.86 \pm 0.49	6.86 \pm 0.86

一致的。

(2) 高光照强度诱导效应 光是杜氏藻养殖生产 β -胡萝卜素中最为重要的因子, 在 β -胡萝卜素累积最适盐度(3.5 mol·L⁻¹)下考察光照度对杜氏藻 β -胡萝卜素累积的影响。结果显示在高光照强度(1 080 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)下, 不管是 β -胡萝卜素总含量和 β -胡萝卜素产量, 还是单细胞 β -胡萝卜素含量都比低光照的体现出一定的优势(表3)。光照强度大的杜氏藻 β -胡萝卜素含量较高。

高光照强度条件下的杜氏藻细胞是橙红色的, 而低光照强度条件下则是绿色的。从 β -胡

萝卜素和叶绿素a的OD比值看, 高光照度诱导 β -胡萝卜素形成, 破坏叶绿素a的合成。因为积累大量 β -胡萝卜素的杜氏藻细胞具有很强的抗强光伤害的能力, 其 β -胡萝卜素红色细胞光饱和点明显高于绿色细胞(Katz等1994)。

3 二步法培养的杜氏藻生产 β -胡萝卜素

从表4可以看出, 二步法培养可提高 β -胡萝卜素产量和总含量, 比正常培养的高2倍以上, 但生物量比正常培养的低一些。其中盐生杜氏藻的 β -胡萝卜素产量最高(8.37%, 53.57 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。其原因可能是二步法培养的第一阶段可保证较高的

表3 不同光照强度对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响

藻株	光照强度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	β -胡萝卜素总含量/ % (DW)	单细胞 β -胡萝卜素含量/ $\text{pg} \cdot \text{个}^{-1}$ (细胞)	β -胡萝卜素产量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	β -胡萝卜素/叶绿素a ($\text{OD}_{453}/\text{OD}_{664}$)
巴氏杜氏藻	1 080	5.35 \pm 0.35	34.40 \pm 2.21	37.44 \pm 2.53	8.42 \pm 0.55
	54	1.72 \pm 0.11	17.12 \pm 1.20	14.64 \pm 0.93	1.67 \pm 0.12
盐生杜氏藻	1 080	6.37 \pm 0.41	44.70 \pm 2.83	43.87 \pm 2.72	8.94 \pm 0.59
	54	1.68 \pm 0.11	13.62 \pm 0.91	10.92 \pm 0.75	1.59 \pm 0.12

表4 不同培养条件对杜氏藻生物量和 β -胡萝卜素含量的影响

藻株	培养方法	生物量/gL ⁻¹	β -胡萝卜素总含量/% (DW)	β -胡萝卜素产量/mg·L ⁻¹
巴氏杜氏藻	正常培养	0.85±0.05	1.89±0.12	16.08±0.10
	二步法	0.67±0.04	5.98±0.38	40.08±2.51
盐生杜氏藻	正常培养	0.83±0.06	1.97±0.12	16.33±0.95
	二步法	0.64±0.04	8.37±0.54	53.57±3.31

生物量, 第二阶段则保证高含量的 β -胡萝卜素, 从而获得高产量的 β -胡萝卜素。

参考文献

- 陈慈美, 方志山, 郑晓玲, 许伟斌, 郑爱榕(1998). 盐藻生产 β -胡萝卜素两阶段养殖新模式研究. 海洋通报, 17 (2): 28-36
- 刘广发, 楼士林, 游兰英, 何斌源, 赖瑞卿(1995). 十种(株)杜氏藻 β -胡萝卜素的提取和含量比较. 厦门大学学报, 34 (1): 94-99
- 刘建国, 赵学武, 王玉君, 王作芸, 陈念洪, 俞立东, 吴以平, 吴超元(1994). 盐胁迫条件下 β -胡萝卜素及其异构体累积的研究——盐度的影响. 海洋与湖沼, 25 (1): 71-75
- 刘建国, 吴超元(1995). 盐藻和 β -胡萝卜素研究述评. 海洋与湖沼, 26 (3): 323-330
- 周世水, 姚汝华(1997). 利用盐藻(*Dunaliella*)培养生产 β -胡萝卜素. 生物学杂志, 14 (80): 15-19
- Harborne JB著. 张凤章译(1991). 植物化学方法. 厦门: 厦门大学出版社, 96-103
- Basu M, Banerjee A, Bhattacharya UK, Bishayee A, Chatterjee M (2000). Beta-carotene prolongs survival, decreases lipid peroxidation and enhances glutathione status in transplantable murine lymphoma. *Phytomedicine*, 7 (2): 151-159
- Borowitzka MA (1988). Algal growth media and sources of algal cultures. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol*, 2: 111-119
- Jahnke LS (1999). Massive carotenoid accumulation in *D. bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *J Photochem Photobiol B*, 48: 68-74
- Katz A, Jimenez C, Pick U (1995). Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the algal *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*, 108 (4): 1657-1664