

凌善锋. 雨生红球藻培养基和诱导条件优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 266-267.

雨生红球藻培养基和诱导条件优化

凌善锋

(荆楚理工学院生物工程学院, 湖北荆门 448000)

摘要:以雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) FACHB-712 为试验藻种, 添加 60~720 $\mu\text{g/L}$ 的 5 种浓度梯度的维生素 B_6 和 15.3 mmol/L 柠檬酸钠, 测定雨生红球藻的细胞密度、生物量、虾青素含量等指标。结果表明, 添加了维生素 B_6 后的 SM 培养基培养后, 雨生红球藻细胞密度和生物量均增加, 证明了雨生红球藻的生长需要微量维生素 B_6 。高光、0.06 mL/L 的乙烯利和 7.0 mg/L 水杨酸再加 700 mg/L 的亚硒酸钠浓度组合胁迫诱导不仅可以加快虾青素积累过程(较对照组提前 7 d 变红), 而且虾青素含量比对照组(0 mg/L)提高 257.69%, 达 9.3 mg/L。

关键词:雨生红球藻; 维生素 B_6 ; 亚硒酸钠浓度; 虾青素含量

中图分类号: S917.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0266-02

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 是一种重要的淡水单细胞绿藻。该藻细胞中虾青素含量很高, 约占细胞干重的 1%~4%^[1], 远远高于红法夫酵母。虾青素可以抗高血压、抗糖尿病、抗癌, 因此, 雨生红球藻作为一种获取虾青素的天然资源被广泛重视。目前已有关于维生素 B_1 、维生素 B_{12} 、维生素 H 对雨生红球藻生长和虾青素积累影响的报道^[2-9], 但尚未见有关维生素 B_6 和柠檬酸钠对雨生红球藻积累虾青素影响的报道。笔者优化了雨生红球藻的培养条件和虾青素的胁迫条件, 旨在为开发利用雨生红球藻提供依据。

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(编号: Q20126101); 荆楚理工学院校级科研项目(编号: ZR201201)。

作者简介: 凌善锋(1971—), 男, 浙江杭州人, 副教授, 主要从事分子生物学研究。E-mail: shanfeng86@163.com。

相同。在培养液中含有 4 mg/L 硼和 60 $\mu\text{g/L}$ 钼浓度组合时, 盐藻积累的蛋白质最多, 硼钼元素浓度过高或过低时, 盐藻蛋白质积累均较少。

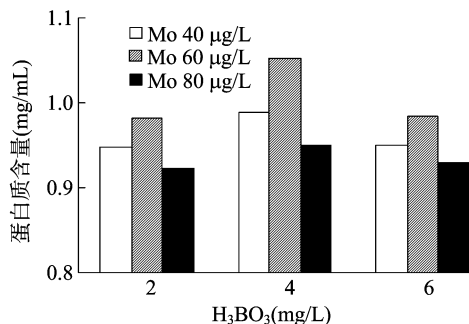


图3 硼钼不同浓度组合对盐藻蛋白质积累的影响

3 小结

微量元素硼、钼均是盐藻细胞生长与代谢的必需元素。硼参与糖的运输与代谢, 缺硼会影响蛋白质代谢过程; 钼是硝酸还原酶的组成成分, 缺钼则硝酸不能还原, 抑制氮代谢过

1 材料与方法

1.1 材料

将雨生红球藻藻种 FACHB-712(中国科学院水生生物研究所藻种库)活化 1 次, 然后将藻种置于 SM 培养基中进行培养^[10]。

1.2 方法

将藻液在人工气候室中静置培养 13 d, 温度为 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$, 营养细胞培养阶段用 3 根平行的灯管照射藻液(1 根红光灯管 40 W, 1 根日光灯管 28 W, 1 根蓝光灯管 28 W), 连续培养 7~10 d 至对数生长期, 测定 $D_{600\text{nm}}$; 然后转至高光强条件下继续光照, 光照强度约 12 000 lx, 每天手摇培养物 1 次, 防止黏壁。

1.3 维生素 B_6 和柠檬酸钠浓度对雨生红球藻生长的影响

柠檬酸钠浓度设为 15.3 mmol/L。维生素 B_6 (上海研生生物技术科技有限公司)设置 5 个浓度: 60、120、180、360、720 $\mu\text{g/L}$ 。

在盐藻的培养基中加入 4 mg/L 硼和 60 $\mu\text{g/L}$ 钼, 可显著促进盐藻细胞的生长, 大幅提高盐藻细胞密度, 有利于通过盐藻细胞获得更多的 β -胡萝卜素和蛋白质等产品, 这一试验结果对于盐藻的科学培养, 或将盐藻作为生物反应器的开发应用具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 李正华, 江树勋, 蔡桂琴, 等. 盐藻分子生物学研究概况[J]. 海洋科学, 2005, 29(6): 69-72.
- [2] 刘亚军, 赵文. 杜氏藻的生物学和生态学研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(2): 126-131.
- [3] 柴玉荣, 王天云, 薛乐勋. 新型生物反应器——杜氏盐藻研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 30-33.
- [4] 郝建欣, 孙钰, 丛威, 等. 盐藻生长过程中氮磷利用与色素积累[J]. 海洋科学, 2003, 27(2): 41-44.
- [5] 郭金耀, 杨晓玲. 钼对盐藻生长与物质积累的调控作用[J]. 盐业与化工, 2007, 36(1): 27-30.
- [6] 郝建军, 康宗利. 植物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 142-143.

1.4 细胞密度测定

每天定时取样,采用血球计数板进行细胞计数,并计算细胞密度。

1.5 生物量测定

每隔 6 d 取 10 mL 藻液,用 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤,80 $^{\circ}\text{C}$ 下烘 36 h,置于干燥器中自然冷却至室温后,用 sartorius BS210S 型电子天平称重。

1.6 诱导虾青素累积

取指数生长期的藻液进行离心,加消毒淡水清洗再离心,重复 2 次。接种到 250 mL 锥形瓶中。每个梯度设 3 个平行对照组。亚硒酸钠浓度分别设为:0、300、400、500、600、700 mg/L。培养条件:温度为 $(24 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,日光灯光照,光照强度为 12 000 lx,连续光照,光周期为 12 h/d。接种时藻密度为 3.812×10^3 个/mL。8 d 后测藻密度和虾青素含量。同时逆境胁迫条件下培养上述添加了 0.06 mL/L 的乙烯利和 7.0 mg/L 水杨酸的藻液(25 $^{\circ}\text{C}$,24 h 5 000 lx 连续光照 + 营养盐饥饿),以诱导藻细胞合成并积累虾青素。

1.7 虾青素含量测定

按照梁英等的方法^[10]测量虾青素含量。

2 结果与分析

2.1 柠檬酸钠、维生素 B₆ 浓度对雨生红球藻细胞密度和生物量的影响

由表 1 可见,当维生素 B₆ 浓度为 360 $\mu\text{g/L}$ 时,藻细胞密度最大,比对照高 3.66%。继续增加维生素 B₆ 浓度,藻细胞密度下降。当维生素 B₆ 浓度为 60~720 $\mu\text{g/L}$ 时,除了 120 $\mu\text{g/L}$,藻细胞生物量均随着浓度的增加而提高,当维生素 B₆ 浓度为 120 $\mu\text{g/L}$ 时,藻细胞生物量最大,比对照高 3.46%。

表 1 维生素 B₆ 浓度对雨生红球藻细胞密度和生物量的影响

维生素 B ₆ 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	细胞密度 (万个/mL)	生物量 (g/L)
0 (CK)	16.00 \pm 1.60	0.260 \pm 0.030
60	16.10 \pm 0.19	0.263 \pm 0.013
120	16.52 \pm 0.36	0.269 \pm 0.016
180	16.37 \pm 0.50	0.265 \pm 0.055
360	16.69 \pm 1.30	0.267 \pm 0.039
720	16.43 \pm 0.38	0.268 \pm 0.064

2.2 亚硒酸钠浓度对雨生红球藻虾青素含量的影响

由图 1 可知,随着亚硒酸钠浓度的增加,雨生红球藻内虾青素含量逐渐增加。当亚硒酸钠浓度为 700 mg/L 时,虾青素含量达 9.3 mg/L,比对照高 257.69%。

3 结论与讨论

雨生红球藻属于光能自养型微生物,对营养要求较低^[5]。光照是影响雨生红球藻生长和虾青素积累的重要因子。混合光(红光、蓝光、白光)对雨生红球藻培养效果较好。红光能够促进光合作用,提高雨生红球藻光能利用率,有利于雨生红球藻生长。蓝光有利于雨生红球藻生物量增加,由于虾青素是一种类胡萝卜素,类胡萝卜素吸收的光能集中在蓝光区,所以蓝光胁迫最有利于虾青素积累^[3]。雨生红球藻对维生素没有特殊要求。张英等、李立欣等研究表明,添加维生

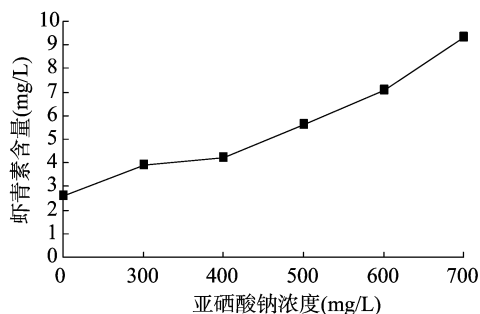


图 1 亚硒酸钠浓度对雨生红球藻虾青素含量的影响

素 B₁、维生素 B₁₂、维生素 H 均能显著促进雨生红球藻细胞的生长^[7-8]。本研究表明,雨生红球藻生物量随着维生素 B₆ 浓度的增加而提高,当维生素 B₆ 浓度为 120 $\mu\text{g/L}$ 时,藻细胞生物量最大,比对照高 3.46%,建议在实际生产中适当添加维生素 B₆。适宜浓度的水杨酸和乙烯利能促进雨生红球藻积累虾青素^[11-12]。本研究表明,随着亚硒酸钠浓度的增加,雨生红球藻虾青素含量逐渐增加。当亚硒酸钠浓度为 700 mg/L 时,虾青素含量达 9.3 mg/L,比对照高 257.69%。

致谢:感谢荆楚理工学院简清梅副教授,湖北圣峰药业有限公司罗书林工程师、袁凯学士,以及湖北省恩施市林业局徐明钊副局长、段海涛局长在论文完成中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 王冬冬,蒋霞敏,姜桢卿. 明矾处理对雨生红球藻形态结构的影响[J]. 海洋水产研究,2007,28(4):89-95.
- [2] Katsuda T, Shiraishi H, Ishizu N, et al. Effect of light intensity and frequency of flashing light from blue light emitting diodes on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2008,105(3):216-220.
- [3] Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, et al. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2006,102(5):442-446.
- [4] 黄水英,齐安翔,李哲,等. 几种胁迫方式对雨生红球藻积累虾青素影响的初步研究[J]. 海洋科学集刊,2009,49:144-151.
- [5] Gökşan T, İlknur A K, Cenker K. Growth characteristics of the Alga *Haematococcus pluvialis* flotox as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,2011,11:377-383.
- [6] 金传荫,宋立荣,刘永定,等. 红球藻水生 748 株 (*Haematococcus* sp. HB748) 培养基的选择与对维生素 B₁₂ 的需求[J]. 应用与环境生物学报,1997,3(2):177-179.
- [7] 张英,蔡明刚,齐安翔,等. 维生素 B₁、B₁₂ 在雨生红球藻不同培养阶段的作用研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2004,43(增刊):142-146.
- [8] 李立欣,段舜山,李爱芬,等. VB₁、VB₁₂ 和 VH 对雨生红球藻生长及类胡萝卜素含量的影响[J]. 生态科学,2006,25(2):102-105.
- [9] 张在宝,周爱芬,徐刚佳,等. 雨生红球藻 712 株营养需求及其培养条件[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2003,32(4):66-72.
- [10] 吴霞,康瑞娟,丛威,等. 转光膜在雨生红球藻养殖上的应用[J]. 过程工程学报,2006,6(6):969-972.
- [11] 高政权,孟春晓,刁英英. 施用水杨酸对雨生红球藻中虾青素积累的影响[J]. 水产科学,2007,26(7):377-380.
- [12] 高政权,孟春晓. 外源乙烯利对雨生红球藻中虾青素积累的影响[J]. 食品科学,2007,28(10):376-380.