

# 培养密度和培养液“老化”对盐藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素累积的影响\*

杨雪梅\*\*

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 通过研究培养密度和培养液“老化”对盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* Teodoresce 生长和 $\beta$ -胡萝卜素累积的影响,发现盐藻的细胞增长率在接种后第2天达到高峰,然后逐渐下降; $\beta$ -胡萝卜素的日累积量在接种后逐渐增加,第7天达到高峰,然后下降,这一现象与在培养过程中细胞密度上升而使每个细胞所接收的光强下降以及培养液的“老化”有关。在维持一定的培养密度和每日更换新鲜培养液条件下,盐藻的细胞增长率和 $\beta$ -胡萝卜素的日累积量较为恒定。结果表明,盐藻的生长和 $\beta$ -胡萝卜素的累积有一定的关系,即在盐藻快速生长时, $\beta$ -胡萝卜素的日累积量很低。在盐藻生长减慢或生长受到抑制时, $\beta$ -胡萝卜素大量累积。

**关键词** 盐藻,生长, $\beta$ -胡萝卜素,累积

$\beta$ -胡萝卜素是维生素A的前体,能预防癌症和心血管系统疾病的发生,是一种重要的保健品<sup>[4~9]</sup>,还可作为天然色素用于食品加工业。研究表明,隶属绿藻门、真绿藻纲、团藻目、盐藻科、杜氏藻属的盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* Teodoresce(简称盐藻)是生产天然 $\beta$ -胡萝卜素的最佳选择。但有关盐藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素累积的关系一直不清楚,本文从培养密度和培养液“老化”的角度探讨这一问题。

## 1 材料和方法

**藻种** 以本实验室保存的高产 $\beta$ -胡萝卜素盐藻品系 HD<sub>20</sub>为实验材料。

**培养液** 以 Johnson's 改良配方养殖盐藻。

**盐藻的培养** 将处于对数生长期的盐藻接种到新培养液中,进行培养。光源为日光灯,光强为 8 300lx,光暗周期为 12:12h。温度为室温,在每天的 08:00,14:00 和 17:00 各记录 1 次。08:00 与 14:00 各摇晃 1 次培养瓶。以后如无特别说明,都是按照这个方法培养。如需更换全部培养液,则以 5 000rpm 离心 15min 以新鲜培养液将藻细胞洗出,进行培养。

**$\beta$ -胡萝卜素的提取和测定** 以丙酮萃取盐藻色素,以 751G 分光光度计测色素-丙酮溶液

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2906 号。

\*\* 现工作地址:青岛海洋大学生命学院,青岛 266003。本文为作者博士毕业论文的一部分。感谢导师吴超元教授的培养、教育。

收稿日期:1996年5月7日

在其吸收峰 450nm 处的光吸收值,按下式计算每升培养液中  $\beta$ -胡萝卜素的含量:

$$\beta\text{-胡萝卜素 (mg/L)} = \text{OD}_{450} \times \text{稀释倍数} \times 10 \times 10^3 / 2500$$

盐藻细胞数量的测定 以血球计数板在显微镜下检查细胞数量,同时以 751G 分光光度计测盐藻培养液在其吸收峰 700nm 处的光吸收,绘制 700nm 处光吸收值与每 ml 培养液细胞数相对应的曲线图。以后只测培养液在 700nm 处光吸收值,从上述曲线中查出细胞数。

盐藻培养时间的确定 为确定盐藻的培养时间的实验,进行了分批培养实验。在长达 25d 的培养中,盐藻生长和  $\beta$ -胡萝卜素累积的高峰都出现在接种后的 7d 以内,在以后的培养中,生长和累积逐渐出现停滞和衰退。华汝成<sup>[1]</sup>和 Fogg(1962)的工作结果也有相同的情况。因此确定本文所有的实验均培养至接种后第 8 天。

## 2 结果

### 2.1 培养密度和培养液“老化”对盐藻生长的影响

2.1.1 培养密度对盐藻生长的影响 实验时,每天定时测定细胞的数量,根据细胞数量的增长,取出相应的盐藻培养,稀释至接种时的密度和体积。

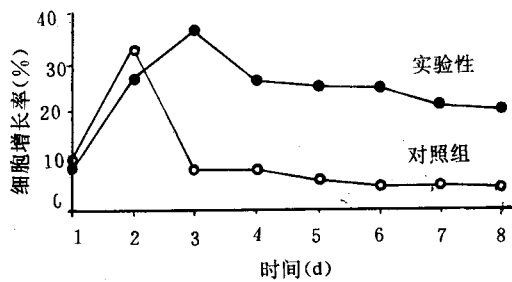


图 1 培养密度对盐藻生长的影响

Fig. 1 Effect of cell density on the growth of *D. salina* (培养条件:光暗周期为 12:12h,光强为 8 300lx,温度为 22,26,24℃)

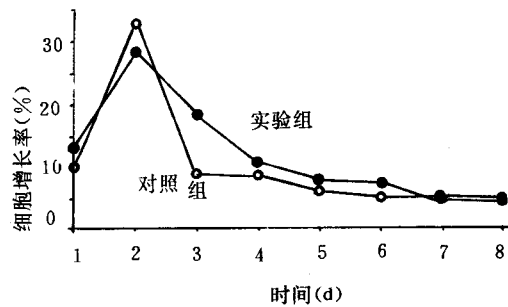


图 2 培养液“老化”对盐藻生长的影响

Fig. 2 Effect of "aged medium" on growth of *Dunaliella salina* (培养条件:光暗周期为 12:12h,光强为 8 300lx,温度为 22,26,24℃)

图 1 表明,对照组在接种后第 2 天进入对数生长期,然后生长速率明显下降。实验组在接种后的第 2 天进入对数生长,对数生长期延长,可以在 3~4d 内维持细胞的快速生长(细胞增长率大于 25%),然后细胞增长率缓慢下降。这说明培养过程中细胞增长率逐渐下降确实与细胞密度增大而彼此“遮光”有直接关系。但这种通过保持一定密度而维持恒定光强的做法,也只能在 3d 左右的时间内维持盐藻的高速生长,细胞增长率仍呈逐渐下降的趋势。

2.1.2 培养液“老化”对盐藻生长的影响 从实验 2.1.1 可以看出,保持接种时的密度,虽然可在一定时间内维持细胞的快速生长,但细胞增长率仍呈下降趋势。在培养过程中,不仅盐藻的密度逐渐增大,培养液的成分也在逐渐改变,有“老化”的趋势。为保持与接种时相同的“新鲜”培养液,每天以离心的方法除去“老化”的培养液,加入等体积的新鲜培养液进行培养,每天定时测定盐藻数量,实验共进行 8d。

图 2 表明,每天离心除去“老化”的培养液,更换成新鲜的培养液,虽然在接种后的第 2 天

细胞增长率略低于对照,但第1,3,4,5,6天则明显高于对照,并且细胞增长率的下降趋势也慢于对照,这说明培养液的“老化”是盐藻培养过程中细胞增长率逐渐下降的原因之一。从上个实验可以看出,盐藻培养过程中细胞增长率下降的另一个原因,是由于细胞密度上升而彼此“遮光”的缘故。但即使是每日稀释至接种密度,细胞增长率也是逐渐降低,就是由于“老化”的培养液限制了生长。

2.1.3 培养密度和培养液“老化”对盐藻生长的影响 从实验2.1.1和2.1.2可以看出,单独维持培养密度和更新培养液,虽都可在一定时间内维持盐藻的快速生长,但细胞增长率都呈下降趋势。为此,每天根据细胞密度的增加,取出相应的盐藻培养液,加入新鲜的培养液,使细胞密度维持在接种时的水平。每天定时检查细胞数量,实验共进行8d。

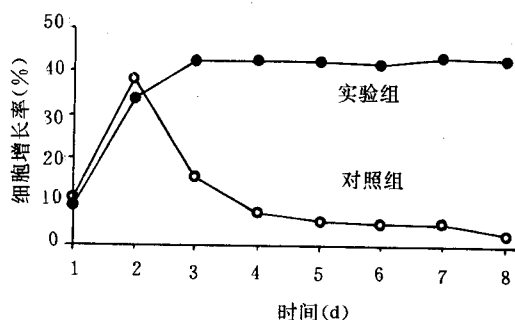


图3 培养密度和培养液“老化”对盐藻生长的影响  
Fig. 3 Effects of cell density and "aged medium" on growth of *Dunaliella salina*

(培养条件:光暗周期为12:12h,光强为8 300LX,温度为22,26,24℃)

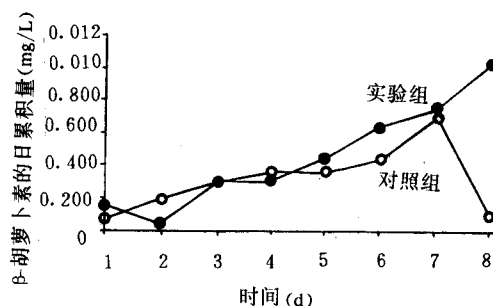


图4 培养密度对β-胡萝卜素累积的影响  
Fig. 4 Effect of cell density on daily β-carotene accumulation of *D. salina*

(培养条件:光暗周期为12:12h,光强为8 300lx,温度为22,26,24℃);数据为接种时全部盐藻的累积量

图3表明,维持一定的培养密度并每天更新培养液,可使实验组在进入对数生长后,一直维持高速增长,细胞增长率没有下降。这说明在培养过程中,由于细胞密度上升而使每个细胞所接收的光强降低和培养液的“老化”,确实是盐藻培养过程中细胞增长率逐渐降低的原因。在此条件下,细胞增长率基本维持恒定。根据 Fogg(1965)总结的单细胞藻生长速度常数公式:

$$K = (\log N/N_0)/t$$

式中: $t$ 为时间(以昼夜计算), $N$ 为观察终期的个体数, $N_0$ 为观察初期的个体数,实验组的细胞生长常数恒定, $K$ 为0.15。

## 2.2 培养密度和培养液“老化”对β-胡萝卜素累积的影响

2.2.1 培养密度对盐藻β-胡萝卜素累积的影响 为研究培养密度对盐藻β-胡萝卜素累积的影响,进行了本实验。处理方法与2.1.1同。

图4表明,对照在接种后β-胡萝卜素的日增加量逐渐增加,至第7天时达到高峰,第8d时下降。实验组在为期8d的培养中,β-胡萝卜素的日累积量除第2天较小外,一直呈逐渐增大的趋势。假设整个实验以接种时的盐藻数量培养而没有检测时的损失,在培养至第8天时,对照组含β-胡萝卜素0.043mg,实验组含0.053mg,实验组高于对照组23.7%,说明培养密度对β-胡萝卜素的累积有影响。在培养过程中降低细胞的密度,有利于β-胡萝卜素的累积。即在生产上,可于培养后期将盐度为180的高盐水注入养殖池,以提高β-胡萝卜素的产量;或在阴天光照较差时,也可用这个方法提高β-胡萝卜素的产量。当然,在实际生产中还要考虑高盐水的价

格和大量处理培养液的费用。

2.2.2 培养液“老化”对盐藻β-胡萝卜素累积的影响 为研究培养液“老化”对β-胡萝卜素累积的影响,进行了本实验。处理方法与2.1.2同。

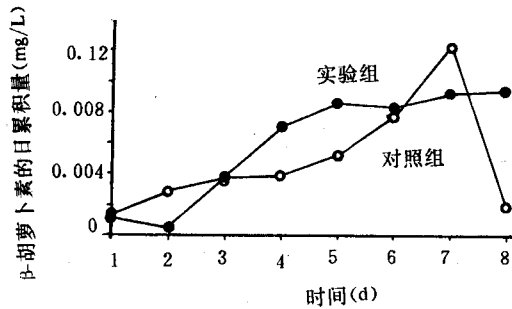


图5 培养液“老化”对盐藻β-胡萝卜素累积的影响  
Fig. 5 Effect of "aged medium" on the daily β-carotene accumulation of *Dunaliella salina*

(培养条件:光暗周期为12:12h,光强为8 300lx,温度为22,26,24℃)

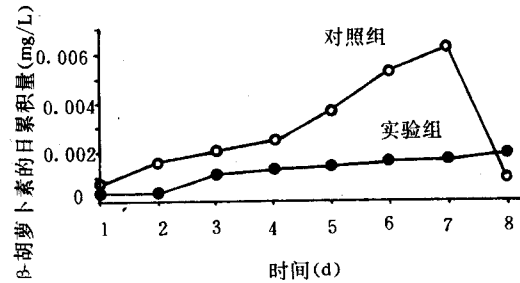


图6 培养密度和培养液“老化”对盐藻β-胡萝卜素累积的影响

Fig. 6 Effect of cell density on daily β-carotene accumulation of *Dunaliella salina*

(培养条件:光暗周期为12:12h,光强为8 300lx,温度:22,26,24℃)

图5表明,实验组在第3,4,5,6,8天,β-胡萝卜素的日累积量大于对照,培养至第8天时,对照组含β-胡萝卜素0.69mg/L,实验组含β-胡萝卜素0.79mg/L,实验组比对照组高14.2%,说明培养液“老化”不利于β-胡萝卜素的累积。实验组第5,6,7,8天,β-胡萝卜素的日累积量基本相等,没有下降。

2.2.3 培养密度和培养液“老化”对盐藻β-胡萝卜素累积的影响 为研究培养密度增大和培养液“老化”对盐藻β-胡萝卜素累积的影响,进行本实验。处理方法与2.1.3同。

图6表明,实验组在第5,6,7,8天,β-胡萝卜素日累积量基本相同,平均为每日0.031mg/L。培养至接种后第8天,对照含β-胡萝卜素0.041mg,而实验组含0.028mg(为接种时全部盐藻的累积量),可见每日离心更换培养液并将之稀释到接种时的密度,对盐藻的生长很有利,但不利于β-胡萝卜素的累积。

### 2.3 盐藻生长与β-胡萝卜素累积的关系

总观所有实验的对照组,其共有的规律是,在接种后第2天细胞的生长最快,β-胡萝卜素的日累积量在接种后第6,7天最多。根据所做的实验,分析其中的原因,可以认为接种3d后盐藻细胞生长减慢是由于培养液“老化”和每个细胞接收光量的减少,那么β-胡萝卜素在培养后期才大量累积是什么原因呢?从本文的实验来看,在盐藻生长较快时,β-胡萝卜素累积较少,而在生长较慢时,β-胡萝卜素大量累积,生长与累积呈负相关。对照Fogg(1965)总结的在分批培养中单细胞藻生长的特有模式,β-胡萝卜素的大量累积是发生在相对生长下降期和生长静止期。盐藻的这种生长和β-胡萝卜素累积的规律,可在培养密度和培养液“老化”对盐藻生长和β-胡萝卜素累积影响的实验中得到证实。在维持接种时的培养密度和每日更新培养液条件下,盐藻一直处于高速生长状态,β-胡萝卜素的日累积量一直很低,没有累积高峰出现。在密度对生长和累积影响的实验中,培养液没有全部更换,在盐藻细胞增长率较大的几天里,β-胡萝卜素的日增加量很低,随着营养物质的消耗,盐藻的细胞增长率下降,β-胡萝卜素的日累积量开

始加大,在培养后期出现高峰。在仅更新培养液的实验中,在培养过程中盐藻的细胞增长率减慢,所以 $\beta$ -胡萝卜素的日累积量在第5,6,7,8几天很大。虽然培养密度和培养液“老化”对盐藻的生长和 $\beta$ -胡萝卜素的累积有不同的影响,但都没有改变这一规律。

### 3 讨论

本研究表明,培养密度和培养液“老化”对盐藻的生长和 $\beta$ -胡萝卜素的累积有影响。在维持一定的培养密度和每日更换新鲜培养液条件下,盐藻的生长速率和 $\beta$ -胡萝卜素的日累积量较为恒定。并且盐藻的生长与 $\beta$ -胡萝卜素的累积有一定的关系,在盐藻快速生长时, $\beta$ -胡萝卜素的日累积量很低。在盐藻生长减慢或生长受到抑制时, $\beta$ -胡萝卜素才大量累积。培养过程中培养密度的增大和培养液的“老化”所产生的效果是这一关系的具体体现。

华汝成<sup>[1]</sup>认为,培养液的“老化”是由于随着培养时间的延长,培养液的pH发生改变,培养液中含有大量的代谢产物,这种“老化”的培养液对生长有抑制作用。作者认为在培养过程中,营养物质被逐渐消耗,与新鲜培养液相比也不利于盐藻的生长。况且在现有的条件下,也很难将缺乏营养物质和代谢产物累积对生长的影响截然分开,故将营养物质的消耗也归于“培养液老化”的问题,一起考虑。

从结果2.1.1和2.2.1可以看出,细胞密度对盐藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素累积的影响非常大。因此研究生长与累积的最适光强以及饱和光强时,都应考虑此时盐藻培养的密度。而在光强大于补偿光强时,每个光强条件下都有最佳的培养密度。这一情况在其他微藻培养中也应该存在。

### 参考文献

- [1] 华汝成,1980.单细胞藻类的培养与利用.农业出版社.
- [2] 华东师范大学生物系植物生理教研组主编,1980.植物生理学实验指导.人民教育出版社.
- [3] 曹宗巽,吴相玉,1979.植物生理学.人民教育出版社,267.
- [4] Hazuka MB, Prasan JE, Newan F *et al.*, 1990. *J. Am Coll Nutr* 9(2):143.
- [5] Moriguchi S, Kishino Y., 1990. *Nutr. Res.* 10(8): 837.
- [6] Potischman N, McCulloch CE, Byers T *et al.*, 1990. *Am J. Clin Nutr* 52(5): 909.
- [7] Schwartz JL, Tanaka J, Khandekar V *et al.*, 1992. *Cancer Chemother Pharmacol* 29(3):207.
- [8] Scita G, Aponte GS, Wolf G., 1992. *J Nutr Biochem* 3(3): 118.
- [9] Shultz TD, Chew BP, Seaman WR *et al.*, 1992. *Cancer Lett* 63(2): 125.

# EFFECTS OF CELL DENSITY AND CULTURE MEDIUM "AGING" ON THE GROWTH AND $\beta$ -CAROTENE ACCUMULATION OF HALOTOLERENT ALGA *Dunaliella salina*

Yang Xuemei

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071*)

Received: May, 7, 1996

**Key Words:** *Dunaliella salina*, Growth,  $\beta$ -carotene, Accumulation

## Abstract

Studies on the effect of cell density and culture medium "aging" on *Dunaliella salina* Teodoresce showed that both of them can affect the growth and  $\beta$ -carotene accumulation in *D. salina*. Growth rate declines with increase of culture time because the medium ages and the algal cells receive less light due to the increased cell density. The rate of growth and  $\beta$ -carotene accumulation can both be maintained constant by keeping the cell density even and renewing the culture medium daily. The growth rate is inversely related to  $\beta$ -carotene accumulation; fast growth rate for less accumulation, and vice versa.