

盐藻的诱变育种及光合反应器培养的初步研究*

姜建国 周世水 姚汝华

(华南理工大学食品生物工程学院 广州 510641)

关键词 光合反应器, 盐藻, 诱变育种

虽然我国已经开展了野外养殖盐藻生产 β -胡萝卜素的研究^[1],但大面积养殖盐藻受地质气候、自然光照、盐度、天敌等环境因素的严格限制,可控性较低,且需占用大面积的土地和水域。遇到下雨渗透压急剧变化常造成细胞破裂,导致 β -胡萝卜素合成消失。我国沿海多雨,内陆咸湖不多且多分布在寒冷低温地区,盐藻养殖期每年一般只有5~6个月,成本相对较高。因此用开放式养殖盐藻的方法生产天然 β -胡萝卜素受到限制。1996年袁生等对利用光合反应器培养单细胞藻类进行了研究报道,但有关盐藻反应器的研究还未见报道。作者利用自制的简易光生物反应器对盐藻进行了培养研究,希望能为解决上述问题开辟一条新途径。

1 材料和方法

1.1 简易轴心式光反应器的设计

反应罐为直径15 cm,内管直径5 cm,罐高40 cm,体积约6 L,有效利用体积5 L。放入8 W荧光灯提供光源(光照在20 000 lx);底端采用磁力搅拌器,一方面混合培养液,另一方面使藻体均匀接受光照;底端通入气体,外壁通循环水,以保持盐藻生长所需的最适培养温度。

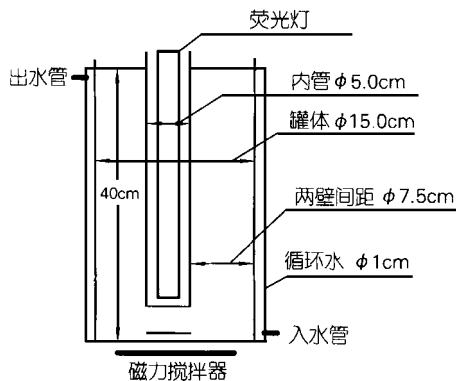


图1 简易轴心式光反应器平面设计

Fig.1 Plane design chart of the axis photobioreactor

1.2 盐藻的培养

1.2.1 藻种及培养条件

盐藻(*Dunaliella salina*)分别由厦门大学刘广发教授、中科院水生生物研究所藻种室及青岛海洋大学微藻室提供。基本培养液和微量元素液参照文献[2]。进行不同条件培养时,在此基础上对成分作相应调整即可。

将处于对数生长期的藻种经4 000 r/min, 5 min离心去掉原培养液后加入到新鲜培养液中培养,光强20 000 lx,光照L:D=12 h:12 h,温度为室温或由恒温装置控制所需温度。摇瓶培养采用50 ml三角瓶,每组实验都做3个重复,取其平均值作为实验结果。

1.2.2 生物量及 β -胡萝卜素的测定

将不同浓度培养液摇匀后在754 G分光光度计630 nm处测其光吸收 OD_{630} 值,再用4 000 r/min离心5 min得沉淀藻体,转到干燥至恒重的滤纸上,用蒸馏水洗2~3次以除去食盐的影响,用吸水纸吸去水分,并取一空白湿滤纸做对照,求出 OD_{630} 值与藻体湿生物量的对应关系曲线;同时将藻体在50~60℃真空干燥称重,求出OD值与藻体生物量(细胞干重g/L)的对应关系曲线;以后只需测OD值便可由曲线查出相应的藻体干、湿生物量。

2 结果和讨论

2.1 诱变育种

2.1.1 藻种的筛选及诱变

按照盐藻培养方法,将不同藻种进行培养,其主要条件为盐度3 mol/L、光强20 000 lx、湿接种量1.0 g/L(湿重)、培养6 d后测定不同藻种的生物量和 β -胡萝卜素的产量,进而求出干藻体中的 β -胡萝卜素的含量(%),结果见表1。

* 广东省自然科学基金资助项目 9805444 号及广东省重点科技攻关资助项目 99 M01410G 号。

收稿日期:2000-01-24;修回日期:2000-07-03

表 1 3 种盐藻藻种各种参数的测定结果

Tab.1 The parameters of the 3 strains of *Dunaliella salina*

藻种	盐藻生物量 (干重 g/L)	β 胡萝卜素含量 (%)	β 胡萝卜素产量 (mg/L)
厦门大学藻种	0.60	3.70	23.60
水生所藻种	0.61	4.10	25.00
青岛海洋大学藻种	0.65	3.20	20.80

表 2 紫外光照诱变育种结果

Tab.2 The results mutagenized by UV light

距离 (cm)	时间 (min)	盐藻生物量 (干重 g/L)	β 胡萝卜素含量 (%)	β 胡萝卜素含量 (mg/L)
10	1	0.6	4.6	27.6
10	3	-	-	-
10	5	-	-	-
20	1	0.63	4.4	27.7
20	3	0.53	4.9	26
20	5	-	-	-
30	1	0.66	4.25	28.1
30	3	0.62	4.80	29.7
30	5	0.58	5.00	29.0
40	1	0.68	4.1	27.9
40	3	0.63	4.5	28.3
40	5	0.6	4.7	28.2

注: - 表示未检测出结果。

表 3 诱变藻种的遗传稳定性

Tab.3 The genetic stability of the mutagenized strain

诱变情况	盐藻生物量 (干重 g/L)	β 胡萝卜素含量 (%)	产物产量 (mg/L)
未诱变	0.67	3.90	26.10
诱变培养 1 批	0.67	3.90	26.10
诱变培养 3 批	0.60	4.60	27.60
诱变培养 5 批	0.64	4.35	27.80
诱变培养 7 批	0.65	4.30	27.90

从表 1 可知水生所的藻种 β -胡萝卜素含量最高且生长较快,故作为实验出发藻种,以期优化藻种并提高产量。将藻种进行紫外光诱变,采用 15 W 紫外灯,不同距离和照射时间,接种量(湿重) 1.0 g/L,经多次诱变得得到较理想结果见表 2。可知相距 30 cm 紫外光照 3 min,经多次诱变筛选到的藻种,从生物量、 β -胡萝卜素含量和产量上综合考虑效果都较好。

2.1.2 诱变藻种遗传稳定性实验

为了解诱变后的藻种是否具有遗传性,进行了不同批次培养,结果见表 3。可知经 30 cm 紫外光照射 3 min 诱变后的藻种,经 7 批以上的培养仍具较好的遗传稳定性,且诱变稳定藻种与未诱变藻种生长速度基本相同, β -胡萝卜素含量略有提高,达 4.3%,说明紫

外光诱变能提高盐藻 β -胡萝卜素含量约 6.9%。据报道盐藻经强蓝紫光照射诱变后得到能在低光强下积 β -胡萝卜素的藻种,还有研究发现盐藻的异养转化,两者都为实现盐藻在光生物反应器中培养生产 β -胡萝卜素提供了新思路 and 可行性。

2.2 反应器培养实验

通过调整培养液成分、光强、温度等环境因子对上述经诱变的藻种进行了培养实验,确定了细胞生长、 β -胡萝卜素累积的最适条件(另文发表),本文用自制简易光生物反应器,采用最适生长条件(光强 30 000 lx,光照时间 12 h,温度 25 °C,盐度 2 md/L,硝酸钾 1.0 mmol/L,磷酸二氢钾 0.1 mmol/L,碳酸氢钠 10 mmol/L,三氯化铁 10 μ mol/L, pH 8.0) 对上述经诱变的藻种进行培养,接种量(湿重) 1.0 g/L,并添加 7×10^{-6} 的乙烯利(ETH),以控制 pH 值 6.5 左右来间歇通入 CO₂ 气体,其中用磁力搅拌使藻液混合,并使藻体细胞间隔得到光照,采用光强 20 000 lx 的荧光灯提供光源,进行全天光照培养。同时与三角瓶(光照周期 14 h: 10 h,其余条件相同)培养作比较。

结果如图 2,可见采用光反应器全天培养仅用 3 d,盐藻生物量便接近三角瓶培养 6 d 的结果,说明反应器培养周期可显著缩短。原因是反应器可采用人工光源全天光照培养,间歇通 CO₂ 增加光合反应时间,使细胞可高度密集;磁力搅拌使细胞有均等机

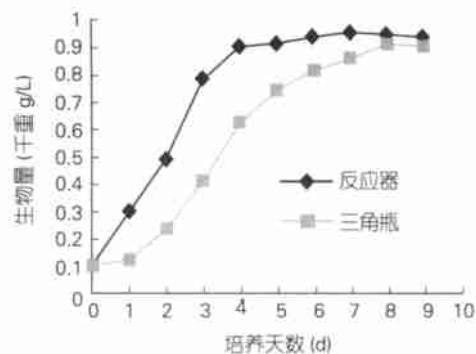


图 2 反应器和三角瓶培养盐藻的比较
Fig.2 The comparison of culturing *Dunaliella salina* between in triangular flask and in bioreactor

会间隔得到光照,从而提高产量。由此可见,应该进一步探索和完善高效光合反应器的工艺及培养条件,进行光合生物反应器放大培养盐藻的研究,以期天然 β -胡萝卜素的工业化提供新途径。☀

参考文献

- 1 李师翁,李虎乾. 生物工程学报,1997, 18(1):93~97
- 2 姜建国,姚汝华. 热带海洋,1999, 18(1):68~72

PRELIMINARY STUDIES ON THE MUTAGEN BREEDING OF *Dunaliella salina* AND ITS CULTIVATION IN SIMPLE AXIS PHOTOBIOREACTOR

JIANG Jian-guo ZHOU Shi-shui YAO Ru-hua

(Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou, 510641)

Received: Jan. 24, 2000

Key Words: Photobioreactor, *Dunaliella salina*, Mutagenesis breeding

Abstract

A optimum started strain collected from 3 strains of *Dunaliella salina* was mutagenized by UV light. A new strain with content of β -carotene 5% higher than that of original strain was obtained. The strain was cultivated with a simple photobioreactor in the optimum condition of cell growth. The result showed that the biomass of *D. salina* cultivated in the bioreactor over the triangular flask had a marked increase and the growth period shortened greatly. (本文编辑:张培新)