

盐藻生长过程中氮磷利用与色素积累

郝建欣 孙 钰 丛 威* 蔡昭铃

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

提要 考察了盐藻在氮浓度 3 mmol/L 和 0.59 mmol/L 两种条件下的生长、氮磷的利用以及色素积累的情况。结果表明氮浓度 3 mmol/L 培养基有利于藻细胞的增值,最终藻体浓度大,稳定期可维持数日;0.59 mmol/L 培养基有利于细胞胡萝卜素积累,单位细胞胡萝卜素与叶绿素的比值达到 12.3,是氮浓度 3 mmol/L 培养基的两倍左右。盐藻细胞在生长初期快速利用氮源,之后即使培养基中仍有较高浓度的氮源,藻细胞也不再利用。两种条件下藻细胞对磷的利用情况相同。两种培养基中盐藻单位细胞叶绿素含量均先增加后减少,胡萝卜素含量均先降低后增加。

关键词 盐藻 (*Dunaliella salina*), 氮, 磷, β -胡萝卜素, 叶绿素

中图分类号 Q949 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0041-04

β -胡萝卜素具有猝灭人体内自由基、延缓衰老、抑制肿瘤转化及抗癌等生物活性,因而受到广泛瞩目。盐藻 (*Dunaliella salina*) 在一定培养条件下能大量积累 β -胡萝卜素,最高可达细胞干质量的 14%^[1]。目前,澳大利亚、以色列、美国和中国等已有十余家从事盐藻生产的公司,盐藻产品的市场仍在日益扩大。氮、磷是盐藻生长的重要营养元素,初始氮磷浓度对盐藻生长的影响已有较多研究,但对于其生长过程中氮磷的利用及色素累积情况却少见报道。本文重点研究了盐藻生长过程中氮和磷的利用及其对胡萝卜素和叶绿素积累过程的影响。以期为盐藻培养工艺优化提供相关依据。

1 材料和方法

藻种:内蒙古兰太生物技术公司提供,经固体平板纯化后使用。

培养基:8.1 mmol/L KCl, 20.3 mmol/L $MgSO_4$, 2.5 mmol/L $CaCl_2$, 0.3 mmol/L Na_2CO_3 , 29 μ mol/L K_2HPO_4 , 528 μ mol/L Na_2SiO_3 , 523 μ mol/L 柠檬酸, 9 μ mol/L $FeCl_3$, 微量元素溶液 10 ml/L^[2], pH8.0 的 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 8.25 ml/L, 2.05 mol/L NaCl, $NaNO_3$ 为氮源,高氮 3 mmol/L,低氮 0.59 mmol/L。固体培养基成分同液体培养基,外加 2%琼脂。

培养条件:采用三角瓶培养,于 HZQ QG 型温控培养箱(哈尔滨东联电子技术公司)中荧光灯 24 h 光

照,平均光强 8.0 mW/cm²,温度 32℃,初始接种浓度 0.5×10^5 cell/mL。

分析检测方法:氮浓度的测定参照 Collas 等 1999 年的方法^[3],磷浓度的测定法参照 T.R. 帕森斯等的方法^[4],用 UV755B 分光光度计(上海精密仪器科学有限公司)测定藻体悬浮液的 OD_{750} 和血球计数法计数确定生物量。胡萝卜素和叶绿素用 90%丙酮提取,测定方法参照 Jensen 1978 年的报道^[5]。

2 结果与讨论

2.1 不同氮源浓度下盐藻细胞的生长

在两种不同氮浓度的培养基中,盐藻生长的迟滞期均不明显(图 1),在其生长初期,即培养的前 3 天,两种条件下盐藻细胞的比生长速率都较大(表 1),且呈逐日上升趋势,氮源浓度 0.59 mmol/L 条件(低氮条件)略高于 3 mmol/L 条件(高氮条件)。最大比生长速率都出现在第 3 天,均为 $0.47 d^{-1}$ 。3 d 后高氮培养基中盐藻细胞仍保持较高比生长速率,至第 6 天进入稳定期,细胞浓度由最初的 0.5×10^5 cells/mL 增殖到

第一作者:郝建欣,出生于 1976 年,硕士,生物化工专业,
E-mail:itsmehao@yahoo.com, * 通讯联系人

收稿日期:2001-10-29;修回日期:2002-03-22

3.0×10^5 cells/mL,且稳定期可维持数日。而在低氮培养基中3 d后盐藻细胞的比生长速率较最大比生长速率下降了82%,之后比生长速率一直较低,维持在 0.05 d^{-1} 左右,培养7 d时细胞浓度最大,为 2.0×10^5 cells/mL,此后细胞很快衰亡。

表1 不同氮浓度下盐藻比生长速率变化(d^{-1})

Tab.1 The specific growth rates of *D. salina* in the media of different NO_3^- concentrations(d^{-1})

时间(d)	3 mmol/L NaNO_3	0.59 mmol/L NaNO_3
1	0.255	0.323
2	0.295	0.357
3	0.47	0.47
4	0.356	0.084
5	0.318	0.057
6	0.079	0.059

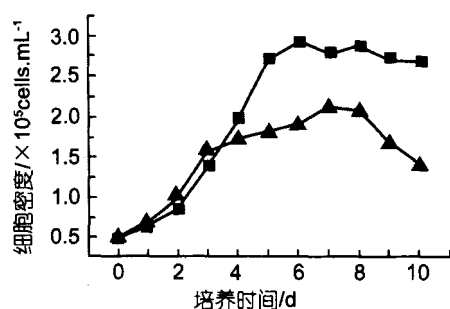


图1 不同氮浓度下盐藻生长曲线

Fig.1 The growth of *D. salina* in the media of different NO_3^- concentrations

—■— 3 mmol/L NaNO_3 —▲— 0.59 mmol/L NaNO_3

以上结果表明,较高氮浓度有利于藻细胞的增殖,能较长时间保持高速率生长,较早达到稳定期并可维持较长时间,达到较高的细胞密度。而氮浓度较低的培养基中虽然培养前期藻细胞增值也较快,但比生长速率很快下降,稳定期短,藻细胞衰亡很快,最终藻体浓度小。

2.2 盐藻细胞对氮磷的利用

低氮培养基中盐藻细胞在培养初期,即前3天,培养液中氮浓度快速下降(图2),由 0.676 mmol/L 下降到 0.215 mmol/L ,降低了 0.461 mmol/L ,单位细胞对氮的最大利用率为 $0.265 \times 10^{-5} \text{ mmol/cell}$ 。在高氮培养基中氮源浓度的快速下降持续到第5天,由

3.077 mmol/L 降低到 2.25 mmol/L ,降低了 0.827 mmol/L 。单位细胞对氮的最大利用率为 $0.269 \times 10^{-5} \text{ mmol/cell}$ 。对数生长期后培养液中氮源浓度基本维持在一稳定范围内,虽然培养基中仍有较高浓度的氮源,但藻细胞也不再利用。在两种不同氮浓度培养基中磷浓度均在前3天由 $29 \mu\text{mol/L}$ 快速降低到 $4 \mu\text{mol/L}$ 以下,降低85%以上(图3),单位细胞最大磷利用率分别为 $16.04 \times 10^{-5} \mu\text{mol/cell}$ 和 $14.6 \times 10^{-5} \mu\text{mol/cell}$,3 d后磷浓度变化均不大。

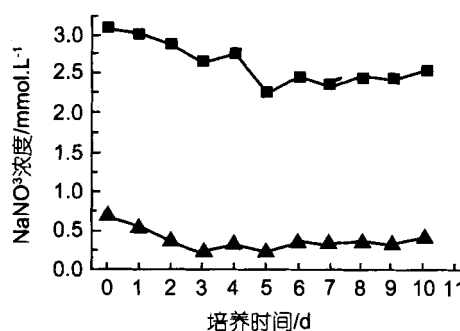


图2 盐藻培养液中氮源浓度的变化

Fig.2 Changes of NO_3^- concentration in cultures of *D. salina*

—■— 3 mmol/L NaNO_3 —▲— 0.59 mmol/L NaNO_3

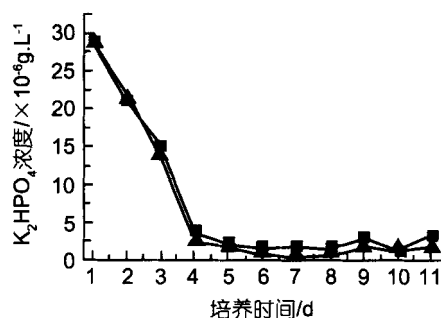


图3 盐藻培养过程中磷源浓度的变化

Fig.3 Changes of PO_4^{3-} concentration in cultures of *D. salina*

—■— 3 mmol/L NaNO_3 —▲— 0.59 mmol/L NaNO_3

由图1和表1可知,前3天低氮培养基中盐藻细胞快速增殖,培养基中氮源浓度急剧下降,表明细胞对氮利用快,3 d后生长速率明显降低,藻细胞对氮源利用有限,氮源浓度变化已不明显。高氮培养基培养

过程中氮源快速下降延续到第5天,此后氮源浓度基本不变,这与细胞的生长情况相对应。而两种氮源浓度条件下磷源的利用情况几乎相同,说明藻细胞生长速率的差异主要是由于培养基中氮源浓度的不同引起的。两种氮源浓度下盐藻培养基中磷浓度均在培养初期急剧下降,然后基本不变,说明初始氮源浓度不影响藻细胞对磷的利用。

2.3 不同初始氮源浓度下盐藻生长过程中色素的积累

盐藻生长过程中单位细胞叶绿素含量先急剧上升,高氮条件下最高达 8.20 pg/cell ,低氮条件下最高 9.59 pg/cell ,之后细胞叶绿素含量逐渐下降(图4),其变化趋势与细胞对氮源的利用基本一致。单位细胞胡萝卜素含量初期呈下降趋势,第4天后开始不断增高,且低氮培养基中单位细胞胡萝卜素含量明显高于高氮培养基,最高达 57.4 pg/cell (图5)。

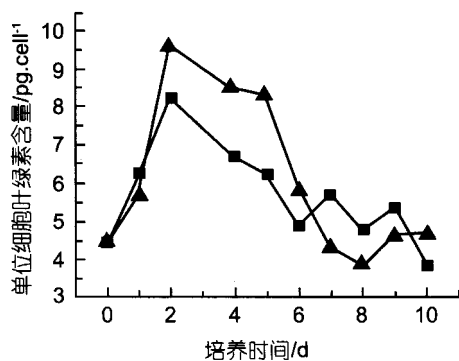


图4 盐藻生长过程中单位细胞叶绿素含量变化

Fig.4 Changes of chl a concentration in *D. salina* cell
—■— 3 mmol/L NaNO₃ —▲— 0.59 mmol/L NaNO₃

叶绿素是含氮色素,所以细胞叶绿素含量与细胞对氮源的利用有关,叶绿素的形成主要依靠细胞提供氮,细胞利用氮源时,细胞内含氮量大,叶绿素含量随之增大,相反,细胞对氮源利用减少后,叶绿素含量便随之减少^[2]。胡萝卜素是不含氮的色素,在氮及其它元素缺乏使得叶绿素难以合成时,胡萝卜素的含量就会增加以补充其色素,其含量与其它色素含量互为消长,所以当氮源相对缺少时,胡萝卜素的合成会被促进。

由图4和图5可知盐藻单位细胞胡萝卜素与叶

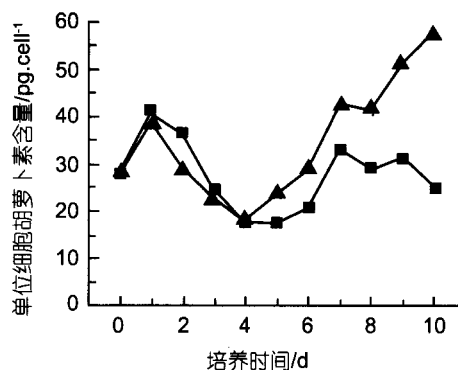


图5 盐藻生长过程中单位细胞胡萝卜素含量变化

Fig.5 Changes of carotene concentration in *D. salina* cell
—■— 3 mmol/L NaNO₃ —▲— 0.59 mmol/L NaNO₃

绿素比值随时间变化的趋势同单位细胞胡萝卜素变化相一致,培养初期呈降低趋势,到第4天后开始递增,高氮培养基中两者比值最高为6.58,低氮培养基中最高达12.3,是高氮培养基的两倍左右。培养过程中培养液胡萝卜素总量随时间的变化在两种条件下基本一致(图6),且均在第7天达最高,分别为 9.144 mg/L 和 9.048 mg/L 。由于高氮源提高了培养成本,所以实际生产中采用较低氮源更适宜。

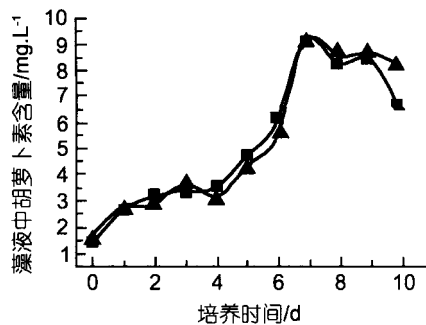


图6 培养过程中胡萝卜素总量随时间的变化

Fig.6 Changes of total carotene concentrations in the cultures of *D. salina*
—■— 3 mmol/L NaNO₃ —▲— 0.59 mmol/L NaNO₃

3 结论

氮浓度 3 mmol/L 培养基有利于盐藻细胞增值,

可较长时间保持较高比生长速率, 最终藻体浓度较大, 培养周期相对缩短; 氮浓度 0.59 mmol/L 培养基中比生长速率较低, 最终藻细胞浓度较小, 培养周期相对较长。高氮浓度培养基中藻细胞对氮源的利用高于低氮培养基。藻细胞的生长与氮源的利用呈正相关。

不同氮浓度培养基中藻细胞对磷源的利用基本相同, 初始氮浓度的不同并不影响磷的利用。

本实验两种不同氮浓度培养基中盐藻单位细胞叶绿素含量均为先升后降, 细胞胡萝卜素含量先降后升, 较低氮浓度培养基中单位细胞胡萝卜素含量高于较高氮浓度培养基, 培养过程中藻液总胡萝卜素含量差别不大。实际生产中建议采用较低氮源浓度。

参考文献

- 1 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 14-16
- 2 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社, 1980. 87-88, 338-339
- 4 T R 帕森斯著. 陈慈美, 陈于望译. 海水分析的化学和生物学方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1991. 24-27
- 3 Collas Y, et al. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 1999(11): 179-184
- 5 Jensen A. Chlorophylls and carotenoids. In: Hellebust J A, et al. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, 1978. 59-70

THE UTILIZATION OF NITRATE AND PHOSPHATE IN *Dunaliella salina* AND THE ACCUMULATIVE PROCESS OF CAROTENE

HAO Jian Xin SUN Yu CONG Wei CAI Zhao Ling

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Received: Oct., 29, 2001

Key Words: *Dunaliella salina*, Nitrate, Phosphate, β -carotene, Chlorophyll

ABSTRACT

The growth of *Dunaliella salina* and accumulation of pigments in two media of 3 mmol/L and 0.59 mmol/L nitrate concentration were examined. The utilizations of nitrate and phosphate were investigated with the growth of alga. It was shown that the higher nitrate concentration medium was favorable for the algal growth and the lower one was better for the accumulation of carotene. The utilization of nitrate lasted a longer period in 3 mmol/L nitrate concentration medium than that in the 0.59 mmol/L one. Cell growth was in accordance with the utility of nitrate. In both media the utilities of phosphate were almost the same. The both accumulations of chlorophyll increased first, but decreased afterwards and the trends of carotene were opposite. The total carotene concentrations in both media were almost the same.

(本文编辑: 张培新)