

有机物质对紫球藻生长的影响*

王明兹 庄惠如 陈必链 施巧琴 吴松刚

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要:研究了有机碳、氮源及 B 族维生素对紫球藻生长的影响。葡萄糖促生长作用最佳,添加 2%(W/V)葡萄糖时,藻细胞生长速度比对照组明显提高,培养 10d 收获的生物量增加 92.6%,培养液中的溶解氧含量和藻体叶绿素 a 含量也有变化。有机氮源的利用率低,仅蛋白胨、酵母汁可被利用。维生素 B₂ 和 B₁₂ 也有促长作用。

关键词:紫球藻,有机物质,生长

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-031-05

* 福建省计委、省自然科学基金资助项目

收稿日期:1999-12-02,修回日期:2000-01-29

EFFECT OF ORGANIC SUBSTANCE ON THE GROWTH OF *PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM*

WANG Ming-Zi ZHUANG Hui-Ru CHEN Bi-Lian SHI Qiao-Qin WU Song-Gan

(Bioengineering College of Fujian Teachers University, fuzhou 350007)

Abstract: The growth of *P. cruentum* when added organic carbon source, organic nitrogen source and group B vitamin into medium were investigated in the present work. Results showed that glucose promoted growth rate observably. When added 2% (W/V) glucose into the medium, the growth rate was doubled and biomass increased 92.6% to that of control after incubated 10 days. organic nitrogen source restrained the growth or harmed to *P. cruentum*. Vitamin B₂ and B₁₂ also promoted the growth rate.

Key words: *Porphyrididium cruentum*, Organic substance, Growth

紫球藻(*Porphyrididium cruentum*)是红藻门中的单细胞种类,常多个细胞聚生,细胞富含多糖、高度不饱和脂肪酸和藻胆蛋白等高价营养成份,尤其是花生四烯酸(AA)和二十碳五烯酸(EPA)含量高,在食品和医药工业上有很大开发价值^[1,2]。有机碳源对许多藻类都有促长作用,如Chen F等培养螺旋藻时加入2g/L葡萄糖可提高收获生物量^[3]。

国外已有关于利用光生物反应器培养紫球藻,生产高价医药产品的报道^[4]。但该法具有设备投资大、运转能耗高、生产周期长、生物量低、易污染杂菌等严重缺陷。开展微藻异养化研究,选育具有异养能力且可发酵生产的经济藻种,可望克服这些难题。我们拟通过细胞工程或基因工程技术选育异养化藻种,本文是筛选紫球藻异养化培养基的基础性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

紫球藻(*P. cruentum*)藻种由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库提供。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化方法:微生物平皿稀释涂布法。

1.2.2 培养方法:KOCH培养基为基本培养基^[1](固体培养基另加1.5%琼脂),固体平板于玻璃培养架上倒置培养,光照强度为800~1600lx(日光灯提供光源),温度为24℃±1℃。液体培养容器用300mL三角瓶,装量为100mL,接种后浓度为4×10⁵ cells/mL,振荡培养(振荡频率为90r/min),温度和光照同上。

1.2.3 细胞计数:采用血球计数板计数。

1.2.4 生长速度测定:用光吸收值变化表示生长。隔天定时取样用752-C型分光光度计测定波长为645nm的光密度值^[5]。

1.2.5 叶绿素a含量测定:取5mL藻悬液,4000r/min离心5min,细胞沉淀用90%丙酮抽提色素至藻体无色,抽提液用752型分光光度计测定光吸收值,根据有关公式计算叶绿素含量^[6]。

1.2.6 溶氧测定:每天定时用RSS-100型便携式测氧仪测定培养液中溶解氧含量。

2 结果与分析

2.1 藻种纯化

取处于对数生长期的藻种用平板稀释法涂布,培养约 15 d 后有可见藻落,分离生长较好的藻落,多次重复,直至分离藻种经细菌培养基鉴定无杂菌为止。

2.2 有机碳源对紫球藻生长的影响

KOCH 基本培养基中,溶解的 CO_2 是唯一碳源,设为碳源试验的对照组,试验组为 KOCH 中分别添加不同种类的有机碳源。分别接种紫球藻,然后按 1.2.2 方法振荡光照培养,各有机碳源加量及培养结果见表 1。结果表明,葡萄糖、蔗糖和乳糖等有机碳源对紫球藻有明显促生长作用,培养藻液分别为深红色、红色和淡红色,细胞干重分别比对照组提高 92.6%、60.3%和 19%。

对照组藻细胞以 CO_2 为碳源,通过光合作用合成有机物维持生长,延迟期长,生长缓慢,细胞浓度增加后阻碍光线通过,生物量低。而葡萄糖等有机碳源使紫球藻生长延迟期缩短,快速进入对数生长,生长速度快,生物量增加。

葡萄糖的促长效果最明显,分别在基本培养基中加入不同浓度葡萄糖,进一步试验不同浓度对紫球藻生长的影响。结果表明,1%~2.5%(w/v)浓度葡萄糖对紫球藻都有促长作用,浓度超过 1%~2.5%(w/v)后促长作用开始下降。从图 1 结果看,葡萄糖浓度为 2%(w/v)时作用效果最佳,故以下各试验培养基中均添加 2%葡萄糖。

叶绿素 a 是藻细胞光合作用的主要色素,培养液中溶解氧含量变化是光合作用与呼吸作用及环境综合作用的结果,紫球藻接种在加葡萄糖的培养液中,定时取样测定藻体叶绿素 a 与培养液溶解氧含量,结果见图 2。

表 1 有机碳源对紫球藻生长的影响

培养特征	乙酸钠 0.5g/L	丙酸钠 0.5g/L	葡萄糖 1.5g/L	蔗糖 1.5g/L	乳糖 1.5g/L	麦芽糖 1.5g/L	可溶性淀粉 1.5g/L	对照
生长状况	+	-	+++	++	++	+	+	+
培养物颜色	红	白	深红	红	淡红	淡红	红	红
生物量(g/L) *	0.583	0.130	1.073	0.893	0.663	0.477	0.537	0.557
细胞总数 $\times 10^5$ /mL **	2.23	0.029	3.21	3.11	2.70	2.32	2.72	2.58

* 培养第 10d, ** 培养第 7d

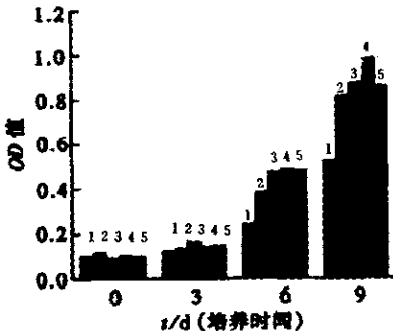


图 1 不同浓度葡萄糖对紫球藻生长的影响

1 0, 2 1%, 3 1.5%, 4 2%, 5 2.5%

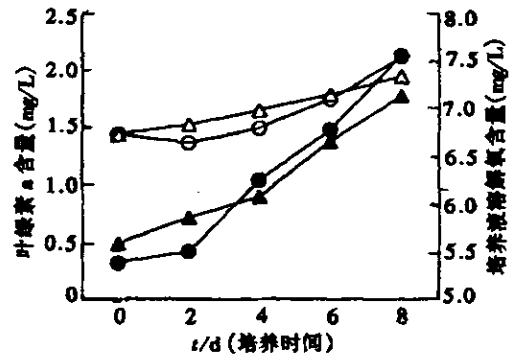


图 2 葡萄糖对紫球藻叶绿素 a 和溶氧的影响

(●—叶绿素 a 含量 ○—培养液溶解氧含量)

—▲—对照, —●—葡萄糖, —△—对照, —○—葡萄糖

图中结果表明:添加葡萄糖后藻细胞叶绿素 a 含量在培养前 2d 低于对照组,此后快速增加并超过对照组。培养液溶解氧含量变化曲线也反映该变化,添加葡萄糖后藻细胞的叶绿素 a 含量较低,光合作用较弱,故培养液中溶解氧含量低于对照组,最大幅度时比对照组低 41.8%;直至培养后期,随着叶绿素 a 含量增加,光合作用增强,溶解氧含量高于对照组,最大幅度可达 16.5%。

2.3 有机氮源对紫球藻生长的影响

KOCH 培养基中以 KNO_3 为氮源,以各种有机氮源替代(含氮量与 1g/L KNO_3 相等),接种后光照培养,比较有机氮源对紫球藻生长的影响,培养结果如表 2。藻细胞对有机氮源利用率稍低,仅酵母浸出液和蛋白胨可替代无机氮源。

酵母浸出液是紫球藻可利用的有机氮源,对其最适加量进行实验,各实验组培养液分别添加 1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L、4.0g/L、5.0g/L 和 6.0g/L 的酵母浸出液为氮源(对照组为无机氮源:1g/L KNO_3),接种后光照培养,定期测定生长指标。结果表明,酵母浸出液超过 6.0g/L 就对藻细胞生长有抑制作用,生长较适浓度为 4.0~5.0g/L。

2.4 维生素 B_1 、 B_2 和 B_{12}

在对照培养基中分别添加维生素 B_1 (200 $\mu\text{g/L}$)、 B_2 (5 $\mu\text{g/L}$)和 B_{12} (5 $\mu\text{g/L}$),比较它们对紫球藻生长的作用(见表 3)。结果表明,维生素 B_2 和 B_{12} 都促进生长,而维生素 B_1 的影响不明显。

表 2 有机氮源对紫球藻生长的影响

氮源	浓度 (g/L)	细胞数($\times 10^5$ cells/mL)				干重 (g/L)
		0d	3d	6d	9d	
KNO_3 (CK)	1.0	5.1	9.8	23	45	0.983
尿素	0.41	5.1	8	19	33	0.645
酵母浸出液	2.47	5.1	9	21	41	0.956
牛肉浸出液	2.23	5	7	13.5	17.5	0.237
蛋白胨	1.24	4.9	8.4	19.3	39.6	0.924
玉米浆	4.94	5.1	6.6	11	15	0.196

3 结果与讨论

葡萄糖、蔗糖、乳糖、乙酸钠等多种有机碳源都对紫球藻有促长作用,糖类化合物优于醋酸盐,尤其葡萄糖作用效果最佳,在光照培养时,添加葡萄糖后,藻细胞生长迅速,延迟期缩短,以混合营养型生长快速增殖,最终收获的生物量增加,葡萄糖的最适添加浓度为 2%(w/v)。

表 3 B 族维生素对紫球藻生长的影响

维生素	OD 值				干重 * (g/L)	细胞数 * ($\times 10^6$ cell/mL)
	0d	3d	6d	9d		
维生素 B_1	0.119	0.416	1.150	1.756	1.01	3.27
维生素 B_2	0.120	0.427	1.182	1.860	1.20	3.85
维生素 B_{12}	0.119	0.417	1.286	1.894	1.22	4.11
$B_1+B_2+B_{12}$	0.118	0.425	1.136	1.620	0.99	3.16
对 照	0.118	0.403	1.112	1.792	1.09	3.53

* 培养第 10d 测定

紫球藻利用葡萄糖进行混合型营养生长时,藻细胞的叶绿素 a 含量在生长初期下降,光合作用强度也较弱,而到培养后期叶绿素 a 含量逐渐超过对照组,光合作用也更强。可能培养基中高浓度有机物存在对叶绿素 a 合成和光合作用产生抑制,这有待更深入研究。因此,混合营养型生长并非自养生长与异养生长的简单加和。

无机氮盐(KNO_3)比有机氮盐更适于紫球藻生长需要;B族维生素是藻类培养时常用的生长因子,维生素 B_2 和 B_{12} 对紫球藻促生长作用较明显。

参 考 文 献

- [1] 华汝成. 单细胞藻类的培养和利用. 北京: 农业出版社, 1986.
- [2] 曹吉祥. 中国海洋药物, 1994(3): 55~56.
- [3] Chen F, Zhang Y M, Guo S Y. *Biotechnology Letter*, 1996, 18(3): 603~608.
- [4] Iqbal Mumammed J. *Ferment. Bioent*, 1993, 75(1): 76~78.
- [5] Pirt S J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.
- [6] 湛江水产学院. 海洋饵料生物培养. 北京: 农业出版社, 1983.