

激光对生产 β -胡萝卜素的藻种——盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)诱变的研究*

赵学武 王作芸 吴以平
(青岛海洋大学生物系, 266003)

张闻迪 邹建华
(青岛海洋大学物理系)

摘要: 用激光(335 nm, 0.014 MW/mm²)对产生 β -胡萝卜素的盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)进行了诱变研究, 藻的存活率为90%。诱导后筛选到三个盐生杜氏藻的品系。生长速度较原藻最高增加20%, 长度增加7.5%, β -胡萝卜素生产能力为0.48 mg·100 ml⁻¹天⁻¹, 比原藻增加19%。

关键词: 激光诱变, 盐生杜氏藻, β -胡萝卜素

Studies on laser-mutagenesis of β -carotene producer *Dunaliella salina*

Zhao Xuewu, Wang Zuoyun, Wu Yiping

(Department of Marine Biology, Ocean University of Qingdao)

Zhang Wendi, Zou Jianhua

(Department of Marine Physics, Ocean University of Qingdao)

Abstract: Laser-mutagenesis of β -carotene producer *Dunaliella salina* were investigated. The algal survival rate is above 90%. After mutagenesis three mutants were screened, in which the growth rate and length of alga were increased by 20% and 7.5% respectively as compared with the original *D. salina*. The productivity of β -carotene was 0.48mg·100 ml⁻¹·day⁻¹, and was increased by 19%.

Key words: laser, mutagenesis, β -carotene, *Dunaliella salina*

盐生杜氏藻是属绿藻门、团藻目盐藻科的单细胞藻类, 可生长在高盐度的盐湖和盐田中, 在体内能积累大量的 β -胡萝卜素。80年代初期, 在美国和澳大利亚等国, 已相继从养殖盐藻生产 β -胡萝卜素的科研阶段, 转入了商品性的生产^[2]。我国也正在开展生产规模的实验^[1]。因此, 对盐生杜氏藻藻种的筛选和培育, 选出适于我国气候和水域中生产用的优良品系, 以提高其产生 β -胡萝卜素的能力, 对在我国开展养殖盐藻生产 β -胡萝卜素的事业是有一定实用价值的。

激光已在育种方面作为诱变处理手段进行了应用, 并取得一定的效果。本文介绍应用激光对盐生杜氏藻进行诱变的实验结果。

收稿日期: 1990年10月12日; 修改稿收到日期: 1990年1月15日。

* 国家自然科学基金资助项目。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 藻种——盐生杜氏藻 (*Dunaliella Salina*) 用史继华老师从青岛海岸石沼中分离的藻种。

2. 培养液——每 1000 ml 海水中加 150 g NaCl, 2 mM KNO₃, 0.2 mM NaH₂PO₄ 和 5 mM NaHCO₃, 及 1 ml 微量元素混合液, 1 ml FeCl₃ 溶液, pH=7.5。

3. 激光源——用海洋大学物理系自行设计和安装的三倍频 YAG 脉冲激光器(见图 1)。

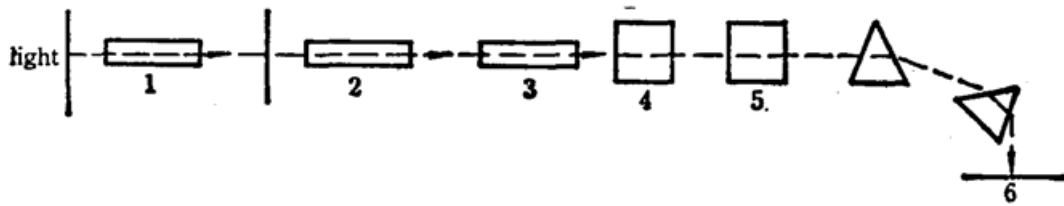


Fig. 1 Schematic diagram of laser irradiation

1-oscillator; 2-first amplifier; 3-second amplifier; 4,5 -KDP crystal; 6-stage

二、方法

1. 盐藻的培养——采用一次培养 (Bath Culture) 将盐藻接种于盛有 20 ml 培养液的 50 ml 的三角瓶中, 自春末至秋初期间, 在室外自然光下进行培养。

2. 激光处理——将培养的盐藻藻液离心浓缩 (R.P.M 500 时间 5 min), 取藻液浓缩液滴在小玻片上, 每片约 100 滴, 每滴约 0.005 ml, 用激光照射处理。预先分别用不同激光强度照射, 根据在显微镜下现场观察的结果, 以致死量 10% 左右的激光功率, 作为激光处理强度 (λ 为 355 nm, 脉冲宽度 10 ns, 激光功率密度为 0.014 MW/mm²)。经激光照射后, 分别将各小滴用培养液冲洗至各个三角瓶中, 进行培养。

3. 诱变种的挑选和培育——利用显微操作, 挑选经过激光诱变处理后培养的藻液中的藻体个体大, 而且黄色较深的单个细胞, 移入培养的三角瓶中, 进行单克隆培养。

4. 生长速度的测定——盐藻的生长速度以藻液在 700 nm 和光径 10 mm 的光密度表示, 应用 751 G 型分光光度计测定。在预备实验中, 证实在 700 nm 下盐藻藻液的 OD 值与用血球计数板计数之间有较好的线性关系, 回归方程为:

$$Y = 1.4995 \times 0.01660$$

5. 胡萝卜素含量的测定——取 15 ml 藻液, 经 1.2 μ m 微孔滤膜抽滤, 将藻体加丙酮研磨提取, 离心取上清液, 再用丙酮重复提取滤渣一次至二次, 直至藻渣呈灰白色为止, 将上清液合并, 定容至 50 ml, 以 751 G 分光光度计测 450 nm 的 OD 值, 按 Jensen^[3]公式换算出相应的胡萝卜素含量。

结 果 和 讨 论

一、激光对盐藻生长的抑制现象

经过激光照射后培养的盐藻, 初期表现出生长停滞的现象, 经过 6 天后, 才表现出正常的

生长(见图 2), 而前二天的结果, 光密度不但不增反而略有下降, 证明仍有藻体继续死亡, 随后进入受伤恢复阶段, 光密度值趋于稳定。约一周后才恢复正常的生长能力, 光密度值呈现稳定增加。Ramabhadran 等(1976)^[4]曾发现近紫外光的辐射能抑制 *E. coli* 的生长和 RNA 的合成, 因之, 355 nm 激光对盐藻的生长所表现的抑制作用, 其机理可能与近紫外光对 *E. coli* 的抑制现象相同, 除引起部分细胞死亡之外, 对另一些未致死的细胞也发生了抑制作用, 尤以初期阶段更为明显。

二、盐藻的突变体

从经过激光处理后培养 20 天后的盐藻培养液中, 用显微操作挑选出个体较大而且黄色较深的单个藻体, 进行单克隆培养, 得到了在 β -胡萝卜素含量和生长速度等指标方面有显著变异的盐藻品系——激 1、激 2 和激 3。

尽管本实验所选用的诱导激光的波长是 355 nm, 处在蛋白质和 DNA 吸收区的边缘, 但也同样会引起 DNA 的破坏作用, Terrell 等用 365 nm (与本实验的 355 nm 波长相近) 照射细菌, 引起 DNA 产生胸腺嘧啶二聚体, 还能产生 DNA 链的断裂和碱性不稳定链^[5]。由此可见, 采用 355 nm 激光照射, 引起个别盐藻细胞发生突变的可能性是存在的, 与经过诱导后筛选出突变品系盐藻激 1、激 2 和激 3 的结果相一致。

三、盐藻突变体的生长速度和胡萝卜素的生产能力

1. 生长速度: 将筛选出的盐藻激 1、激 2 和激 3 的突变品系, 与未经激光处理的对照, 分为四组, 每组二个重复, 进行接种培养, 每二天测定一次光密度, 进行生长测量, 结果见图 3。激 1

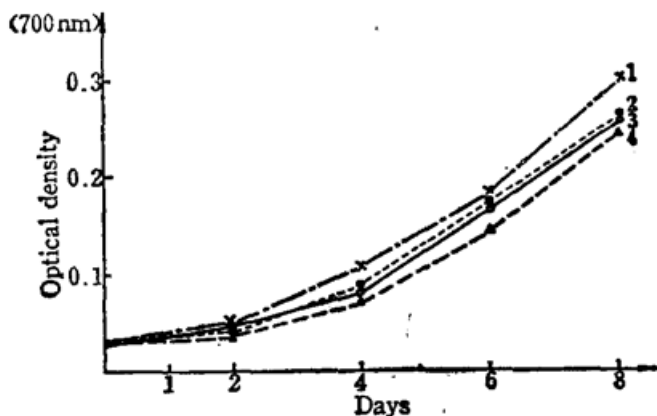


Fig. 3 Growth curve of *D. salina* of mutants

1—L₁; 2—L₃; 3—L₂; 4—Control

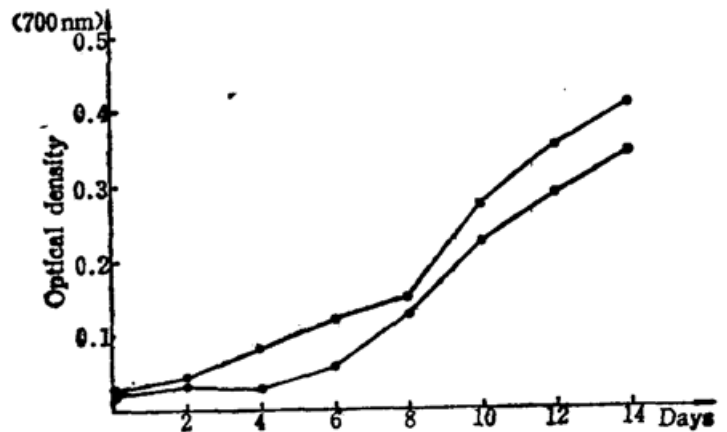


Fig. 2 Growth rate of *D. salina* after laser irradiation

●—control; ○—treatment

品系的生长速度最快, 8 天后约比对照的生长增加约 20%, 其次是激 3 比对照增加约 10%, 激 2 增加最少。

2. 藻体长度: 在显微镜下分别对对照、激 1、激 2 和激 3 随机取样 20 个, 测定其长径和宽径的长度, 统计结果见表 1。

经激光诱导的突变子激 1、激 2 和激 3 与对照的藻体长度进行比较, 其中以激 3 为最大, 长径约比对照增加 7.5%, 宽径增加 13.1%, 激 1 次之, 激 2 增加最小。盐藻藻体的体积因生长发育时期和环境条件的

不同而会表现出一定的差异, 但本实验是在相同的时间和相同组成的培养液条件下进行的, 因之, 对诱导的突变体与对照的长度的不同这一比较结果, 客观地反映了真实差别。

不仅突变体的不同品系和对照的藻体长径和宽径有一定差别, 而且长径和宽径之比也存在一定的差异。

Table 1 Length and content of carotene of *D. salina* mutant

Item	Length (μm)				Content of carotene ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt.)	
	Length		Wide		Average	P
	Average	P	Average	P		
Control	17.4		11.4		6.13	
L ₁	18.4	>0.05	12.6	<0.05	6.27	<0.05
L ₂	17.6	<0.05	11.9	>0.05	6.18	<0.05
L ₃	18.7	<0.05	12.9	<0.01	6.32	<0.05

3. 生产胡萝卜素的能力: 对突变子和对照的藻进行培养 12 天后, 分别测定其胡萝卜素含量, 结果见表 1。

从生产的角度筛选较优的盐生杜氏藻品系, 决定于二个因子: 一是藻体积累胡萝卜素的能力, 亦即藻体的胡萝卜素含量; 另一是藻体的生长速度。较优的品系不仅是含胡萝卜素的量高, 而且生长也较迅速。因之, 通过养殖实验的对比, 选出单位时间和单位水体生产胡萝卜素最高的品系, 是最优的品系。激 1、激 2 和激 3 产生 β -胡萝卜素的能力分别为 0.48, 0.41 和 0.47 $\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}\cdot\text{天}^{-1}$, 因之, 以激 1 为最优, 激 3 次之, 激 2 只略比对照 ($40\text{mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}\cdot\text{天}^{-1}$) 高一些, 最次。关于盐藻生产胡萝卜素的能力以及其体内胡萝卜素含量, 根据国外已有的正式报道, 含量最高是 8%, 产量是 $800\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{天}^{-1}$, 由于养殖条件和环境因子等的不同, 难于同其进行严格的比较, 但从筛选的实测结果, 在青岛地区分离出的藻种并经过诱导筛选出的品系, 具有养殖的条件, 应进一步在开放的养殖池中继续进行筛选和培育。

在正常的生活环境中, 盐藻以纵向无丝分裂进行繁殖。分裂速度约为 24 h 一次, 因此, 当通过激光照射后进行培养的期间, 经激光诱导产生的突变体, 以及未变的藻体, 均已在繁殖和传代, 所以, 通过显微操作所分离出的体形大和黄色深的藻体个体, 已经经过了传代过程, 经过单克隆的培养后, 已是诱变后的突变品系。

也正是由于藻体的迅速分离和繁殖的特点, 使得进行统计诱变的频率较为困难, 无法求得实验进行的诱变率。

参 考 文 献

- 1 赵学武, 海洋药物, (3), 48~53(1986)
- 2 Curtain *et al.*, *Aust. J. Biotech.*, 1(3), 51~57(1987)
- 3 Jensen A., In *hellebast. J. A., Craigie. J. S.*, (eds.). *Handbook of phycolgical methods*, 1978, p. 65. Cambridge University Press, Cambridge
- 4 Ramabhadran T. V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 59~63(1976)
- 5 Terrell R. M. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 20, 395~398(1974)