

{研究简报}

## 雨生红球藻培养基的改良\*

邱保胜 刘其芳

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### AN IMPROVEMENT ON THE GROWTH MEDIUM FOR *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Qiu Baosheng and Liu Qifang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**关键词** 雨生红球藻, 培养基, 缓冲体系, 磷酸盐, 甘氨酰甘氨酸

**Key words** *Haematococcus pluvialis*, Medium, Buffer, Phosphate, Glycylglycine

近年来, 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* Flot et Will)作为一种获取天然虾青素的资源被广泛重视<sup>[1,2]</sup>。目前, 有关雨生红球藻的研究主要集中于虾青素的积累机制、合成调控及其生物学功能<sup>[1]</sup>。关于雨生红球藻生长调控方面的工作报道较少, 还没有一个很理想的红球藻培养基<sup>[3]</sup>, 从而在很大程度上阻碍了对雨生红球藻的深入研究与开发利用。雨生红球藻尤其是它的绿色游动细胞对环境pH值的改变较敏感, 其生长状况与培养液的pH稳定性关系密切<sup>[4,5]</sup>, 而目前较多采用的MCM、BBM和BG-11培养基都存在着缓冲能力过弱的问题<sup>[5]</sup>。McLachlan曾试图将Tris引入ASMG培养基以增强其缓冲能力, 但效果不佳<sup>[6]</sup>。为此, 作者研究了磷酸盐( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}-\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )和甘氨酰甘氨酸缓冲体系对雨生红球藻生长的影响, 以期实现两者优势互补。

#### 1 材料与方法

1.1 材料 雨生红球藻(*H. pluvialis*-6B)采自江苏镇江, 在本实验室分离纯化, 每次以绿色游动细胞接种。

1.2 培养条件 培养温度22℃; 光照强度 $70\mu\text{mol} \cdot \text{quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 24h连续光照; 静止培养。

1.3 生长测定 以单位体积培养物叶绿素含量作为生长指标, 叶绿素测定采用丙酮提取<sup>[7]</sup>。

1.4 pH测定 采用精密pH试纸测定。

1.5 磷酸盐缓冲体系对*H. pluvialis*-6B生长的影响 以SM<sup>[8]</sup>培养基中的磷酸盐缓冲体系( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}-\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )为基准, 即 $26.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}, 6.60\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 为P。当浓度分别为 $6.5, 1.65\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}, 13.0, 3.30\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}, 19.5, 4.95\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}, 26.0, 6.60\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

\* 国家自然科学基金(No.39570086)资助。

1) 邱保胜, 刘其芳。红球藻研究进展。水生生物学报待发表。

1998-04-01收到; 1999-04-18修回

时代表磷酸盐缓冲体系的量为  $1/4P$ 、 $1/2P$ 、 $3/4P$  和  $P$ 。比较 A(表示 ASMG<sup>[6]</sup>培养基)、S'(表示 SM 培养基中不含  $NaAc \cdot 3H_2O$  与  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O - K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) 和 AS'(表示 ASMG 与 S' 1:1 混合) 中磷酸盐缓冲体系的加入量( $1/4P$ 、 $1/2P$ 、 $3/4P$  和  $P$ )对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响,每水平两个重复。

**1.6 甘氨酸酰甘氨酸与磷酸盐缓冲体系对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响** 比较 A'(表示 ASMG 培养基中不含甘氨酸酰甘氨酸)和 A'S'(表示 A' 与 S' 以 1:1 混合)中 G(表示 ASMG 培养基中的甘氨酸酰甘氨酸,  $10\text{mmol} \cdot L^{-1}$  时为 +G,  $5\text{mmol} \cdot L^{-1}$  时为 +1/2G, 不加入以-G 表示)的加入与否及磷酸盐缓冲体系( $3/4P$  和  $P$ )对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响,每水平两个重复。

**1.7 实验数据分析** 数据处理采用方差分析和最小显著差数法(LSD)的多重比较,对稳定期单位体积培养物叶绿素含量进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷酸盐缓冲体系对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响

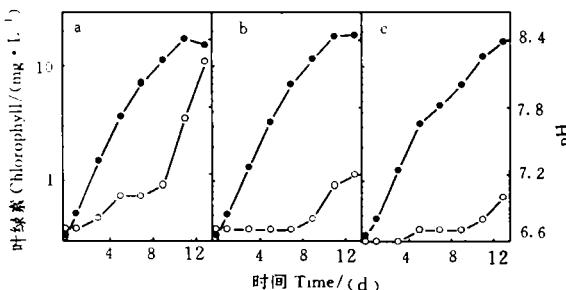


图1 培养基A中磷酸盐缓冲体系对pH值和*H. pluvialis*-6B生长的影响

Fig.1 Effects of phosphate on the pH value and growth of *H. pluvialis*-6B in A.

●—● 叶绿素 ○—○ pH a. A+1/2P b. A+3/4P c. A+P

图1和图2所示:在A中(因水槽有限,故仅做磷酸盐缓冲体系为 $1/2P$ 、 $3/4P$ 和 $P$ 三个水平,各一个重复),当磷酸盐缓冲体系为 $1/2P$ 时培养液的pH值在接种后第9d有较大幅度上升,单位体积培养物叶绿素含量在接种后第12d也相应有所下降;当磷酸盐缓冲体系为 $3/4P$ 和 $P$ 时,*H. pluvialis*-6B在培养全过程中,培养液pH值上升幅度较前者小,*H. pluvialis*-6B的生长未出现受抑制现象。在S'中,当磷酸盐缓冲体系为 $1/4P$ 时,培养液pH值在接种后第5d急剧上升至8.2,*H. pluvialis*-6B的生长也相应受到抑制;当磷酸盐缓冲体系为 $1/2P$ 、 $3/4P$ 和 $P$ 时,培

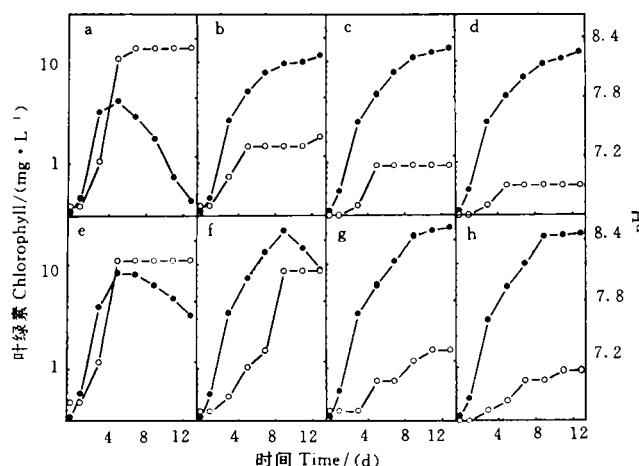


图2 培养基 S' 和 AS' 中磷酸盐缓冲体系对 pH 值和 *H. pluvialis*-6B 生长的影响

Fig.2 Effects of phosphate on the pH value and growth of *H. pluvialis*-6B in S' and AS'

图例同图1注 a. S' + 1/4P b. S' + 1/2P c. S' + 3/4P d. S' + P e. AS' + 1/4P

f. AS' + 1/2P g. AS' + 3/4P h. AS' + P

养液的 pH 值始终稳定在 6.9 至 7.4 之间, 培养后期 *H. pluvialis*-6B 的生长未出现受抑制现象; *H. pluvialis*-6B 的生长在磷酸盐缓冲体系为 3/4P 时较其它水平条件下好。在 AS' 中, 当磷酸盐缓冲体系为 1/4P 和 1/2P 时, 培养液的 pH 值在培养过程中均变化较大, 分别上升至 8.2 和 8.1, *H. pluvialis*-6B 的生长也相应受到抑制, 只是当磷酸盐缓冲体系为 1/4P 时 *H. pluvialis*-6B 的生长受抑制出现得早; 当磷酸盐缓冲体系为 3/4P 和 P 时, *H. pluvialis*-6B 生长过程中培养液的 pH 值变动较小, 培养后期内未出现生长受抑制现象; *H. pluvialis*-6B 的生长在磷酸盐缓冲体系为 3/4P 时也较其它水平好。

对实验数据进行方差分析表明: 培养基类型 (A、S' 和 AS') 与磷酸盐缓冲体系的加入量 (1/4P、1/2P、3/4P 和 P) 对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响均具有极显著差异 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ )。由于磷酸盐缓冲体系为 1/4P 和 1/2P 时, *H. pluvialis*-6B 的生长在培养后期通常受抑制, 故在此未对磷酸盐缓冲体系与其生长间的关系作多重比较。对三种培养基进行多重比较表明: 在采用磷酸盐作缓冲体系后, AS' 最有利于 *H. pluvialis*-6B 生长, A 其次, S' 最差。A 和 AS' 均较 S' 有利于 *H. pluvialis*-6B 生长, 很可能是由于两者中都存在有甘氨酰甘氨酸的缘故。

## 2.2 甘氨酰甘氨酸与磷酸盐缓冲体系对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响

图 3 所示: 当磷酸盐缓冲体系为 3/4P 和 P 时, *H. pluvialis*-6B 生长过程中培养液的 pH 值均较稳定; 当有甘氨酰甘氨酸存在时, *H. pluvialis*-6B 在两种培养基中的生长状况均优于无甘氨酰甘氨酸存在时的状况。对实验数据进行方差分析表明: 两种培养基 (A' 和 A'S') 之间, 甘氨酰甘氨酸的加入与否及磷酸盐缓冲体系的量 (3/4P 和 P) 对 *H. pluvialis*-6B 生长的影响均具有极显著差异 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ )。多重比较表明, A'S' 较 A' 更有利于 *H. pluvialis*-6B 生长; 甘氨酰甘氨酸的加入促进 *H. pluvialis*-6B 生长; 而磷酸盐缓冲体系为 3/4P 时较 P 时更适合 *H. pluvialis*-6B 生长。故作者认为培养基 A'S' + 3/4P + 1/2G 较适合于 *H. pluvialis*-6B 生长。当接种浓度为  $0.1192 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  叶绿素, 培养条件为  $22^\circ\text{C}$ 、 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、连续光照、静止培养时, 在该培养基中 *H. pluvialis*-6B 的加倍时间为 18.8h(以叶绿素为基准)。雨生红球藻细胞数的加倍时间与叶绿素、蛋白质及干重的加倍时间存在较大差异, 如: 在相同的培养条件下 ( $22^\circ\text{C}$ 、 $130 \mu\text{mol} \cdot \text{quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、改良 BG-11 培养基中以  $1.5\%$   $\text{CO}_2$  充气培养), 雨生红球藻细胞数、叶绿素、蛋白质和干重的加倍时间分别为 14.4、25.7、28.9 和 34.7h<sup>[9]</sup>。尽管

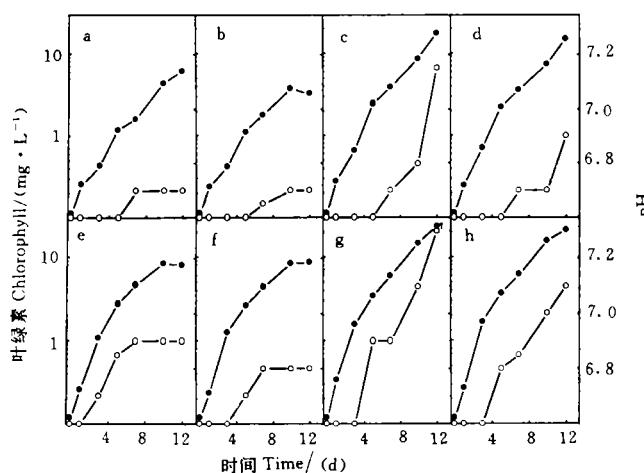


图 3 培养基 A' 和 A'S' 中甘氨酰甘氨酸与磷酸盐缓冲体系对 pH 值和 *H. pluvialis*-6B 生长的影响

Fig. 3 Effects of glycylglycine and phosphate on the pH value and growth of *H. pluvialis*-6B in A' and A'S'

图例同图 1 注 a. A' + 3/4P - G b. A' + P - G c. A' + 3/4P + G d. A' + P + G e. A'S' + 3/4P - G

f. A'S' + P - G g. A'S' + 3/4P + 1/2G h. A'S' + P + 1/2G

*H. pluvialis*-6B 在 A' S' + 3/4P + 1/2G 培养基中的生长速度(叶绿素加倍时间 18.8h)略慢于其他研究者以细胞数为基准各自得出的雨生红球藻的最快生长速率( $0.054\text{h}^{-1}$ <sup>[9]</sup>,  $0.97\text{d}^{-1}$ <sup>[3]</sup>, 分别相当于加倍时间为 12.9 和 17.3h), 但是鉴于以上原因及实验材料等的差异性, 本实验结果仍有力地表明: A' S' + 3/4P + 1/2G 能较好地满足 *H. pluvialis*-6B 的营养需求。

在 ASMG 培养基中, 甘氨酰甘氨酸原本用作缓冲剂, 迄今未见甘氨酰甘氨酸促进红球藻生长的报道。本实验结果清晰表明, *H. pluvialis*-6B 的生长在有甘氨酰甘氨酸存在的情况下得到显著改善, 但甘氨酰甘氨酸促进 *H. pluvialis*-6B 生长的机理尚不清楚。在乙醇酸途径中, 有一中间产物甘氨酸, 培养基中的甘氨酰甘氨酸是否与之有关, 尚不得而知, 这无疑值得今后深入探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Grung M, D'Souza F M L, Borowitzka M et al. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.*, 1992, 4:165—171
- [2] Johnson E A, An G H. Astaxanthin from microbial sources. *Crc. Crit. Rev. Biotechnol.*, 1991, 11:297—326
- [3] 金传荫、宋立荣、刘永定等. 红球藻水生 748 株营养需求的研究. 水生生物学报, 1996, 20: 293—296
- [4] Proctor V W. Preferential assimilation of nitrate by *Haematococcus pluvialis*. *Am. J. Bot.*, 1957, 44:141—143
- [5] 邱保胜、刘其芳. 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*-6B) 培养条件研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 1999, 33(1): 112—118
- [6] McLachlan, J. Some effects of tris(hydroxymethyl) aminomethane on the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Can. J. Bot.*, 1963, 41:35—40
- [7] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1949, 24:1
- [8] Sager R, Granick S. Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1953, 56:831—838.
- [9] Lu F, Vonshak A, Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 1994, 30:829—833.