

两株钝顶螺旋藻紫外诱变株的特征

李建宏 郑 卫 倪 霞 翁永萍 潘 欣 浩云涛

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 采用紫外诱变的方法筛选获得了两株优良的稳定钝顶螺旋藻突变株 M1-3 和 M5-1。与出发株相比, M5-1 较粗大, M1-3 较细, 但很长, 藻体螺旋数超过 40; 两株突变株的生长速度和光合放氧速率均有显著提高; M1-3 的藻蓝蛋白含量高于出发藻株 20.2%; 突变株的长碳连不饱和脂肪酸含量高于出发藻株, 总脂中 M1-3 含花生四烯酸(20:4) 4.93%、M5-1 含 EPA(20:5) 2.49%。两株突变株对 NH_4^+ 和 Zn^{2+} 的抗性也发生了改变。

关键词: 钝顶螺旋藻; 紫外诱变; 藻蓝蛋白; 不饱和脂肪酸

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)05-0486-05

螺旋藻因其含有丰富蛋白质、不饱和脂肪酸、各种维生素等多种营养成分而具有极高的营养价值^[1]。同时螺旋藻也因其含有多种生物活性物质, 而具有促进免疫、抗癌、降血脂、减肥等临床疗效^[2]。螺旋藻的培养和利用在国内外已形成相当规模的产业。对于螺旋藻生产而言, 优良的藻种是必须的。不同的生产藻种不但生长速度不同, 其组成成分也会有一定的差异^[3]。生产中不仅要获得高产量, 还需要较高的生物活性物质的含量。目前大多数生产厂采用的藻种多为从自然界直接分离获得, 应用人工诱变获得优良藻种的方法开展得还很少, 仅有少数化学诱变的工作^[4], 尚未见应用紫外线对螺旋藻进行诱变育种的报道。本文探索了应用简便的紫外诱变方法, 获得优良螺旋藻种的途径。

1 材料及方法

1.1 藻种及培养基 藻株为钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* Geitl), 所用液体培养基为常用的 Zarrouk 培养基, 固体培养基中加入 2% 琼脂。

1.2 紫外诱变及变异株筛选 将螺旋藻丝用超声波破碎仪破碎成单细胞后, 用普通的 20W 紫外灯照射诱变, 诱变后涂布于平板培养基上, 置上 40W 日光灯下培养。30d 后, 从平板上生长出的藻落中, 在显微镜下用毛细管分离出形体较大的变异藻株进行培养。

1.3 生长及光合放氧测定 藻浓度用分光光度计测定, 测定波长为 560nm; 光合放氧用薄膜氧电极法测定^[5]。

收稿日期: 2000-02-01; 修订日期: 2000-07-15

基金项目: 江苏省教委自然科学基金资助(98KJD180002)

作者简介: 李建宏(1963—)男, 浙江省温岭县人; 博士, 副教授; 藻类生理及环境微生物。参加本文工作的还有谢砥、姚莉、丰英、张霞。

1.4 脂肪酸及藻蓝蛋白测定 过滤收取藻体, 经过氯仿萃取、甲醇酯化后, 用高压气相色谱法测定脂肪酸; 总蛋白采用凯氏定氮法; 藻蓝蛋白含量测定用 Siegelman^[6]的方法。

2 结果和讨论

2.1 突变株形态特征的改变

经过紫外诱变后, 诱变出了几十株突变株, 它们与出发藻株的形态明显不同。经反复筛选纯化, 获得两株藻体较大, 形态与出发藻株有明显差异的突变株: M1-3 和 M5-1。M1-3 的形态特点是细而长。藻丝直径、螺旋直径均显著小于出发藻株。但其长度远远比出发藻株长得多, 其螺旋数目可达 100 个以上; M5-1 显得比原始株粗壮, 藻丝直径和螺旋直径均明显比原始藻株粗。表 1 所列两株突变株与出发株形态特征上的差异。这两株突变株经过两年多的继代培养, 藻体形态保持稳定, 表明这是两株稳定的突变株。螺旋藻形态的大小是与生产密切相关的参数。较大的形体使藻体更容易被过滤收获。突变株 M5-1 的粗大和 M1-3 加长都是理想的特征。尤其是 M5-1 的特性更优良。

表 1 突变株与出发藻株形态特征的比较

藻株	藻丝直径(μm)	螺旋直径(μm)	螺距(μm)	每条藻丝螺旋数(个)
Strain	Filament diameter	Spiral diameter	Spiral span	Spiral number
出发藻株	12.8	89	128	4~8
M1-3	6.3	38	62	40~120
M5-1	15.2	115	152	4~9

注: 表中所列数据为 20 条藻丝的平均值

2.2 突变株生长速度和光合作用速率的改变

两株突变株不但在形态上与原始株有明显的差异, 其生长速度也发生了变化。M1-3 和 M5-1 的生长速度都高于出发藻株(图 1)。

两株突变株光合作用速率也有不同的提高, M1-3 的光合放氧速率比出发藻株高 8.9%, M5-1 的光合放氧速率也比出发藻株提高 7.0%(表 2)。

表 2 突变株与出发藻株光合放氧速率

藻株	光合放氧速率(μmol/μg chl. min)
Strain	Photosynthetic O ₂ evolution
出发藻株	0.0157
M1-3	0.0171
M5-1	0.0168

较高的生长速度是获得高产的前提, 从生长曲线和光合作用速率来看, 两株突变株的生长速率均高于出发藻株。尤其是 M1-3 无论是光合作用速率还是生长速度均有较大的提高。因此, 从获得较高产量的

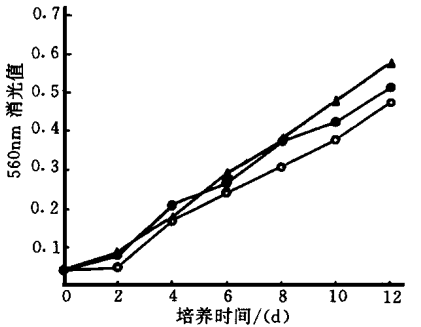


图 1 出发藻株和突变株的生长曲线
Fig. 1 The growth curves of parent strain and two mutants.
—○—出发藻株 —●—M1-3 —▲—M5-1

角度来看 M 1- 3 较好。

2.3 突变株生化组成的变化

藻蓝蛋白是螺旋藻重要的组成成分之一。许多研究表明该物质具有促进免疫、抗癌以及血细胞再生等临床疗效。藻蓝蛋白也被提取用作天然蓝色素。因此, 较高藻蓝蛋白含量的螺旋藻具有更高的商品价值。尽管突变株蛋白质总含量并未发生明显改变, 但藻蓝蛋白的相对含量却发生了一定的变化。在同等培养条件下, M1- 3 的藻蓝蛋白相对含量比出发藻株提高了 20. 2%。但 M5- 1 的藻蓝蛋白含量与出发株含量差别不大。

表 3 突变株与出发藻株藻胆蛋白含量

藻株	蛋白质(%干重)	藻蓝蛋白含量(%干重)
Strain	Protein	Phycocyanin
出发藻株	66. 1	10. 75
M1- 3	65. 7	12. 92
M5- 1	64. 9	9. 86

表 4 诱变株与出发藻株不饱和脂肪酸组成

不饱和脂肪酸	出发藻株	M1- 3	M5- 1
Unsaturated fatty acid	Parent strain		
油酸(18: 1)	—	1. 38	11. 98
亚油酸(18: 2)	10. 35	0. 9	—
γ - 亚麻酸(18: 3)	31. 15	11. 53	4. 97
花生四烯酸(20: 4)	—	4. 93	0. 29
EPA(20: 5)	—	0. 89	2. 49

表 4 所示为出发藻株和两株诱变株不饱和脂肪酸的相对含量。出发藻株中亚油酸和 γ - 亚麻酸有相对高的含量, 二者之和占总脂的 41. 5%, 这一结果与过去的报道相似。但两株突变株的不饱和脂肪酸组成有了较大的变化, 在 M1- 3 中, 亚油酸和 γ - 亚麻酸的相对含量明显下降, 但花生四烯酸的含量有较高的积累, 同时也检出有少量的 EPA; 在 M5- 1 中, γ - 亚麻酸含量大大减少, 亚油酸的含量已低到难以检出, 但油酸和 EPA 的含量却有明显的增加。这一结果说明, M1- 3 和 M5- 1 的突变已使控制脂肪酸合成的酶系统发生了一定的变化。长碳链的多不饱和脂肪酸是一类重要营养物质, DHA 和 EPA 具有提高人体免疫机能、促进婴幼儿、防治心血管疾病等功效。螺旋藻中含有较多的 γ - 亚麻酸, 一些新筛选获得的品系也是富含此类不饱和脂肪酸^[7], 但在过去的文献中尚未见螺旋藻含有长碳链多不饱和脂肪酸的报道。通过诱变, 螺旋藻突变株产生了一定量的 DHA 和 EPA, 无疑大大提高了螺旋藻的营养保健价值。通过进一步诱变筛选工作, 将获得更高含量的 DHA、EPA 藻种。

2.4 突变株对环境有毒离子的抗性

2.4.1 对 NH₄⁺ 的抗性 对环境有毒物质的抗性也是藻株生理特征的一方面。一定浓度的 NH₄⁺ 对螺旋藻有毒害作用, 从图 2 中的生长曲线可见, 在 10mmol/L NH₄⁺ 存在下,

出发藻株不能生长。而突变株对 NH_4^+ 的抗性有明显的提高, 在相同浓度 NH_4^+ 存在时, M5-1 可缓慢生长, M1-3 却有相对高的生长速率。

2.4.2 对 Zn^{2+} 的抗性 诱变株对重金属 Zn^{2+} 的敏感性也发生了不同的变化(图3)。出发株在 1.0mmol/L Zn^{2+} 存在时, 生长速度虽然受到一定的抑制, 但它仍可保持缓慢生长; M5-1 虽然在接种的前 48h 内生长速度比原始藻株慢, 但在接种后 2—4d 内却快速生长, 4d 后生长速度又减缓。因此总体上看 M5-1 对 Zn^{2+} 的抗性略强于出发藻株; M1-3 在接种后的前 6d 中, 一直保持相对较高的生长速度, 但 6d 后藻体却开始死亡。因此, 总体来看 M1-3 对 Zn^{2+} 的抗性低于原始藻株。

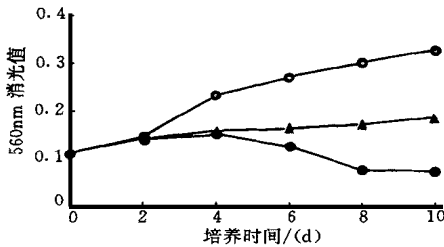


图2 突变株和出发藻株在 10mmol/L NH_4^+ 下的生长曲线

Fig.2 The growth curves of parent strain and two mutants under 10mmol/L NH_4^+

●—出发藻株 ○—M1-3 ▲—M5-1

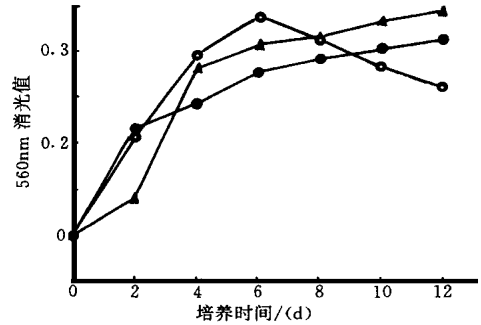


图3 突变株和出发藻株在 1.0mmol/L Zn^{2+} 下的生长曲线

Fig.3 The growth curves of parent strain and two mutants under 1.0mmol/L Zn^{2+} .

●—出发藻株 ○—M1-3 ▲—M5-1

螺旋藻是具有重要经济价值的藻类, 应用螺旋藻处理废水, 既可达到治理废水的目的, 又可收获藻体作为珍稀动物的饲料, 或作为提取精细化工产品和生物活性物质的原料, 使废物资源化。在废水中往往含有各种对藻类生长的有毒物质, 因此, 提高对环境有毒物质的抵抗能力, 对螺旋藻应用于废水处理十分重要。铵离子和锌离子都是废水中常见的有害离子, 突变藻株对这些有害离子抗性的提高, 使它们更能适用废水的处理。

综观上述获得的实验结果可见, 运用简便的紫外诱变方法获得的 M1-3 和 M5-1 均为较具有优良特性的藻株, 可用于生产。综合形态大小、生长速度和生化组成的特点, M1-3 相对更优良。

参考文献:

- [1] Henrikson R. Earth food: *Spizulina*. Ronore Enterprises, Inc. Laguna Beach, California. 1989, 25—42
- [2] Belay A, Ota Y, Miyakawa K, et al. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina* [J]. *J Appl Phycol*, 5: 235—241
- [3] Fatma T, Sarada R, Verkatarman L V. Evaluation of selection of *Spirulina* for their constituents [J]. *Phykos*, 1994, 33: 89—97
- [4] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社. 1999, 277—316

- [5] 李德耀, 叶继宇. 薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定[J]. 植物生理通讯, 1980, (1): 35—39
- [6] Siegelamen H W, Kycia J H. Alga biliprotein, Handbook of Phycological Method [M]. London: Cambridge University Press. 1978, 72—78
- [7] Cohen Z, Reungjitchachawali M, Siangdung W, et al. Herbicide resistant lines of microalgae: Growth and fatty acid composition [J]. *Phytochemistry*, 1993, **34**(4): 973—978

CHARACTERISTICS OF TWO *SPIRULINA PLATENSIS* MUTANTS INDUCED BY ULTRAVIOLET

LI Jianhong, ZHENG Wei, NI Xia, WENG Yongping, PAN Xin and HAO Yuntao
(Bioscience college, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: *Spirulina platensis* was induced by ultraviolet irradiation as a mutagen. Two good mutants, M1—3 and M5—1, were selected. M5—1 was bigger than PS (Parent Strain), and M1—3 was thinner and much longer with its spiral number of one filament being over 40; The growth and photosynthetic O₂ evolution rates of two mutants were higher than those of PS obviously. Phycocyanin content in M1—3 was 20.2% higher than those of PS. The two mutants had more long carbon chain polyunsaturated fatty acids. The M1—3 contained 4.93% arachidonic acid(20:4), and M5—1 contained 2.49% EPA (20:5) in the total fat. The antitoxic abilities of two mutants to toxic ions, NH₄⁺ and Zn²⁺ were different from PS also.

Key words: *Spirulina platensis*; Ultraviolet induce; Phycocyanin, Unsaturated fatty acid