

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, 其螺旋数目可多达 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 所列为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

Tab. 1 Characteristics of two mutants and their parent strain

藻株 Strain	藻丝直径(μm) Filament diameter	螺旋直径(μm) Spiral diameter	螺距(μm) Spiral span	每条藻丝螺旋数(个) 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

Tab. 2 Photosynthetic O₂ evolution of two mutants and the parent strain

藻株 Strain	光合放氧速率(μmol/μg chl. min) 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

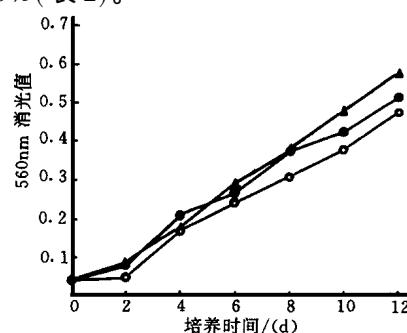


图 1 出发藻株和突变株的生长曲线

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, M 1- 3 的藻蓝蛋白相对含量比出发藻株提高了 20.2%。但 M 5- 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

Tab. 3 The content of phycocyanin of two mutants and their parent strain

藻株 Strain	蛋白质(%干重) Protein	藻蓝蛋白含量(%干重) Phycocyanin
出发藻株	66.1	10.75
M 1- 3	65.7	12.92
M 5- 1	64.9	9.86

表 4 诱变株与出发藻株不饱和脂肪酸组成

Tab. 4 Unsaturated fatty acids of two mutants and their parent strain

不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acid	出发藻株 Parent strain	M 1- 3	M 5- 1
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 M 1- 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 M 5- 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, M 1- 3 和 M 5- 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, M 5- 1 可缓慢生长, M 1- 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 1.0 mmol/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; M 5- 1 虽然在接种的前 48 h 内生长速度比原始藻株慢, 但在接种后 2—4 d 内却快速生长, 4 d 后生长速度又减缓。因此总体上看 M 5- 1 对 Zn^{2+} 的抗性略强于出发藻株; M 1- 3 在接种后的前 6 d 中, 一直保持相对较高的生长速度, 但 6 d 后藻体却开始死亡。因此, 总体来看 M 1- 3 对 Zn^{2+} 的抗性低于原始藻株。

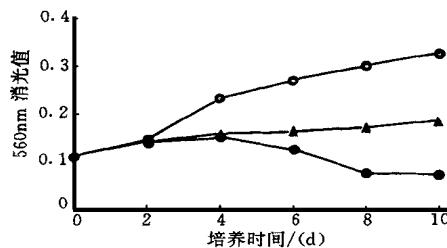


图 2 突变株和出发藻株在 10 mmol/L NH_4^+ 下的生长曲线

Fig. 2 The growth curves of parent strain and two mutants under 10 mmol/L NH_4^+
—●—出发藻株 —○—M1-3 —▲—M5-1

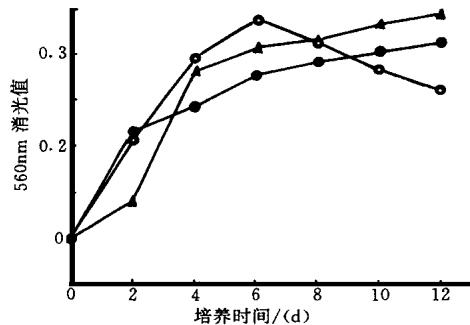


图 3 突变株和出发藻株在 1.0 mmol/L Zn^{2+} 下的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of parent strain and two mutants under 1.0 mmol/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 M 1- 3 和 M 5- 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, M 1- 3 相对更优良。

参考文献:

- [1] Henrikson R. Earth food: *Spirulina*. 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, Verkataraman 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. Algal Lipoprotein, 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