

转光膜在雨生红球藻养殖上的应用

吴霞^{1,2}, 康瑞娟¹, 丛威¹, 谭天伟²

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 通过对雨生红球藻在不同光质条件下生长的比较, 确定了红色光有利于藻生长, 进而用 2.5 L 气升式光照反应器在转光膜及普通 PE 膜下培养藻进行对比, 结果显示雨生红球藻生物量、色素、光合活性等几项生物指标在转光膜条件下明显高于普通 PE 膜. 在气升式反应器内培养的藻细胞, 接种 9 d, 虾青素含量可达 3.57 mg/L, 叶绿素浓度达到 12.42 mg/L, 干重提高 8.8% 以上.

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 转光膜

中图分类号: Q949.21

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)06-0969-04

1 前言

虾青素(Astaxanthin)是类胡萝卜素的氧化产物, 呈鲜红色, 具有很高的经济价值, 其抗氧化能力强于 β -胡萝卜素和维生素 E, 被誉为“超级抗氧化剂”^[1,2], 在鲑鱼养殖中被广泛用作饵料添加剂, 具有很好的着色效果, 而且能增强水产品对疾病的抵抗力^[3,4].

目前, 虾青素生产包括化学合成及天然产虾青素. 化学合成虾青素价格昂贵, 到目前为止, 只有瑞士罗氏公司(Hoffmann-La Roche)生产, 商品名为加丽素红(Carophyll Pink). 而可利用的天然虾青素资源有 3 种, 即真菌、甲壳类动物和微藻^[5]. 甲壳类动物虾青素含量低, 且其中灰分和几丁质含量较高, 限制了虾青素的提取和利用. 真菌类如红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)突变株系的虾青素含量达到 0.3%, 是一种较有利用价值的资源. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)细胞内虾青素含量较高, 超过细胞干重的 2%^[6]. 各种虾青素自然资源的比较表明, 雨生红球藻细胞由于虾青素含量相对较高, 成为生产天然虾青素的主要原料, 开发培养雨生红球藻生产虾青素的技术具有巨大的商业价值.

农用转光膜(Sun-light Conversion Film, SCF)^[7]是在高压聚乙烯中添加转光剂吹制而成, 其主要作用是把日光中的紫外线转化为能被植物利用的红橙光, 从而改变农田光照条件, 使光能利用率提高. 大量的农田应用试验和实地扣棚应用表明, 转光膜能改善作物品质, 实现增产. 由于目前农用转光膜仅局限于农作物的养殖, 在藻类上的应用鲜见报道, 本工作将转光膜同藻类养殖相结合, 以雨生红球藻为对象, 研究转光膜对藻类生长的影响及在藻类养殖中应用的可能性.

2 材料与方法

2.1 转光膜的制备及有色膜性能测定

本工作所用转光膜是从湖南师范大学购买的转光母粒, 所含转光剂为紫外光转换为红光的稀土无机化合物(代号 UVTRI-MS). 基料为低密度聚乙烯(LDPE 1F7B 型), 用普通吹塑机吹制, 采用传统工艺, 单螺杆挤出吹膜, 厚度 0.05 mm, 转光剂含量 5%(占基料质量比), 并对其性能进行了简单测定.

用分光光度计在可见光范围内扫描转光膜及 PE 膜, 用岛津 UV-2401PC 紫外/可见分光光度计测定有色膜的透光率, 扫描范围 350~800 nm.

2.2 藻种的培养

2.2.1 藻种

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(武汉)引进, 经过划线、培养和初步筛选后, 获得纯化的藻种.

2.2.2 培养基及培养条件

雨生红球藻培养在 SM 培养基中进行. 培养基组成(mg/L): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3670, K_2HPO_4 1150, NH_4NO_3 300, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300, CaCl_2 40, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10, 醋酸钠 15 mmol/L, 柠檬酸钠 1.7 mmol/L; 加入 10 mL 微量储备液[组成(mg/L): H_3BO_3 100, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6], 121 °C 灭菌后, 将 pH 值调至 6.8~7.2.

三角瓶培养: 250 mL 三角瓶内装 100 mL 培养基. 接种对数生长期(转培后 3~5 d)的藻种, 接种后的细胞密度约 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, OD_{674} 值 0.04. 于光照培养箱内培养, 温度控制在 $(23 \pm 1.5) \text{ }^\circ\text{C}$, 日光灯提供检测光源, 连续照

收稿日期: 2005-12-14, 修回日期: 2006-02-13

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716007)

作者简介: 吴霞(1979-), 女, 吉林省长春市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 丛威, 通讯联系人, E-mail: weicong@home.iipe.ac.cn.

明, 光照强度 $40\sim 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. 每天定时摇匀 3 次, 防止细胞贴壁.

气升式光生物反应器培养: 采用 2.5 L 气升式光生物反应器, 内装 2 L SM 生长培养基. 接种细胞密度 $4\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 左右, OD_{674} 值 0.085. 日光灯提供检测光源, 连续照明, 光照强度 $40\sim 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. 水浴循环温度控制在 $(23\pm 1.5)^\circ\text{C}$. 连续培养 9 d, 通气量 0.4 L/min.

2.3 生长生理指标的测定

2.3.1 生长速率

每天定时取样, 用 721 型分光光度计在波长 674 nm 下测定各组藻液的细胞密度 OD_{674} , 用培养基作参比液. 同时用浮游植物计数框进行细胞计数, 测定方法参照文献[8]. 比生长速率 K 按式 $K=(\lg N_t - \lg N_0)/t$ 计算, N_t 为培养 $t(\text{d})$ 时间后的细胞密度(OD), N_0 为初始细胞密度(OD).

2.3.2 叶绿素及虾青素含量测定

参照文献[9], 取一定量细胞藻悬液, 4000 r/min 离心除掉盐分, 蒸馏水清洗后加入 3 mL 二甲基亚砜, 在冰水浴中利用超声波破碎仪(宁波新芝科器研究所, 功率 300 W)破碎 3 min 后密封. 室温放置 6 h. 再离心去掉细胞碎片, 以二甲基亚砜作参比液, 用 721 型分光光度计在 666 及 490 nm 下测定吸光值.

虾青素 $(\text{mg/L})=4.5\text{OD}_{490}V_a/V_b$, 叶绿素 $(\text{mg/L})=11.5\text{OD}_{666}V_a/V_b$, V_a, V_b 为二甲基亚砜和藻液体积(mL).

2.3.3 光合作用活性测定

利用 DW2/2 型氧电极(Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK)测定对数期活体藻细胞的光合放氧速率, 温度控制在 $(22\pm 1)^\circ\text{C}$. 根据 Henley 方法^[10], 以方程 $P=P_m \tanh(\alpha I/P_m)+R_d$ 对实验数据进行非线性参数拟合, 并计算出各种参数. 其中 I 为光照强度 $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$, P 是光照强度为 I 时的光合作用速率 $[\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})]$; P_m 为最大光合作用速率 $[\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})]$, 即光饱和时的光合作用速率; α 是光合作用在光限制部分的初始斜率 $[\text{m}^2\cdot\text{s}/(\text{mg}\cdot\text{h})]$, 可表示表观光合作用效率; R_d 为暗呼吸速率 $[\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})]$; I_k 表示光饱和点光照强度 $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$, $I_k=P_m/\alpha$; I_c 表示光补偿点光照强度 $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$, $I_c=R_d/\alpha$.

3 结果与讨论

3.1 有色膜及转光膜透光曲线及光谱

为比较不同光质对光合作用的影响, 选择购买不同颜色的滤光片, 并对其透光性能进行了检测, 结果如图 1 所示. 实验结果表明, 不同颜色的滤光片光质单一, 符合实验要求, 但对光的透过率不同, 需要调整滤光片的厚度以获得相同的光强.

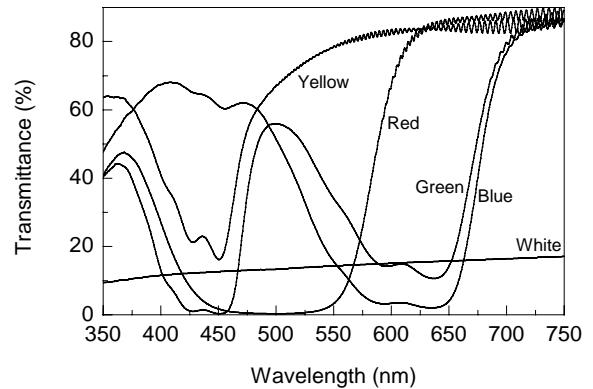


图 1 有色膜透光率

Fig.1 Light penetration rates of color films

对转光膜及 PE 膜在 300~800 nm 波长范围内扫描, 其吸收光谱如图 2 所示. 从光谱可以看出, 含有转光剂的塑料膜在 650 nm 左右的峰值明显加强, 表明转光膜增加了红光部分, 与光合作用的有效光谱一致.

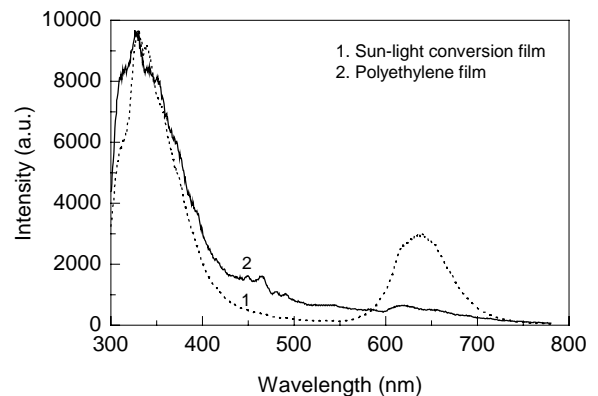


图 2 转光膜及 PE 膜光谱

Fig.2 Spectra of SCF and PE

3.2 光质的影响

3.2.1 光质对雨生红球藻生长的影响

雨生红球藻的生长期分为绿色的营养细胞生长期及红色的孢子生长期 2 个阶段, 适当延长营养细胞的生长期可以得到较高的生物量. 为测定光质对红球藻生长的影响, 分别以红色、黄色、蓝色和绿色膜覆盖在 250 mL 三角瓶上, 以无色膜覆盖的培养液为对照, 并通过调整膜的厚度使藻液面的光强基本一致. 在相同条件下培养 6 d, 每天定时取样, 连续测定藻细胞生长, 实验结果见图 3. 从图可见, 随着培养时间的延长, 光质对藻细胞生长的影响逐渐显著. 到培养后期, 红、黄色膜覆盖的藻细胞密度高于对照, 而蓝光和绿光下的藻细胞明显低于对照. 其中, 红光下的藻生物量比对照高出 9.7%, 表明红色光有利于红球藻的生长, 对生物量的增加有利.

3.2.2 光质对叶绿素及虾青素含量的影响

叶绿素含量的变化在一定程度上决定了藻细胞生长状况. 为了测定不同颜色的光对红球藻细胞色素积累的影响, 分别以红色、黄色、蓝色、绿色膜覆盖在 250 mL 三角瓶上, 以无色膜覆盖的培养液为对照, 并通过调整膜的厚度使藻液面的光强基本一致. 在相同条件下培养 6 d, 每天定时取样, 连续测定藻细胞中叶绿素及虾青素的含量, 实验结果见图 4. 如图所示, 随着培养时间的延长, 光质对藻细胞叶绿素及虾青素含量的影响逐渐显著, 培养后期, 红色膜覆盖下的藻细胞叶绿素含量比对照增长近 18.9%, 虾青素含量变化也存在同样的趋势, 比对照高出 16.9%, 而蓝光和绿光对色素含量影响不显著. 实验结果表明红光有利于藻细胞色素积累.

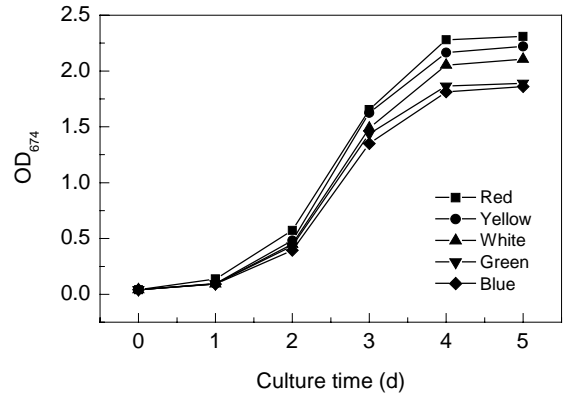


图 3 光质对雨生红球藻生长的影响
Fig.3 Effect of light quality on growth of *H. pluvialis*

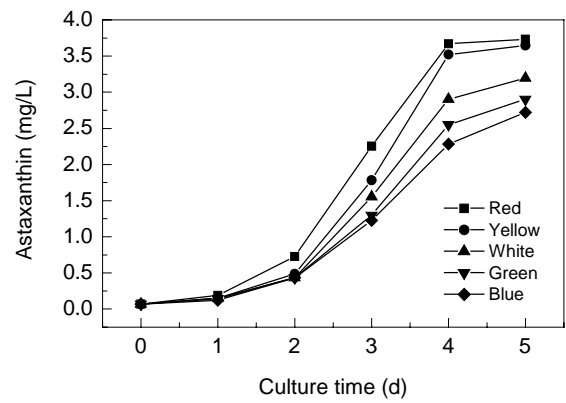
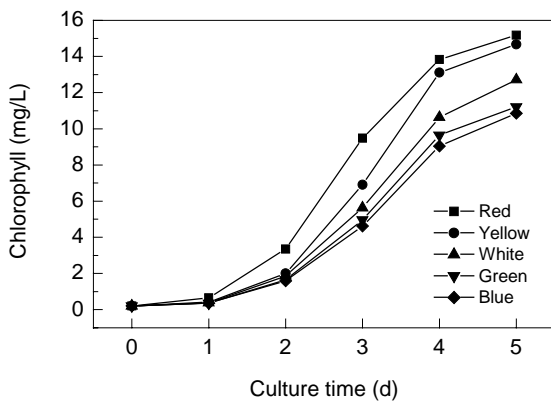


图 4 光质对红球藻色素含量的影响
Fig.4 Effect of light quality on pigment content of *H. pluvialis*

3.3 转光膜对雨生红球藻生长的影响

为提高光能利用率, 考察能否利用转光剂将紫外光转为红色光, 利用掺入了转光剂的 PE 膜(转光膜), 与不掺入转光剂的 PE 膜作对照, 研究转光作用对藻细胞生长及色素积累的影响规律.

3.3.1 转光膜对雨生红球藻生长的影响

在 2.5 L 气升式光生物反应器中培养红球藻, 考察转光膜对藻细胞生长的影响. 将转光膜覆盖在反应器外壁, 以 PE 膜覆盖的反应器培养为对照, 连续光照培养 9 d, 每天定时取样测定藻细胞的生长. 光强为 40~60 μmol/(m²·s), 温度为(23±1.5)℃, 通气量 0.4 L/min, 实验结果如图 5 所示. 从图可以看出, 到培养后期, 转光膜覆盖下培养的红球藻生物量比 PE 膜覆盖下培养的藻提高了 8.8%以上. 原因在于转光膜能够提供普通 PE 膜所不能提供的红色光质, 而红光又利于藻细胞生长, 由此表明转光膜能够促进雨生红球藻生长.

3.3.2 转光膜对叶绿素及虾青素含量的影响

为测定转光膜对红球藻细胞中色素积累的影响, 取样测定了覆盖转光膜和 PE 膜的气升式光生物反应器中培养的藻细胞的色素含量, 结果如图 6 所示. 实验结果

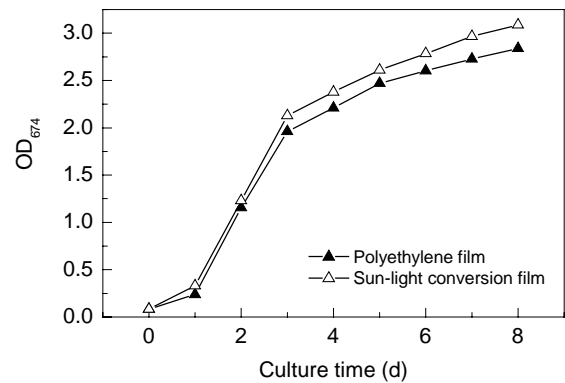


图 5 转光膜与普通 PE 膜对红球藻生长影响
Fig.5 Effects of SCF and PE on growth of *H. pluvialis*

表明, 转光膜条件下培养的藻细胞叶绿素含量可达 13.25 mg/L, 而在 PE 膜下培养的藻细胞叶绿素只有 11.47 mg/L, 相比增加 15.5%. 在转光膜覆盖下培养的藻细胞虾青素含量达到 3.81 mg/L, 比在普通 PE 膜下培养的藻细胞虾青素含量高 15.1%. 同样说明使用转光膜可以提高色素含量, 促进色素积累.

3.3.3 转光膜对雨生红球藻光合活性的影响

将在覆盖转光膜和 PE 膜的气升式光生物反应器中

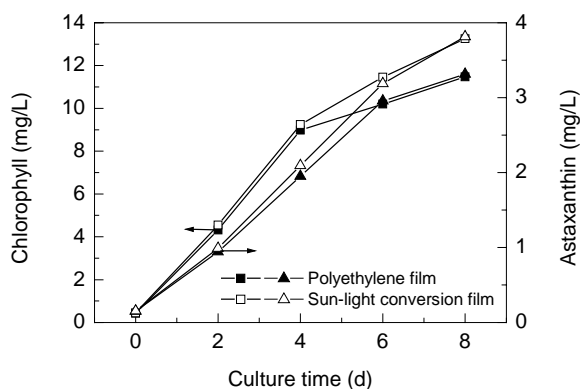


图6 转光膜与PE膜对红球藻色素含量影响

Fig.6 Effects of SCF and PE on pigment content of *H. pluvialis*

培养至对数生长期的藻细胞放入氧电极,测定藻细胞的光合放氧曲线,如图7所示.并根据净光合速率曲线获得不同条件下的光合作用参数(表1),来描述不同条件下的光合作用特性.从表可知,转光膜下培养的红球藻初始斜率 α 高于普通PE膜培养的藻,光饱和点光强 I_k 降低45%,而补偿点光强 I_c 降低61.4%.说明转光膜可以大幅度提高藻细胞的光合效率.由于转光膜增加了有效光强,因此可以在较低的光照强度下使藻细胞达到较高的光合作用速率.

表1 对数生长期测得的不同膜下雨生红球藻光合作用参数

Table 1 Photosynthetic parameters of *H. pluvialis* under PE film and SCF

Film	α_{O_2} [$m^2 \cdot s / (mg \cdot h)$]	I_k [$\mu mol / (m^2 \cdot s)$]	I_c [$\mu mol / (m^2 \cdot s)$]
PE	2.024±0.127	96.443	-39.944
SCF	2.918±0.252	53.406	-15.403

4 结论

采用转光膜培养雨生红球藻,结果显示紫外光转红光的转光膜对红球藻的生长有一定的促进作用,叶绿素及虾青素含量也相应提高.结合气升式光生物反应器培养时,生物量可以提高8.8%以上.光合活性实验显示转光膜下的藻细胞光合活性较高,光饱和点降低,这进一步说明转光膜的应用可以增加有效光强,提高光利用

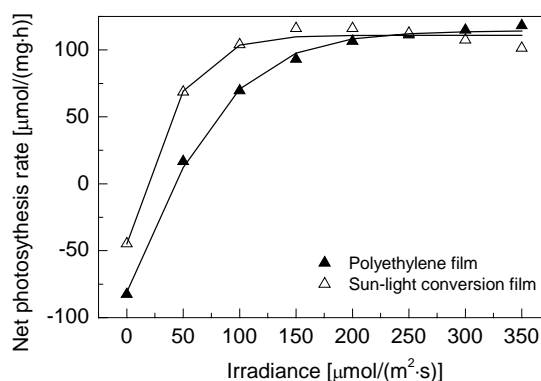


图7 转光膜及PE膜条件下红球藻光合活性曲线

Fig.7 Photosynthetic curve of *H. pluvialis* under PE film and SCF

率,在培养藻细胞时,可以适当降低光照强度.规模培养时可采用反应器表面覆盖转光膜的方式提高藻细胞收率及色素含量.

参考文献:

- [1] Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, et al. Antioxidant Role of Astaxanthin in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, 48(3): 351-356.
- [2] Miki W. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids [J]. Pure Appl. Chem., 1991, 63(1): 141-146.
- [3] Kranzfelder J A. Carotenoids from Microalga [J]. J. Phycol., 1994, 72(Suppl.): 11-13.
- [4] Todd L R, Gerald R C. Commercial Potential for *Haematococcus microalgae* as a Natural Source of Astaxanthin [J]. Trends Biotechnol., 2000, 18(4): 160-167.
- [5] 陈锋,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999. 174-207.
- [6] Johnson E A, Schroeder W A. Microbial Carotenoids [J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1995, 53(1): 169-178.
- [7] 张颂培,李建宇,陈娟,等.我国农用转光膜的研究进展[J].中国塑料,2003,17(11): 19-23.
- [8] 金传荫,宋立荣,刘永定,等.红球藻水生748株营养需求的研究[J].水生生物学报,1996,20(3): 293-296.
- [9] Boussia S, Vonsbak A. Astaxanthin Accumulation in the Green Algae *Haematococcus pluvialis* [J]. Plant Cell Physiol, 1991, 32(7): 1077-1082.
- [10] Henley W J. Measurement and Interpretation of Photosynthetic Light-response Curves in Alga in the Context of Photoinhibition and Diel Changes [J]. J. Phycol., 1993, 29(6): 729-739.

Application of Sun-light Conversion Film on the Growth of *Haematococcus pluvialis*

WU Xia^{1,2}, KANG Rui-juan¹, CONG Wei¹, TAN Tian-wei²

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. College Life Sci. & Technol., Beijing Univ. Chem. Technol., Beijing 100029, China)

Abstract: The photosynthetic microalga *Haematococcus pluvialis*, a potential source of astaxanthin, has been widely used in breeding of salmon. The influence of light quality on the growth of *Haematococcus pluvialis* was studied. The results showed that red light was beneficial to the growth and astaxanthin accumulation of *H. pluvialis*. By comparing the effects of sun-light conversion film (SCF) and PE film on *H. pluvialis* in a 2.5 L air-lift photobioreactor, it is concluded that the values of biomass, pigments and photosynthetic parameters under the SCF were all much higher than those under PE film. In the case of the air-lift photobioreactor, the concentration of astaxanthin and chlorophyll reached 3.57 and 12.42 mg/L respectively, and the dry weight increased 8.8% after 9 d.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; sun-light conversion film