



临沂大学博士教授文库

LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

# 盐生杜氏藻研究

YANSHENG DUSHIZAO YANJIU

王培磊 著

21

山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社



临沂大学博士教授文库

LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

# 盐生杜氏藻研究

王培磊 著

山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

盐生杜氏藻研究/王培磊著. —济南:山东人民出版社,2013.6

ISBN 978-7-209-07363-9

I. ①盐… II. ①王… III. ①绿藻门-研究 IV. ①Q949.21

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第139637号

责任编辑:李楠

## 盐生杜氏藻研究

王培磊 著

山东出版集团

山东人民出版社出版发行

社址:济南市经九路胜利大街39号 邮编:250001

网址:<http://www.sd-book.com.cn>

发行部:(0531)82098027 82098028

新华书店经销

山东省东营市新华印刷厂印装

规格 16开(169mm×239mm)

印张 10.5

字数 150千字

版次 2013年6月第1版

印次 2013年6月第1次

ISBN 978-7-209-07363-9

定价 25.00元

如有质量问题,请与印刷厂调换。(0546)6441693

## 前 言

1831年，法国生物学家杜纳尔无意中发现地中海沿岸的某些盐池中有一种尾部具有双鞭毛的红色单细胞藻类。后人为纪念他的发现，将此藻类命名为“盐生杜氏藻”，简称“盐藻”或“杜氏藻”，拉丁学名为 *Dunaliella salina*。它属绿藻门，绿藻纲，团藻目，盐藻科，盐藻属，是一种单细胞真核藻类，是迄今为止发现的最耐盐的真核生物之一。它属于高盐逆境生物，适应性强，繁殖快，自然生存于盐池、盐湖等地方，特殊的环境造就了独特的生长机制。其细胞大小约  $15\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ，具有奇特的动植物双重特性，喜强光、耐强酸强碱、耐高寒（ $-27^{\circ}\text{C}$ ）和酷热（ $+53^{\circ}\text{C}$ ），可在极为恶劣的自然条件下生存。

杜氏藻含丰富的油脂、 $\beta$ -胡萝卜素、蛋白质、多糖等，同时含较高的Ca、P、Zn等矿物质、18种氨基酸，积累的甘油为细胞干重的40%~50%，在适当条件下，体内合成的 $\beta$ -胡萝卜素可达干重的10%~14%，为自然界所有生物之首。作为 $V_A$ 的前体， $\beta$ -胡萝卜素能使皮肤和黏膜细胞正常化，并可维持视网膜正常的功能。此外， $\beta$ -胡萝卜素还能提高机体免疫功能，消除自由基的伤害，预防癌症、心血管疾病，预防衰老。青岛大学医学院、青岛市第二人民医院、湖北省疾病预防控制中心等进行的临床实验表明盐生杜氏藻及其 $\beta$ -胡萝卜素具有以下功用：预防和辅助治疗冠心病及心脑血管疾病；预防和辅助治疗糖尿病；预防和辅助治疗癌症，减轻化疗不良反应；预防和辅助治疗肝脏疾病；预防和辅助治疗胃部常见病及口腔溃疡；辅助治疗白内障，预防干眼症、改善视力；提高免疫力，抗氧化，延缓衰老。

由于盐藻的营养和药用价值极高，国际上对有关盐藻的研究非常重视。1983年召开的第十一届国际海藻会议将盐藻的提取物之一—— $\beta$ -胡萝卜素列入大会专题讨论。1990年世界营养学会将盐藻提取物 $\beta$ -胡萝卜素在医学界的广泛作用的研究列为会议的核心主题，从而引发了全世界范围内医学专家和生物学专家的高度关注。1991年美联社将盐藻提取物 $\beta$ -胡萝卜素研究列为当年世界十大科技中的第三大科技工程。1986年，我国在联合国开发计划署的援助下首次引入盐藻藻种，“联合国科技扶贫项目”在我国正式启动。我国政府把盐藻的研究列入了国家“七五”“八五”重点科技攻关项目。“盐藻提取物的应用研究”于1990年通过国家鉴定，获得国家“七五科技攻关重大成果奖”；“盐藻素对实验性动脉粥样硬化预防作用的研究”，被列入国家科委“八五”攻关课题。进入21世纪，我国以盐藻产业化研究为标志的“藻类基因工程”，与载人航天、新能源技术一道，迎来了新一轮的发展契机。

该书收集了作者近年来对盐生杜氏藻研究的成果，共十余篇。研究结果可为杜氏藻的进一步研究和规模化养殖提供参考。研究和成文过程中，得到了导师张学成教授的热情指导和师弟孟振的大力帮助，内蒙古兰太集团生物公司为本研究提供了卤水、部分藻种和其他便利条件，在此表示真诚感谢。

由于作者水平和研究条件有限，研究结果可能有不当之处，恳请该领域的专家和学者批评指正。

作者

2013.03.18

# 目 录

前 言 .....	1
导 论 .....	1
第一章 胁迫因子对杜氏藻生长和色素积累的影响研究进展 .....	9
1 杜氏藻的形态、分类和生态分布 .....	9
2 胁迫条件对杜氏藻细胞形态结构、生化组成和生长速度的影响 .....	10
3 胁迫条件对杜氏藻 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响 .....	13
4 杜氏藻的功用 .....	16
5 杜氏藻研究开发应用前景及需要解决的问题 .....	17
参考文献 .....	18
第二章 乙酸对两种杜氏藻生长和细胞生化组成的影响 .....	23
1 材料与方法 .....	23
2 结果和讨论 .....	25
参考文献 .....	32
第三章 盐度对盐生杜氏藻生长及其 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响 .....	35
1 材料与方法 .....	35
2 结 果 .....	37
3 讨 论 .....	39
参考文献 .....	40

第四章 盐生杜氏藻对不同氮源吸收规律的比较研究.....	43
1 材料与方法 .....	43
2 结 果 .....	45
3 讨 论 .....	49
参考文献.....	50
第五章 活性磷对盐生杜氏藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响 .....	52
1 材料与方法 .....	52
2 结 果 .....	54
3 讨 论 .....	57
参考文献.....	59
第六章 碳源对盐生杜氏藻生长及其 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响 .....	61
1 材料与方法 .....	61
2 结 果 .....	63
3 讨 论 .....	66
参考文献.....	67
第七章 不同氮源对盐生杜氏藻生长和细胞生化组成的影响 .....	70
1 材料与方法 .....	70
2 结果与分析 .....	72
3 讨 论 .....	78
参考文献.....	79
第八章 C、N、P 比例对两株盐藻生长和生化组成的影响 .....	83
1 材料与方法 .....	83
2 结 果 .....	85
3 讨 论 .....	94
4 小 结 .....	97
参考文献.....	97

第九章 两种杜氏藻对硝酸盐利用模型的比较研究 .....	100
1 材料和方法 .....	100
2 结 果 .....	102
3 讨 论 .....	106
参考文献 .....	108
第十章 Fe 对两株盐生杜氏藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响 .....	110
1 材料与方 法 .....	110
2 结 果 .....	112
3 讨 论 .....	117
参考文献 .....	118
第十一章 盐生杜氏藻对 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 耐受性的研究 .....	120
1 实验目的 .....	120
2 材料与方 法 .....	120
3 结 果 .....	121
第十二章 光照、温度和营养盐对三株盐生杜氏藻生长和色素积累的影响 .....	123
1 材料和方法 .....	124
2 实验结果 .....	127
3 正交分析结果 .....	134
4 讨 论 .....	136
参考文献 .....	139
第十三章 海洋单胞藻浓缩和保存研究进展 .....	142
1 微藻浓缩和保存的必要性和重要性 .....	142
2 国内外微藻浓缩和保存研究状况 .....	143
3 研究所用试验材料、技术方法、试验结果及结果评价指标 .....	144
4 单胞藻浓缩和冷冻保藏结果的评价分析 .....	147
5 本研究领域发展前景及存在问题 .....	148



参考文献 .....	148
<b>第十四章 两种海洋单胞藻浓缩与保存效果的研究 .....</b>	<b>150</b>
1 材料和方法.....	150
2 结 果.....	152
3 讨 论.....	157
参考文献 .....	159
<b>后 记 .....</b>	<b>160</b>

## 导 论

盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 在人工控制和胁迫条件下, 能大量积累  $\beta$ -胡萝卜素 (占干重的 10% ~ 14%), 被公认为是生产  $\beta$ -胡萝卜素的理想天然资源。早在 1966 年, Massyuk 就提出杜氏藻可作为产品化的  $\beta$ -胡萝卜素的来源。杜氏藻还含有约 40% 的蛋白质, 其氨基酸组成与植物蛋白相似, 可用作动物饲料蛋白源。杜氏藻在适宜的条件下具有很高的生物产量, 最高为 15 ~ 20g/ ( $\text{m}^2 \cdot \text{d}$ ), 大规模生产的平均水平亦可为 10 ~ 15 g/ ( $\text{m}^2 \cdot \text{d}$ ), 高于大多数其他藻类产量, 因此, 杜氏藻是一种很好的单细胞蛋白源。甘油是重要的有机化工原料, 目前主要从石油中提取, 其售价为 3 ~ 5 美元/kg, 但随石油资源的耗尽, 其价格不断上涨, 因此利用杜氏藻生产甘油具有潜在的发展前景。大量积累甘油的杜氏藻种类, 在适当的条件下, 其甘油含量可达干重的 50%。综合提取胡萝卜素和甘油, 可使甘油生产成本降至 0.752 美元/kg, 低于石油生产甘油的成本 (0.88 美元/kg, 1998 年价格)。另外, 杜氏藻有很宽的盐度适应范围, 可在 1% ~ 35% 的盐度范围内生长, 是自然界最耐盐的真核生物之一, 是生物学工作者研究生物机体对高渗环境适应机制的模式生物。有鉴于此, 美国、澳大利亚、以色列、日本、西班牙、加拿大等国较早就开展了杜氏藻的形态、生理、生态和医学研究, 并投入生产和工业化养殖。我国具有漫长的海岸线 (18000km) 和星罗棋布的内陆盐湖 (仅  $1\text{km}^2$  以上的就有 500 多个), 具有培养杜氏藻生产  $\beta$ -胡萝卜素得天独厚的自然条件。

C、N、P、Fe 源及 pH 是影响杜氏藻生长的重要环境因子之一，明确杜氏藻对不同营养盐的吸收规律和杜氏藻生长的二阶段对营养盐种类和浓度的不同要求，对优化杜氏藻培养基、提高生长速度、促进杜氏藻和  $\beta$ -胡萝卜素产业的发展有重要意义。本文研究了乙酸，C、N、P 比例，以及氨盐、铁盐、磷盐、盐度、碳盐对杜氏藻 (*Dunaliella*) 生长、色素积累和生化组成的影响，建立了杜氏藻对主要营养盐吸收利用的动力学方程，并研究了杜氏藻对氨 [  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ] 毒性的耐受性。

主要研究结果是：

1. 对 *D. salina*，乙酸调节 pH 可明显促进生长。细胞密度最大值为  $120 \times 10^4 \text{ cell/mL}$  ( $\text{pH} \leq 8.5$ )， $\beta$ -胡萝卜素最大值为  $102 \text{ mg/g}$  ( $\text{pH} \leq 8.0$ )，叶绿素 a 含量达到  $104 \text{ mg/g}$  ( $\text{pH} \leq 8.5$ )，三者与对照组相比均有显著差异。乙酸调节 pH 还可以提高单不饱和脂肪酸 18:1 和多不饱和脂肪酸 18:2n6 的含量。蛋白质含量随 pH 升高而提高。对 *D. parva*，乙酸调节 pH 对生长无明显促进作用，也不能提高  $\beta$ -胡萝卜素含量，但明显提高叶绿素 a 含量，最大值达  $144 \text{ mg/g}$  ( $\text{pH} \leq 9.0$ )，还可提高蛋白含量，达到 33.5% ( $\text{pH} \leq 9.0$ )。

2. *D. salina* OUN04 最大细胞密度  $14.2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 、最大  $\beta$ -胡萝卜素含量  $100.4 \text{ mg/g}$ 、最大叶绿素 a 含量  $114.6 \text{ mg/g}$  分别出现在 C、N、P 比例为 12:1:0.05、12:2:0.1、12:1:0.05 的处理组中，且均与对照组差异显著。不同 C、N、P 比例对 *D. salina* OUN04 主要脂肪酸 (16:0、18:1、18:2n6) 组成有显著影响，最大蛋白含量 32.44% 出现在 6:1:0.05 的处理组中，但与对照组 (31.46%) 差异不明显。*D. salina* OUN05 最大细胞密度  $101.2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 、最高  $\beta$ -胡萝卜素含量  $109.2 \text{ mg/g}$ 、最大叶绿素 a 含量  $108.7 \text{ mg/g}$  分别出现在 C、N、P 比例为 6:2:0.05、6:0.5:0.1、12:2:0.1 的处理组中，且均与对照组差异显著。最大蛋白含量 34.41% 出现在 6:1:0.05 的处理组中，但与对照组 (33.17%) 差异不显著。

3. *D. salina* OUN07 生长最合适的氮源是尿素 ( $0.75 \text{ mmol/L}$ )，最大细

胞密度为  $10^5 \times 10^4$  cell/mL, 对照组仅为  $59 \times 10^4$  cell/mL ( $P < 0.05$ ); 最高  $\beta$ -胡萝卜素含量 (110.6 mg/g) 出现在  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ /尿素复合肥 (0.125 mmol/0.125 mmol) 中, 但与对照组 (109.4 mg/g) 差异不显著; 较低的氮盐有利于  $\beta$ -胡萝卜素的积累。1.0 mmol/L 尿素培养的 *D. salina* OUN07 叶绿素 a 含量最高 (48.5 mg/g), 但与对照组 (48.1 mg/g) 差异不显著; 较高的氮盐有利于叶绿素 a 的合成。藻液 pH 最初 5 天急剧上升, 随后 2~3 天有所下降, 最后几天波动较大。最大 pH (9.92) 出现在  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ /尿素复合肥 (0.25 mmol/0.25 mmol) 中。

4. *D. salina* OUN04 生长最适的 Fe (柠檬酸铁) 浓度为 0.05 mmol/L (最大细胞密度为  $111.5 \times 10^4$  cell/mL), 其次为 0.01 mmol/L (细胞密度为  $100 \times 10^4$  cell/mL)。对照组为  $82.9 \times 10^4$  cell/mL。0.25 mmol/L Fe 组细胞密度 ( $70 \times 10^4$  cell/mL) 最低, 说明高浓度 Fe 对杜氏藻生长有抑制作用。最大  $\beta$ -胡萝卜素含量 (83.2 mg/g) 出现在 0.25 mmol/L Fe 组中, 其次为 0.05 mmol/L 组 (75.8 mg/g), 对照组 (63.4 mg/g) 最低。Fe 浓度为 0.25 mmol/L 时有最大的叶绿素 a 含量 (98.4 mg/g), 其次为 0.01 mmol/L 组 (89.5 mg/g), 对照组为 80.2 mg/g。前 6 天藻液 pH 急剧上升, 7~12 天波动较大, pH 最大值为 10.38 (对照组)。Fe 浓度测定结果表明, 开始 1~3 天, Fe 吸收较慢, 4~7 天吸收加快, 后又变慢。并建立了杜氏藻对 Fe 吸收的动力学方程。*D. salina* OUN09 生长最快的 Fe 浓度为 0.05 mmol/L (最大细胞密度为  $131 \times 10^4$  cell/mL)。对照组密度为  $118.5 \times 10^4$  cell/mL。0.25 mmol/L Fe 组细胞密度 ( $102.3 \times 10^4$  cell/mL) 仍最低。最大  $\beta$ -胡萝卜素含量为 130.2 mg/g (0.05 mmol/L Fe 组), 对照组为 70.4 mg/g。叶绿素最大值为 64.2 mg/g (0.05 mmol/L Fe 组), 对照组为 37.4 mg/g。pH 变化和 Fe 的吸收情况与 *D. salina* OUN04 相似。

5. 细胞生长最快的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度是 0.10 mmol/L, 最高浓度为  $118 \times 10^4$  cell/mL, 无磷对照组密度最低;  $\beta$ -胡萝卜素积累量最高的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度是 0.10 mmol/L, 其次是 0.05 mmol/L; 0.10 mmol/L 浓度的磷在 7 天内吸收

完毕,磷在培养液中残存的时间与其最初的施用浓度呈正相关关系;浓度过大(超过 $0.15\text{mmol/L}$ )对细胞生长和分裂及 $\beta$ -胡萝卜素积累有抑制作用,浓度越高抑制作用越大;细胞培养的前 $6\sim 7$ 天,藻液pH有明显的上升趋势,随后 $3\sim 4$ 天又下降。本研究还在实验的基础上建立了藻液中活性磷被盐生杜氏藻吸收的量与培养时间之间的函数关系。

6. 在实验盐度范围(30, 60, 90, 120, 对照)内,较低盐度对细胞生长、 $\beta$ -胡萝卜素积累、叶绿素a合成都很有利,也提高细胞蛋白含量,处理组与对照组差异显著( $P < 0.05$ )。

7.  $12\text{mmol/L}$ 的 $\text{NaHCO}_3$ 对*D. salina*生长最合适,细胞最大密度为 $84.6 \times 10^4 \text{cell/mL}$ ,对照组仅为 $36.7 \times 10^4 \text{cell/mL}$ ;在实验范围内, $\beta$ -胡萝卜素含量随 $\text{NaHCO}_3$ 浓度的升高而增加, $15\text{mmol/L}$ 组有最高的 $\beta$ -胡萝卜素含量 $104.6 \text{mg/g}$ ,对照组仅为 $60.8 \text{mg/g}$ ;叶绿素a最大含量 $135\text{mg/g}$ 也出现在 $15\text{mmol/L}$ 组;建立了 $\text{NaHCO}_3$ 吸收的动力学方程。

8. 在实验范围(0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5,  $1.8\text{g/L}$ )内,细胞存活率随 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 剂量的增加和处理时间的延长而下降, $12\text{h}$ 半致死剂量为 $0.6\text{g/L}$ ;施加 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 后,藻液pH迅速升高,最高达 $9.38$ ,随后 $12\text{h}$ 逐渐下降, $12\sim 48\text{h}$ 继续下降,但降速较慢;施加 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 后,出现细胞死亡、溃烂、沉淀,程度随 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 剂量的增加和处理时间的延长而增加。本实验结果和我们的实践经验认为,在杜氏藻大规模生产中,可用 $0.6\text{g/L}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 处理藻液 $4\text{h}$ 或 $0.3\text{g/L}$ 处理 $6\sim 8\text{h}$ 来抑制变形虫、游仆虫等原生动物造成的污染。

本研究的创新点在于率先进行了乙酸对杜氏藻(*Dunaliella*)生长和 $\beta$ -胡萝卜素积累影响的研究,并首次研究了C、N、P比例对盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)生长和细胞生化组成影响。

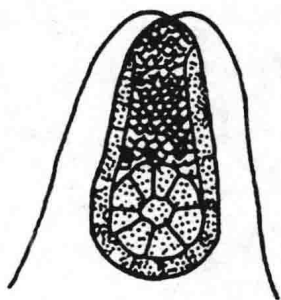


图 1 盐生杜氏藻外形

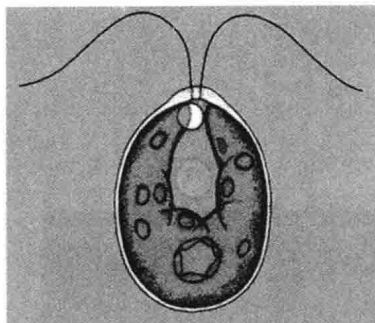


图 2 盐生杜氏藻模式图

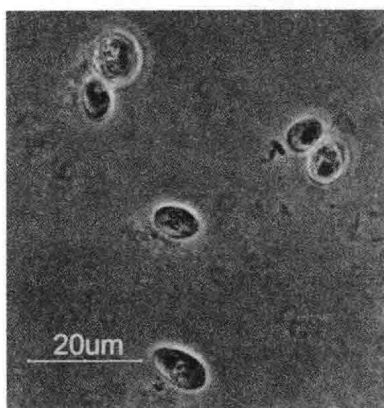


图 3 显微镜下的盐生杜氏藻

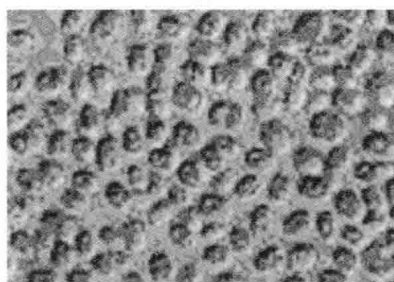


图 4 积累叶绿素阶段的盐生杜氏藻

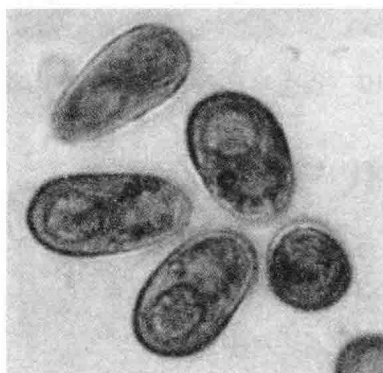


图 5 培养 3~4 天的盐生杜氏藻

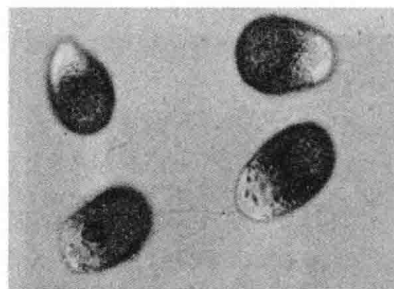


图 6 大量积累  $\beta$ -胡萝卜素的盐生杜氏藻

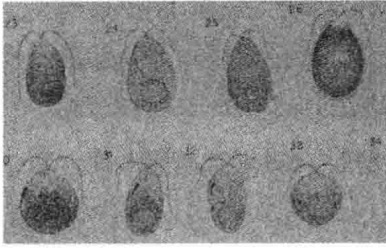


图7 不同细胞周期的盐生杜氏藻

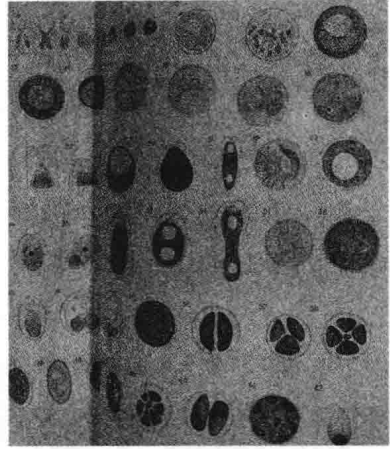


图8 不同条件（光照、温度、盐度、营养盐等）胁迫下的盐生杜氏藻形态差异很大

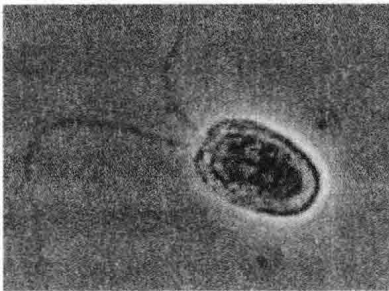


图9 大量积累β-胡萝卜素杜氏藻细胞



图10 盐生杜氏藻自然生存的盐湖

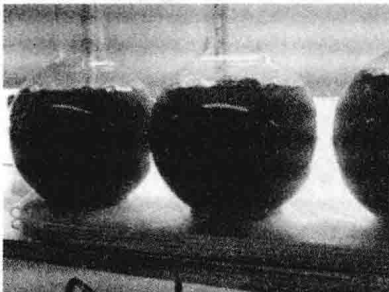


图11 平底烧瓶培养杜氏藻

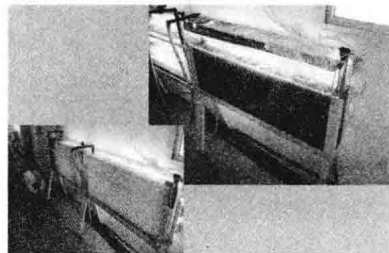


图12 平板式生物反应器培养杜氏藻

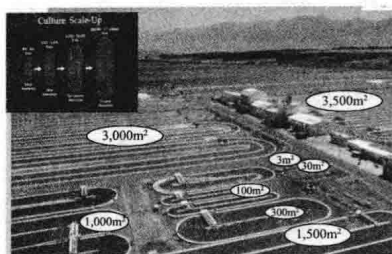


图 13 杜氏藻逐级扩种池 3 ~ 3500m<sup>2</sup>



图 14 叶轮式水车驱动跑道池中藻液

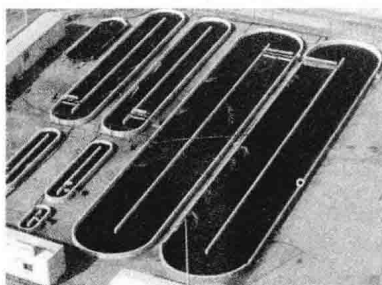


图 15 杜氏藻逐级扩种池

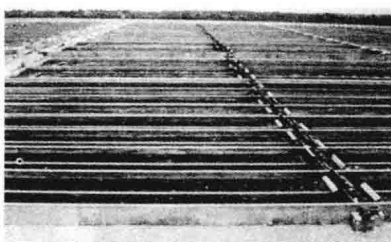


图 16 跑道池大规模培养盐生杜氏藻

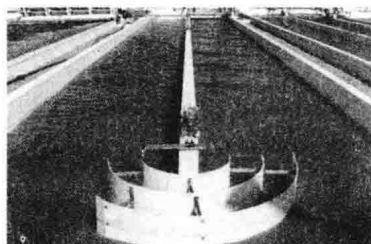


图 17 跑道池式养殖池放大图

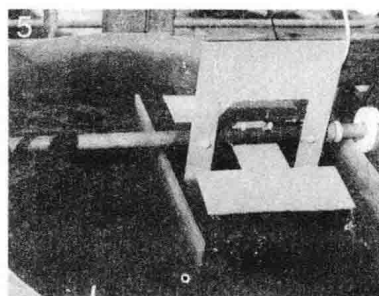


图 18 驱动跑道池中藻液的叶轮式水车



图 19 大规模培养盐生杜氏藻跑道池俯视图



图 20 跑道池大规模培养盐生杜氏藻



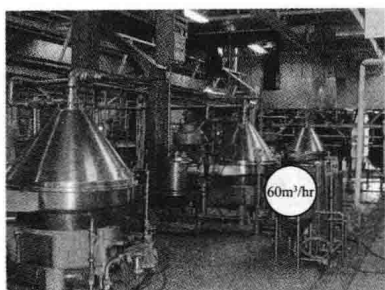


图 21 采收杜氏藻所用的维斯伐里亚连续离心机

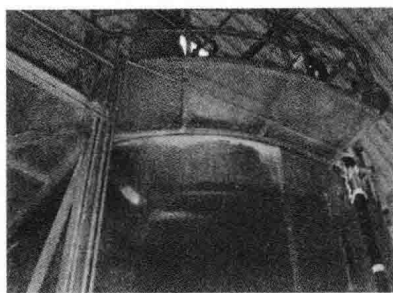


图 22 干燥杜氏藻所用的喷雾干燥机

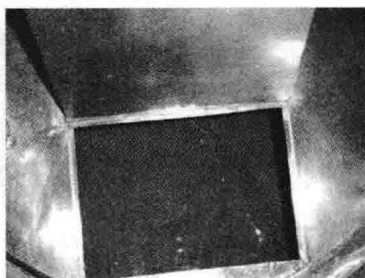


图 23 杜氏藻藻液离心后的藻浆 (15%)



图 24 盐生杜氏藻干燥粉



图 25 投放市场的杜氏藻胶囊



图 26 杜氏藻室内三角烧瓶扩种

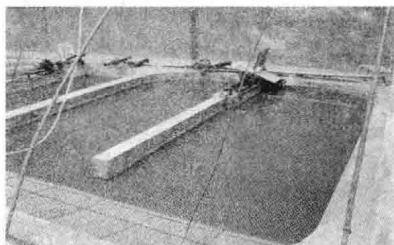


图 27 内蒙古兰太生物公司用跑道池进行杜氏藻扩种



图 28 内蒙古兰太生物公司用跑道池养殖杜氏藻