

谷 兵, 张达娟, 王 沂, 等. 铁对紫球藻生长及可溶性蛋白和胞外多糖含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 159–162.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.045

铁对紫球藻生长及可溶性蛋白和胞外多糖含量的影响

谷 兵¹, 张达娟^{1,2}, 王 沂¹, 包志明¹, 王雪莹¹, 余海军¹

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要:通过研究不同铁离子浓度条件下紫球藻的比生长率、主要叶绿素含量、可溶性蛋白及胞外多糖含量的变化情况, 来阐述铁离子对紫球藻生长的影响。结果表明, 添加不同浓度的 Fe^{3+} 对紫球藻的生长有明显的促进作用; Fe^{3+} 浓度在 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内时, 紫球藻的生长和叶绿素 a、 β -胡萝卜素、可溶性蛋白、胞外多糖的积累随 Fe^{3+} 浓度的升高而增加, 当 Fe^{3+} 浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 紫球藻的生长较为缓慢, 其细胞密度略低于其他处理及对照组, 且上述各指标均与 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 处理组之间无显著差异。因此, 紫球藻培养中铁的最适添加浓度约为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

关键词:紫球藻; 铁; 可溶性蛋白; 胞外多糖

中图分类号: S968.43+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0159-04

铁是浮游植物的微量营养元素和催化元素, 是浮游植物生长的关键限制因子之一, 影响着浮游植物的电子传递、氧的新陈代谢、氮的吸收利用、呼吸作用和光合作用^[1], 且在海洋“生物泵”循环过程起着关键作用^[2]。20 世纪 30 年代初, 研究学者提出铁是海洋浮游植物生长的潜在性限制因子^[3-6]。李丽研究了铁离子对三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、小球藻 CS-01 (*Chlorella sorokiniana* CS-01) 和等鞭金藻 (*Isocrydium galbana*) 生长和脂质积累的影响, 发现铁对这 3 株微藻的生长和脂质积累均有促进作用, 同时还比较研究了铁、镁、铜、钙对小球藻生长和脂质积累的影响, 其中铁离子的影响最为显著^[7]。王培磊等研究了铁对盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 生长和 β -胡萝卜素积累的影响, 结果表明, 较高浓度的铁有利于其 β -胡萝卜素的积累^[1]。

紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 细胞呈圆形或卵圆形, 外披黏质的鞘膜, 隶属于红藻门 (Rhodophyta) 原红藻纲 (Protorhodophyceae) 紫球藻目 (Porphyridiales) 紫球藻科 (Porphyridiaceae) 紫球藻属 (*Porphyridium*), 是红藻门中唯一的单细胞藻类, 紫球藻广泛分布于海水、淡水、咸水及潮湿的土壤中^[8]。关于紫球藻的研究主要集中在培养工艺的优化改良和多种生物活性物质的开发利用方面^[9]。已有相关文献研究表明^[10], 基于藻类的光合作用效率和生长潜能, 1 hm^2 大小的土地理论上计算可以生产超过 30 000 L, 即 200 桶油的量, 相当于同样土地上大豆产油量的 100 倍, 而紫球藻生长快、繁殖周期短, 且抗盐性强, 具广阔的应用前景及较大的潜在市场。本研究主要探讨了不同浓度的铁离子对紫球藻比生长率

和叶绿素 a、 β -胡萝卜素、可溶性蛋白、胞外多糖含量的影响, 以期为进一步探讨紫球藻的培养条件以及生物活性物质的提取提供有益参考。

目前, 国内外关于海藻多糖的研究主要集中在其组成、结构分析、生理活性及药理试验等方面, 而对于影响或促进海藻多糖合成和分泌的外界物理因子的研究相对比较少。

1 材料与方法

1.1 试验藻种

紫球藻藻种, 由中国科学院水生生物研究所藻种库提供。

1.2 培养条件

试验采用 f/2 培养基, 以自然光照为光源, 光—暗周期为 12 h—12 h, 光照度为 $2\ 000 \sim 2\ 500 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 培养温度为 $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。设置对照组和 4 个处理组, 处理组培养基中铁离子浓度分别为 5×10^{-7} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-5} 、 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 每组分别设置 3 个平行, 按 10% 的量接种紫球藻液, 试验进行培养周期为 14 d, 每 2 d 取样 1 次测定相关指标。

1.3 各项指标的测定及方法

1.3.1 紫球藻比生长率的测定 用血球计数板记录紫球藻细胞数, 每个重复均需要测定后取平均数。

相对生长率 $= \ln(X_2 - X_1) / (T_2 - T_1)$ 。

式中: X_1 和 X_2 分别代表 T_1 和 T_2 时紫球藻细胞的浓度。

1.3.2 叶绿素 a 的提取与测定 参考韩娟等的方法^[11], 取紫球藻液, $4\ 500 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃上清液, 藻团中加入甲醇振荡混匀, 70°C 水浴振荡 5 min, 自然冷却后 $4\ 500 \text{ r/min}$ 离心 5 min 取上清液, 即为紫球藻叶绿素 a 提取液, 1 cm 光径下测定 750、665 nm 波长处的吸光度。

叶绿素 a 含量 $= 13.9 \times (D_{665 \text{ nm}} - D_{750 \text{ nm}}) \times V_1 / V_2$ 。

式中: V_1 为最终体积, V_2 为取样体积, 13.9 为相关系数。

1.3.3 β -胡萝卜素的提取与测定 参考刘建国等的方法^[12-13], 取紫球藻液, $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 弃上清液, 将藻团转入到研磨器中, 加入 80% 的丙酮溶液, 研磨均匀,

收稿日期: 2015-12-09

基金项目: 天津市高等学校创新团队基金 (TD12-5018); 天津市级大学生创新创业训练计划 (编号: 201510061114)。

作者简介: 谷 兵 (1994—), 男, 四川达州人, 主要从事浮游植物生理生态学研究。E-mail: 15022197687@163.com。

通信作者: 张达娟, 博士, 中级, 主要从事浮游生物生理生态学及水域生态学研究。Tel: (022) 23787855; E-mail: dajuazhang@163.com。

4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至容量瓶中, 再将沉淀转入研磨器中, 重复上述操作, 合并所有上清液并定容, 450 nm 波长、1 cm 光径测定吸光度。

β -胡萝卜素含量 = $[D_{450\text{ nm}} \times \text{稀释倍数} \times 10 \times 1\,000] \div 2\,500$ 。公式中, 10 为所取藻液的体积, 1 000 为单位换算值, 2 500 为 β -胡萝卜素系数。

1.3.4 水溶性蛋白的测定

1.3.4.1 蛋白质标准曲线的制作 准确称取 100 mg 的牛血清蛋白溶于少量的无菌水中, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 配制成 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的母液, 再分别稀释制成不同浓度的蛋白质标准溶液(表 1), 分别吸取 0.5 mL 蛋白质标准溶液置于 20 mL 的比色管中, 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂, 反应 2 min 后在 1 cm 光径、595 nm 波长处测定溶液的吸光度(表 1), 然后以蛋白质浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制蛋白质标准曲线(图 1)。

表 1 蛋白质浓度与吸光度的关系

浓度($\mu\text{g/mL}$)	吸光度
0	0
20	0.061
40	0.134
80	0.261
120	0.392
160	0.522
200	0.632

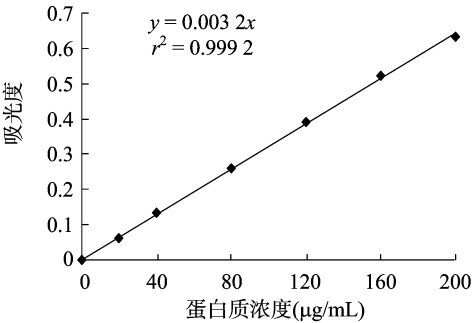


图 1 可溶性蛋白标准曲线

1.3.4.2 可溶性蛋白的提取与测定 取紫球藻液, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 分别用无菌水和 10 mmol/L、pH=6.8 的磷酸盐缓冲液冲洗藻团 1 次, 再将藻团转入到钵钵中, 并加入少许磷酸盐缓冲液和 0.05 g 二氧化硅, 在冰浴下充分研磨, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即为可溶性蛋白的粗提取物, 采用 Bdarofdr 法^[14]测定其蛋白含量。

1.3.5 多糖含量的测定

1.3.5.1 多糖标准曲线的制作 准确称取 100 mg 葡萄糖(烘干至恒质量), 溶于少量的无菌水中, 并定容至 100 mL 容量瓶中, 制成 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的母液, 再分别稀释制成不同浓度的标准溶液(表 2)。以苯酚-硫酸法测定葡萄糖含量, 取标准溶液各 1 mL, 冰水浴一段时间后加入 1 mL 6% 的苯酚溶液, 随即加入 5 mL 的浓硫酸, 反应完全后在水浴锅中加热 20 min 使其充分反应, 自然冷却后 490 nm 波长、1 cm 光径测定吸光度(表 2), 以标准液浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘

制多糖标准曲线(图 2)。

表 2 葡萄糖浓度与吸光度的关系

浓度($\mu\text{g/mL}$)	吸光度
0	0
10	0.095
20	0.202
30	0.296
40	0.407
60	0.582
80	0.783

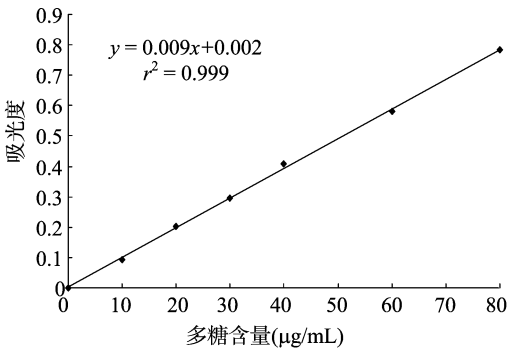


图 2 多糖标准曲线

1.3.5.2 紫球藻多糖的制备与含量的测定 取紫球藻液, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 向藻细胞团中加入 0.01 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液, 在磁力搅拌器上搅拌 45 min, 再加入同倍体积 20% 的三氯乙酸(TCA)溶液脱蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 3 倍体积的无水乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉过夜, 5 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 将沉淀物装入透析袋(透过分子量 8 000), 在无菌蒸馏水中透析 24 h, 透析后的溶液即为提取的多糖溶液。以无菌蒸馏水作为空白对照, 用苯酚-硫酸法测定样品多糖含量。

1.3.6 数据分析 试验结果均用平均值 \pm 标准差的形式表示, 在统计软件 SPSS 17.0 中利用单因素方差分析(one-way ANOVA)对数据进行分析比较, 标有不同小写字母者表示组间有显著差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Fe^{3+} 对紫球藻生长的影响

由图 3 可知, 各组紫球藻的生长趋势基本相同, 接种后各组的藻细胞都处于静止适应状态, 从培养 6 d 开始, 紫球藻进入对数生长阶段, 生物量不断增大, 培养 10 d 紫球藻基本达到稳定期, 生长速度减慢。从紫球藻比生长率(表 3)来看, 紫球藻的生长状况为处理组 2 > 处理组 3 > 处理组 1 > 对照组 > 处理组 4。 Fe^{3+} 浓度在 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内时对紫球藻的生长具有促进作用, 以 5×10^{-6} mol/L 的 Fe^{3+} 对紫球藻的生长促进作用最大, 其次是 5×10^{-5} mol/L。 5×10^{-4} mol/L 的 Fe^{3+} 抑制了紫球藻的生长。

2.2 不同浓度 Fe^{3+} 对紫球藻叶绿素 a 含量的影响

由图 4 可知, 紫球藻叶绿素 a 的含量在接种后基本保持不变, 随细胞浓度升高, 叶绿素 a 的含量在培养 6 d 后逐渐升

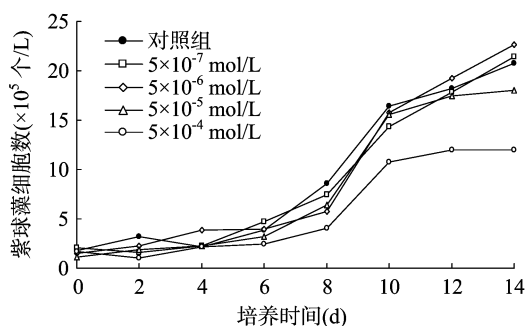
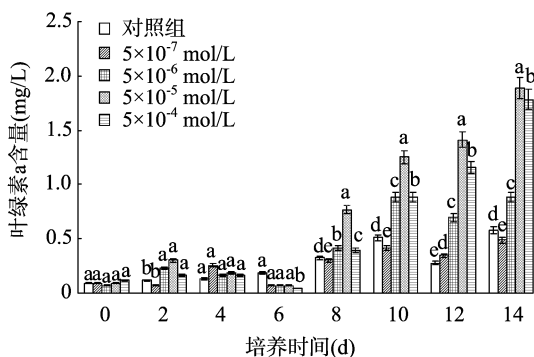
图3 不同 Fe^{3+} 浓度下紫球藻的生长曲线

表3 紫球藻比生长率

培养时间 (d)	对照组	比生长率			
		5×10^{-7} mol/L	5×10^{-6} mol/L	5×10^{-5} mol/L	5×10^{-4} mol/L
2	0.12	-0.06	0.08	0.12	-0.12
4	-0.09	0.14	0.12	0.03	0.16
6	0.09	0.16	0.08	0.08	0.04
8	0.10	0.18	0.08	0.15	0.11
10	0.13	0.14	0.22	0.19	0.21
12	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02
14	0.04	0.04	-0.03	0.06	0.05
平均值	0.075	0.077	0.083	0.08	0.06

高,在培养 10 d 基本稳定,随后 Fe^{3+} 浓度为 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} mol/L 的处理组紫球藻叶绿素 a 含量还持续升高。单因素方差分析结果表明,在培养的前 6 d,各处理组的叶绿素 a 含量差异不显著($P > 0.05$),自培养 8 d 开始, 5×10^{-5} mol/L 处理组中紫球藻叶绿素 a 的含量显著高于其他处理组及对照组($P < 0.05$)。

图4 不同 Fe^{3+} 浓度对紫球藻叶绿素a含量的影响

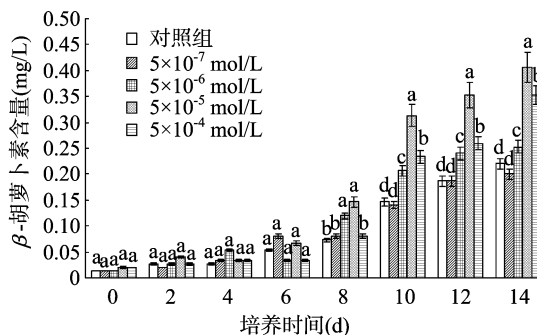
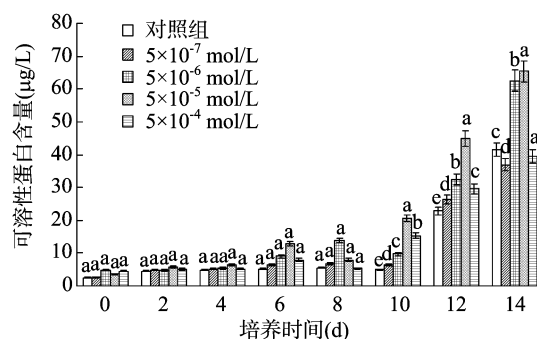
2.3 不同浓度 Fe^{3+} 对紫球藻 β -胡萝卜素含量的影响

由图 5 可知,紫球藻 β -胡萝卜素含量在接种后的一段时间里基本保持不变,随细胞浓度升高,培养 6 d 后 β -胡萝卜素含量逐渐升高,但 Fe^{3+} 浓度为 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} mol/L 的处理组 β -胡萝卜素含量升高的速率比对照组和 Fe^{3+} 浓度为 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} mol/L 的处理组快。单因素方差分析结果表明,在培养的前 6 d,各处理组的 β -胡萝卜素含量差异不显著($P > 0.05$),自培养 8 d 开始, 5×10^{-5} mol/L 处理组中紫球藻 β -胡萝卜素含量显著高于其他处理组及对照组($P < 0.05$)。

2.4 不同浓度 Fe^{3+} 对紫球藻可溶性蛋白含量的影响

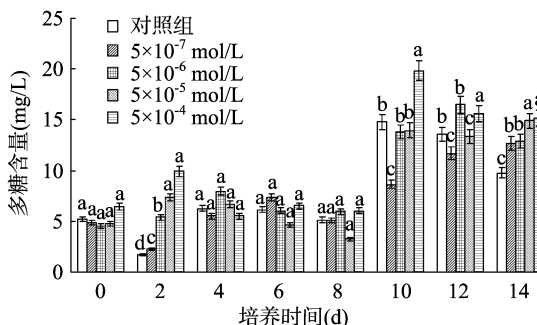
由图 6 可知,在培养的前 8 d,各处理组可溶性蛋白含量

与对照组无显著差异($P > 0.05$),在培养 10 d, Fe^{3+} 浓度为 5×10^{-5} mol/L 处理组的紫球藻可溶性蛋白含量显著高于其他处理组及对照组($P < 0.05$),在培养 12、14 d,各处理组的可溶性蛋白含量与对照组相比均有显著升高($P < 0.05$),添加不同浓度的 Fe^{3+} 可以有效地促进紫球藻可溶性蛋白的分泌。

图5 不同 Fe^{3+} 浓度对紫球藻 β -胡萝卜素含量的影响图6 不同 Fe^{3+} 浓度对紫球藻可溶性蛋白含量的影响

2.5 不同浓度 Fe^{3+} 对紫球藻胞外多糖积累的影响

由图 7 可知,紫球藻胞外多糖含量在接种后的一段时间里基本保持不变,随细胞浓度升高,从培养 8 d 开始,胞外多糖含量逐渐升高,在培养 10 d 基本达到稳定。在培养的前 8 d,对照组与各处理组的胞外多糖含量差异不显著($P > 0.05$),自培养 8 d 开始,各处理组胞外多糖含量出现差异,但差异不显著($P > 0.05$),在培养 10、12、14 d,各处理组与对照组的胞外多糖含量几乎保持稳定,但添加 Fe^{3+} 的浓度越高,紫球藻胞外多糖的积累量越多。

图7 不同 Fe^{3+} 浓度对紫球藻胞外多糖含量的影响

3 讨论

相关研究表明,Fe 对藻类的影响不仅取决于 Fe 的含量,

更重要的是取决于它转化成生物活性形式的速度以及藻类的有效吸收^[1]。本试验研究表明,不同 Fe^{3+} 浓度下紫球藻的生长趋势基本相同,在试验所涉及的 Fe^{3+} 浓度范围内,随着 Fe^{3+} 浓度升高,生长促进作用逐渐增强,但并不是 Fe^{3+} 浓度越高越好,适量的 Fe^{3+} (5×10^{-6} 、 5×10^{-5} mol/L) 会促进紫球藻的生长,但 Fe^{3+} 浓度增加到一定浓度 (5×10^{-4} mol/L) 后,紫球藻细胞的促进作用开始减弱,甚至抑制了紫球藻的生长。 Fe^{3+} 浓度高抑制了紫球藻细胞生长的原因可能为 Fe^{3+} 过高时,藻类光合作用效率下降,表现在叶绿素 a 含量的下降、细胞变小、细胞分裂率和生长率均下降^[1]。刘丹楹等指出,紫球藻生长的最适 Fe^{3+} 浓度为 1×10^{-5} mol/L, 其次为 5×10^{-6} mol/L^[14], 本试验结果与之相似。由此可见,最适紫球藻生长的 Fe^{3+} 浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5}$ mol/L, 这为实际生产提供了数据参考。

藻体中色素含量的多少直接影响藻体的光合作用的能力^[13], 同时 Fe 是藻类细胞光合色素合成不可缺少的元素, Fe^{3+} 添加量较低时,紫球藻活性物质的积累量少,这是因为 Fe 不足会影响细胞代谢活动中一些重要的酶的合成或降低其催化活性^[1]。随着 Fe^{3+} 添加量的升高,紫球藻主要色素叶绿素 a 和胡萝卜素的含量明显增多,本试验 Fe^{3+} 最适浓度为 5×10^{-5} mol/L。

藻胆蛋白是蓝藻、红藻和隐藻光合作用的捕光色素,主要包括藻红蛋白、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白,其中藻红蛋白是十分有开发前景的一员。紫球藻细胞内含有丰富的藻红蛋白和藻蓝蛋白,且以藻红蛋白含量最多。紫球藻的生长环境会影响藻胆蛋白的含量,仅见少数报道^[13-14]。在本试验中,紫球藻的可溶性蛋白在培养的中后期开始明显升高。王明兹等指出,随着紫球藻生长周期中细胞浓度的升高,可见光在培养液中的穿透和扩散受到了影响,细胞仅由叶绿素吸收光能而不能满足细胞代谢的需要,藻细胞在对数晚期开始积累代谢产物——藻胆蛋白^[13], 这在一定程度上解释了本试验紫球藻可溶性蛋白含量在其对数生长期后期开始明显升高的现象。本试验中,有利于紫球藻水溶性蛋白积累的 Fe^{3+} 浓度为 5×10^{-5} mol/L, 这与刘丹楹等的结果^[14] 相似。在通入 1% 二氧化碳后,紫球藻的水溶性蛋白含量显著降低,不过在补加氮源后,紫球藻水溶性蛋白含量明显升高^[11]。

紫球藻细胞外包围着一层黏质鞘,即细胞分泌出来的水溶性黏多糖,该多糖是一类由葡萄糖、木糖和半乳糖等单糖组成的易溶于水的多聚体。它是 1 种磺酸化多糖,在抗病毒、抗肿瘤、抗血脂、抗菌等方面具有特殊的生物活性作用。紫球藻多糖的产量和提取效率低、制备成本高限制了该多糖的大规模开发应用^[15]。因此,对不同生态条件下紫球藻多糖产量的研究具有十分重要的意义。尽管本试验中 4 个 Fe^{3+} 处理组的紫球藻胞外多糖产量与对照组之间不存在显著差异,但其产量随培养时间的延长和 Fe^{3+} 浓度的升高而增大,说明 Fe^{3+} 加富对紫球藻胞外多糖的分泌有着一定的促进作用。由于紫球藻胞外多糖通过高尔基体合成并分泌到胞外,因此其产量受到培养条件的明显影响^[16]。因此,筛选适宜的培养条件对获取紫球藻胞外多糖具有重要的作用。韩娟等在培养紫球藻时通入 1% 的二氧化碳,可以显著提高紫球藻的活性物质积

累,其多糖含量最高可达 238.8 mg/L,且在补加氮源后,其胞外多糖和水溶性蛋白的含量均显著升高^[11]。王明兹等指出,1 060 nm 的激光照射可以使紫球藻多糖的分泌量提高 50% ~ 150%^[8]。此外,有研究表明,高盐度对紫球藻胞外多糖的分泌具有一定的刺激作用,尤其在盐度 5% 时,胞外多糖的分泌量显著增大^[17],使藻细胞表面的外被增厚,有利于细胞形成表面的微环境,防治由于盐度过高造成的细胞水分丢失,这是细胞防止离子毒害的机制之一^[18]。

参考文献:

- [1] 王培磊,刘明河,张学成,等. Fe 对两株盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 生长和 β -胡萝卜素积累的影响[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 39-43.
- [2] 金心,石广玉. 生物泵在海洋碳循环中的作用[J]. 大气科学, 2001, 25(5): 683-688.
- [3] Coale K H, Johnson K S, Fitzwater S E, et al. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean[J]. Nature, 1996, 383: 495-501.
- [4] Hutchins D A, Ditullio G R, Zhang Y, et al. An iron limitation mosaic in the California upwelling regime[J]. Limnology and Oceanography, 1998, 43(6): 1037-1054.
- [5] Flynn K J, Hipkin C R. Interactions between iron, light, ammonium and nitrite: insights from the construction of a dynamic model of algal physiology[J]. Journal of Phycology, 1999, 35(6): 1171-1190.
- [6] Geider R J. Complex lessons of iron uptake[J]. Nature, 1999, 400(400): 815-816.
- [7] 李丽. 铁离子对三株典型微藻生长和脂质积累及相关基因表达的影响研究[D]. 长沙: 中南大学, 2010: 10-19.
- [8] 王明兹,施巧琴,郑梅清,等. 紫球藻的培养与利用(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2001, 30(2): 66-69.
- [9] 郑彩云,卢伟婷,王艳,等. 不同氮浓度对紫球藻生长及藻胆蛋白和叶绿素 a 含量变化的影响[J]. 中国酿造, 2013, 32(6): 133-135.
- [10] 赵薇. 紫球藻脂肪酸代谢调控[D]. 福州: 福建师范大学, 2009: 12-27.
- [11] 韩娟,王江宏,李爱芬,等. 通入 CO_2 和补加氮源对紫球藻生长和代谢物质积累的影响[J]. 生态科学, 2013, 32(1): 51-56.
- [12] 刘建国,赵学武,王玉君,等. 胁迫条件下盐藻 β -胡萝卜素及其异构体累积的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(1): 71-72.
- [13] 王明兹,施晓琴,陈必链,等. 紫球藻生长周期可见光吸收光谱与生化变化[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 23-26.
- [14] 刘丹楹,陆波,李玲玉. Fe^{3+} 对紫球藻生长及蛋白质和 β -胡萝卜素含量的影响[J]. 资源开发与市场, 2013, 29(5): 464-466.
- [15] 李战. 三种紫球藻培养、胞外多糖提取及 RAPD 分析[D]. 上海: 上海师范大学, 2004: 37-42.
- [16] 王长海. 紫球藻及其应用研究[J]. 海洋通报, 1998, 17(3): 79-84.
- [17] 刘洪艳,王麟. 不同 NaCl 浓度对紫球藻生长及生化组分含量的影响[J]. 盐业与化工, 2008, 37(5): 35-37, 43.
- [18] 贾顺义. 不同盐度及氮磷浓度对紫球藻生长代谢的影响[D]. 大连: 大连理工大学, 2006: 28-35.