

盐度对蛋白核小球藻生长、叶绿素荧光参数及代谢酶的影响

江灵芝^{1,2}, 孙 雪^{1,2*}, 王玮蔚^{1,2}, 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以蛋白核小球藻 820 为实验材料, 研究了 3 种盐度(15、30、45)对其生长、叶绿素荧光参数和两种代谢酶活性的影响, 以了解该小球藻对盐度的适应能力。结果表明, 蛋白核小球藻 820 的生长随盐度增加而变慢; 而油脂含量随盐度增加而升高。叶绿素荧光参数中的 PSII 最大光能转化效率(F_v/F_m)、PSII 实际光能转化效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(q_P)随盐度升高下降, 而非光化学淬灭系数(NPQ)随盐度升高而上升。超氧化物歧化酶(SOD)活性变化大致趋势是低盐和高盐下活性较高, 碳酸酐酶(CA)活性则随盐度升高而降低, 第 5 d 时 45 盐度是 30 盐度培养的 0.43 倍。因此, 认为高盐一定程度地抑制了蛋白核小球藻的生长、叶绿素荧光参数和 CA 活性, 但是促进了总脂含量和抗氧化酶 SOD 活性的提高。

关键词: 蛋白核小球藻; 盐度; 叶绿素荧光; 超氧化物歧化酶; 碳酸酐酶

中图分类号: Q513

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2013) 03-0006-05

小球藻(*Chlorella*)为绿藻门普生性常见单细胞藻, 是第一种被人工培养的微藻^[1]。在我国常见的种类主要有蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、椭圆小球藻(*C. ellipsoidea*)、普通小球藻(*C. vulgaris*)、原始小球藻(*C. protothecoides*)等。小球藻含有丰富的蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸、膳食纤维、维生素和微量元素等^[2], 具有很高的营养价值, 是人类优良的保健食品和水产养殖饵料。小球藻生长因子(CGF)以及小球藻中高含量的 EPA、DHA 等不饱和脂肪酸使小球藻在医药、化工和食品等行业也有广泛应用。

盐度是影响水生藻类生长繁殖的一个重要生态因子, 盐胁迫会引起微藻生理生化和分子水平等一系列的变化。首先, 盐胁迫可以干扰光合作用在内的一系列生理过程, 从而抑制藻类生长和光合作用^[3]。盐度还可以影响藻类光合色素含量, 如低盐有利于盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)叶绿素含量的提高, 而高盐则增加了胡萝卜素含量^[4]。

盐度胁迫主要是渗透胁迫和离子胁迫。渗透压力和钠离子毒性还可以引起活性氧(ROS)包括超氧自由基、过氧化氢、羟自由基等的形成, 后者可以破坏线粒体和叶绿体的细胞结构。而超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内第一个参与活性氧清除反应的重要保护酶^[5], 在抗氧化损伤中发挥着重要作用。在较低盐度范围内, 随着 NaCl 浓度的提高, 盐藻 SOD 活性显著增强^[6]。但杜氏藻 *D. tertiolecta* 中的不同抗氧化酶和抗氧化底物对盐度的响应则不同^[7]。

盐度逆境也影响了藻类碳氮代谢等基础代谢活动。碳酸酐酶(CA)是一种广泛存在于动植物体内的重要酶类, 负责催化 CO_2 与 HCO_3^- 的转化, 参与生物体诸多生理过程, 如光合作用、呼吸作用、 CO_2 和离子运输、钙化作用和酸碱平衡等^[8-9]。CA 活性的高低可反映出藻细胞无机碳利用情况, 不同盐度对藻类 CA 活性也有着直接影响^[10]。

笔者使用盐度耐受范围比较广的蛋白核小球

收稿日期: 2013-01-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省科技厅公益性研究项目 (2010C33066); 浙江省创新团队项目 (2009R50012-6, 2010R50025); 宁波市科技攻关项目 (2010C10022); 宁波市国际合作项目 (2010D10012)。

第一作者: 江灵芝 (1987—), 女, 湖北鄂州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 藻类生理生化。E-mail: zihan19870101@163.com

*通信作者: 孙 雪 (1974—), 女, 山东烟台人, 副研究员, 主要研究方向: 藻类生化与分子生物学。E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 820 为实验材料,研究了不同盐度对藻生长和叶绿素荧光参数的影响,并结合不同盐度培养下藻细胞的 SOD 和 CA 活性变化,探讨适合小球藻生长和碳代谢的盐度,了解小球藻对盐度环境的适应能力,为增强小球藻抗逆性,提高其无机碳利用和生物量等提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

本实验所用藻种为蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*) 820, 来自宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室。用分别添加不同 NaCl 浓度的 3 种盐度(15、30、45)人工海水培养基培养,每个浓度设置 3 个平行。培养温度为 25℃,光照强度为 3 500 klx,光暗周期为 12L:12D。

1.2 实验方法

(1) 生长曲线制作:从第 1 d 到第 15 d,每天取样测定藻液的 OD₄₄₀ 吸光值,再按照藻细胞数与 OD₄₄₀ 标准曲线公式 $Y = 15.528X - 0.9178$, ($R^2 = 0.9960$), 计算出相应 OD 值对应的小球藻细胞数,制作藻细胞的生长曲线。

(2) 总脂含量测定:以 5 000 r·min⁻¹ 离心收集平台期小球藻,冷冻干燥后取 10 mg 干藻粉,参照香草醛比色法测定其总脂含量^[11]。

(3) 叶绿素荧光参数的测定:用 Water-PAM 水样叶绿素荧光仪(Walz, Germany)进行叶绿素荧光参数的测定。测量前将微藻样品暗适应 15 min,再利用水样叶绿素荧光仪发出的强饱和光激发,测量不同盐度下的荧光参数:PSII 最大光能转化效率(F_v/F_m)、PSII 实际光能转化效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(qP)和非光化学淬灭系数(NPQ)。

(4) 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:参考朱广廉等氮蓝四唑法^[12]测定 SOD 活力,以抑制氮蓝四唑光还原的 50%为 1 个酶活力单位。

(5) 碳酸酐酶(CA)活性测定:采用 pH 计法,参照 Wilbur 和 Anderson 方法^[13],并稍做改进。

(6) 数据处理:数据均采用 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同盐度对蛋白核小球藻生长的影响

小球藻在不同盐度培养基中生长情况如图 1

所示。图 1 显示,3 种盐度培养蛋白核小球藻均可以正常生长,只是随着盐度的增加生长速度变慢。其中,低盐(15)培养藻生长最快,其次是正常盐度(30),最慢的是高盐(45)培养。初始接种量相同,生长到第 15 d,低盐和高盐的细胞数分别是正常盐度(30)培养的 1.04 倍和 0.83 倍。可见,在此盐度范围内,该小球藻均能较快生长,说明本实验用小球藻的盐度适应范围较广。

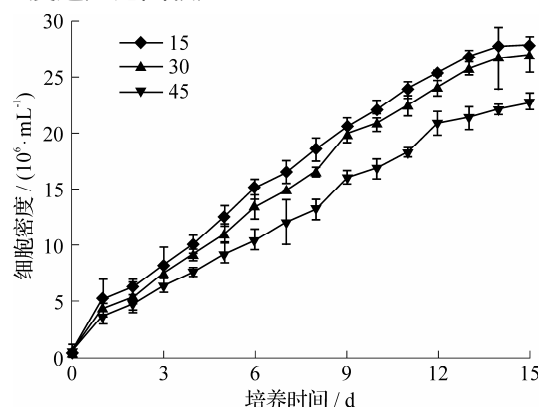


图 1 不同盐度对蛋白核小球藻生长的影响

2.2 不同盐度对蛋白核小球藻总脂含量的影响

盐度不仅可影响藻类生长,还影响藻类的生化组成。蛋白核小球藻 820 在不同盐度培养中的总脂积累情况见表 1。由表 1 可见,不同盐度影响了小球藻总脂的积累,随着盐度升高蛋白核小球藻 820 总脂含量增加。低盐(30)条件下小球藻总脂含量最低,为 22.44%,是正常盐度下总脂含量的 0.87 倍,而高盐培养的总脂含量是正常盐度条件下的 1.36 倍。可见高盐度促进了该小球藻的总脂积累。

表 1 不同盐度对蛋白核小球藻总脂含量的影响

盐度	总脂含量/%
15	22.44±0.16
30	25.93±0.06
45	35.22±0.21

2.3 不同盐度对蛋白核小球藻叶绿素荧光参数的影响

蛋白核小球藻 820 的 PSII 最大光能转化效率(F_v/F_m)、PSII 实际光能转化效率(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(qP)和非光化学淬灭系数(NPQ)随培养时间的变化如图 2 所示。从图中可知,不同盐度对 4 个叶绿素荧光参数的影响不同,其中 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 qP 均随着培养时间的增加呈现出先升后降趋势,

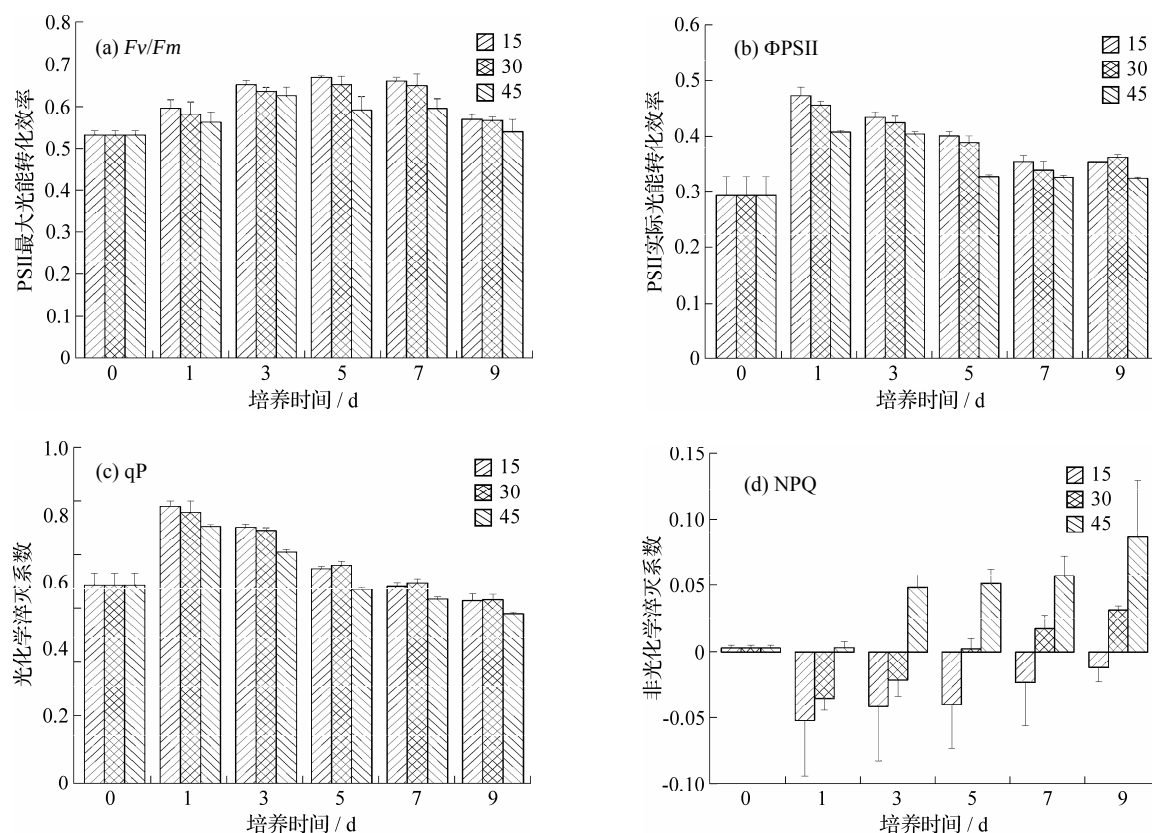


图2 不同盐度对蛋白核小球藻叶绿素荧光参数的影响

并且随盐度升高而降低, 而 NPQ 则随着盐度的升高和盐胁迫时间的延长而增加。

2.4 不同盐度对蛋白核小球藻 SOD 活性的影响

不同盐度培养的蛋白核小球藻 SOD 活性变化如图 3 所示。从图中可见, SOD 活性随时间增加大致表现出“降—升—降”的过程, 即在培养的前 2 h, SOD 活性先稍有降低, 在 2~20 h 阶段 SOD 活性不断上升, 在 20 h 时 SOD 活性最高, 20~72 h 阶段 SOD 活性又降低。不同盐度对 SOD 活性的影响较复杂, 但大致趋势是低盐和高盐培养 SOD 活性要高于正常盐度培养, 这可能与高低盐胁迫下藻体内产生较多的活性氧自由基, 因此诱导了 SOD 酶活性的增加, 以抵御和适应盐度逆境条件有关。

2.5 不同盐度对蛋白核小球藻 CA 活性的影响

图 4 是不同盐度条件下蛋白核小球藻碳酸酐酶活性变化情况。从图 4 可见, CA 活性随着培养时间的延长经历了先升再降的变化过程, 即在培养的第 5 d, 蛋白核小球藻 820 CA 活性达到最高值 (前 2 d 由于培养初期藻密度低, 酶活性低, 所以未测出)。盐度对蛋白核小球藻碳酸酐酶活性影响是

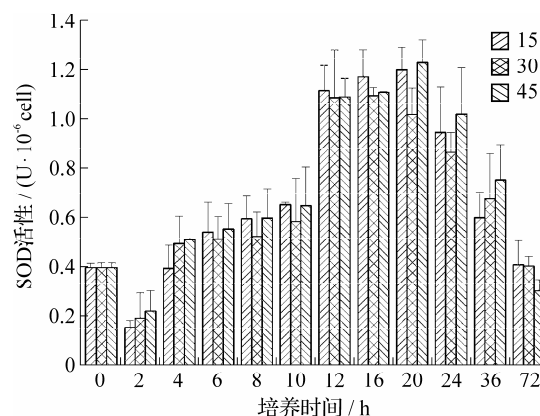


图3 不同盐度对蛋白核小球藻 SOD 活性的影响

随着盐度升高 CA 活性降低。其中在酶活性最高的第 5 d, 低盐(15)是正常盐度培养的 1.99 倍; 而高盐(45)则为 30 盐度培养的 0.43 倍。

3 讨论

3.1 盐度对微藻生长和油脂积累的影响

盐度是影响水生藻类生长繁殖的一个重要环境因素, 过低或过高盐度都会影响微藻生长和生化组成。关于盐度对微藻总脂积累的影响, 多数结

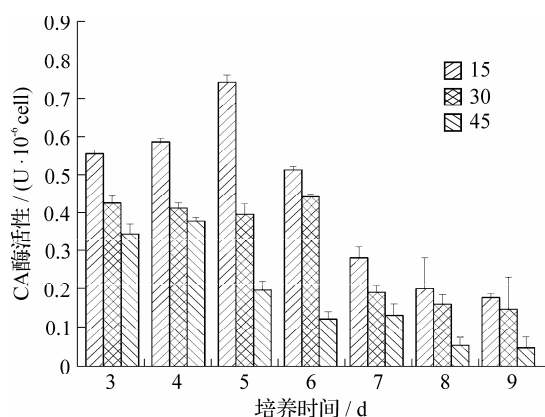


图4 不同盐度对蛋白核小球藻碳酸酐酶活性的影响

果表明,适当增加盐分可促进微藻的脂类含量^[14]。如在淡水培养小球藻中,不同盐度对小球藻油脂积累有不同程度的促进作用^[15-16]。而在耐盐绿藻杜氏藻 *D. tertiolecta* 中,其总脂含量从 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 培养的 60% 增加到 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 67%^[17]。本研究结果也表明高盐度促进了微藻脂类积累。

3.2 盐度对微藻叶绿素荧光参数的影响

叶绿素在光能的吸收、传递和转换过程中起着非常重要作用。叶绿素荧光分析技术就是一种以光合作用理论为基础、利用植物体内叶绿素作为天然探针,研究和探测植物光合生理状况及各种外界因子对其细微影响的新型植物活体测定和诊断技术^[18],其中常用几个重要叶绿素荧光动力学参数有 PSII 最大光能转化效率(F_v/F_m)、PSII 实际光能转化效率(ΦPSII)、光化学淬灭(qP)和非光化学淬灭(NPQ)等。这些叶绿素荧光参数与光合作用的各反应过程密切相关,任何逆境条件对光合作用的影响都可通过叶绿素荧光诱导动力学反映出来^[19]。

文中结果与大多数藻类在盐胁迫逆境中的结果一致,如塔胞藻和小新月菱形藻中的相关研究结果表明在高盐度下藻细胞的荧光动力学参数 F_v/F_m 、 ΦPSII 、 qP 低于正常海水,而 NPQ 却随着盐度升高而上升^[20-21]。这与非光化学淬灭是一种自我保护机制,对光合结构具有一定的保护作用相关^[22]。

3.3 盐度对微藻 SOD 活性的影响

SOD 作为生物体内第一个参与活性氧清除反应的重要保护酶^[5],在抗氧化酶类中处于重要地位。SOD 的主要功能是将超氧化物阴离子自由基(O_2^-)快速歧化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧; H_2O_2 再

在过氧化氢酶(CAT)和其它过氧化物酶(如 APX)等的作用下转变为水和分子氧。

不同植物物种在盐胁迫中 SOD 活性变化并不完全相同。高等植物中多数研究表明,盐度可以增加 SOD 的活性,也可以不改变其酶活^[7]。在藻类中也是如此,笔者的结果是高盐一定程度地增加了 SOD 活性;而杜氏藻 *D. tertiolecta* 在 $0.05 \sim 3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 整个盐度范围内,其 SOD 活性没有变化^[7]。

3.4 盐度对微藻碳酸酐酶活性的影响

碳酸酐酶(CA)是二氧化碳浓缩机制(CCM)的重要组成部分,在微藻无机碳转运过程中发挥着重要作用。碳酸酐酶活性变化将影响微藻光合作用中可利用无机碳浓度。CA 属于诱导酶类,其活性高低受无机碳浓度、盐度、 Zn^{2+} 等环境因子的影响。本研究结果表明,CA 活性受高盐抑制,该结果与其它微藻中研究结果一致。如盐生杜氏藻在 5~20 盐度的低渗培养基中培养时,其胞外 CA 活性显著降低^[10];而小新月菱形藻中胞外 CA 活性也是随盐度升高而逐渐降低^[21]。

参考文献:

- [1] 胡开辉,汪世华. 小球藻的研究开发进展[J]. 武汉工业学院学报, 2005, 24(3):27-30.
- [2] 杨鹭生,李国平,陈林水. 蛋白核小球藻粉的蛋白质、氨基酸含量及营养价值评价[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(1):36-38.
- [3] Xia J R, Li Y J, Zou D H. Effect of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements[J]. Aqua Bot, 2004, 80:129-137.
- [4] 王培磊,袁子懿. 盐度对盐生杜氏藻生长及其色素积累的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(2):71-74.
- [5] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein)[J]. J Biol Chem, 1969, 244:6049-6055.
- [6] 郭金耀,杨晓玲. 盐藻超氧化物歧化酶分子类型鉴定[J]. 水产科学, 2011, 30(5): 298-300.
- [7] Jahnke L S, White A L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*[J]. J Plant Physiol, 2003, 160:1193-1202.
- [8] Henry R E. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism[J]. Annu Rev Physiol, 1996, 58:523-538.
- [9] Badger M R, Price G D. The role of carbonic anhydrase

- in photosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45:369-392
- [10] Liu W, Ming Y, Li P, et al. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 54:43-48.
- [11] 丛峰, 孙雪, 徐年军. 几种小球藻油脂含量检测方法的比较及优化[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2012, 25(1): 20-23.
- [12] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学试验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990:37-40.
- [13] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase[J]. *J Biol Chem*, 1948, 176:147-154.
- [14] Harwati T U, Willke T, Vorlop K D. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 121: 54-60.
- [15] 黄冠华, 陈锋. 环境因子对异养小球藻脂肪酸组分含量和脂肪总酸产量的影响[J]. *可再生能源*, 2009, 27(3): 65-69.
- [16] 张桂艳, 温小斌, 梁芳, 等. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(8):2076-2085.
- [17] Takagi M, Karseno, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(3):223-226.
- [18] 赵会杰, 邹奇, 余振文. 叶绿素荧光分析技术及其在植物光合机理研究中的应用[J]. *河南农业大学学报*, 2000, 34(3): 248-251.
- [19] 梁英, 冯力霞, 尹翠玲, 等. 叶绿素荧光技术在微藻环境胁迫研究中的应用现状及前景[J]. *海洋科学*, 2007, 31(1):71-77.
- [20] 梁英, 冯力霞, 田传远, 等. 盐胁迫对塔胞藻生长及叶绿素荧光动力学的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(5):726-732.
- [21] 余锦兰, 夏建荣, 邹永东. 小新月菱形藻碳酸酐酶活性和光合作用对高盐度胁迫的响应[J]. *水产学报*, 2011, 35(4):515-523.
- [22] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义与讨论[J]. *植物学通报*, 1999, 16(4):444-448.

Effect of Salinity on the Growth, Chlorophyll Fluorescence Characteristics and Enzymes of *Chlorella pyrenoidosa*

JIANG Ling-zhi^{1,2}, SUN Xue^{1,2*}, WANG Wei-wei^{1,2}, XU Nian-jun^{1,2}

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Minister of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Chlorella pyrenoidosa* is a kind of important economic microalgae. In this paper, the effects of different salinity (15, 30 and 45) on the growth, total lipid content, chlorophyll fluorescence parameters and enzymic activities of *C. pyrenoidosa* 820 are investigated in order to understand how the alga responds to salinity. Results show that, with the increase of salinity, the growth speed of *C. pyrenoidosa* 820 decreases, but the lipid contents keep increasing. The chlorophyll fluorescence parameters of the maximal photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m), actual photochemical efficiency of PSII ($\Phi PSII$) and photochemical quenching (qP) decline with the increasing salinity, whereas the non-photochemical quenching (NPQ) is enhanced with the increasing salinity. The superoxide dismutase (SOD) activities are higher under the 15 and 45 salinity than that of 30. The carbonic anhydrase (CA) activities are reversely proportional to the salinity increase, and CA activity of 45 is 43% of that of 30 salinity on the fifth day. These results suggest that the growth, chlorophyll fluorescence parameters and CA activity of *C. pyrenoidosa* are inhibited to a certain extent by the increased salinity, but the lipid content and SOD activity are enhanced to adapt the adverse salt environment.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; salinity; chlorophyll fluorescence; superoxide dismutase; carbonic anhydrase

(责任编辑 章践立)