

锌锰组合对盐藻生长和蛋白质、 β -胡萝卜素积累的影响

郭金耀, 杨晓玲

(淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要:为了探索培养盐藻的微量元素条件, 实验研究了微量元素锌、锰的不同浓度组合对盐藻细胞生长与物质积累的影响。结果表明, 培养液中适当锌锰浓度的组合对盐藻细胞生长和物质积累有促进作用, 锌锰浓度过高或过低都是相对不利的。在试验的9种锌锰浓度组合中, 以培养液中 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/L 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L 的浓度组合对盐藻细胞的生长和物质积累促进作用最好, 它可使培养液中的盐藻细胞密度、蛋白质积累量和 β -胡萝卜素积累量都达到最高。培养液中 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mg/L 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/L 的浓度组合可使单个盐藻细胞中 β -胡萝卜素和蛋白质积累量都最高, 但可能仅是盐藻细胞在锌、锰过多的逆境条件下的适应性反应。

关键词: 锌锰组合; 盐藻; 生长; 物质积累

中图分类号: Q945.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2010)04-0127-04

盐藻 (*Dunaliella salina*) 又名盐生杜氏藻, 为单细胞绿色自养藻, 因它能积累大量的蛋白质、甘油和 β -胡萝卜素而具有多种用途和较高经济价值, 例如: 作为重要鱼、虾、贝类幼体的饵料, 作为人类食品添加剂, 作为重要的医药原料和化工原料等 (王春波等, 1998; 刘成玉等, 2000; 刘亚军和赵文, 2004; 李正华等, 2005)。近年来, 又将盐藻作为生物反应器, 加紧开发研究目标基因产物 (柴玉荣等, 2004)。所以, 开展盐藻的科学养殖研究有重要意义。已有研究表明, 磷酸盐是盐藻生长最好的磷源, 而硝酸盐则为盐藻生长的最好氮源 (陈晗华和钱凯先, 1997; 郝建欣等, 2003)。微量元素对盐藻生长的作用报道较少 (杨晓玲和郭金耀, 2007; 郭金耀和杨晓玲, 2008)。本文报道微量元素锌锰组合对盐藻生长与物质积累的影响, 以期对盐藻的科学培养和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

盐藻 (*Dunaliella salina*) 藻种由中国海洋大学提供, 实验前培养至对数生长期。

1.2 实验方法

1.2.1 实验处理与培养 参照郭金耀等 (2008) 的

盐藻培养方法, 配制含有不同浓度 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4、6、8 mg/L) 与 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2、4、6 mg/L) 组合的9种类型的盐藻培养基, 然后分别接入盐藻藻种, 使溶液吸光度 $A_{450\text{nm}} = 0.2$, 再将每种类型的培养液分装在 100 mL 的三角瓶中, 每瓶 60 mL, 每种类型培养液装 3 瓶, 封口后放入智能光照培养箱中培养。培养温度白天为 25℃, 夜间 20℃。光暗比为 12 h: 12 h。白天光照强度 3 500 lx。培养 15 d 后, 测定盐藻细胞的密度、 β -胡萝卜素含量和蛋白质含量。

1.2.2 盐藻细胞生长与物质积累的测定 盐藻细胞的密度、 β -胡萝卜素含量和蛋白质含量的测定按照杨晓玲等 (2007) 的方法进行。单个盐藻细胞样本的 β -胡萝卜素含量和蛋白质含量分别根据提取液样本的细胞密度与相应的 β -胡萝卜素含量和蛋白质含量计算而得。

2 结果与分析

2.1 锌锰组合对盐藻生长的影响

细胞密度的变化可反映盐藻的生长状况, 盐藻经 15 d 培养后, 测定的各培养液中的盐藻细胞密度结果见图 1。

可以看出, 不同锌锰浓度组合的培养液中, 盐藻细胞密度各不相同。 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度分别为 6 mg/L 和 4 mg/L 时, 盐藻细胞密度最高, 而 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度分别为 8 mg/L 和 6 mg/L 时, 盐藻细胞密度最低。当锌浓度一定时, 随着锰浓度的增加, 盐藻细胞密度逐渐增加, 当 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加到 4 mg/L 时, 盐藻细胞密度达到最大, 当 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度继续增

收稿日期: 2009-08-21 收修改稿日期: 2010-05-11

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题项目 (HS08010), 淮海工学院自然科学基金 (Z2007033)。

作者简介: 郭金耀, 1956年生, 山西平遥人, 教授, 现从事海洋藻类生理学研究。E-mail: gjyao6688@yahoo.com.cn

加到6 mg/L时,盐藻细胞密度又降低。当锰浓度一定时,随着锌浓度的增加,盐藻细胞密度逐渐增加,当 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度增加到6 mg/L时,盐藻细胞密度达到最大,当 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度继续增加到8 mg/L时,盐藻细胞密度又降低。表明各锌锰浓度组合下培养的盐藻细胞密度差异较大。

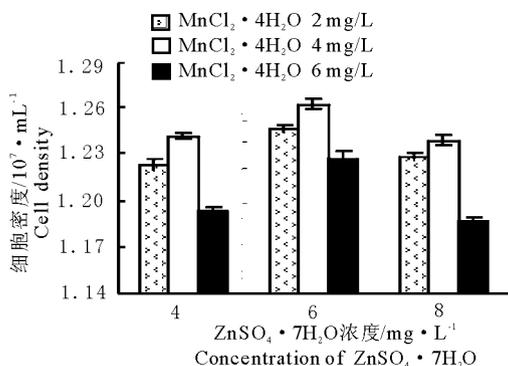


图1 锌锰组合对培养液中细胞密度的影响

Fig. 1 Combination of Zn and Mn influenced on cellular density in culture medium

这些结果表明,锌、锰元素均为盐藻生长所必需,但浓度过高或过低都会对盐藻细胞生长产生相对不利的影响。在培养液中的锌锰浓度组合为 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 6 mg/L和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 4 mg/L时,最适合盐藻细胞的生理与生长,是盐藻生长培养中较为理想的一种微量元素浓度组合,有利于盐藻细胞的增殖。

2.2 锌锰组合对盐藻β-胡萝卜素积累的影响

经过15 d培养后,提取盐藻细胞β-胡萝卜素,测定结果如图2和图3。

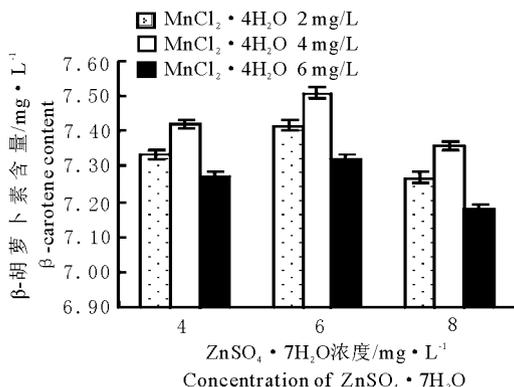


图2 锌锰组合对提取液中β-胡萝卜素含量的影响

Fig. 2 Combination of Zn and Mn influenced on β-carotene content in extract

由图2可以看出,不同锌锰浓度组合的培养液中,β-胡萝卜素积累也各不相同。 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 浓度分别为6 mg/L和4 mg/L时,提取液中的β-胡萝卜素最多。在锌浓度一定时,

随着锰浓度的提高,盐藻细胞对β-胡萝卜素积累的规律与盐藻细胞密度的变化规律一致。即当培养液中的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 浓度为2 mg/L时,提取液中的β-胡萝卜素含量较低;随着培养液中的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 浓度增加到4 mg/L时,提取液中β-胡萝卜素含量逐渐增加至最大,表明锰为盐藻细胞生长代谢所必需,缺锰影响盐藻β-胡萝卜素的积累;培养液中的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 浓度增加到6 mg/L时,提取液中β-胡萝卜素含量又降低,说明高浓度的锰会抑制盐藻β-胡萝卜素的积累。当锰浓度一定时,锌浓度对盐藻培养中β-胡萝卜素积累的影响情况也与盐藻细胞密度的变化规律相类似。说明各锌锰浓度组合的培养液之间,β-胡萝卜素积累量差异明显。

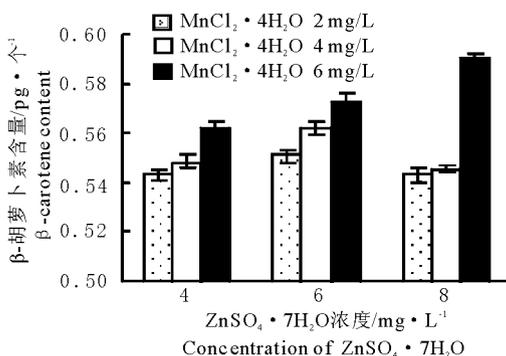


图3 锌锰组合对单个细胞中β-胡萝卜素积累的影响

Fig. 3 Combination of Zn and Mn influenced on β-carotene content in single cell

由图3可以看出,单个盐藻细胞中的β-胡萝卜素含量也随培养液中的锌、锰浓度的不同发生一定规律性变化,但与提取液中β-胡萝卜素含量的变化规律不同。在培养液中加入较低浓度的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (6 mg/L或4 mg/L)和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (4 mg/L或2 mg/L)组合时,单个盐藻细胞中的β-胡萝卜素含量都较低,而当培养液中加入较高浓度的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (6 mg/L)时,单个盐藻细胞中的β-胡萝卜素含量较高,尤其在锌锰浓度组合为 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8 mg/L和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 6 mg/L时,单个盐藻细胞中的β-胡萝卜素含量达到最高。

2.3 锌锰组合对盐藻蛋白质积累的影响

经15 d培养后,提取盐藻细胞蛋白质,检测结果如图4和图5。

从图4可以看出,不同锌锰浓度组合的培养液中,蛋白质的积累也各不相同。 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 浓度分别为6 mg/L和4 mg/L时,提取液中的蛋白质最多。在锌浓度一定时,随着锰浓

度的提高, 盐藻细胞对蛋白质积累的规律与盐藻 β -胡萝卜素积累的规律一致。即当培养液中的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 2 mg/L 时, 提取液中的蛋白质含量较低; 随着培养液中的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加到 4 mg/L 时, 提取液中蛋白质含量逐渐增加至最大, 说明锰与盐藻细胞氮代谢有关, 缺锰影响盐藻蛋白质的形成; 培养液中的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加到 6 mg/L 时, 提取液中蛋白质含量又降低, 说明高浓度的锰会抑制盐藻细胞的生长。当锰浓度一定时, 锌浓度对盐藻培养中蛋白质积累的影响情况也与 β -胡萝卜素积累的规律相类似。说明各锌锰浓度组合的培养液之间, 蛋白质积累差异明显。

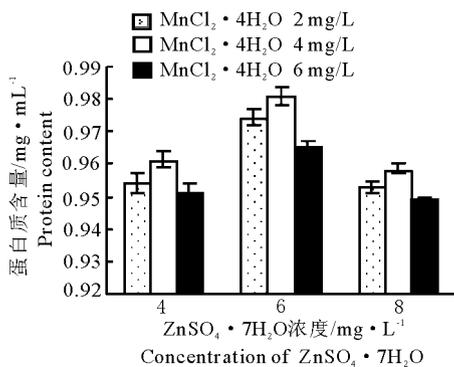


图4 锌锰组合对提取液中蛋白质含量的影响

Fig. 4 Combination of Zn and Mn influenced on protein content in extract

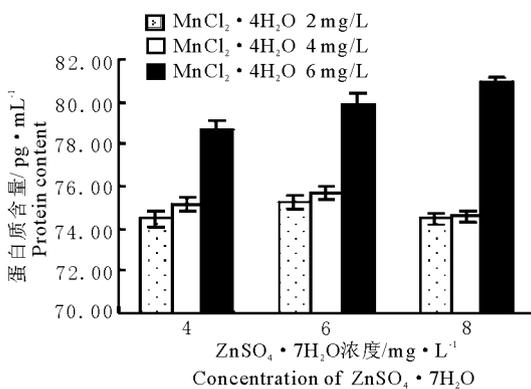


图5 锌锰组合对单个细胞中蛋白质积累的影响

Fig. 5 Combination of Zn and Mn influenced on protein content in single cell

由图5可以看出, 单个盐藻细胞中的蛋白质含量也随培养液中的锌、锰浓度的不同发生一定规律性变化, 但与提取液中蛋白质含量的变化规律不同。在培养液中加入较低浓度的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6 mg/L 或 4 mg/L) 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/L 或 2 mg/L) 组合时, 单个盐藻细胞中的蛋白质含量都较低, 而当培养液中加入较高浓度的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (6 mg/L) 时, 单个盐藻细胞中的蛋白质含量较高, 尤其在 ZnSO_4

$\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度分别为 8 mg/L 和 6 mg/L 时, 单个盐藻细胞中的蛋白质含量达到最高。这可能是盐藻细胞在高浓度锌锰组合的逆境条件下的适应性反应。

3 讨论

锌、锰均是盐藻细胞生长与代谢中的必需元素。锌是碳酸酐酶的成分, 缺锌时呼吸作用和光合作用均会受到影响。锌也是谷氨酸脱氢酶及羧肽酶的组成成分, 因此, 它在氮代谢中也起一定作用, 缺锌会影响氮代谢过程。锰是光合放氧复合体的主要成员, 缺锰时光合放氧受到抑制。锰为形成叶绿素和维持叶绿素正常结构的必需元素。锰也是许多酶的活化剂, 如一些转移磷酸的酶和三羧酸循环中的柠檬酸脱氢酶、草酰琥珀酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、柠檬酸合成酶等, 都需锰的活化, 故锰与光合作用和呼吸作用均有关系。锰还是硝酸还原的辅助因素, 缺锰时硝酸就不能还原成氨, 细胞也就不能合成氨基酸和蛋白质 (郝建军和康宗利, 2005)。盐藻培养中, 锌锰浓度的不同组合可对盐藻细胞的生长与物质积累产生明显的调控作用。

培养液中适当锌锰浓度的组合对盐藻细胞的生长和物质积累有促进作用, 而锌锰浓度过高或过低则都是相对不利的。将盐藻的培养基中加入 6 mg/L 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 4 mg/L 的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 是一种好的浓度组合选择。因为它可明显地促进盐藻细胞的生长, 使培养液中盐藻细胞的密度大幅度提高, 有利于通过盐藻细胞获得更多的 β -胡萝卜素和蛋白质等产品。而将培养液中加入 8 mg/L 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 6 mg/L 的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度组合, 虽然可使单个盐藻细胞中 β -胡萝卜素和蛋白质积累量都达到最高, 但这可能仅是在高浓度锌锰组合的逆境条件下, 盐藻细胞的适应性反应。因为此时培养液中的细胞密度、盐藻蛋白质含量、 β -胡萝卜素含量都很低, 通过盐藻细胞获得的 β -胡萝卜素和蛋白质总量减少。

参考文献:

- 柴玉荣, 王天云, 薛乐勋. 2004. 新型生物反应器 - 杜氏盐藻研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 24(2): 30-33.
- 陈晗华, 钱凯先. 1997. 氮、磷对盐藻生长及其 β -胡萝卜素积累的影响[J]. 浙江大学学报: 自然科学版, 31(6): 731-736.
- 郭金耀, 杨晓玲. 2008. 锰对盐藻生长与物质积累的调控作用[J]. 水产科学, 27(3): 148-150.
- 郝建军, 康宗利. 2005. 植物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社.

版社: 142 - 143.

郝建欣, 孙钰, 丛威, 等. 2003. 盐藻生长过程中氮磷利用与色素积累[J]. 海洋科学, (2): 41 - 44.

李正华, 江树勋, 蔡桂琴, 等. 2005. 盐藻分子生物学研究概况[J]. 海洋科学, 29(6): 69 - 72.

刘成玉, 王春波, 蓝孝贞, 等. 2000. 盐藻 β - 胡萝卜素对恶性肿瘤病人红细胞免疫粘附肿瘤细胞能力的影响[J]. 中国海洋药物, (1): 30 - 32.

刘亚军, 赵文. 2004. 杜氏藻的生物学和生态学研究进展

[J]. 大连水产学院学报, 19(2): 126 - 131.

王春波, 蓝孝贞, 张晋平, 等. 1998. 盐藻 β - 胡萝卜素对实验性动脉粥样硬化预防作用的研究[J]. 中国海洋药物, (1): 7 - 12.

杨晓玲, 郭金耀. 2007. 锌对盐藻生长与物质积累的调控作用[J]. 微生物学杂志, 27(1): 91 - 94.

(责任编辑 杨春艳)

Effects on Growth and Accumulation of Protein and β - carotene in *Dunaliella salina* Influenced by Combination of Zn and Mn

GUO Jin-yao, YANG Xiao-ling

(Key Construction Lab of Marine Biotechnology of Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: In order to research the microelement concentration to *Dunaliella salina* cell cultured, the experiment study on that effects on growth and material accumulation of *Dunaliella salina* influenced by different concentration combination of Zn and Mn. The results showed that adequate concentration of Zn and $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ had improving to *Dunaliella salina* cell growth and material accumulation, it was disadvantageous when concentration was too high or too low. when the combination was in a $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration of 6 mg/L and Mn concentration of 4 mg/L in culture medium, the effects were most advantageous to growth, accumulation of protein and β -carotene in *Dunaliella salina* in 9 different patterns. Made cellular density, protein and β -carotene accumulation of *Dunaliella salina* to reach high limit among. When the combination was in a $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration of 8 mg/L and $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ concentration of 6 mg/L, they made protein and β -carotene accumulation in single cell of *Dunaliella salina* to reach high limit among. The latter may be a response adaptation of *Dunaliella salina* cell to adversity of too much Zn and Mn.

Key words: Combination of Zn and Mn; *Dunaliella salina*; Growth; Material accumulation