

盐度变化对杜氏盐藻的游离氨基酸和脂肪酸含量的影响

朱松玲¹, 王怡洁²

(1. 青岛职业技术学院, 山东 青岛 266555; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要: 研究了盐度对杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)的生理生化效应。结果表明该藻适于生活在盐度为6~7倍海水的试验水中(海水盐度为33.5)。在此盐度中其光合速率、细胞增长速率、光合色素增长速率, 游离氨基酸总量及多聚不饱和脂肪酸总量均高于生活在其它盐度的藻。

关键词: 盐度; 杜氏盐藻(*Dunaliella salina*); 游离氨基酸; 脂肪酸

中图分类号: Q949.2 **文献标识:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)03-0008-04

目前“盐田生态”已被列入重要研究课题之一。盐藻不仅是盐田生态系统的主要生产者, 还是卤虫等动物的饵料。它的分布及含量又直接影响盐田的富营养化及盐的结晶, 因此它是盐田生态系统中重要一环。目前中外学者对盐田生态调控及其机理的研究还较零散。姚南瑜^[1]对生活在不同盐度中盐藻的渗透调节的研究; Laurel^[2]盐度对海藻光合作用的影响; Flynn^[3]盐度对海藻氨基酸含量的影响研究等。作者以杜氏盐藻为材料, 研究了不同盐度对盐藻的游离氨基酸和脂肪酸含量的影响, 为盐田生态调控及其经济价值提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)藻种分离于青岛东风盐场盐田卤水中(盐度饱和)分离后进行藻种播种, 培养约2个月待用。

1.2 方 法

1.2.1 不同盐度培养液的配制

采用f/2^[4]配方(加脲 20×10^{-6} mol/L)配成的培养液作母液, 然后向母液中添加不同量的NaCl配成盐度分别为海水盐度1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍的试验水, 再经玻璃纤维过滤后备用。

1.2.2 杜氏盐藻的接种

取藻液100 mL, 3 000 r/min离心10 min, 弃去上清液, 将沉淀分别移至装有600 mL不同盐度培养液的消毒三角瓶中, 接种密度约为 4×10^4 个/mL, 进行一次性培养, 光照周期L:D=14:10, 光照3 500~4 000 lx, 温度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.2.3 测定方法

1.2.3.1 光合色素含量的测定

分别取处于指数增长期的不同盐度的藻液各20 mL, 经玻璃纤维滤膜(孔径小于1 μm)过滤, 把滤膜放入离心管中捣碎, 并加入10 mL质量分数为90%的丙酮于 2°C 冰箱中提取24 h, 取出以4 000 r/min离心15 min, 最后取上清液用751型分光光度计分别在波长450、630、645、663、750 nm处测吸光度A值。

1.2.3.2 光合速率的测定

取处于指数增长期的不同盐度中培养的藻液, 用虹吸法注入100 mL碘量瓶中, 采用黑白瓶法测定光合速率, 光照为4个40 W的白色日光灯, 光强12 000 lx, 温度 25°C , 反应时间0.5 h。

1.2.3.3 细胞增长率的测定

所测样品为接种后第4天及第7天的藻。细胞密度测定是用格鲁氏液固定, 血球记数板记数。

1.2.3.4 游离氨基酸种类及含量的测定

分别取不同盐度中处于指数增长期的藻液1000 mL, 以3 000 r/min离心15 min, 用蒸馏水洗涤后离心除去盐分, 沉淀于 60°C 烘干, 测定时加6 mol/L的HCl 500 mL于 110°C 烘箱中水解28 h, 用日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。

1.2.3.5 藻体细胞中膜脂脂肪酸(SAFA)种类及含

收稿日期: 2003-05-29; 修回日期: 2003-11-30

作者简介: 朱松玲(1961-), 女, 副教授, 山东莱阳人, 研究方向: 盐藻的系列化反应, E-mail: slzhu@163.com

量的测定

藻液处理与1.4.2相同,离心后充 N_2 , $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,参照王俊德等^[5]的方法,用高效液相色谱法测定。

1.2.3.6 杜氏盐藻培养液中氨氮及磷酸盐含量的测定

接种后第2、6、9、12天分别取不同盐度的藻液,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤后的水样用于测定氮和磷。(1) NH_4-N 的测定:采用靛酚蓝分光光度法,用721型分光光度计于 640 nm 处测 A 值。(2) 磷酸盐的测定:采用磷钼蓝分光光度法^[6],用721型分光光度计于 800 nm 测 A 值。

2 实验结果

2.1 杜氏盐藻生长速率与盐度的关系

杜氏盐藻生长速率是以不同盐度中杜氏盐藻细胞增长速率及色素增长速率为指标的。如图1所示,细胞数增长率(K_{cell}),叶绿素 a 含量增长率(K_{chla})和类胡萝卜素增长率(K_{caro})变化趋势大体相似,即在4~8倍海水盐度的试验水中,培养的藻增长率较高。其中以6倍海水盐度的试验水中 K_{cell} 及 K_{caro} 值最高,5倍海水盐度的试验水中 K_{chla} 值最高,且 $K_{caro} > K_{chla} > K_{cell}$ 。

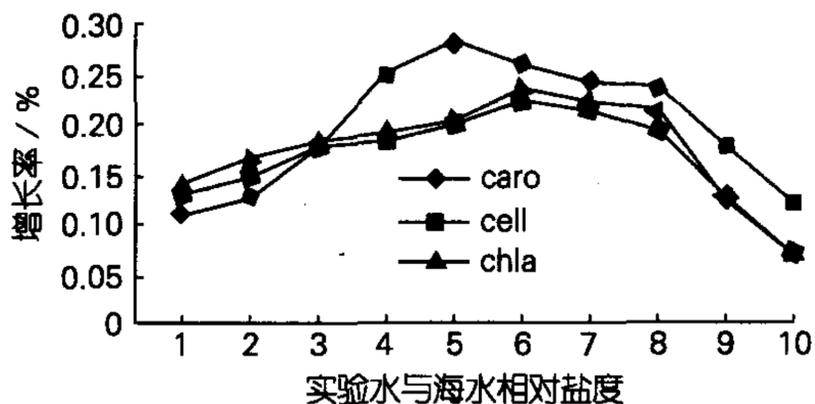


图1 杜氏盐藻细胞增长率,光合色素含量增长率与盐度的关系

Fig.1 Relationships between the NaCl conc. and the increase rates of cell number and pigments in *D. salina* cultures

2.2 盐度对杜氏盐藻光合速率的影响

实验结果如图2所示,从1倍海水盐度的试验水开始,杜氏盐藻光合速率随盐度升高而升高,在盐度为6倍海水的试验水时达峰值,之后随盐度的升高光合速率随之降低。再次证明盐度为6倍海水的试验水中盐藻生长最快。

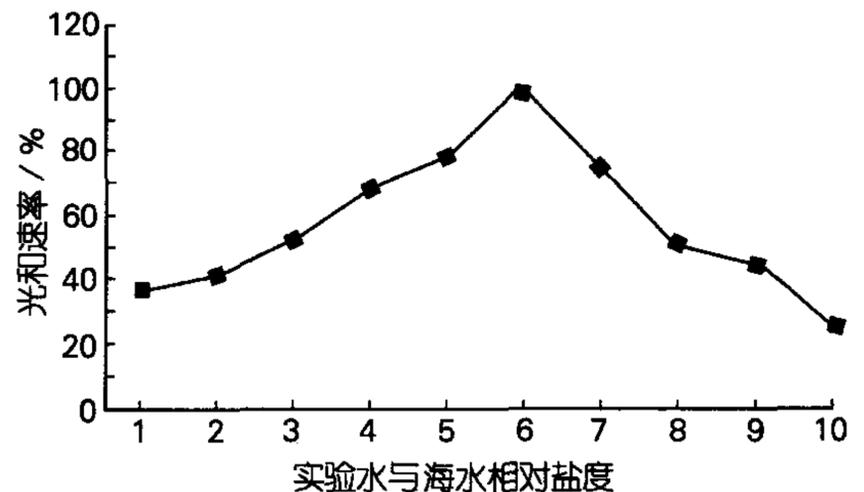


图2 杜氏盐藻在不同盐度中相对光合速率
Fig.2 Comparison of relative photosynthetic rate of *D. salina* in various NaCl concentrations of solution

2.3 盐度对杜氏盐藻膜脂脂肪酸含量的影响

从表1看出,7倍海水盐度的试验水中生长的藻其多聚不饱和脂肪酸(PUFA)占脂肪酸(FA)总量的百分比($\Sigma PUFA / \Sigma FA$)、平均双键数(M.D.B)、平均碳链长(M.C.L)皆高于盐度为4倍及10倍海水的试验水中生长的藻。

另外,本实验还表明,膜脂脂肪酸中含量较多的有软脂酸(16:0)、亚麻酸(18:3n3),亚油酸(18:2n6)及油酸(18:1n9),在盐度为7倍海水中分别占 ΣFA 的22.73%、29.22%、16.74%和7.73%。在各盐度生长的该藻中,缺乏EPA(20:5n3),但含少量DHA(22:6n3),其含量表现为随盐度升高而增加。对衡量藻类饵料价值有意义的亚麻酸/亚油酸值,随盐度增加而减少。

表1 不同盐度中杜氏盐藻膜脂脂肪酸的变化

Tab.1 Content of fatty acid of *D. salina* in different salinities

实验水盐度	$\Sigma SAFA / \Sigma FA$	$\Sigma PUFA / \Sigma FA$	平均双键数	平均碳链长	亚麻酸 / 亚油酸
4倍海水盐度	30.720	66.269	1.680	16.464	1.810
7倍海水盐度	29.537	70.368	1.785	17.054	1.676
10倍海水盐度	36.072	63.428	1.528	16.857	1.449

2.4 盐度对杜氏盐藻的氨基酸组成及含量的影响

表2表明生长于不同盐度中的杜氏盐藻所含主要游离氨基酸的种类及含量变化, 生活于海水盐度7

倍的实验水中的盐藻所含游离氨基酸及必需氨基酸的量最高。实验还表明胱氨酸(Cys)₂、蛋氨酸(Met)含量较少(均为0.1%)而脯氨酸的含量几乎不随盐度的变化而变化(0.6%左右)。

表2 不同盐度杜氏盐藻所含主要游离氨基酸的组成及含量

Tab.2 Composition and content of free amino acid of *D.salina* in salinities

实验水盐度	游离氨基酸组成 (%)						氨基酸总含量	必需氨基酸含量
	门冬氨酸 Asp	谷氨酸 Glu	丙氨酸 Ala	缬氨酸 Val	亮氨酸 Leu			
4倍海水盐度	1.44	1.88	1.34	1.16	1.60	15.82	7.58	
7倍海水盐度	1.84	2.20	1.50	1.32	1.76	17.52	8.08	
10倍海水盐度	1.44	2.10	1.42	1.24	1.66	15.8	7.6	

2.5 杜氏盐藻培养液中氮氮及磷酸盐的变化

为了解该藻在不同盐度中N, P代谢情况, 作者测定了培养液中N、P含量。结果表明, 氮氮及磷酸盐的含量随培养时间的延长而减少。至实验的

第12天, 磷酸盐的含量已测不出。实验还表明以盐度为7倍海水的盐藻对N、P的吸收为最多, 这同样是与盐度为7倍海水中细胞数量加快有关。

表3 不同盐度培养液中氮氮及磷酸盐含量的变化

Tab.3 Variation of NH₄⁺-N, PO₄³⁻-P of *D.salina* in different salinities

实验水盐度	NH ₄ ³⁺ -N (mg/L)				PO ₄ ³⁻ -P (mg/L)		
	2	6	9	12	2	6	9
1倍海水盐度	0.325	0.175	0.100	0.017	0.2925	0.0435	0.0252
4倍海水盐度	0.225	0.110	0.088	0.0025	0.2025	0.01	0.008
7倍海水盐度	0.4375	0.375	0.012	0.002	0.225	0.05	0.011
10倍海水盐度	0.225	0.12	0.065	0.023	0.226	0.03	0.0072

3 讨论

从细胞增长率、叶绿素及类胡萝卜素增长率随盐度的变化曲线看出, 生活在盐度为5~6倍海水的试验水中的杜氏盐藻生长状况最好, 盐度过高或过低都不利于藻类的生长。一般叶绿素b受盐度影响较小, 在盐度为4~6倍海水的试验水中叶绿素a含量较高。受不良环境影响时叶绿素a的破坏快于类胡萝卜素。并且在各个盐度中类胡萝卜素增长速率高于细胞增长率及叶绿素a增长率。说明在单个细胞中类胡萝卜素的合成非常快。

从图2可明显看出盐度为6倍海水的试验水中(NaCl质量分数约18%)藻体光合速率最高, 较适合的盐度范围为4~7倍海水的试验水。这与相应盐度中叶绿素a的含量较高有一定关系。另外, 盐度的改变还可能影响到藻体中HCO₃⁻转化为CO₂的

碳酸酐酶(CA)的活性。在此适合的盐度范围内, 藻体表面碳酸酐酶的活性较强。

生活于盐度为7倍海水的试验水中的杜氏盐藻其ΣPUFA/ΣFA值、平均双键数和平均碳链数均高于生活于盐度为4倍及10倍海水中的值。从所测其它生理生化指标来看, 生活于盐度为7倍海水的试验水中的杜氏盐藻其生长状况好于其它盐度。由此可得出结论: 膜脂脂肪酸中ΣPUFA/ΣFA、平均双键数和平均碳链数值可作为藻类生长状况好坏的指标, 即盐度的改变可使膜脂中不饱和脂肪酸含量减少或增加、平均键长及平均双键数的增减。由于盐度变化导致膜脂脂肪酸种类及含量变化, 势必影响膜的透性, 改变其生理状况。

实验所测的膜脂脂肪酸SFA中的软脂酸(16:0), 多聚不饱和脂肪酸PUFA中的亚麻酸

(18:3n3), 油酸(18:1n9)含量较高, 这是绿藻属共同的特点。Banaimoon^[7]研究不同门类海洋藻类的脂肪酸时有类似的发现。另外, 盐藻还含DHA(22:6), 因此该藻具较高的饵料价值。

至于盐度影响脂肪酸含量的机理, 有实验表明, 盐度能影响CO₂的固定速度, 进而影响脂肪酸的合成。作者认为盐度不同则CO₂浓度不同, 因而使[HCO₃⁻]_i浓度发生变化, 而[HCO₃⁻]_i在脂肪酸合成中起催化作用, 最终影响到膜脂脂肪酸合成, 这方面需进一步探讨。实验表明, 在盐度为7倍海水的试验水中养殖的杜氏盐藻所含氨基酸总量及必需氨基酸含量均达峰值。当藻体处于缺氮及缺碳环境时, 氨基酸含量减少, 为了解氨基酸含量减少的原因, 作者在进行氨基酸测定的同时, 也对培养液中硝酸盐的氮进行了测定, 虽然NH₄⁺-N含量减少, 但氮源还是充足的。这说明本实验中氨基酸含量的变化主要受盐度变化的影响。其机理有待进一步探讨。

另外, 杜氏盐藻中脯氨酸含量不随盐度的改变而变化, 说明体内脯氨酸累积能力与抗盐性无关。进一步证实了盐度胁迫与脯氨酸累积没有普遍意义的论点。

4 小结

盐度为5~7倍海水的试验水, 杜氏盐藻生长状态良好, 表现为细胞增长速率、光合色素增长率及

光合速率都较高。

在盐度为4、7、10倍海水的试验水中, 以生长在盐度为7倍海水的试验水中杜氏盐藻吸收N、P最多, 所含游离氨基酸和必需氨基酸也高。膜脂脂肪酸的Σ PUFA/Σ FA, 平均键长及平均双键数最高。

参考文献:

- [1] 姚南瑜. 藻类生理学[M]. 大连: 大连工学院出版社, 1987.190.
- [2] Laurel. A L. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina*[J]. *J Mar Biol Ass U K*, 1982.662: 493-508.
- [3] Flynn K J. Composition of intracellular and extracellular pools of amino acids and amino acid utilization of microalgae of different sizes[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1990,39(3): 151-166.
- [4] Stien J R. Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements Sponsored by the phyco-logical society of America.inc[M]. New York, USA:Cambridge. University.press, 1973. 43-44.
- [5] 王俊德. 高效液相色谱法[M]. 北京: 中国石油出版社, 1992.291-302.
- [6] 国家海洋局发布. 海洋污染检测规范[M]. 北京: 海洋出版社, 1991.277-281.
- [7] Banaimoon J K, Jeffrey S W. Fatty acid and lipid composition of several species of microalgae used in mariculture[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1989.128: 219-240.

Effect of seawater salinity on free amino acid and fatty acid of *Dunaliella salina*

ZHU Song-ling¹, WANG Yi-jie²

(1.Qingdao Technical & Vocational College, Qingdao 266555, China; 2.Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: May, 29, 2003

Key words: salinity; *Dunaliella salina*; free amino acid; fatty acid

Abstract: In this paper the effects of seawater salinity on free amino acid and fatty acid of *Dunaliella salina* were studied. The result showed that *D. salina* lives better in middle salinity conc (6.0 to 7.0-fold conc) under which higher rate of photosynthesis, larger increment of cells and photosynthetic pigment, and more free amino acid and polyunsaturated fatty acid.

(本文编辑: 张培新)