

中华植生藻某些特性的研究*

沈银武 王乾麟 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提要 中华植生藻 (*Richelia sinica* HB 58) 是最近分离培养的一个固氮蓝藻新种。该藻能在水生 111(HB111) 无氮培养基中, 在 $130\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 下于 4—8h 内呈指数生长。在指数生长期, 当温度分别采用 29°C , 35°C 和 38°C 培养时, 生长速率均随温度增高而加快, 以 38°C 时为最快; 世代时间随温度增高而缩短, 在 38°C 时 10.5h 为一代。用 80% 丙酮提取色素, 其叶绿素 a 含量为 5.14—6.55 mg/g 干重。与固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* HB 686) 和稻田鱼腥藻 (*A. oryzae* HB 13) 相比, 它们的色素吸收峰有一定差别; 用 0.001mol/L 磷酸缓冲液提取色素, 与固氮鱼腥藻吸收峰相似。藻胆蛋白含量因培养条件或藻生长状况差别变动较大, 藻蓝蛋白含量在 32.00—134.00 mg/g 干重之间; 别藻蓝蛋白含量在 15.00—52.00mg/g 干重之间。不同条件下多次培养, 均未发现 C-藻红蛋白吸收峰, 可能不具 C-藻红蛋白或含量甚微。该藻蛋白质含量为 59.44%(干重), 与螺旋藻 (*Spirulina*) 和鱼粉相近, 高于鱼腥藻 (*Anabaena*)、栅藻 (*Scenedesmus*)、小球藻 (*Chlorella*) 和盐藻 (*Dunaliella*)。有可能代替鱼粉作为家畜、家禽的饲料和水产品饵料的精料或添加成分使用, 是一种有应用前景的藻类。

中华植生藻 (*Richelia sinica* HB58) 是最近分离培养的一个固氮蓝藻新种¹⁾。植生藻属在淡水中还未见过报道。为进一步了解该藻的生理生化特性, 我们对其生长、固氮和色素组成特性进行了研究, 同时对该藻的蛋白质含量和氨基酸组成进行了测定。为评价它的应用价值也与当前生产上应用的某些藻类进行比较。

一、材料和方法

中华植生藻用水生 111 (HB111) 培养液^[4]培养。生长试验是在 $130\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下连续光照, pH 为 6.5, 温度分别控制在 29°C , 35°C 和 38°C , 通空气培养。用 721 分光光度计测定 665nm 藻液的光密度, 在半对数坐标上绘出生长曲线, 计算生长速率和世代时间^[5]。色素分析用的藻是在光照培养箱内静置培养的, 温度控制在 30°C , 光强为 $40\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 用日光灯和钨丝灯分别光照比较培养, 12 小时光照, 12 小时黑暗。叶绿素 a 用 80% 丙酮提取^[6]。藻胆蛋白用 0.001mol/L 磷酸缓冲液 (pH 为 6.7) 提取^[9]。用岛津 UV—3000 型分光光度计测定叶绿素 a 和藻胆蛋白吸收光谱。采用乙炔还原法测定固氮活性^[2]。用凯氏定氮法测定全氮, 用 $\text{N}\% \times 6.25$, 计算出粗蛋白含量。氨基酸组

* 王后乐和黄泽波分别帮助测定色素吸收峰和蛋白质, 特此志谢。

1) 沈银武、李尧英, 1987。蓝藻植生藻属一新种。

收稿日期: 1988 年 6 月 7 日。

成用日立 835-50 型氨基酸分析仪测定。

二、结果与讨论

1. 生长速度

中华植生藻在水生 111 培养液中采用通空气连续光照 [$130 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], 在 38°C 下培养, 生长较快。接种后 0—4h 为停滞期, 4—48h 为指数生长期, 然后转入迟缓生长 (见图 1)。指数生长期期间增代时间为 10.5h。当分别采用 29°C , 35°C 和 38°C 培养时, 生长速率 (μm) 随温度增高而加快, 增代时间 (h) 随温度增高而缩短。进行不同温度下各阶段增殖速度的比较表明, 主要差别是在 24—48h 之间, 在 38°C 时的增殖速度比在 35°C 和 29°C 时的快, 24h 前和 48h 后增殖速率差别不大明显 (表 1)。

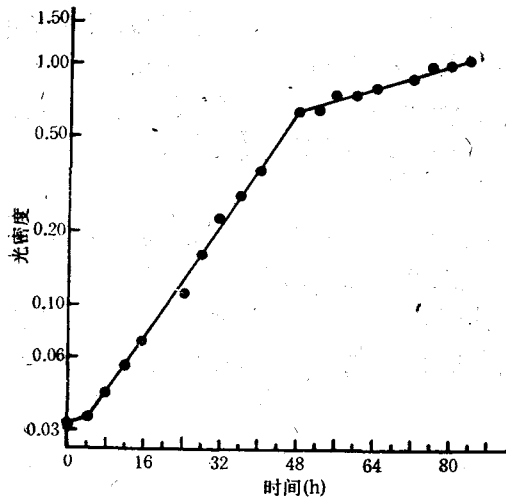


图 1 中华植生藻生长增殖曲线

Fig. 1 The growth curve of *Richelia sinica*

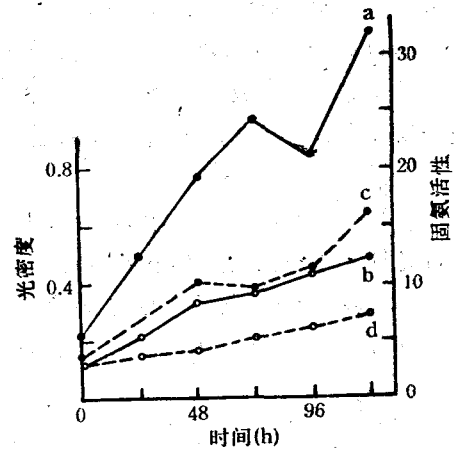


图 2 两种蓝藻固氮活性的比较

Fig. 2 Comparison of the N_2 -fixing activity of two species of blue-green algae

a. 中华植生藻的固氮活性; b. 中华植生藻的增殖; c. 稻田鱼腥藻的固氮活性; d. 稻田鱼腥藻的增殖。

表 1 不同温度对中华植生藻在生长的不同阶段增殖的影响

Tab. 1 Effects of temperatures on the growth rate and generation time of *Richelia sinica* in different growth phases

时间 (h)	O.D. _{665nm}			平均生长速率 (μm)			增代时间 (h)		
	29°C	35°C	38°C	29°C	35°C	38°C	29°C	35°C	38°C
0	0.050	0.050	0.032						
24	0.160	0.160	0.110	0.048	0.048	0.051	14.4	14.4	13.6
48	0.330	0.440	0.630	0.030	0.042	0.073	23.1	16.5	9.5
72	0.460	0.720	0.900	0.015	0.021	0.015	46.2	33.0	46.2

实验结果表明, 该藻是一个高温种。适宜于 $35-38^\circ\text{C}$ 生长, 是否此温度是最适温度,

还需进一步验证。但我们认为,营养、光照和温度三者之间,在营养和光照适宜的条件下,影响中华植生藻增殖的主要因素是温度。

2. 固氮能力

中华植生藻是具有异形胞的蓝藻,它能在无氮培养基(HB111)中迅速增殖,应该能利用空气中的氮素。用乙炔还原法测定表明,它确实具有固氮能力,并且固氮活性随藻的增殖而增加(图 2)。这与其它固氮蓝藻是相类似的。我们以中华植生藻的增殖和固氮活性与稻田鱼腥藻(*Anabaena oryzae* HB13)进行比较,可以看出中华植生藻增殖速度和固氮活力均高于稻田鱼腥藻(图 2)。这可能是由于中华植生藻藻丝短¹⁾,异形胞频率高于稻田鱼腥藻所引起的。

· 色素组成

(1) 脂溶性色素 用 80% 丙酮提取色素表明,中华植生藻叶绿素 a 含量由于培养条件与时间不同,一般在 5.14—6.55mg/g 干重之间。但中华植生藻与固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* HB 686)、稻田鱼腥藻的色素吸收峰有一定差别(图 3 和图 4)。无论在日光灯还是在钨丝灯下培养,中华植生藻在 450nm 处比固氮鱼腥藻和稻田鱼腥藻多一吸收峰。相反,固氮鱼腥藻和稻田鱼腥藻在 415nm 处的吸收峰,中华植生藻却没有。

(2) 藻胆蛋白 用 0.001mol/L 磷酸缓冲液(pH 为 6.7)提取藻胆蛋白,无论是在日光灯下还是在钨丝灯下培养的中华植生藻、固氮鱼腥藻和稻田鱼腥藻都有藻蓝蛋白吸收峰(615nm)(图 5,6)。因培养条件或藻生长状况的差别,其藻蓝蛋白数量变动较大,约在 32.00—134.00mg/g 干重之间;别藻蓝蛋白在 15.00—52.00mg/g 干重之间。在

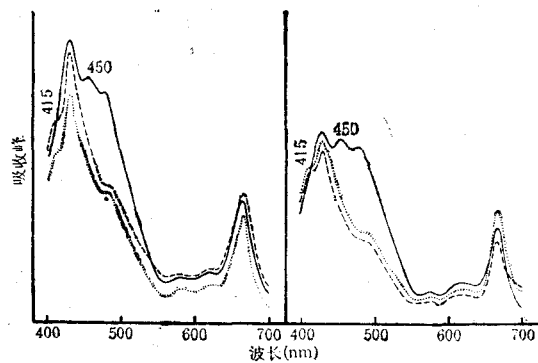


图 3 日光灯下培养的三种蓝藻的脂溶性色素吸收峰

Fig.3 Absorption spectra of lipid soluble pigments from three species of blue-green algae grown under fluorescent lamps

图 4 钨丝灯下培养的三种蓝藻的脂溶性色素吸收峰

Fig. 4 Absorption spectra of lipid soluble pigments from three species of blue-green algae grown under tungsten lamps

——中华植生藻;固氮鱼腥藻; -----稻田鱼腥藻。图 4,5,6 同。

1) 沈银武、李尧英, 1987。蓝藻植生藻属一新种。

两种光源下培养的中华植生藻和固氮鱼腥藻在 565nm 处都无 C-藻红蛋白吸收峰,而稻田鱼腥藻在两种光源下培养却都有,并且在日光灯下 C-藻红蛋白吸收峰高于藻蓝蛋白吸收峰,在钨丝灯下则相反(图 5,6)。这说明中华植生藻可能不具 C-藻红蛋白或含量甚微。

中华植生藻的脂溶性色素吸收峰与固氮鱼腥藻、稻田鱼腥藻有一定差别(图 3,4),这可能是植生藻属与鱼腥藻属的一个差别。图 3 和图 4 的吸收峰应该能表明中华植生藻脂溶性色素吸收峰的特征。

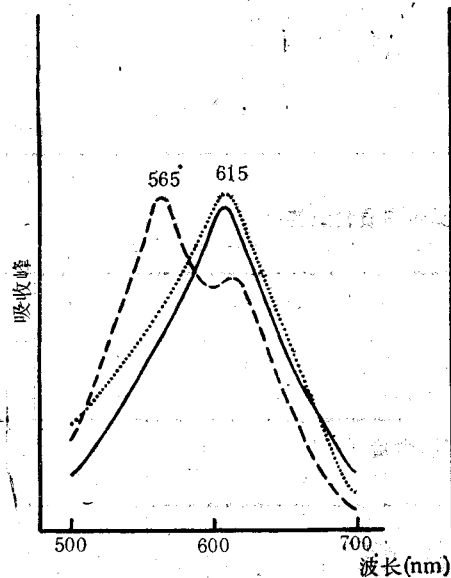


图 5 日光灯下培养的三种蓝藻的水溶性色素吸收峰

Fig. 5 Absorption spectra of water soluble pigments from three species of blue-green algae grown under fluorescent lamps

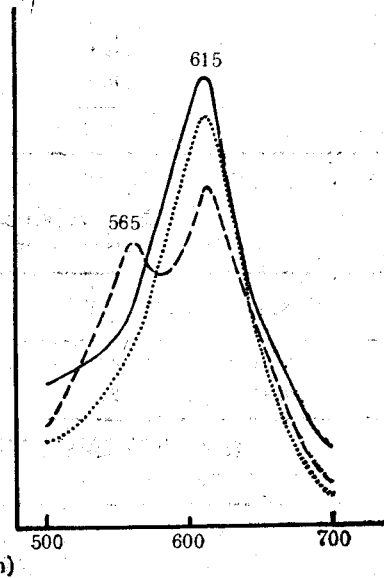


图 6 钨丝灯下培养的三种蓝藻的水溶性色素吸收峰

Fig. 6 Absorption spectra of water soluble pigments from three species of blue-green algae grown under tungsten lamps

4. 蛋白质和氨基酸组分

(1) 蛋白质 用凯氏定氮法对八次培养的中华植生藻进行测定,结果表明,含氮量均在 8.47—11.03% 之间,平均为 9.51%,即蛋白质含量在 52.94—68.94% 之间,平均为 59.44% (表 2)。与目前所应用的藻相比较,其蛋白质含量与螺旋藻 (*Spirulina*)^[6]相近;高于鱼腥藻 (*Anabaena*)^[4]、栅藻 (*Scenedesmus*)^[7]、小球藻 (*Chlorella*)^[1] 和盐藻 (*Dunaliella*)^[11] (表 3)。由此可见,中华植生藻是一种蛋白质含量较高的藻类。

(2) 氨基酸 氨基酸分析结果表明,十八种常规氨基酸(除色氨酸未测定外)在中华植生藻中都存在(表 4)。其中谷氨酸和天门冬氨酸含量较高,分别占氨基酸总量的 13.8% 和 10.7%;这与固氮鱼腥藻是相似的^[4]。同目前应用较多的某些藻类相比较,氨基酸总和低于螺旋藻;高于栅藻、小球藻和盐藻等;与稻田鱼腥藻相近(表 4)。

表 2 中华植生藻蛋白质含量
Tab. 2 Protein content of *Richelia sinica*

培养天数	总氮量(%)	标准差	蛋白质(%)
3	9.58	0.10	59.88
4	11.03	0.03	68.94
4①	9.77	0.02	61.06
5	9.95	0.12	62.19
7	9.86	0.05	61.63
7	8.47	0.24	52.94
7	8.49	0.04	53.06
10	8.90②	0.02	55.63
平均	9.51		59.44

① 采用 Allen 有氮培养基培养; ②在太阳下晒干。

表 3 几种藻类蛋白质含量的比较
Tab. 3 Comparison of protein content in different algae

藻类	中华植生藻	钝顶螺旋藻 ^[8]	鱼腥藻 ^[4]	斜生栅藻 ^[7]	小球藻 ^[1]	盐藻 ^[11]
N(%)	9.51	10.00	6.01	8.32	6.40	6.40
蛋白质(%)	59.44	62.50	37.56	52.00	40.00	40.00

表 4 几种藻类的氨基酸含量 ($\times 10^{-2}g/g$, 干重)
Tab. 4 Comparison of amino acid compositions in different algae

氨基酸	中华植生藻	钝顶螺旋藻	稻田鱼腥藻①	斜生栅藻	小球藻	盐藻	鱼粉②
异亮氨酸 (Ile)	2.98	4.19	2.30	1.87	1.69	1.68	2.56
亮氨酸 (Leu)	4.65	6.13	4.30	3.80	1.99	4.40	4.36
缬氨酸 (Val)	2.97	4.44	4.50	3.12	2.67	2.32	2.91
苯丙氨酸 (Phe)	2.26	3.31	3.40	2.50	2.14	2.32	2.42
酪氨酸 (Tyr)	2.23	3.31	2.00	1.66		1.48	1.97
赖氨酸 (Lys)	2.44	3.00	2.00	2.91	2.43	2.80	4.20
蛋氨酸 (Met)	0.83	1.56	0.90	0.78	0.57	0.92	1.80
胱氨酸 (Cys)	0.16	0.56	0.90	0.31		0.48	0.55
色氨酸 (Trp)	未测	0.19	未测	0.16	0.41	0.28	0.74
苏氨酸 (Thr)	2.98	3.38	2.70	2.56	1.91	2.16	2.42
丙氨酸 (Ala)	3.80	5.94	3.90	4.68		2.92	
精氨酸 (Arg)	3.24	4.56	2.90	3.69	2.39	2.92	3.25
天冬氨酸 (Asp)	5.12	7.38	5.20	4.37		4.16	
谷氨酸 (Glu)	6.58	6.25	5.70	5.66		5.08	
甘氨酸 (Gly)	2.53	3.25	2.40	3.69	2.20	2.20	3.66
组氨酸 (His)	0.75	1.38	0.80	1.09	0.65	0.70	1.40
脯氨酸 (Pro)	2.09	2.63	1.40	2.03		1.32	
丝氨酸 (Ser)	2.32	3.19	2.20	1.98		1.84	2.38
总合	47.84	64.65	47.50	46.85	19.05	39.98	34.62

① 中科院水生所藻类室生态组测定。 ② 中科院水生所等, 1984。固氮蓝藻作为鸡饲料的研究。

从以上结果可以看出,中华植生藻蛋白质含量(59.44%)与螺旋藻和鱼粉(60.8%)相近,高于鱼腥藻、栅藻、小球藻、盐藻(表3);同时主要氨基酸组分也基本符合联合国粮农卫生组织(FAO/WHO)的标准(表5)。因此,从蛋白质含量和氨基酸角度上,我们认为把中华植生藻作为家畜、家禽的饲料和水产品饵料的精料或添加成分,有可能代替鱼粉以解决植物蛋白营养价值低的问题。但对其它营养成分如,脂肪、碳水化合物、维生素等尚未进行研究。此外中华植生藻具有固氮能力,能在淡水无氮培养基中生长,就其培养成本而言,则大大低于螺旋藻、小球藻、栅藻和盐藻等。因为后几种藻都是非固氮种类,在培养基中必需加有氮源才能生长,另外,螺旋藻的培养基中需加入大量碳酸氢钠才能培养。尽管有些研究者对螺旋藻的培养基做了减少碳酸氢钠的修改¹⁾或利用海水驯化,工业污水及城市废水等^{3,10,12)}进行培养,但成本依然较高。中华植生藻生长快,培养方法简单,容易掌握。我们认为它是一种具有应用前景的藻类。

表5 几种藻类的主要氨基酸成分($\frac{1}{16}$ g/g, 氮)与 FAO/WHO^①模式(1973)的比较

Tab. 5 Comparison of main amino acid compositions of different algae with FAO/HWO recommended pattern (1973)

藻类	氨基酸							
	异亮氨酸	亮氨酸	缬氨酸	苯丙氨酸 +酪氨酸	赖氨酸	蛋氨酸 +胱氨酸	色氨酸	苏氨酸
FAO/WHO ^①	5.0	7.0	5.0	6.0	5.5	3.5	1.0	4.0
中华植生藻	5.0	7.8	5.0	7.4	4.1	1.6	未测	4.9
钝顶螺旋藻 ^②	6.7	9.8	7.1	10.6	4.8	3.4	0.3	6.2
稻田鱼腥藻 ^②	4.6	8.3	9.0	10.8	4.0	3.6	未测	5.4
斜生栅藻 ^⑦	3.6	7.3	6.0	8.0	5.6	2.1	0.3	5.1
小球藻 ^⑩	4.2	5.0	6.7	5.4	6.1	1.4	1.0	4.8
盐藻 ^⑪	4.2	11.0	5.8	9.5	7.0	3.5	0.7	5.4

① 见 FAO/WHO 专家组关于所需要的能量和蛋白质的报告。No. 52(1973)。

② 中科院水生所藻类室生态组测定。

参 考 文 献

- [1] 华汝成, 1986. 单细胞藻类培养与利用. 农业出版社, 423—446 页。
- [2] 何振荣等, 1985. 柱孢鱼腥藻固氮酶防氧的呼吸保护. 水生生物学报 9(4): 324—330。
- [3] 吴伯堂等, 1988. 钝顶螺旋藻海水驯化的初步研究. 海洋与湖沼 19(2): 197—200。
- [4] 黎尚豪, 1981. 固氮蓝藻作为晚稻肥源的研究. 水生生物学集刊 7(3): 417—423。
- [5] Coombs, J. et al., 1985. 生物生产力和光合作用测定技术. 邱国雄等译, 1986. 科学出版社, 196—199 页。
- [6] Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1—15.
- [7] Becker, E. W., 1984. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass* 4: 1—19.
- [8] Becker, E. W., 1984. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass* 4: 105—125.

1) 林惠明等, 1985. 螺旋藻培养初报. 淡水生物学科技情报 3: 20。

2) 俞敏娟, 1985. 微型藻类的培养与利用. 淡水生物学科技情报 2: 1—5。

- [9] Siegelman, H. W. et al., 1978. Algal biliproteins: physiological and biochemical methods. In: Handbook of Phycological Methods, ed by Hellebust, J. A. Cambridge University Press, pp. 71—79.
- [10] Soeder, C. J., 1980. Massive cultivation of microalgae: result and prospects. *Hydrobiologica*. 72: 197—209.
- [11] Venkataraman, L. V. and E. W. Becker, 1985. Biotechnology and Utilization of Algae. The India Experience, Department of Science & Technology, New Delhi, India, pp. 89—104.

STUDY ON SOME CHARACTERISTICS OF *RICHELIA SINICA*

Shen Yinwu, Wang Qianlin and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

ABSTRACT

Richelia sinica HB 58 is a new species of nitrogen-fixing blue-green algae which were isolated and cultured recently. It grew in HB 111 nitrogen-free medium and under light intensity $130 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Exponential growth phase was between 4—8 h in our batch culture. The growth rate increased along with temperature raising. The generation time shortened as culture grew at 29°C, 35°C and 38°C respectively. At 38°C, generation time was 10.5 h. When the pigments were extracted with 80% acetone, their absorption spectra were different from that of *Anabaena azotica* HB 686 and *A. oryzae* HB 13. However, when the pigments were extracted with 0.001 mol/L phosphat buffer, their absorption spectra were similar to that of *A. azotica* HB 686. Chlorophyll a concentration was about 5.14—6.55 mg/g dry weight. In various conditions, phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC) concentrations varied between 32.00—134.00 mg/g dry weight and 15.00—52.00 mg/g dry weight respectively. No. C-phycoerythrin (PE) absorption spectrum was found in this organism. Maybe there was no PE or only with trace amount. Protein content was 59.44% (dry weight) which is similar to that of *Spirulina* and fish meal, but higher than that of *Anabaena*, *Scenedesmus*, *Chlorella* and *Dunaliella*. So that biomass of *Richelia sinica* HB 58 will possibly be used as a substitute for fish meal in feed of livestock, poultry and aquatic products. It's an alga with useful prospects.