

两种培养温度下钝顶螺旋藻吸收累积 锗的研究*

王大志 高亚辉[†] 程兆第[†] 洪华生

(厦门大学国家教育部海洋生态环境开放研究实验室 厦门 361005)

[†](厦大学生物系 厦门 361005)

摘要 于1995年1—3月将钝顶螺旋藻培养在5—15mg/L锗(Ge)浓度的培养基内,研究两种培养温度下(25℃和30℃)藻细胞、蛋白质、脂类和碳水化合物结合锗的量,探讨温度影响螺旋藻吸收累积锗的机理。结果表明,在两种培养温度下钝顶螺旋藻均可吸收累积一定量的锗(22.44—52.13μg/g)并均匀地结合到蛋白质、脂类和碳水化合物中;藻细胞结合锗的量在低温下(25℃)随外加锗的浓度增加而增加,在高温下(30℃)与外加锗的浓度关系不明显;两种培养温度下蛋白质、脂类和碳水化合物中结合锗的量均随外加锗的浓度增加而增加,但高温下(30℃)结合的锗量要高于低温下(25℃)的各相应值;低温下(25℃)三种大分子物质中锗的结合率较稳定(48%左右),高温下(30℃)则随外加锗的浓度增加而明显增加(37.2%—72.0%)。根据实验结果推测,低温(25℃)主要影响螺旋藻对锗的吸附作用,高温(30℃)则影响锗与细胞内大分子物质的结合作用。

关键词 温度 钝顶螺旋藻 锗 累积 蛋白质 脂类 碳水化合物

学科分类号 S968.4

锗在元素周期表中是一种准金属元素(Metalloid),具有金属和非金属的双重特性。尽管目前尚没有足够的证据证明它是生物体的一种必需微量营养元素,但大量研究表明,有机锗具有增进人体和动物健康、调节身体机能、抗癌、消炎和抗菌等功能(王夔,1996)。但目前所使用的有机锗皆为人工合成,不仅合成难度大、成本高,而且存在一定的副作用,因而如何生产高效低毒或无毒的有机锗产品引起了人们的重视。已有学者尝试利用香菇金针菇的吸收转化作用来生产天然的有机锗(寿红霞等,1991),但存在培养周期长、转化效率低等缺点。螺旋藻(*Spirulina*)是一种蓝藻,由于富含蛋白质(高达60%)及均衡的营养成分,被联合国粮农组织推荐为人类明天最理想的食物。此外螺旋藻还含有丰富的多种维生素、微量元素、矿物质及亚油酸、亚麻酸等而具有抗衰老、抗肿瘤和抗辐射等效用(商树田,1996)。Yanagimoto等人(1983)曾研究了pH值变化对螺旋藻吸收锗的影响,但实验周期较短(1d)且pH值(10.5—12.3)偏高,只是一种短期的胁迫效应,尚不能真正反映螺旋藻

* 国家自然科学基金资助项目,39270539号;国家教委博士点基金资助项目,9538408号;福建省重中之重项目资助。王大志,男,出生于1970年12月,博士后,E-mail: dzwang@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:1997-10-24,收修改稿日期:1998-10-07

对锗的吸收及锗在细胞中的代谢状况。本文对培养在两种温度下的钝顶螺旋藻细胞累积锗(6—8d)以及锗在细胞内的分布情况进行研究,探讨温度对螺旋藻吸收累积锗的影响机理,以期为利用螺旋藻生产天然有机锗及锗的生物化学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养

实验于 1995 年 1—3 月进行,所用藻种钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 系本室保存种。采用改进的 Zarroub 液体培养基, NaHCO_3 的含量减至 10.0g/L,在其中加入 GeO_2 来提供锗。锗对钝顶螺旋藻生长影响的实验中,锗的最终浓度为 0.1、1.0、5.0、25.0 和 100.0mg/L。培养光源为日光灯,光强 3 500lx,光暗周期 14h/10h,培养温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。藻类的生长通过测定其在 680nm 处的光密度 (OD_{680}) 来监测,每天定时测定各浓度组藻液的 OD_{680} 值,取平均值,培养 4d。钝顶螺旋藻对锗的吸收累积实验,设置两种温度组, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 锗的最终浓度为 5.0、10.0 和 15.0mg/L, 锗 0.0mg/L 浓度组为对照组,其它培养条件同上。至对数生长期后期(6—8d),用过滤法收集藻细胞,收集后的藻细胞用去离子水配制的 0.5mol/L 甲酸氨溶液冲洗 3—4 次,用滤纸吸干藻体表面的残余水分,将藻体移至 25ml 小烧杯中,置于 45°C 恒温箱中烘至恒重,临用时称其干重。

1.2 蛋白质、脂类和碳水化合物的提取

藻类蛋白质、脂类和碳水化合物的提取采用 Kochert (1978) 的方法。取烘干藻粉 1g,先用高氯酸冷处理,以除去细胞内的无机物质及一些小分子物质。离心后在沉淀中加入适量冷的氯仿-甲醇混合液(V/V, 1/1)抽提 3 次,经离心、分液萃取后,脂类用氮气吹干;沉淀用冷的 6% 三氯醋酸(TCA)提取 3 次,将 3 次离心的上清液合在一起,即得碳水化合物,沉淀即为蛋白质。

1.3 锗含量的测定

将藻粉及分离后的蛋白质、脂类和碳水化合物样品在 100°C 下烘至干。用混合酸消化(浓硝酸/浓硫酸 = 10/1, V/V),取 1.0ml 消化液加 3.0ml 浓 HCl,用 1.0ml CCl_4 萃取两次,萃取液用 1.0ml 蒸馏水反萃取,取水层转移至 10ml 刻度试管中,加入 1.0ml 桑色素、0.01ml 0.05% EDTA,加无水乙醇至刻度,10min 后在 850 型荧光分光光度计(Hitachi)上检测荧光强度(陈雁君等,1992),条件为:激发波长(λ_{ex}) = 425nm,发射波长(λ_{em}) = 499nm;狭缝宽度:激发(EX) = 5nm,发射(EM) = 5nm,正常定波长(PM-NORMAL)。用标准曲线法来定量锗(均以 $\mu\text{g/g}$ 干重的形式表达)。

1.4 结合率的计算

藻细胞对锗的结合率按照下式来计算:

$$\text{结合率} = \frac{(\text{蛋白质结合锗} + \text{脂类结合锗} + \text{碳水化合物结合锗})}{\text{细胞结合锗量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 不同浓度锗对钝顶螺旋藻生长的影响

本研究首先检查了锗对钝顶螺旋藻生长的影响,结果见表 1。当锗浓度低于 5.0mg/L 时,各浓度组的光密度值与对照组基本接近,说明该浓度下锗对钝顶螺旋藻的生长没有抑制作用,而具有一定的促进作用;当锗浓度达到 25.0mg/L 时,钝顶螺旋藻的生长明显被抑

表1 不同锗浓度下钝顶螺旋藻的光密度值

Tab.1 OD₆₈₀ of *S. platensis* grown in different germanium concentration

锗浓度 (mg/L)	0.0	0.1	1.0	5.0	25.0	100.0
培	0	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089
养	1	0.188	0.189	0.188	0.178	0.166
时	2	0.545	0.545	0.522	0.489	0.461
间	3	1.045	1.023	0.998	0.944	0.767
(d)	4	1.583	1.511	1.444	1.543	0.967

表2 钝顶螺旋藻在不同锗浓度下的生物量

Tab.2 Biomass of *S. platensis* grown in different germanium concentration

锗浓度 (mg/L)	藻粉干重 (mg/L)
0.0	222
0.1	288
1.0	205
5.0	252
25.0	102
100.0	24

制; 锗浓度增至 100.0mg/L时, 钝顶螺旋藻的生长完全被抑制。

不同锗浓度下钝顶螺旋藻的生物量见表 2。0.1、1.0 和 5.0mg/L浓度组的藻粉干重与对照组的相差不大, 说明在锗浓度低于 5.0mg/L时, 钝顶螺旋藻的生长受到一定程度的促进; 而 25.0mg/L和 100.0mg/L组的藻粉干重明显低于对照组的, 这说明藻类的生长受到了抑制和毒害。这些与表 1 的结果基本吻合。

Yanagimoto 等 (1983) 在研究 pH 值对藻类吸收锗的影响时发现, 当培养液中锗浓度达到 20.0mg/L 时, 钝顶螺旋藻的生长即受到明显的抑制。高亚辉等 (1997) 也观察到 25.0mg/L 锗明显地抑制钝顶螺旋藻的生长。本研究结果与之基本一致。因而在利用钝顶螺旋藻吸收转化锗时, 选用的锗添加浓度必须低于 20.0mg/L。

2.2 温度对钝顶螺旋藻锗吸收量的影响

实验结果见表 3。在 25℃ 和 30℃ 下, 在培养液中添加锗均可使钝顶螺旋藻很好地吸收锗, 其吸收量分别为 25.57—52.13μg/g, 22.44—38.40μg/g, 为钝顶螺旋藻本身锗含量 (1.40μg/g) 的 20—36 倍。

从两次实验的两个温度组 (25℃ 和 30℃) 的锗吸收量的比较发现, 25℃ 组的锗吸收量都略高于 30℃ 组的, 且 25℃ 组的锗吸收量随外加锗的浓度增加而增加; 30℃ 的锗吸收量与外加锗的浓度关系不明显, 并且保持相对稳定, 这可能与钝顶螺旋藻的生理状况有关。

表3 不同温度下钝顶螺旋藻对锗的吸收量

Tab.3 The contents of germanium accumulated by *S. platensis* cultured under different temperatures

时间 (月.日)	温度 (℃)	培养液中锗浓度 (mg/L)	细胞中锗含量 (μg/g)	时间 (月.日)	温度 (℃)	培养液中锗浓度 (mg/L)	细胞中锗含量 (μg/g)
03. 18	25±1	0.0	1.40	03. 24	25±1	0.0	1.40
		5.0	25.57			5.0	27.64
		10.0	34.83			10.0	38.64
		15.0	52.13			15.0	49.03
	30±1	0.0	1.40		30±1	0.0	1.40
		5.0	22.44			5.0	38.25
		10.0	24.74			10.0	35.79
		15.0	28.60			15.0	38.40

据缪坚人等报道(1985),钝顶螺旋藻的最适生长温度为28—34℃,温度偏低或偏高都会影响藻类的正常功能。本研究所用低培养温度(25℃)低于藻类的最适培养温度,这势必影响到藻类的生理功能,如细胞膜通透性增加,使得进入细胞内的锗的含量随外加锗浓度而增加;而所用的高培养温度(30℃)在钝顶螺旋藻的最适生长范围内,细胞处于一种正常的生理状态,细胞膜对锗的吸收具有选择性,并不随外加锗的浓度增加而增加。此外也可能与高温(30℃)下的代谢损失较大有关。这说明,温度对锗吸收量的影响在相对较低的温度下(25℃)起作用,在较高温度下(30℃)则不起作用。

2.3 不同温度下钝顶螺旋藻蛋白质、脂类和碳水化合物结合锗的量

结果表明,在每一培养温度下,蛋白质、脂类和碳水化合物等三种大分子结合锗的量均随外加锗的浓度增加而增加,但在同一锗浓度下,高温组(30℃)的三种大分子物质中锗的含量要略高于低温组(25℃)的相应值(表4)。另一方面,在25℃组中,三种大分子物质中锗的结合率较稳定(48.4%—60.0%),而30℃组则随外加锗的浓度增加明显增加(37.2%—72.0%),这可能与细胞内酶的活力有关。低温下(25℃)酶的活力较低,转化锗的能力较弱;而高温下(30℃),细胞内酶活力较高,转化锗的能力较强。此外酶的活力与外加锗浓度有关,随锗浓度增加而增加。因此较高的温度(30℃)和较高的锗浓度(15mg/L)有利于锗的转化。

从表4可看出,吸收到细胞中的锗约50%与胞内的大分子物质结合,最高结合率可达总锗的72%(30℃),这可能与藻细胞的解毒机制有关。培养液中的水合锗离子,经藻细胞膜进入胞内后,在酶的参与下,通过一系列生化过程,或者取代了这些大分子结构中的某些离子与肽链以共价键结合(如蛋白质);或者与这些大分子中的双键或三键以非共价键结合(如脂类或碳水化合物),从而将有机的无机锗转化为无毒或低毒的有机锗化合物,达到解毒的目的(黄玉山等,1992;Hudson *et al*, 1993),这有待进一步探索。

此外表4还表明,不论是25℃组还是30℃组,锗在三种大分子物质中的分布比较均匀,并未出现某一组分中锗异常富集的现象,而此三种大分子物质在钝顶螺旋藻中的含量却相差较大,蛋白质约占60%,脂类占4%,碳水化合物占19%(商树田,1996),这种现象的

表4 不同温度下钝顶螺旋藻藻细胞、蛋白质、脂类和碳水化合物结合锗的量(μg/g)

Tab.4 The contents of germanium bound to algal cells, proteins, lipids and carbohydrates by *S. platensis* cultured under different temperatures

温度 (℃)	培养液中锗浓度 (mg/L)	藻细胞	蛋白质	脂类	碳水化合物	结合率 (%)
25 ± 1	0.0	1.40	0.29	0.27	0.28	60.0
	5.0	27.64	4.51	4.32	4.56	48.4
	10.0	38.64	6.42	5.47	6.81	48.4
	15.0	49.03	6.20	8.77	(未测)	—
30 ± 1	0.0	1.40	0.29	0.27	0.28	60.0
	5.0	38.25	4.50	4.27	5.47	37.2
	10.0	35.79	8.03	6.88	8.30	64.9
	15.0	38.40	9.30	9.31	9.05	72.0

机制也有待进一步研究探讨。

3 结语

当钝顶螺旋藻培养在含 5.0—15.0mg/L 浓度锗的培养液中时,藻细胞、蛋白质、脂类和碳水化合物均能从培养介质中吸收累积一定量的锗,可达钝顶螺旋藻本身锗含量的 20—36 倍左右,因而利用钝顶螺旋藻来吸收转化锗是可行的。

钝顶螺旋藻吸收转化锗受到培养温度的影响,低温(25℃)主要影响其吸收量,而高温则影响其转化量。较高的培养温度(30℃)和较高的锗浓度(15mg/L)有利于锗的转化。

参 考 文 献

- 王 夔, 1996. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社, 790—813
- 寿红霞, 虞杏英, 徐依民. 1991. 含锗香菇金针菇栽培的研究. 中国食用菌, 11(1): 15—16
- 陈雁君, 上官国强, 王 宁等, 1992. 桑色素荧光分光光度法测定水和保健饮料中的痕量锗. 分析化学, 20(1): 71—74
- 高亚辉, 王大志, 程兆第, 1997. 锗对几种微藻生长的影响. 台湾海峡, 16: 63—66
- 商树田, 1996. 螺旋藻的营养保健作用. 植物杂志, 3: 20
- 黄玉山, 陈健敏, 谭凤仪, 1992. 植物重金属结合体的研究现状. 植物学报, 34(2): 146—158
- 缪坚人, 戚长敬, 1985. 螺旋藻的开发利用与培养技术. 见: 农牧渔业部螺旋藻协作组, 江西省农科院科技情报研究所编. 蓝藻——螺旋藻(*Spirulina platensis*)开发利用与生物技术. 南昌: 江西出版社, 1—17
- Kochert G, 1978. Handbook of Phycological Methods. Hellebust J A, Craigif J S ed. Cambridge: Cambridge University Press, 189—190
- Hudson R J M, Morel F M M, 1993. Trace metal transport by marine microorganisms: implications of metal coordination kinetics. Deep-Sea Research, 40(1): 129—150
- Yanagimoto M, Saitoh H, Kakimoto N, 1983. Alkaline shift effect on the uptake of germanium by algae, *Chlorella ellipsodeae*, *Oscillatoria* sp. and *Spirulina platensis*. J Ferment Technol, 61(3): 233—238

STUDY ON THE ACCUMULATION AND BINDING OF GERMANIUM IN *SPIRULINA PLATENSIS* CULTURED IN TWO TEMPERATURES REGIMES

WANG Da-zhi, GAO Ya-hui[†], CHENG Zhao-di[†], HONG Hua-sheng

(The Research Laboratory of State Education Department of Marine Ecological Environment, Xiamen University, Xiamen, 361005)

[†](Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract The present experiment were carried out from January to March 1995; the algal species were provided by Laboratory of Diatom Research, Department of Biology, Xiamen University. *Spirulina platensis* grown in the Zarrouk's media with contents of dioxide germanium, i.e. 5.0, 10.0 and 15.0 mg/L germanium was cultured in two temperatures regimes (25℃ and 30℃). Absorption of germanium in algal cells and distribution of germanium in proteins, lipids and carbohydrates were

studied. The results show that *S. platensis* can accumulate some amounts of germanium in cells (22.44—52.13 $\mu\text{g/g}$ algal dry weight) and bind them with proteins, lipids and carbohydrates evenly in the two culture temperatures; the germanium absorbed by *S. platensis* increased with added germanium at the lower temperature (25 $^{\circ}\text{C}$), from 25.57 to 52.13 $\mu\text{g/g}$ dry weight, but was not so sensitive to added germanium at the higher temperature (30 $^{\circ}\text{C}$), from 22.44 to 38.40 $\mu\text{g/g}$ dry weight. The germanium bound to the proteins, lipids and carbohydrates increased with added germanium at the two temperatures, but the amount bound to these three macromolecular compounds at the higher temperature (30 $^{\circ}\text{C}$) was higher than that at the lower temperature (25 $^{\circ}\text{C}$). The binding ratio of germanium to three macromolecular compounds at lower temperature (25 $^{\circ}\text{C}$) was stable, about 48%. The ratio increased with added germanium at higher temperature (30 $^{\circ}\text{C}$), from 37.2% to 72.0%. On the basis of the above results, lower temperature mainly affects absorption of germanium, and higher temperature (30 $^{\circ}\text{C}$) affects biochemical formation of germanium-macromolecular compounds with protein, lipids and carbohydrates.

Key words Temperature *Spirulina platensis* Germanium Accumulation Proteins

Lipids Carbohydrates

Subject classification number S968.4