

添加碳酸钙后螺旋藻中钙元素的分布及主要生化组成的变化

郑江^{1,2}, 高亚辉², 韦青阳¹, 欧阳丽佳², 唐川宁², 谢明艺²

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过向螺旋藻培养液中添加固体 CaCO_3 粉末的方法, 获得了富钙螺旋藻样品。采用原子吸收光谱法对螺旋藻的细胞壁和生化组分进行钙含量分析, 结果表明, 细胞壁在钙的富集过程中起了决定性的作用, 螺旋藻细胞吸收富集的钙中, 约有 96% 结合在细胞壁上; 而糖类物质在有机钙的形成方面起了较为主要的作用, 约有 88% 的有机钙与糖类物质结合, 螺旋藻的生物富钙机制可能主要依靠细胞壁的吸附作用以及糖类物质的离子交换和主动运输来实现。对螺旋藻的生化分析显示, 螺旋藻富集钙后, 糖和蛋白质含量有所下降, 而叶绿素 a 和类胡萝卜素含量则有较大地提高, 前者可能与细胞壁的通透性及钙信号的刺激有关, 后者则可能与螺旋藻自身的适应性调节作用有关。

关键词: 碳酸钙; 螺旋藻; 生化组成

中图分类号: Q946.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0462-05

螺旋藻 (*Spirulina*) 是一种光合放氧生物, 在分类上属于植物界、蓝藻门 (Cyanophyta)、颤藻目 (Oscillatoriales)、颤藻科 (Oscillatoriaceae)、螺旋藻属 (*Spirulina*)^[1], 由于含有多种营养成分和生物活性物质, 使其在生物医药、食品、保健品等行业有着广泛用途。

研究表明, 螺旋藻具有较强的生物富集能力, 对硒、碘、铜、铁、锰、锌等众多元素都具有较强的富集作用^[2-6], 利用这一特点, 目前已初步开发出了富硒螺旋藻、富碘螺旋藻等产品, 但迄今有关螺旋藻对钙的生物富集作用及富钙螺旋藻的开发研究尚未见到专门的报道。

藻类富集元素的机制非常复杂, 随所富集的离子种类不同而异^[7]。一些学者发现, 螺旋藻在对硒的富集作用中, 硒主要以主动运输的方式进入螺旋藻形成硒蛋白^[3,5]。刘志礼等^[6]研究了螺旋藻对铜的富集作用后认为, 铜是通过被动运输的方式进入藻细胞内, 形成稳定的金属整合肽。但有关螺旋藻对钙元素生物富集机制方面的研究, 国内外尚属空白。

本项目通过研究钙元素在螺旋藻中的分布状况及添加 CaCO_3 后螺旋藻生化组成的变化, 探讨了螺旋藻生物富钙的机制, 旨在为生物富集理论的研究和

富钙螺旋藻的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养液

极大螺旋藻 [*Spirulina maxima* (Setch. et Gard.) Geitler], 为厦门大学生命科学学院微藻实验室保存藻种。培养液为简化的 Zarrouk 培养液, 不含微量元素成分 A₅ 和 B₆^[1,8]。

1.2 培养方法

从同一母液中按体积比 1:3 分别接种等量的藻种到简化的 Zarrouk 培养液中, 分别向培养液中加入 0.6 g/L 的固体 CaCO_3 粉末, 温度控制在 (25 ± 1) °C, pH 8.0 ~ 10.0, 培养光源为日光灯, 光照强度 4 000 lx 左右, 光照周期 L:D = 12 h:12 h, 每天振荡 3 次, 培养 7 d 后收获, 分别获得对照组和富钙组。

1.3 螺旋藻细胞壁的分离及含钙量的测定

将湿藻分两部分, 一部分称重后, 烘干, 测其干重、总钙含量, 并计算出湿藻的含水量; 另一部分称重后, 按照盛雪芬等^[9]的方法, 将细胞壁分离出, 测定其中的钙含量, 再根据湿藻中的含水量折算为单位干重藻体中的细胞壁钙含量, 用总钙含量减去细胞壁钙含量可得原生质的钙含量。

收稿日期: 2004-03-11; 修订日期: 2004-04-21。

基金项目: 福建省青年科技人才创新基金 (2001J035)。

作者简介: 郑江 (1971-), 男, 讲师, 主要从事海洋生物活性物质的研究。E-mail: jzheng@jmu.edu.cn

通讯作者: 高亚辉。Tel: 86-0592-2181386。E-mail: Gaoyh@xmu.edu.cn

1.4 生化组分的提取分离及含钙量的测定

无机钙的分离采用改进的汤秀梅的方法^[10],糖的提取采用热水抽提法^[11-12],脂类的提取采用改进的 Bligh 和 Dyer 的方法^[13],蛋白质的分离参考王大志^[3]的方法。具体如下:取适量藻粉,一份测总的钙含量;另一份用 6% 的三氯乙酸浸泡 3~5 min, 4 000 r/min 离心,溶液即为无机钙部分,弃去,再用 6% 的三氯乙酸浸泡沉淀提取 2 次,离心后,沉淀部分即为含有机钙的组分;在上述沉淀中加入少量的水,用 NaOH 调 pH 值至 7 以上,放在沸水浴中提取 1h,加 6% 的三氯乙酸沉淀蛋白质,4 000 r/min 离心,取上清液,即为螺旋藻中含糖的组分;在剩下的沉淀中,加入冷的氯仿与甲醇混合液(体积比 1:1)提取 2 次,4 000 r/min 离心,分液萃取后,得脂类样品;而余下的沉淀部分为蛋白质样品。成分分离后,分别测定各组分中的钙含量,用总钙含量减去各有机组分的钙含量即为无机钙含量。

1.5 测定方法

1.5.1 干重 收获洗涤后,将藻细胞转移到已经称重过的滤纸片上(或小烧杯中),放在干燥箱中 45℃ 烘干至恒重,称量滤纸片和藻细胞的总质量,扣除原滤纸片的质量即为藻细胞的干重。

1.5.2 钙含量 原子吸收光谱法。

1.5.3 叶绿素 a 含量和类胡萝卜素含量 通过乙醇提取法测色素含量^[11]。

1.5.4 螺旋藻中糖含量 硫酸-苯酚法^[11]。

1.5.5 螺旋藻中蛋白质含量 采用微量凯氏定氮法^[11]测定螺旋藻中的总蛋白含量。

2 结果和讨论

2.1 钙在细胞结构中的分布

如图 1 所示,对照螺旋藻中,钙在细胞壁和原生质中的分布相差不大,原生质中的钙略多些,细胞壁中的钙只占总钙的 46% 左右;富钙后的螺旋藻中,细胞壁和原生质中的钙含量都有提高,但细胞壁中的钙含量提高较大,是对照的 10 多倍,而原生质中的钙含量只提高了约 40%,细胞壁中的钙含量约占富钙后螺旋藻总钙含量的 90%;从另一个角度看,富钙后螺旋藻中增加的钙,约有 96% 结合在细胞壁上,只有 4% 进入原生质,说明细胞壁在钙的富集过程中起了决定性的作用。

螺旋藻的超微结构显示,其细胞壁可分 4 层:最外层是呈平行线状排列的藻丝轴,与革兰氏阴性细

菌的细胞壁相似;第 2 层是绕藻丝轴的纤维蛋白原;第 3 层是肽聚糖层;最内层是纤维层^[1]。这种特定的细胞结构主要由肽聚糖、磷脂和蛋白质组成,具有黏性,带有一定负电荷,并可提供许多能与离子结合的官能团,从而决定了其富集离子的性质、生物富集的效率 and 选择性^[7]。另外,在其细胞壁外还有一层能水化的胶质层,具有较强的吸附小颗粒及金属离子的能力^[9]。因此,在螺旋藻的生物富集过程中,细胞壁发挥了决定性的作用。盛雪芬等^[9]研究了螺旋藻对 Au 的吸附后发现,80%~90% 的 Au 都集中在其细胞壁和细胞质膜中,其吸附能力之强可见一斑。这也和本研究结果相一致。

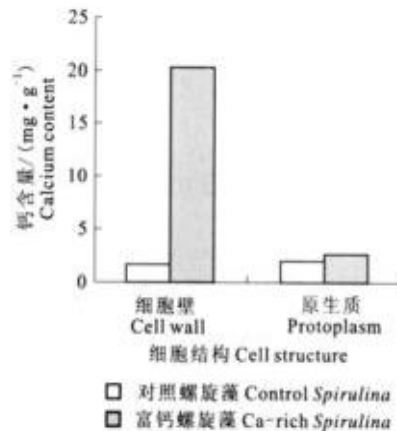


图 1 钙在螺旋藻细胞结构中的分布

Fig. 1 Distribution of calcium in different parts of *S. maxima* cells

尽管螺旋藻的细胞壁能吸附结合较多的钙,但能进入细胞内转化为原生质钙的并不多,这一方面是由于螺旋藻等藻类对钙的需要量非常少^[14];另一方面是由于细胞内的钙通常是处于一种稳定状态,即胞浆中的游离钙离子与线粒体、内质网等钙库处于一种动态平衡中,一旦这种平衡打破后无法恢复,将导致细胞的死亡^[15],因此螺旋藻细胞原生质中的钙含量的提高是非常有限的,一旦超过了细胞的代谢能力或不可逆地破坏了细胞所处的钙稳态,将会导致细胞代谢紊乱,直至死亡。

2.2 钙在各生化组分中的分布

图 2 比较了对照组与富钙组在生化组成上的钙分布。从中可看出,富钙后的螺旋藻在无机组分、糖、脂、蛋白质中的钙含量都有程度不同的提高,其中与糖结合的钙和无机钙提高较多,约是对照的 3

倍和2.7倍,而脂和蛋白质中的钙含量增加不明显。不论对照还是富钙后的螺旋藻,无机钙占的比例都较高,约是总钙含量的2/3。从另一个角度看,螺旋藻在吸收富集的钙中,约有3/4是以无机钙的形式

存在于藻细胞中,转化为有机钙的只占了约1/4,且主要结合在糖类碳水化合物(约占有有机钙的88%),说明糖类物质在有机钙的形成方面起了较为主要的作用。

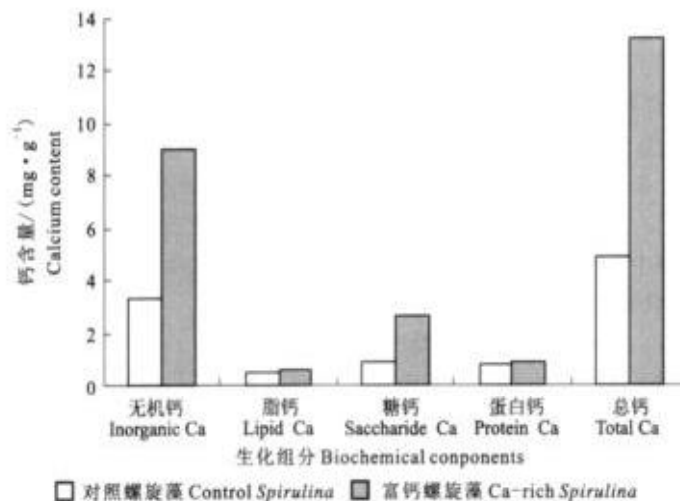


图2 钙在螺旋藻生化组分中的分布

Fig. 2 Distribution of calcium in biochemical components of *S. maxima*

藻类生物富集是多种机理共同作用的结果,生物吸附和主动运输是其主要途径^[7]。生物吸附主要依靠氨基酸中带负电的残基、羧基等的络合作用以及多糖中的藻酸盐和硫酸盐多糖的离子交换作用来实现,而主动运输是一个极为复杂的过程,与藻体的糖、脂、蛋白等代谢密切相关,并形成微量元素与糖、脂、蛋白质的结合体,具有较高的生物活性,目前已知螺旋藻对铬、硒、碘等元素的生物富集机制与主动运输有关^[7]。本实验的研究表明,螺旋藻富集的钙主要结合在含糖的组分中或以无机态的形式出现,且主要富集在细胞壁上,说明螺旋藻对钙的富集,尤其是对无机钙的富集,主要还是通过细胞壁的生物吸附作用来完成的;而含糖组分对钙的富集,则可能与细胞壁多糖的离子交换作用和主动运输功能都有一定关系;而少部分存在于原生质中的有机钙和无机钙可能也是通过主动运输等途径进行富集的,相关途径尚待进一步研究证实。

2.3 主要生化组成的变化

表1显示,富钙后的螺旋藻干重比对照低,蛋白质、糖的含量也比对照低,而叶绿素a和类胡萝卜素的含量则比对照高。

表1 富钙螺旋藻主要生化组成的变化

Table 1 Changes of main biochemical compositions in Ca-rich *Spirulina*

项目 Item	对照 Control	富钙螺旋藻 Ca-rich <i>Spirulina</i>
干重/(g · L ⁻¹) Dry weight	0.65	0.48
蛋白质含量/% Protein content	56.40	40.30
糖含量/% Saccharide content	13.80	9.60
叶绿素a含量/(mg · g ⁻¹) Chl a content	5.323	9.195
类胡萝卜素含量/(mg · g ⁻¹) Carotenoid content	1.785	2.598

Francisco等^[16]曾报道,在N限制条件下,螺旋藻中藻蓝蛋白含量、可溶性蛋白质含量及可溶性碳水化合物含量都有较大幅度的降低,而类胡萝卜素含量则有一定程度的提高。螺旋藻在富钙培养的过程中,藻体细胞壁上吸附了较多的CaCO₃,有可能影响到细胞内外的物质交换,从而限制了藻细胞对环境中的营养物质的吸收利用,使螺旋藻中糖、蛋白质的合成受到限制。同时,由于钙离子是细胞内的一种信号物质,螺旋藻细胞吸收过多钙后,也会干扰细胞的正常生理代谢活动,影响细胞的生长。研究表

明,线粒体在接收到胞质中的钙信号刺激后,会吸收钙离子,使有氧呼吸加强^[17-18]。因此,当钙离子进入螺旋藻细胞质后,会加快呼吸底物糖、蛋白质的消耗,使其含量下降。此外,CaCO₃的加入也降低了光照强度,使光合作用受到抑制,相应的糖和蛋白质的合成也会受到影响。

加入CaCO₃后,螺旋藻的叶绿素a含量和类胡萝卜素含量大幅提高,可能与螺旋藻的适应性调节有关。曾文炉等^[19]认为,螺旋藻在某些异常条件下,为维持一定的生长,自身的理化成分或组织结构会发生某些适应性的改变;王大志等^[20]发现,一些微藻为抵抗外界不良因子的伤害会促进类胡萝卜素等一些保护色素的合成,而Tomaselli^[21]也发现巨大螺旋藻(*Arthrospira maxima*)在由强辐照向低辐照环境切换时,其捕光色素含量将上升,碳水化合物合成速率则很快下降。因此,在培养液中加入CaCO₃进行富钙的过程中,由于细胞呼吸作用加强,光合作用减弱,使细胞中糖、蛋白质含量下降,螺旋藻细胞为维持正常的生理功能,需要进行适应性调节。而通过提高色素含量来提高光合作用的效率,以弥补由于富钙作用所带来的负面影响,可能是螺旋藻细胞适应性调节的一种方式。

参考文献:

- [1] 胡鸿钧,郑怡,陈启发.螺旋藻——养殖原理·技术·应用[M].北京:中国农业出版社,2002.1-136.
- [2] Mosulishvili I. M., Kirkesali E. I., Belokobylsky A. I., et al. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium-and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002,30:87-97.
- [3] 王大志,程兆第.硒对钝顶螺旋藻生长的影响及其在细胞中的积累和分布[J].台湾海峡,1998,17(4):432-438.
- [4] 李日强,王翠红,席玉英,等.钝顶螺旋藻对五种元素生物富集作用的研究[J].山西大学学报(自然科学版),2001,24(2):167-169.
- [5] 黄峙,向军俭,郑文杰.钝顶螺旋藻富集转化硒及硒在藻体中的分布[J].植物生理学通讯,2001,37(1):12-14.
- [6] 刘志礼,李朋富.螺旋藻富集铜锰的两个实验[J].南京大学学报(自然科学),1999,35(2):244-251.
- [7] 陈小霞,吴振强,梁世中.微藻对微量元素的生物富集及其机理的探讨[J].食品与发酵工业,1999,25(4):56-60.
- [8] Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirina maxima*[D]. Paris: University of Paris, 1966.
- [9] 盛雪芬,张景荣,曾昭琪.藻类富集金的机理初探[J].南京大学学报(自然科学),1999,35(3):303-308.
- [10] 汤秀梅,李崇宗,尹家元,等.蔬菜中钙铝元素存在形态分析[J].微量元素与健康研究,2001,18(4):49-50.
- [11] 李和生,孙群,赵世杰,等.植物生理生化实验原理与技术[M].北京:高等教育出版社,2000.134,186,199.
- [12] 钱志刚.螺旋藻多糖提取新工艺研究[J].淮海工学院学报,2000(2):50-52.
- [13] Bligh E. C., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1956,29:427-434.
- [14] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999.60.
- [15] 王起恩,王生,常元勋.高温与细胞内钙稳态失调[J].国外医学卫生学分册,1995,22(3):133-136.
- [16] Francisco J. L., Gordillo, Carlos Jimenez, et al. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) [J]. J Appl Physiol, 1999,10:461-469.
- [17] 梁晚益,杨宗城,黄跃生.线粒体Ca²⁺转运与细胞代谢调节[J].生理科学进展,2000,31(4):357-360.
- [18] Tchao F., Jouaville L. S., Mazat J. P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals[J]. Cell, 1997,89:1145-1153.
- [19] 曾文炉,丛威,蔡昭玲,等.螺旋藻的营养方式及光合作用影响因素[J].植物学通报,2002,19(1):70-77.
- [20] Kohata K., Watanabe M. Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in *Pyramonas parkeae* (Prasinococcyceae)[J]. J Phycol, 1989,25:377-385.
- [21] Tomaselli L. Physiological behavior of *Arthrospira* (S.) *maxima* during acclimation to changes in irradiance[J]. J Appl Physiol, 1997,9(1):37-43.

Distribution of calcium and changes of main biochemical components in *Spirulina* after adding CaCO_3

ZHENG Jiang^{1,2}, GAO Ya-hui², WEI Qing-yang, OUYANG Li-jia², TANG Chuan-ning², XIE Ming-yi²

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: As a kind of prokaryotic algae, *Spirulina* not only has very high nutrition value, but also can bioaccumulate many kinds of elements, such as Se, I, Cu, Fe, Mn and Zn. So the researches on its bioaccumulation have drawn much attention. Although the products of selenium-rich *Spirulina* and iodine-rich *Spirulina* have been developed, the studies on calcium-rich *Spirulina* and its bioaccumulation for calcium have not been specially reported so far.

The Ca-rich *Spirulina* was attained by adding solid powder CaCO_3 to the Zarrouk culture of *Spirulina*. Then the cell wall was separated by the method of SHENG Xue-feng's, and its calcium content and total calcium content were analyzed by atom absorption spectrum. The results showed that about 96% calcium accumulated by *Spirulina* was combined with cell wall. It was proved that the cell wall of *Spirulina* played a critical role in procedure of calcium accumulation. We also extracted the different biochemical components in the Ca-rich *Spirulina*. Inorganic calcium components were separated by the method of TANG Xiu-mei's, and the saccharides were extracted by hot-water-extraction method; the lipids were attained by the improved method of Beigh and Dyer's, and the proteins were separated by the method of WANG Da-zhi's. The actual procedures were described as below. The powder of Ca-riched *Spirulina* was divided into two sections. One was used to measure the total calcium content. The other was soaked in 6% trichloroacetic acid (TCA) for 3–5 min, then centrifugated at 4 000 r/min. The liquid of inorganic component was discarded. The deposit was thought as the organic component after it was soaked and centrifugated for three times. Then a little of water was added into it and NaOH was used to increase its pH to 7. The deposit was extracted in boiled water for 1 h, and TCA was added to deposit proteins. After it was centrifugated at 4 000 r/min, the liquid upside was the saccharide component. The lipids could be extracted from the rest deposit by adding the cool mixture of chloroform and methanol (v/v = 1:1). The last deposit was protein. The calcium contents of all the components can be analyzed by atom absorption spectrum. The control was dealt with by the same procedure. By comparing the calcium contents of different chemical components in Ca-rich *Spirulina* with that of control, it can be found that saccharide played a primary role in forming the organic calcium, of which about 88% was linked to saccharide. So the calcium bioaccumulation by *Spirulina* could probably depend on the adsorption of cell wall as well as the exchange with ions and active transportation of saccharide. Biochemical analysis of Ca-rich *Spirulina* showed that the contents of sugar and protein decreased, while chlorophyll a and carotenoid contents increased much. The decreases of sugar and protein might be related to the penetration of cell wall and the stimulation of Ca signal. The increases of chlorophyll a and carotenoid could be a sort of adaptive regulation by *Spirulina*.

Key words: CaCO_3 ; *Spirulina*; biochemical components

Corresponding author: GAO Ya-hui. E-mail: Gaoyh@xmu.edu.cn

* This work was supported by the Fund of Innovation of Young Scientist of Technology in Fujian Province (No. 2001J035)