

不同理化因子对雨生红球藻 CG-11 碳酸酐酶活性的影响

王铭, 桑敏, 李爱芬*, 张成武, 杨扬

暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632

摘要:以雨生红球藻 CG-11 为实验藻株, 探讨在不同 CO_2 、 HCO_3^- 、 Zn^{2+} 浓度以及 pH 和氮磷比例条件下, 藻细胞的碳酸酐酶活性对这些理化因子的响应。结果表明, 通入空气实验组的碳酸酐酶活性最高, 为 $(75.20 \pm 1.53) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a), 通入 5% CO_2 条件下的碳酸酐酶活性为 $(9.96 \pm 1.43) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a); 高浓度 HCO_3^- 对碳酸酐酶活性亦具有明显抑制作用, 培养液中可溶性无机碳的浓度与碳酸酐酶活性呈负相关; 在实验设置的 pH 范围内, pH 9.0 时碳酸酐酶活性最高, 为 $(62.32 \pm 3.25) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a); 适当的氮磷比与 Zn^{2+} 浓度显著提高了雨生红球藻 CG-11 的生长速率, 碳酸酐酶的活性亦有明显提高。

关键词: 雨生红球藻; 碳酸酐酶活性; 理化因子

Effects of Physical and Chemical Factors on Carbonic Anhydrase Activity of *Haematococcus pluvialis* CG-11

WANG Ming, SANG Min, LI Ai-Fen*, ZHANG Cheng-Wu, YANG Yang

Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: The strain *Haematococcus pluvialis* CG-11 was used to explore the effects of different concentrations of CO_2 , HCO_3^- , Zn^{2+} , pH and the ratio of nitrogen and phosphorus on the carbonic anhydrase activity. The results showed that only supplying compressed air for mixing, the maximum carbonic anhydrase activity can reach $(75.20 \pm 1.53) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a), but providing compressed air enriched with 5% CO_2 for mixing, carbonic anhydrase activity was only $(9.96 \pm 1.43) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a). High concentration of HCO_3^- also inhibited the carbonic anhydrase activity, and the concentration of total inorganic carbon in culture medium and carbon anhydrase activity was negatively correlated. The maximum carbonic anhydrase activity was $(62.32 \pm 3.25) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Chl a), that was obtained at pH 9.0 in the range of experiments. The appropriate ratio of nitrogen and phosphorus and the concentration of Zn^{2+} could significantly increase the growth rate of *H. pluvialis* CG-11, and carbonic anhydrase activity was also improved significantly.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, carbonic anhydrase activity, physical and chemical factors

CO_2 的固定是光合作用制造有机物的重要步骤之一, 水体可溶性 CO_2 远低于藻类正常光合作用所需量, 在长期的进化过程中, 藻类形成了一整套机制, 以应对水体可溶性 CO_2 不足带来的光合限制问题, 即出现了二氧化碳浓缩机制 (CO_2 -concentrating mechanism, CCM), 而其中碳酸酐酶扮演着重要的角色 (Spalding 等 1983; Moroney 等 1985; 邱保胜和高坤山 2001)。

碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 是一种含有锌离子的金属酶, 广泛存在于各类生物体中。微藻的碳酸酐酶主要参与介导 CO_2 和 HCO_3^- 的可逆反应, 维持这两种可溶性无机碳形式在溶液中的平衡。有关真核微藻碳酸酐酶的研究工作, 一直是真核藻类 CCM 研究的热点之一。对真核微藻碳酸酐

酶的存在及其功能的研究表明, 碳酸酐酶的存在已成为判断真核微藻存在 CCM 的标志之一 (Karlsson 等 1998; Eriksson 等 1998; Villarejo 等 1998; Moroney 和 Somanchi 1999)。

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种淡水单细胞绿藻, 生长周期的红色细胞阶段能大量积累虾青素, 含量可高达细胞干重的 6.0% 以上 (Borowitzka 等 1991), 因而成为生产天然虾青素的理想材料。本实验室开展了对于雨生红球藻培养及其虾青素积累等方面的研究工作 (刘健晖和李爱

收稿 2010-04-23 修定 2010-05-14

资助 珠海市科技重大项目 (PB20041018)。

* 通讯作者 (E-mail: tiger@jnu.edu.cn; Tel: 020-85224366)。

芬 2006; 董伟婷 2007), 并对 *H. pluvialis* CG-11 藻株的光合作用特性进行了初步探讨(王铭等 2009)。本实验以 *H. pluvialis* CG-11 为材料, 研究了不同 CO_2 、 HCO_3^- 、 Zn^{2+} 浓度以及不同 pH 和氮磷比例对 *H. pluvialis* CG-11 碳酸酐酶活性的影响, 探讨不同理化因子提高 *H. pluvialis* CG-11 碳酸酐酶活性的条件, 旨在为进一步阐明碳酸酐酶在 *H. pluvialis* CCM 中的作用机制, 并为雨生红球藻规模化生产中的 CO_2 添加方式和途径, 以及对可能存在的无机碳源利用相关的环境因子提供理论指导。

材料与方 法

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* Flotow. CG-11)由暨南大学水生生物研究中心藻种室提供。以BBM培养基作为基础培养基, 光照培养箱温度为 $(24 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 光照强度为 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为 12 h:12 h。培养至指数生长末期的 *H. pluvialis* CG-11 于 $4\ 000\times g$ 离心 3 min 去上清, 收集藻泥, 重悬浮于新鲜的 BBM 培养基中, 用于后续实验。

将培养的新鲜藻液, 设置如下实验: (1) 分别通入不同浓度的 CO_2 气体, 设置 CO_2 与空气的比例为 0.5%、1% 和 5%, 以通入普通空气作为对照组; (2) 在 BBM 培养基中加入不同浓度的 NaHCO_3 , 使培养基中 HCO_3^- 的浓度分别为 1、2、5、10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 不加 HCO_3^- 的作为对照组; (3) 使用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 或 NaOH 调节培养基的 pH 值, 使得 BBM 培养基的 pH 值分别为 7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0; (4) 以原始 BBM 培养基中氮磷比(约为 3:2)作为对照组; 氮的量固定不变, 添加 2 倍 BBM 培养基的磷含量, 设置一组氮磷比为 3:4 的实验组; 磷的量固定不变, 分别添加 2、3 和 6 倍 BBM 培养基的氮含量, 设置氮磷比为 6:2、9:2 和 18:2 的实验组; (5) 将离心得到的藻泥悬浮于新鲜缺 Zn^{2+} 的 BBM 培养基中, 分别加入不同浓度的 ZnSO_4 , 使 BBM 培养基中的 Zn^{2+} 浓度分别为 0、1、10、30、100 和 $1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 原 BBM 培养基 Zn^{2+} 浓度($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)为对照组。其中, 实验(1)采用 500 mL 的柱状玻璃管培养至对数末期, 测定 CA 活性; 实验(3)采用 500 mL 三角瓶静置培养, 接种 300 mL 藻液, 在培养过

程当中每隔 4 h 调节培养基的 pH 值, 使之维持在实验设计的 pH (± 0.05) 范围内, 培养 48 h 后, 测定 CA 活性; 实验(2)、(4)和(5)采用 500 mL 三角瓶静置培养, 按照 10% 的接种量接种 300 mL 藻液, 培养至对数末期, 取样测定 CA 活性, 实验(4)和(5)每 2 d 测定光密度值($\text{OD}_{680 \text{ nm}}$); 以上各实验组均设置 3 个平行。

碳酸酐酶活性测定根据 Wilbur-Anderson 量电法(Wilbur 和 Anderson 1948), 并进行了适当修正。取各处理条件下对数生长期的藻液 50 mL, 4°C , $3\ 000\times g$ 离心 10 min 后去上清, 收集藻细胞, 使用 4°C 预冷的巴比妥钠缓冲液($\text{pH } 8.4$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)洗涤一次, 离心后使用 5 mL 巴比妥钠缓冲液悬浮藻细胞, 进行冰浴超声波破碎, 超声波功率 200 W, 共作用 64 s, 每次作用时间 8 s, 间隔时间 9.9 s。在 4°C 下迅速加入 3 mL 0°C 饱和 CO_2 的蒸馏水至细胞匀浆液中, 用 pH 计监测反应体系 pH 值变化, 记录 pH 值从 8.3 降到 7.0 所需的时间。碳酸酐酶活性(U)的计算公式为: $U=10\times(T_0/T-1)$, 其中 T_0 为反应体系中未加细胞时 pH 值下降所需的时间, T 是反应体系中加细胞破碎液时 pH 值下降所需的时间。同时测定藻液叶绿素 a 含量, 叶绿素含量按下列公式计算: $\text{Chl a}=(11.93\times A_{664})-(1.93\times A_{647})$ (Jeffrey 和 Humphrey 1975), 碳酸酐酶活性单位(以 Chl a 计)为 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Chl a)。

取各处理对数生长期的藻液 30 mL, $5\ 000\times g$ 离心 10 min, 取上清液至分析瓶内, 上机测定可溶性无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)浓度。使用总有机碳(总氮)分析仪(德国, Elementar), 分析测定 DIC 的浓度。

实验数据采用 Origin 7.5 软件进行图表绘制。

实验结果

1 CO_2 对雨生红球藻碳酸酐酶活性的影响

不同 CO_2 浓度培养条件下的碳酸酐酶活性与培养液中 DIC 的浓度如图 1 所示。随着通入 CO_2 浓度的升高, 碳酸酐酶的活性呈现出下降趋势, 通入空气的对照组中碳酸酐酶的活性最高, 达到了 $(75.20 \pm 1.53) \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Chl a), 而 5% CO_2 培养条件下

的碳酸酐酶活性仅有(9.96±1.43) U·mg⁻¹ (Chl a)。培养液中DIC的浓度随着CO₂浓度的升高, 呈现增加的趋势, 当CO₂浓度为5%时, 溶液中DIC的浓度为(47.65±1.26) mg·L⁻¹。

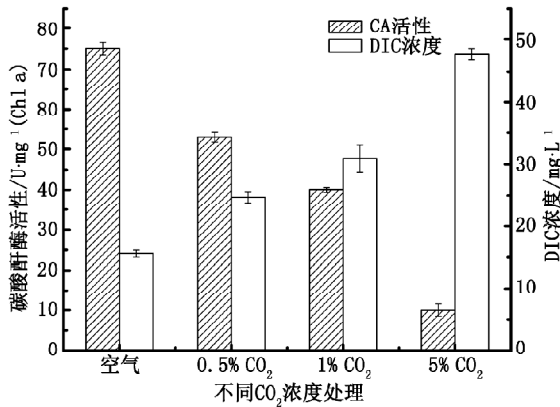


图1 *H. pluvialis* CG-11 在不同 CO₂ 浓度条件下碳酸酐酶活性与 DIC 浓度

Fig.1 The CA activity and DIC contents of *H. pluvialis* CG-11 with different CO₂ content source

2 HCO₃⁻对雨生红球藻碳酸酐酶活性的影响

添加不同HCO₃⁻浓度实验对碳酸酐酶活性的影响结果(图2)表明, 高浓度的HCO₃⁻能够抑制碳酸酐酶的活性。对照组的碳酸酐酶的活性为(59.44±1.02) U·mg⁻¹ (Chl a)。20 mmol·L⁻¹ HCO₃⁻浓度的实

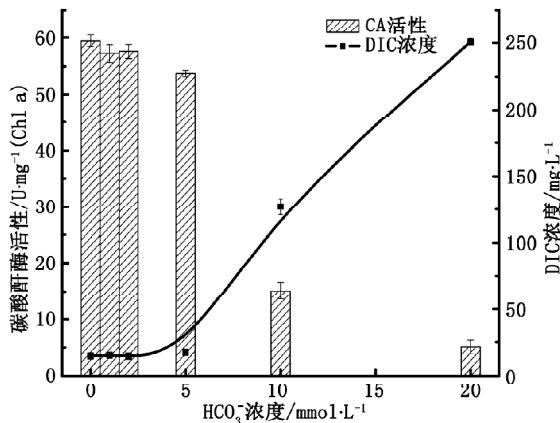


图2 *H. pluvialis* CG-11 在不同 HCO₃⁻ 浓度条件下的碳酸酐酶活性与 DIC 浓度

Fig.2 The CA activity and DIC contents of *H. pluvialis* CG-11 with different HCO₃⁻ content source

验组, 测得的碳酸酐酶活性最低, 为(5.05±1.21) U·mg⁻¹ (Chl a)。培养液中 DIC 浓度与碳酸酐酶的活性呈负相关, DIC 的最高浓度出现在 20 mmol·L⁻¹ HCO₃⁻ 浓度的实验组, 其 DIC 浓度为(250.63±2.50) mg·L⁻¹。

3 pH对雨生红球藻碳酸酐酶活性的影响

图3是雨生红球藻在不同pH条件下的碳酸酐酶活性与培养液中DIC的浓度。培养液pH为7.0和7.5时, 碳酸酐酶的活性差别不大, 分别为(40.32±1.72)和(40.09±2.01) U·mg⁻¹ (Chl a), 碳酸酐酶的活性在pH 7.5~9.0范围内, 随培养液pH的升高活性增大, pH 9.0时碳酸酐酶活性最高, 为(62.32±3.25) U·mg⁻¹ (Chl a)。培养液DIC浓度在pH为8.0时出现最高值, 为(18.65±1.72) mg·L⁻¹。

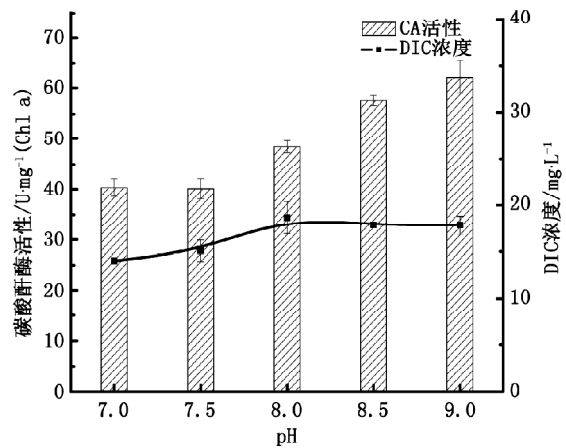


图3 *H. pluvialis* CG-11 在不同 pH 条件下的碳酸酐酶活性与 DIC 浓度

Fig.3 The CA activity and DIC contents of *H. pluvialis* CG-11 with different pH

4 氮磷比值对雨生红球藻生长及碳酸酐酶活性的影响

不同氮磷比条件下, 藻液的OD₆₈₀变化情况如图4-A所示。与对照组, 即原始BBM培养基中氮磷比(3:2)相比, 低氮高磷(3:4)培养条件下, 生长至第4天起, 明显低于对照组; 氮磷比为6:2与9:2的实验组藻液OD₆₈₀自第4天后, 开始高于对照组; 而氮磷比(18:2)最高的实验组藻液OD₆₈₀的变化趋势与对照组相似, 但OD₆₈₀低于对照组。对于不同氮磷

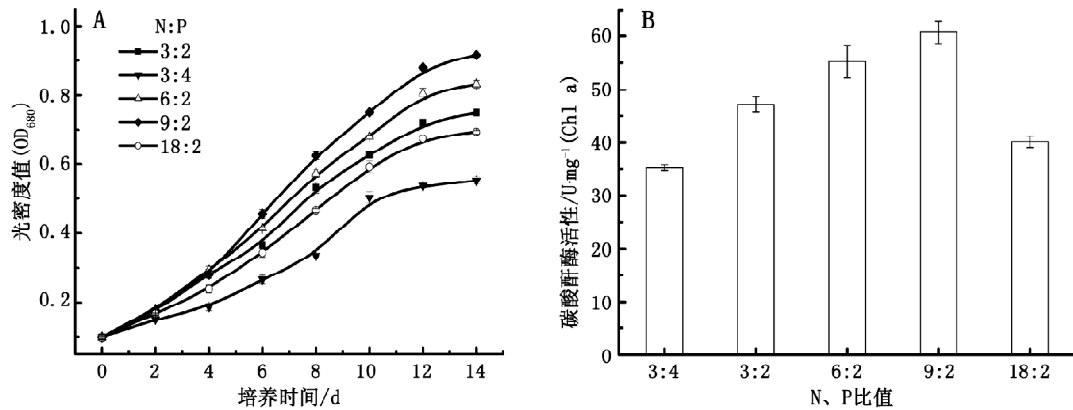


图4 *H. pluvialis* CG-11 在不同 N/P 条件下生长的相关参数

Fig.4 The growth parameters of *H. pluvialis* CG-11 with different N/P content source

A: 光密度; B: 碳酸酐酶活性。

比实验对碳酸酐酶活性的影响结果如图 4-B, 对照组碳酸酐酶的活性为(47.16±1.50) U·mg⁻¹ (Chl a), 不同氮磷比(3:4、6:2、9:2 和 18:2)的实验条件下, 测得的碳酸酐酶活性分别为对照组的 74.7%、117.1%、128.7% 和 85.2%, 其中以氮磷比为 9:2 时的碳酸酐酶活性最高, 达到了(60.70±2.14) U·mg⁻¹ (Chl a)。

5 Zn²⁺对雨生红球藻生长及碳酸酐酶活性的影响

在不同 Zn²⁺浓度条件下测得藻液的 OD₆₈₀变化如图 5-A 所示。与对照组, 即原始 BBM 培养基(Zn²⁺浓度为 30 μmol·L⁻¹)相比, 培养液 Zn²⁺浓度为 1 000

μmol·L⁻¹条件下, 藻体生长至第4天出现白化死亡现象; Zn²⁺浓度为 1 μmol·L⁻¹实验组, 生长状况始终优于对照组; Zn²⁺浓度为 10 μmol·L⁻¹实验组的生长情况与对照组基本相同; Zn²⁺浓度为 0 μmol·L⁻¹和 100 μmol·L⁻¹两实验组藻液 OD₆₈₀一直低于对照; 而 Zn²⁺浓度为 100 μmol·L⁻¹实验组从第8天起藻液 OD₆₈₀开始高于缺 Zn²⁺实验组。不同 Zn²⁺浓度实验对碳酸酐酶活性的影响表明(图 5-B), 对照组的碳酸酐酶的活性为(42.86±2.14) U·mg⁻¹ (Chl a), 而 Zn²⁺浓度为 1 μmol·L⁻¹时, 碳酸酐酶活性最高, 为(52.21±1.50) U·mg⁻¹ (Chl a)。

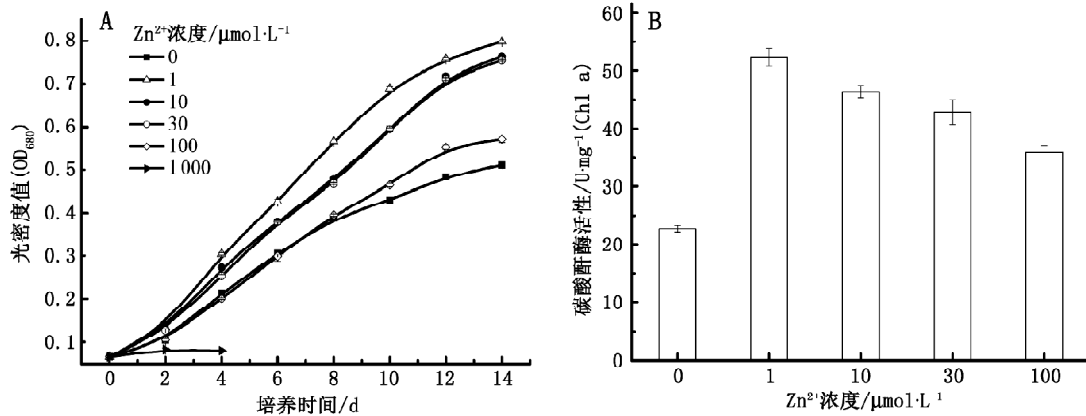


图5 *H. pluvialis* CG-11 在不同 Zn²⁺ 浓度下生长的相关参数

Fig.5 The growth parameters of *H. pluvialis* CG-11 with different Zn²⁺ content source

A: 光密度; B: 碳酸酐酶活性。

讨 论

研究证实,无机碳对碳酸酐酶活性的影响比较复杂,在天然水体中 HCO_3^- 占主要形式,对于 HCO_3^- 离子的吸收利用碳酸酐酶发挥首要作用,而pH等环境因子对 HCO_3^- 和 CO_2 形式的转化也影响到碳酸酐酶活性(Villarejo等1997;陈雄文等2000;Beardall和Giordano 2002;Giordano等2005)。*H. pluvialis* CG-11不具有胞外碳酸酐酶活性(王铭2009),因此 HCO_3^- 的直接利用受到很大限制。本文的初步实验表明, HCO_3^- 对*H. pluvialis* CG-11胞内碳酸酐酶活性的影响不仅仅局限于其本身的作用,添加 HCO_3^- 引起的培养体系pH的改变对碳酸酐酶活性的影响更明显。碳酸酐酶能够催化 HCO_3^- 脱水生成 CO_2 ,并且远远高于其自发脱水的速率。*H. pluvialis* CG-11不存在胞外碳酸酐酶,因此,培养体系中游离态的 HCO_3^- 不能有效地转化为藻体可直接利用的 CO_2 。培养液添加 HCO_3^- 后,*H. pluvialis* CG-11细胞被诱导表达出了碳酸酐酶活性,随着浓度的增加,碳酸酐酶的活性呈现明显的下降趋势,这是过量的 HCO_3^- 对*H. pluvialis* CG-11的生理状态产生了影响,致使*H. pluvialis* CG-11光合活性降低,消耗的DIC减少,引起了碳酸酐酶活性下降(王山杉等2006)。培养液pH值在7.0~9.0区间主要通过DIC的形态变化影响*H. pluvialis* CG-11碳酸酐酶活性(Villarejo等1997;Moroney和Somanchi 1999;王山杉等2006)。

氮和磷作为大量营养元素,对于微藻生长至关重要。本文结果显示,适量增加氮磷比有利于*H. pluvialis* CG-11的生长(图4-A)和碳酸酐酶活性的提高(图4-B)。因为氮磷比增加,有利于提高*H. pluvialis* CG-11的光合生理活性,从而增加了培养系统对DIC的需求,诱导*H. pluvialis* CG-11表达出更高的碳酸酐酶活性。已有研究也表明,适当浓度的磷限制能够提高碳酸酐酶活性(Beardall等2005),增加氮浓度,对碳酸酐酶活性亦具有促进作用(Giordano等2005)。

本实验表明,较低浓度的 Zn^{2+} 有利于*H. pluvialis* CG-11的生长, Zn^{2+} 浓度超过一定范围后,

H. pluvialis CG-11的生长受到抑制,藻体全部死亡(图5-A)。而Ikegami等(2005)的研究发现,黑暗培养的*Chlorella*叶绿体中的 Zn^{2+} 浓度高达10~40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,这表明不同藻种对于 Zn^{2+} 浓度的耐受程度有差异。 Zn^{2+} 是碳酸酐酶的重要组分,实验证实,适当浓度 Zn^{2+} 对*H. pluvialis* CG-11碳酸酐酶的活性具有促进作用, Zn^{2+} 缺乏碳酸酐酶的活性受到明显抑制(图5-B)。

综上所述,通空气培养、碳酸氢钠浓度低于5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 9.0、氮磷比值为9:2(3倍BBM基础培养基氮含量)和锌离子浓度为1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,都能提高*H. pluvialis* CG-11的碳酸酐酶活性。

参考文献

- 陈雄文,戴新宾,张荣铤(2000). pH值和氮素对莱氏衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)胞外碳酸酐酶活性的影响. 南京农业大学学报, 23 (1): 27~29
- 董祎婷(2007). 雨生红球藻*Haematococcus pluvialis* CG-11积累虾青素的生态调控研究[学位论文]. 广州:暨南大学
- 刘健晖,李爱芬(2006). 雨生红球藻在不同培养基的生长比较. 生态科学, 25 (2): 113~115
- 邱保胜,高坤山(2001). 蓝藻浓缩二氧化碳的机制. 植物生理学通讯, 37 (5): 385~392
- 王铭(2009). 雨生红球藻绿色细胞的光合特性及其无机碳利用机制[学位论文]. 广州:暨南大学
- 王铭,李涛,李爱芬,徐宁,张成武(2009). 光照,温度和pH对雨生红球藻光合特性的影响. 水生生物学报, 33 (3): 38~43
- 王山杉,刘永定,邹永东,李敦海(2006). 微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应. 生态学报, 26 (8): 2443~2448
- Beardall J, Giordano M (2002). Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO_2 concentrating mechanisms, and their regulation. *Funct Plant Biol*, 29 (2/3): 335~347
- Beardall J, Roberts S, Raven JA (2005). Regulation of inorganic carbon acquisition by phosphorus limitation in the green alga *Chlorella emersonii*. *Botany*, 83 (7): 859~864
- Borowitzka MA, Huisman JM, Osborn A (1991). Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* (I): Effects of nutrients on growth and cell type. *J Appl Phycol*, 3 (4): 295~304
- Eriksson M, Villand P, Gardeström P, Samuelsson G (1998). Induction and regulation of expression of a low- CO_2 -induced mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 116 (2): 637~641
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005). CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 99~131
- Ikegami I, Nemoto A, Sakashita K (2005). The formation of Zn-Chl *a* in *Chlorella* heterotrophically grown in the dark with

- an excessive amount of Zn^{2+} . *Plant Cell Physiol*, 46 (5): 729~735
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz*, 167: 191~194
- Karlsson J, Clarke AK, Chen ZY, Huggins SY, Park YI, Husic HD, Moroney JV, Samuelsson G (1998). A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO_2 . *EMBO J*, 17 (5): 1208~1216
- Moroney JV, Husic HD, Tolbert NE (1985). Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 79 (1): 177~183
- Moroney JV, Somanchi A (1999). How do algae concentrate CO_2 to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiol*, 119 (1): 9~16
- Spalding MH, Spreitzer RJ, Ogren WL (1983). Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* requires elevated carbon dioxide concentration for photoautotrophic growth. *Plant Physiol*, 73 (2): 268~272
- Villarejo A, Orús MI, Martínez F (1997). Regulation of the CO_2 -concentrating mechanism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 by glucose. *Physiol Plant*, 99 (2): 293~301
- Villarejo A, Orús MI, Ramazanov Z, Martínez F (1998). A 38-kilodalton low- CO_2 -inducible polypeptide is associated with the pyrenoid in *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 206 (3): 416~425
- Wilbur KM, Anderson NG (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 176 (1): 147~154