

不同氮源形态和植物激素对小球藻 USTB01 生长及叶黄素含量的效应

Effects of Various Nitrogen Sources and Phytohormones on Growth and Content of Lutein in *Chlorella* sp USTB01

王素琴/WANG Su-qin^{1,2}, 闫海/YAN Hai¹, 张宾/ZHANG Bin^{1,2}, 吕乐/LU Le¹, 林海/LIN Hai²

1. 北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083

2. 北京科技大学土木与环境工程学院环境工程系, 北京 100083

1. Department of Biological Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

2. Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

[摘要] 在光照条件下,分别研究了氯化铵、尿素和硝酸钾 3 种氮源,以及吲哚乙酸(IAA)和吲哚丁酸(IBA) 2 种植物激素对小球藻生长及叶黄素含量的效应。结果表明,葡萄糖和硝酸钾分别作为唯一碳源和氮源可以支持小球藻快速持续生长;尿素作为唯一氮源时小球藻生长缓慢,而氯化铵作为唯一氮源时因使培养物中的 pH 快速降低而抑制了小球藻的进一步生长。与尿素和氯化铵相比,硝酸钾是促进小球藻生物合成叶黄素的最好氮源,小球藻细胞中的叶黄素含量可以达到 0.85 mg/g。在葡萄糖为碳源和硝酸钾为氮源条件下,加入植物激素 IAA、IBA 非但不能明显促进小球藻的生长,反而明显抑制了小球藻对叶黄素的生物合成。

[关键词] 小球藻,叶黄素,氮源,植物激素 **[中图分类号]** Q914.82

[文献标识码] A **[文章编号]** 1000-7857(2005)12-0037-04

Abstract: The effects of three nitrogen sources such as ammonium chloride, urea and potassium nitrate, and two phytohormones such as indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA), on the growth and the content of lutein in *Chlorella* sp were investigated under light condition, respectively. The results showed that when glucose and potassium nitrate were used as the sole carbon and nitrogen sources, the rapid and continuous growth of *Chlorella* sp was achieved. If urea was used as the sole nitrogen source, the growth of *Chlorella* sp was distinctly slow. Using ammonium chloride as the sole nitrogen source, the growth of *Chlorella* sp could be apparently inhibited by the rapid decrease of pH of culture solution. Compared with urea and ammonium chloride, potassium nitrate was the best nitrogen source to promote biosynthesis of lutein by *Chlorella* sp, and the yield of lutein in dry algal cells could reach 0.85mg/g. In the presence of glucose and potassium nitrate, the growth of *Chlorella* sp could not be accelerated, on the contrary, the biosynthesis of lutein was inhibited by IAA or IBA, respectively.

Key Words: *Chlorella* sp, lutein, nitrogen source, phytohormone

Document Code: A

CLC Number: Q914.82

Article ID: 1000-7857(2005)12-0037-04

1 引言

微藻不仅可以通过光合作用吸收二氧化碳放出氧气,而且含有多种重要的生命活性物质如 EPA (Eicosapentaenoic Acid)、DHA (Decosahexaenoic Acid)、藻胆蛋白 (Phycobiliprotein)、 β -胡萝卜素 (β -carotene)、Vc、叶黄素 (Lutein) 和虾青素 (Astaxanthin) 等^[1-3],具有广泛的商业价值。微藻中的小球藻属于单细胞绿藻,包括大约 10 个种,细胞形态为圆形或椭圆形,细胞直径 2~12 μm ^[4]。小球藻

不仅含有丰富的蛋白质、脂质、多糖、食用纤维和维生素等营养成分,而且含有小球藻因子和叶黄素等一系列生命活性物质,具有重要的保健和药理作用^[5]。叶黄素是人类血液和食物中最重要的类胡萝卜素之一^[6],植物中的叶黄素属于天然色素,色泽鲜艳,无毒性,可广泛应用于食品着色、化妆品、医药和禽畜饲料中^[7]。由于小球藻富含叶黄素,因此小球藻不仅可以看作是高价值健康食品,而且在医药、化工和食品等领域有着广泛的应用前景。目前在

收稿日期:2005-09-22

基金项目:国家自然科学基金(20377047)

作者简介:王素琴,女,北京海淀区学院路 30 号北京科技大学土木与环境工程学院环境工程系,硕士生,研究方向为藻类生物学;

E-mail:wangsq804@sina.com

闫海(通讯作者),男,北京海淀区学院路 30 号北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系,教授,研究方向为环境生物学与藻类;E-mail:haiyan@sas.ustb.edu.cn

国外期刊有利用小球藻生产叶黄素的研究报道^[8],但在国内刊物中尚未发现有此领域的研究介绍。至今小球藻培养方式以开放式培养和封闭式培养为主^[9],但在这两种培养方式下小球藻产量都不高,因此,近几年来,许多学者致力于异养培养超高细胞浓度小球藻的技术研究^[8,10],使小球藻的培养进入一个崭新的阶段。我们在国内率先成功筛选出既可以在自养条件下利用光能和二氧化碳进行自养生长,也可以在无光照异养培养条件下利用有机碳源进行生长的小球藻藻种;并在此基础上^[11],重点研究了不同氮源形态和植物激素对小球藻生长和叶黄素含量的效应,这不仅具有重要的基础研究价值,而且为进一步应用小球藻生产叶黄素的产业化生产奠定了重要的基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验用小球藻藻种是我们从天然水体中筛选出的小球藻纯种^[11]。不同氮源形态硝酸钾、尿素和氯化铵均为分析纯化学试剂。植物激素吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)均为北京鼎国生物技术有限责任公司产品,用乙醇溶解后于实验前在洁净工作台内加入到小球藻培养物中。叶黄素标准品购自北京禹光生物科学研究中心,叶黄素用甲醇-二氯甲烷(2:1)溶液溶解配制一系列标准浓度后进行 HPLC 测定。

2.2 培养基和培养条件

实验所用培养基是文献^[11]所示的培养基。在不同氮源形态实验中,以硝酸钾、尿素和氯化铵作为唯一氮源,分别配制相同浓度的氮初始浓度。在不同植物激素实验中,分别配制不同初始浓度的 IAA 和 IBA。培养基初始 pH 都调至 6.5 左右。实验器皿为 300 mL 三角瓶,培养量为 100 mL。培养基和实验器皿均经 121 ℃、20 min 的高温高压和超净工作台紫外灯照射 20 min 灭菌后使用。在洁净工作台内接种小球藻后,在光照培养箱中进行光照静置培养,培养条件是:温度 30 ℃,2 h 光照黑暗循环,光照强度 3 000 lux,每天摇瓶 2 次。

2.3 小球藻生物量的测定

用 722S 可见分光光度计在波长 680 nm 下测定光密度(OD_{680nm})以示小球藻的生长量。通过 OD_{680nm} 按照如下公式可计算出对应的小球藻细胞干重浓度: $y=0.3571x-0.0027$, x 为 OD_{680nm} , y 为藻细胞干重 g/L^[11]。

2.4 叶黄素的提取和测定

在小球藻培养实验结束时,取 5 mL 藻液,离心后倒去上清液,沉降于离心管底部的藻细胞用磷酸盐缓冲溶液(pH7.0)重新悬浮后再次离心倒去上清液,如此重复 3 次清洗藻细胞后,加入 5 mL 甲醇-二氯甲烷(2:1)提取剂,用超声波细胞破碎机破碎藻细胞 20 min(超声 10 s,间隔 2 s)后,再次经过离心取上清液在 HPLC 上测定。实验前用甲醇-二氯甲烷(2:1)配制叶黄素浓度分别为 4 mg/L、8 mg/L、12 mg/L、16 mg/L 和 20 mg/L 的标准溶液,依次在 HPLC 上进样。在不同叶黄素浓度下,得到叶黄素峰高(y)与叶黄素浓度(x)的一元线性回归方程($y=4.0408x-0.8169$, $R^2=0.9987$)。实验通过叶黄素峰高计算出对应的叶黄素浓度。

叶黄素含量测定条件是:高效液相色谱(HPLC)仪(岛津 LC-10ATvp 泵,SPD-M10Avp 二极管阵列检测器),采用 Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×25 cm)分离柱,流动相是乙腈-甲醇-乙酸乙酯(45:10:45),流速为 1 mL/min,进样量 20 μL,检测波长为 460 nm。

3 结果与讨论

3.1 叶黄素标准品及小球藻提取物的 HPLC 色谱图

20 mg/L 叶黄素标准品及小球藻提取物的 HPLC 谱图(图 1)显示,标准品叶黄素出峰的保留时间为 3.06 min(图 1 a),小球藻细胞提取液在同样的保留时间也存在一个明显的出峰,因此初步

确认我们筛选的小球藻种能够产生叶黄素。

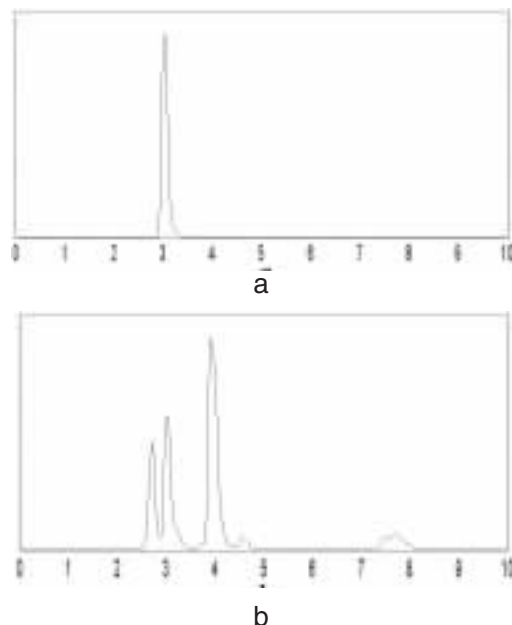


图 1 叶黄素标准品及小球藻提取物 HPLC 谱图
a—叶黄素标准品;b—小球藻提取物

为了更进一步确认在藻细胞提取液中与标准品叶黄素有同样保留时间的出峰就是叶黄素,分别对叶黄素标准品的出峰以及在藻提取液中与之有相同保留时间的出峰从 375 nm 到 800 nm 进行吸收扫描,结果(图 2)显示,标准品叶黄素与藻提取液中的出峰的扫描图谱基本相同,最大吸收波长均在 460 nm 左右,因此证实小球藻中确实含有叶黄素。

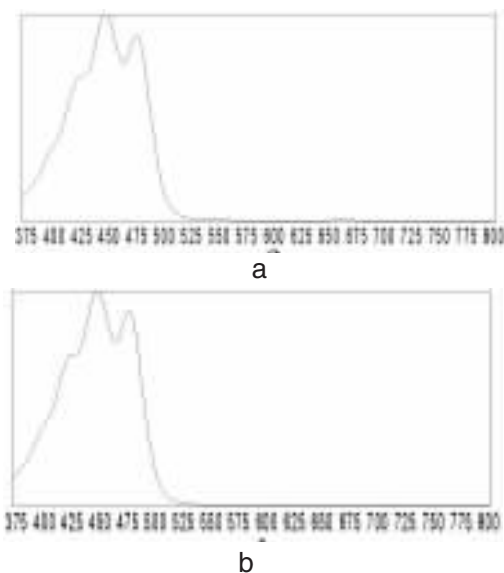


图 2 叶黄素标准品及小球藻提取物中叶黄素的扫描图谱
a—叶黄素标准品;b—小球藻提取物

3.2 不同氮源对小球藻生长及叶黄素产量的效应

在葡萄糖初始浓度为 10 g/L、总氮浓度都为 0.277 g/L 条件下,研究了硝酸钾、尿素和氯化铵对小球藻生长的效应。结果表明,在所用的 3 种氮源中,小球藻均能生长,但在不同氮源条件下,生长状况有很大的差别(图 3)。以氯化铵作为氮源时,培养第一天小球藻生长较好,但此后小球藻生长基本处于停顿状态。以

尿素作为氮源时, 小球藻可以生长但生长缓慢。而以硝酸钾作为氮源时, 小球藻一直保持较快的生长速度, 培养第 4 天 OD_{680nm} 达到了 6.72。上述结果表明, 与尿素和氯化铵相比, 硝酸钾是支持小球藻快速稳定生长的最好氮源。

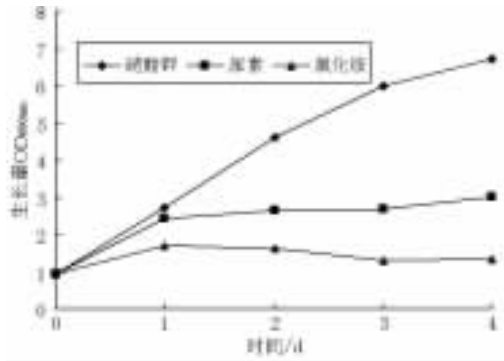


图 3 不同氮源对小球藻生长的效应

采用不同氮源形态培养小球藻后的 pH 变化表明 (图 4), 在初始 pH 都为 6.5 左右条件下, 以氯化铵作为氮源时, 培养第一天, 小球藻培养物的 pH 值就下降到 4.57, 此后 pH 仍然在下降 (图 4)。分析原因主要是铵根离子直接被小球藻吸收后, 为了保证细胞内电荷平衡而释放出氢离子使得培养液的 pH 值下降, 如此低的 pH 可能是导致小球藻停止生长的主要原因 (图 3)。以尿素作为唯一氮源时, 小球藻培养液的 pH 值虽然也有所下降, 但仍然保持在 5.0 以上 (图 4), 因此也在一定程度上抑制了小球藻的生长 (图 3)。在硝酸钾作为唯一氮源时, 培养物的 pH 呈现缓慢上升趋势, 但没有超过 8.0 (图 4), 因此小球藻可以持续稳定地快速生长 (图 3)。据报道^[12]小球藻不能直接利用 NO_3^- 中的氮, 而是首先在硝酸盐还原酶的作用下将其还原为 NO_2^- , 再由亚硝酸根还原酶将其彻底还原为 NH_4^+ 后才能被小球藻吸收利用。虽然以硝酸钾作为氮源会消耗能量, 但小球藻在吸收硝酸盐过程中伴随质子共转运 (NO_3^-/H^+ Symport) 现象, 使培养基中的质子浓度降低 pH 值上升, 这有利于小球藻的生长。因此, 与尿素和氯化铵相比, 硝酸钾是支持小球藻快速稳定生长的最好氮源。

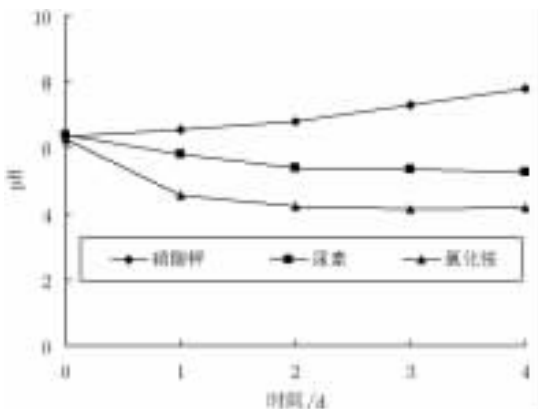


图 4 不同氮源条件下小球藻培养物中 pH 的变化

图 5 显示, 分别以硝酸钾、尿素和氯化铵作为氮源时, 小球藻都可以产生叶黄素, 但当硝酸钾作为唯一氮源时, 培养所得小球藻的叶黄素产量最高, 达到 0.85 mg/g。而以尿素或氯化铵作为唯一氮源时, 叶黄素产量分别比以硝酸钾作为氮源时下降了 39.9%、37.9%, 这进一步说明硝酸钾不仅可以支持小球藻快速稳定生长, 而且也有利于小球藻对叶黄素的生产。

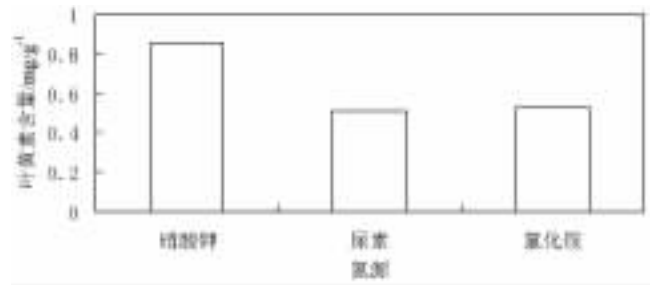


图 5 不同氮源条件下小球藻细胞内叶黄素产量

3.3 不同植物激素对小球藻生长及叶黄素产量的效应

在葡萄糖浓度为 10 g/L、硝酸钾浓度为 2 g/L 的条件下, 研究了 IAA 及 IBA 对小球藻的生长及叶黄素含量的效应。从图 6 可看出, IAA 加量在 10 mg/L~100 mg/L 范围内, 对小球藻的生长没有明显的促进或抑制作用。图 7 表明, 在 20 mg/L~100 mg/L 范围内, IBA 的存在明显抑制了小球藻的生长, 且 IBA 加量越大, 抑制效应越明显。据报道^[13] IAA 或 IBA 在 20 mg/L 浓度时可以促进小球藻的生长, 而增加到 100 mg/L 时会抑制小球藻的生长。我们的研究结果显示 (图 6 和 7), IAA 或 IBA 在此浓度范围没有明显促进小球藻生长的效应, 其原因可能是采用的小球藻种不同所致。

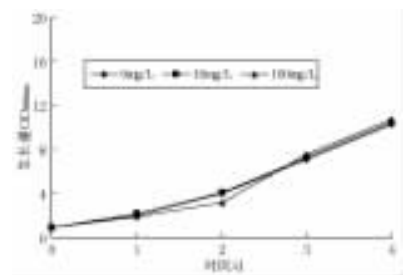


图 6 不同吲哚乙酸含量对小球藻生长的效应

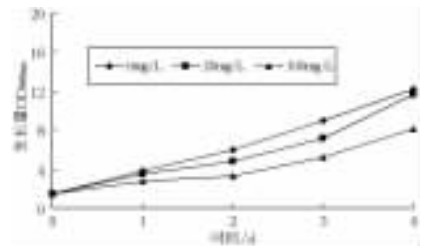


图 7 不同吲哚丁酸含量对小球藻生长的效应

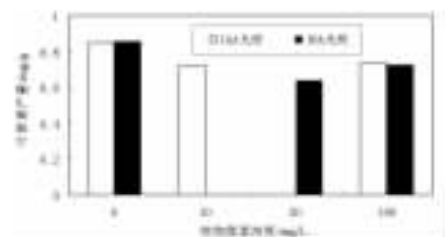


图 8 植物激素作用下小球藻细胞中叶黄素含量

图 8 显示, 在不同初始浓度下, 无论是 IAA 还是 IBA 与对照相比藻细胞中叶黄素含量都有明显的下降趋势, 因此添加植物激素 IAA 和 IBA, 不仅对小球藻的生长没有促进作用, 反而会明显抑制藻类的叶黄素合成。由于至今尚未发现有植物激素对小球藻生物合成叶黄素效应的研究报道, 因此其机理还有待于进一步研究。

在RBAC模型中“责权分离约束”的冲突检测与消解

Conflict Checking and Solving of Separation of Duty Constraints in RBAC

崔中杰/CUI Zhong-jie^{1,2}, 胡昌振/HU Chang-zhen^{1,2}

1. 北京理工大学信息安全与对抗技术研究中心, 北京 100081

2. 北京理工大学机电工程学院, 北京 100081

1. Information Security and Confrontation Technology Research Center, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2. School of Mechatronic Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

[摘要] 详细论述了责权分离约束在基于角色的访问控制(RBAC)中的冲突检测与解决方案。研究了该约束在“权限-角色授权”(PRA)、“权限-主体授权”(PSA)、“角色-主体授权”(RSA)、“角色-角色授权”(RRA)等各类授权关系中的典型示例,并结合数学中的有向图理论给出冲突检测的算法分析,为实际应用奠定了基础。此外,还对冲突产生后的消解方法进行了深入讨论,总结出多种方案并进行仿真比较,根据实验结果给出一套优化后的解决途径。

[关键词] 责权分离,冲突检测,冲突消解,有向无环图,角色分层

[中图分类号] TP301

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)12-0040-04

Abstract: The conflict checking and solving of separation of duty constraints were particularly discussed in RBAC we researched these constraints' typical examples in authorization relations of the permission-to-role assignment (PRA), the permission-to subject assignment (PSA), the role-to-subject assignment (RSA), and the definition of a role hierarchy (role-to-role assignment, RRA). The arithmetic analysis of conflict checking which links with the theory of directed acycline graph (DAG) was provided. It will be a basis for practical application. Furthermore, the conflict solving was further discussed in the paper. Several schemes are summarized and achieved imitating experiment. Subsequently, we provided an optimized solving method for the further work.

Key Words: separation of duty, conflict checking, conflict solving, directed acycline graph, role hierarchy

CLC Number: TP301

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)12-0040-04

收稿日期:2005-10-20

作者简介:崔中杰,男,北京中关村南大街5号北京理工大学,博士生,研究方向为信息安全;E-mail:bjcuizj@163.com

胡昌振(通讯作者),男,北京理工大学机电工程学院,教授,研究方向为信息安全;E-mail: chzhoo@bit.edu.cn

4 结论

1) 在光照培养条件下,与尿素和氯化铵相比,硝酸钾是支持小球藻持续快速生长的最好氮源。

2) 在光照培养条件下,与尿素和氯化铵相比,硝酸钾是促进小球藻生物合成叶黄素的最好氮源,小球藻细胞中的叶黄素含量可以达到0.85 mg/g。

3) 植物激素 IAA 和 IBA 不但不能明显促进小球藻的生长,反而明显抑制了小球藻对叶黄素的生物合成。

(致谢:感谢北京科技大学校基金和北京科技大学方兴科技孵化器项目的资助。)

参考文献(References)

- [1] CHEN F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth [J]. Tibtech, 1996, 14: 421-426.
- [2] KYLED. Production and use of lipids from microalgae [J]. Lipid Technol, 1992, 4(3): 59-64.
- [3] BOROWITZKAME. Microalgae source of pharmaceuticals and other biologically active compounds[J]. J of Appl Phyco, 1995, 7: 3-15.

- [4] 陈峰,姜悦主编.微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [5] 刘学铭,梁世中.小球藻的保健和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 1999, 30(5): 383-386.
- [6] SHI X M, CHEN F. Stability of lutein under various storage conditions[J]. Nahrung/Food, 1997, (41): 38-41.
- [7] 宋昊,何泽超,章杰,等.万寿菊中叶黄素的提取[J]. 化工设计,2003, 13(4): 10-12.
- [8] SHI X M, CHEN F, YUAN J P. et al. Heterotrophic production of lutein by selected Chlorella strains [J]. J. Appl. Phycol, 1997, 9: 445-450.
- [9] BOROWITZKAME M A, BOTOWITZKA L J. Micro-algal biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- [10] GLADUE R M, MAXEY J E. Microalgal feeds for aquaculture[J]. J. Appl. Phycol, 1994, 6: 131-141.
- [11] 闫海,周洁,何宏胜,等.小球藻的筛选和异养培养[J]. 北京科技大学学报, 2005, 27(4): 408-412.
- [12] MCAULEY P. Nitrogen limitation and amino-acid metabolism of Chlorella symbiotic with green hydra[J]. Planta, 1987, 171: 532-538.
- [13] 刘世名,梁世中.植物激素在小球藻异养培养中的作用 [J]. 植物学通报, 1999, 16(6): 696-700.

(责任编辑 王 芷)