温度和盐碱度对液体培养发菜生长和生理特性的影响

郭金英，李彤辉，史明科，任国艳，王萍，张玉先，罗登林，冯惠敏
（河南科技大学食品与生物工程学院，河南洛阳 471023）

摘要：比较不同温度和不同浓度盐碱处理对液体培养发菜（*Nostoc flagelliforme*）细胞生长和生理特性的影响。80 μmol/(m^2 s)光照下，采用含有不同浓度的NaCl和Na_2CO_3的BG-11培养液，分别在25、35和45 ℃温度下培养发菜细胞，在培养8、12、16和24 h时，分别测定发菜细胞生物量、质膜透性、超氧化物歧化酶活性、丙二醛、脯氨酸、可溶性蛋白以及可溶性糖含量。结果表明，在高温和盐碱作用下，发菜细胞相对外渗率增加，最高达193.2%；丙二醛含量先上升后下降；随着处理程度的提高，发菜细胞超氧化物歧化酶活性和脯氨酸含量先上升后下降；可溶性蛋白含量呈上升趋势，与处理程度呈正相关；可溶性糖含量先上升后下降；与对照相比，随着温度和盐碱浓度的提高，发菜细胞生长速率明显下降。研究表明在不同培养温度下，应用含有不同浓度盐碱的液体培养基人工培养发菜的过程中，发菜可溶性蛋白和可溶性糖具有重要的生理作用，发菜细胞对不同温度和盐碱浓度产生生理的应激响应。

关键词：温度；盐碱；发菜；生理特性

文章篇号：1673-9078(2015)8-199-204 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.032

Effects of Temperature, Salinity, and Alkalinity in Liquid Culture on Growth and Physiological Characteristics of *Nostoc flagelliforme*

GUO Jin-ying, LI Tong-hui, SHI Ming-ke, REN Guo-yan, WANG Ping, ZHANG Yu-xian, LUO Deng-lin, FENG Hui-min

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: The temperature, salinity, and alkalinity of *Nostoc flagelliforme* liquid culture were varied and the effects on the growth and physiological characteristics of the cells were studied. Modified BG-11 culture medium containing different concentrations of NaCl and Na_2CO_3 was used to culture *N. flagelliforme* cells at 25 ℃, 35 ℃, and 45 ℃, under light intensity of 80 μmol/(m^2 s). Cell biomass of *N. flagelliforme*, plasmalemma permeability, and superoxide dismutase (SOD) activity, as well as the content of malondialdehyde (MDA), proline, soluble proteins, and soluble polysaccharides were determined at 8, 12, 16, and 24 h of incubation. The results indicated that, under high temperature and saline-alkali stress, the relative plasmalemma permeability of *N. flagelliforme* cells was increased by 193.2% and MDA content declined after an initial increase. With increase in the duration of treatment, SOD activity and proline content increased at first and then decreased. Soluble protein showed an upward trend, which was positively correlated with the duration of treatment. The soluble polysaccharide content declined after an initial increase. Compared with the growth rate of the control group, that of *N. flagelliforme* cells decreased significantly with theincrease in temperature and salinity-alkalinity. The results indicate that, during the process of artificial culture of *N. flagelliforme* in liquid medium with different levels of salinity and alkalinity at different incubation temperatures, soluble proteins and polysaccharides exert an important physiological effect. Thus, different temperatures and salinity-alkalinity can induce physiological response of *N. flagelliforme*.

Key words: temperature; salinity-alkalinity; *Nostoc flagelliforme*; physiological characteristics

发菜属于念珠蓝细菌科念珠蓝细菌属，俗称地毛、龙须菜等，是一种在全世界范围内广泛分布的可食用陆生经济蓝细菌[1]。发菜在我国主要分布在西部和北部的干旱半干旱荒漠地区，这一地区年降雨量少，光照强，日温差大，存在着大面积既含有中性盐（NaCl）又含有碱性盐（Na_2CO_3）的盐碱化土壤，大部分耕作层土壤盐含量在0.78~1.68%[2]。

作为一种食品，发菜在我国已有近两千年的历史，其药用价值也早有记载[3]。发菜营养极为丰富，富含大量胶物质和蛋白质、20多种微量元素、19种氨基酸、叶黄素、藻蓝蛋白、叶绿素和角黄素等[4]。由于发菜营养价值高，人们过量搂发菜，同时野生发菜生长缓慢，导致其野生资源遭受严重的破坏，导致了风灾旱灾程度加重，大片土地荒漠化和沙尘暴加剧，

收稿日期：2014-10-16

基金项目：河南省重点科技攻关计划项目（142102110038）；河南科技大学博士科研启动基金；河南科技大学大学生研究训练（SRTP）项目（2014117）

作者简介：郭金英（1971-），男，博士，副教授，研究方向为食品新资源

对环境安全带来了严重影响。因此，自2000年7月起，中国政府为了保护发菜资源和生态环境，全面禁止发菜的采收和销售。因此，为实现发菜的可持续利用，探索人工培养发菜技术，对于保护资源和生态具有重要的意义。

早期发菜人工培养主要是模拟自然条件，将切成的发菜原植体节段接种到固体培养基上进行培植，但生长条件难以控制[5]。目前发菜人工悬浮培养成为发菜培养的主要方法，有关研究者主要从培养基的营养成分、培养温度、光照等环境条件的改变来提高发菜的生长量[6~8]。这些研究为发菜的高密度培养提供了有益的参考，但是由于对发菜人工培养的生理特性认识不足，目前人工液体培养发菜的生物量还较低，还不能应用于大规模生产。因此，进行多条件对人工培养发菜生理特性的影响研究具有重要的意义。

本研究以液体培养的发菜细胞为材料，采用含有不同浓度盐碱物质（NaCl和Na_2CO_3）的BG-11培养基，在不同的温度下培养发菜，从渗透调节物质（脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖）、膜系统（膜透性、膜脂质过氧化）和保护酶(SOD)活性角度，研究发菜对不同温度和盐碱条件产生的生理应激响应，揭示人工液体培养发菜细胞的生理特性，以期为发菜的人工大规模培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 发菜培养和处理

发状念珠蓝细菌（*Nostoc flagelliforme*）采集于宁夏银川贺兰山东麓，天津科技大学工业微生物教育部重点实验室分离、纯化、提供。发菜经活化后，于生化培养箱中在25 ℃和80 μmol/(m^2 s)光照强度条件下进行静止培养，培养20 d后，4000 r/min离心10 min，然后收集细胞悬浮于新鲜无菌的BG-11（不含$NaNO_3$）培养基中。

取处于对数生长期的发菜细胞各5 mL，分别接种到装有100 mL BG-11（不含$NaNO_3$）培养基的三角瓶内，培养基中含有按含体积比1:1混合的NaCl和Na_2CO_3（0、60、120、180、240 mmoL/L），分别置于25、35和45 ℃的光照培养箱中，80 μmol/(m^2 s)光照强度下静置培养，培养8、12、16和24 h时进行测定，以25 ℃处理作为对照，每种处理做3组平行。

1.2 生长量的测定

细胞生物量：干重法，取50 mL混合均匀的发酵液，转入离心杯中，4000 r/min离心10 min，到出上清液，细胞转移到已烘至恒重的干燥器中，80 ℃烘至恒重。

1.3 质膜透性测定

不同处理的发菜细胞离心后，各称取鲜藻泥2 g，放入烧杯中，加20 mL去离子水，25 ℃下静置10 h。用玻璃棒轻轻搅拌均匀，恒温下用电导仪测定溶液电导率。再将试管放入100 ℃沸水中恒温水浴15 min，待其冷却至25 ℃时，恒温测定煮沸液电导率。根据下述公式计算质膜透性（以电解质相对渗透率表示）：

电解质相对渗透率/%=（处理液电导率值/煮沸液电导率值）×100%

1.4 丙二醛（MDA）含量测定

取0.5 g发菜细胞加5 mL 50 mmol/L（pH 7.8）磷酸缓冲液，冰浴上研磨匀浆，4000 r/min离心10min，取上清液1 mL加2.5 mL 0.6% TBA（硫代巴比妥酸）溶液混匀，加塞，沸水水浴反应15 min，迅速冷却后离心，取上清液，在波长450、532、600 nm处测定吸光度，根据下述公式进行计算：

$$\text{MDA浓度C}(\mu mol/L)=6.45(A_{532}-A_{600})-0.56A_{450}$$

1.5 超氧化物歧化酶（SOD）活性测定

取0.5 g发菜细胞加5 mL 50 mmol/L（pH 7.8）磷酸缓冲液，冰浴上研磨匀浆，10000 r/min 4 ℃离心10 min，上清液即为酶提取液，-20 ℃保存。取透明度高且均一的试管，按表1加入各溶液组分。

表1 SOD反应液

Table 1 Composition of the SOD reaction mixture

Reagent	Volume /mL	Last concentration
0.05 mol/L Phosphate buffer	1.5	
130 mmol/L Met	0.3	13 mmol/L
750 μmol/L NBT	0.3	75 μmol/L
100 μmol/L EDTA-Na_2	0.3	10 μmol/L
20 μmol/L Riboflavin	0.3	2.0 μmol/L
Enzyme	0.05 (Buffer in control test tube)	
Distilled water	0.25	
Total volume	3.0	

混匀后将2支对照管置暗处做空白对照，其余各管于80 μmol/m^2/s光下反应25 min，反应结束后，以不照光的对照管为空白，560 nm下测定*OD*值。SOD酶活性以抑制NBT光化学反应的50%为一个酶活性单位（U），计算SOD酶活性。

1.6 脯氨酸（Pro）含量测定

准确称取离心后的发菜细胞0.5 g，加5 mL 3%的磺基水杨酸，匀浆后放入具塞试管里，沸水水浴10 min；不断振荡摇动，冷却，4000 r/min离心10 min，上清液即为提取的脯氨酸溶液。取2 mL提取液加入2 mL 冰乙酸和4 mL 酸性茚三酮，沸水浴60 min，冷却后加入4 mL甲苯，振荡30 s，静止片刻，吸取上层红色甲苯溶液于比色杯中，以甲苯为空白对照，测OD_{520}值。

1.7 可溶性蛋白含量测定

取上述SOD提取液1 mL加5 mL考马斯亮兰，摇匀，放置2 min后，以蒸馏水做空白，595 nm比色，测定OD_{595}。

1.8 可溶性糖含量测定

称取不同处理的发菜细胞 0.5 g 加 5 mL 10% TCA 匀浆后浸泡，离心，取上清液 1 mL 加 5 mL 蒽酮，沸水中煮 10 min，流水冷却，冷却后在室温下静止 10 min，以 80%乙醇调零，测定 626 nm 波长处的吸光度。

1.9 统计分析

试验数据用平均值±标准差（$\bar{x} \pm SD$）表示，用 Origin 8.0 进行数据作图。

2 结果与分析

2.1 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞生长的影响

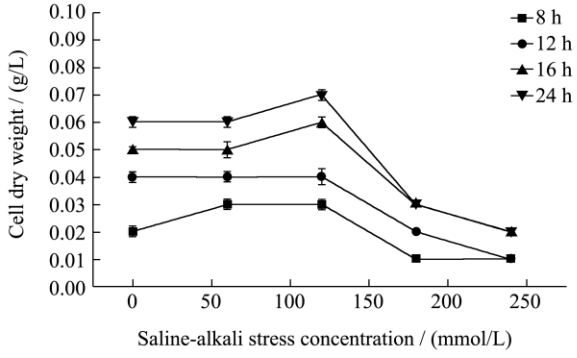


图 1 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞生长的影响

Fig.1 Effect of salinity-alkalinity on the growth of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

由图 1 和 2 可以看出，与对照相比，在 35 ℃和 45 ℃温度及盐碱处理下，发菜细胞生长量降低，但差异不显著。当盐碱浓度增加到 180 mmoL/L 时，与对照相比，在两种处理温度下，发菜细胞生长量均显著降低。袁南南等[9]研究发现，过量碱伤害细胞内部结构，抑制光合作用，抑制细胞生长，与本实验研究结果一致。

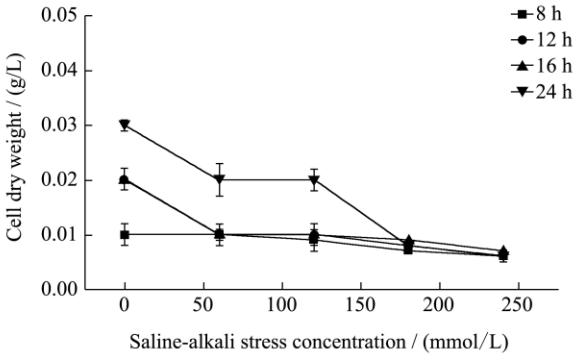


图 2 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞生长的影响

Fig.2 Effect of salinity-alkalinity on the growth of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

2.2 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞膜透性的影响

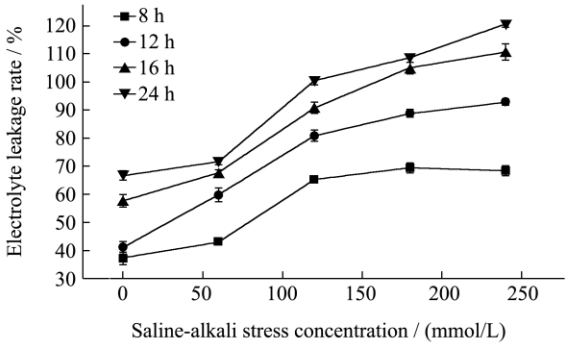


图 3 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞质膜透性的影响

Fig.3 Effect of salinity-alkalinity on the plasmalemma permeability of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

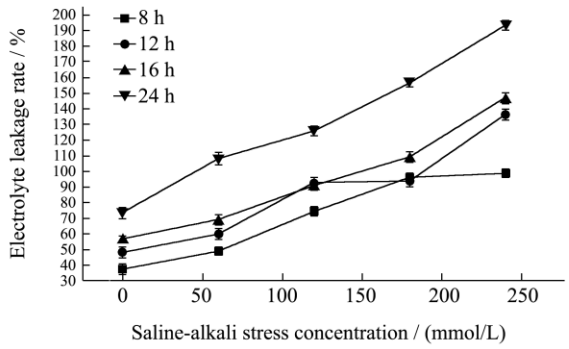


图 4 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞质膜透性的影响

Fig.4 Effect of salinity-alkalinity on the plasmalemma permeability of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

细胞外渗率直接反映了质膜的受破坏程度，外渗率越高，膜透性越大，质膜受破坏的程度越严重。由图 3 和 4 可以看出，与对照相比，在 35 ℃和 45 ℃温度及盐碱处理下，发菜细胞的外渗率均显著增加，且在相同处理时间时，45 ℃的高渗与高温交叉处理的发菜细胞渗透率增加较之 35 ℃处理更迅速，实验条件下最大值达 193.2%，细胞膜遭受严重破坏。

2.3 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞 MDA 含量的影响

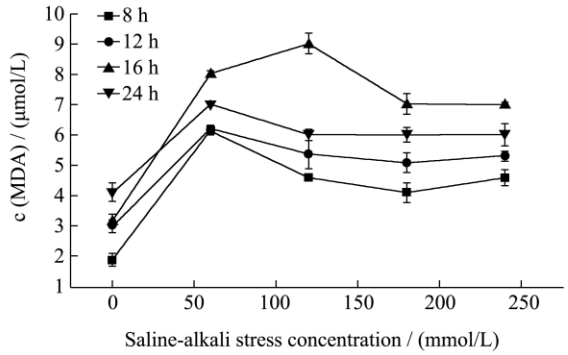


图 5 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞 MDA 含量的影响

Fig.5 Effect of salinity-alkalinity on the MDA content of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

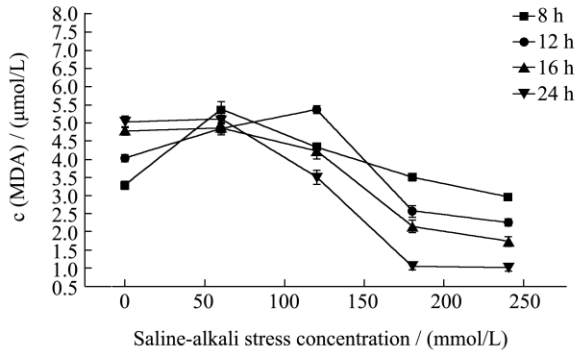


图 6 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞 MDA 含量的影响

Fig.6 Effect of salinity-alkalinity on the MDA content of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

丙二醛是脂质过氧化的主要产物之一，它可与细胞膜上的蛋白质、酶等结合或交联并使之失活，从而破坏生物膜的结构与功能。从图 5 和图 6 可以看出，在两种不同温度下，随着盐碱浓度增加，MDA 的含量短暂增加后下降，45 ℃温度下降速度更快，说明高温和盐碱交叉胁迫下积累的自由基引发了细胞膜脂过氧化作用，对细胞膜产生了一定的伤害作用，高温和高浓度盐碱可能导致发菜细胞膜破裂甚至死亡，这与盐胁迫下发状念珠藻的生理特性研究结果一致[10]。赵学敏[11]等研究发现发菜培养液中添加外源硝酸盐时，与对照相比，发菜细胞丙二醛含量显著降低，分析认为发菜固氮酶在有充足氮源时，该酶对盐胁迫不敏感。本研究表明，在高温和高盐碱浓度下，可能固氮酶活性受到影响较大，丙二醛含量增加，超过一定浓度后，发菜细胞正常生长受到较大影响，MDA 含量也随着降低。

2.4 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞 SOD 酶活性的影响

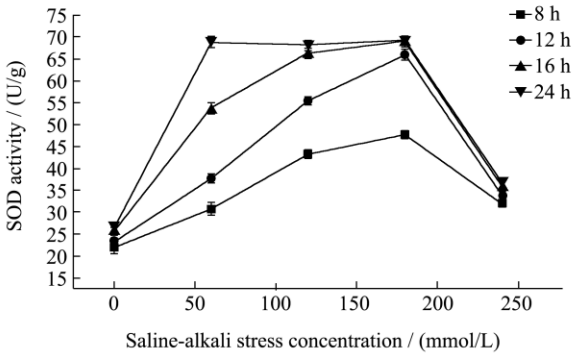


图 7 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞 SOD 活性的影响

Fig.7 Effect of salinity-alkalinity on the SOD activity of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

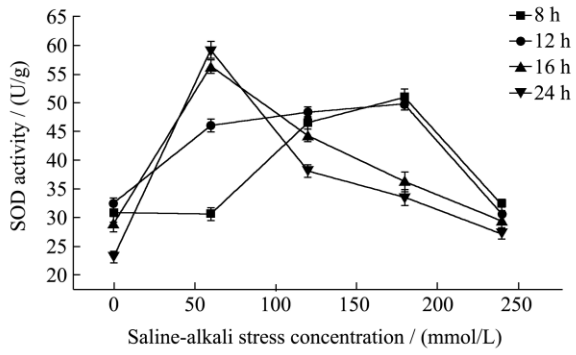


图 8 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞 SOD 活性的影响

Fig.8 Effect of salinity-alkalinity on the SOD activity of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

图 7 所示，随着盐碱浓度提高，发菜细胞 SOD 活性先上升后下降，在处理浓度为 180 mmol/L 时达到最大值。图 8 显示，与对照相比，在 45 ℃下，随盐碱处理浓度增加，SOD 活性增加不显著。对比图 7 和 8 可以发现，45 ℃高温盐碱处理下 SOD 活性相对较低，且在较低盐碱浓度下就开始出现下降趋势，表明发菜细胞受到的伤害更大，SOD 活性系统遭到破坏。SOD 能够有效的清除体内的超氧自由基，在多种环境胁迫中发挥重要的保护作用，蓝发菜细胞如螺旋藻[12]和盐生隐杆藻[13]进行盐胁迫处理后，SOD 活性均表现为处理前期增加，达到最大值后迅速下降。

2.5 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞 Pro 含量的影响

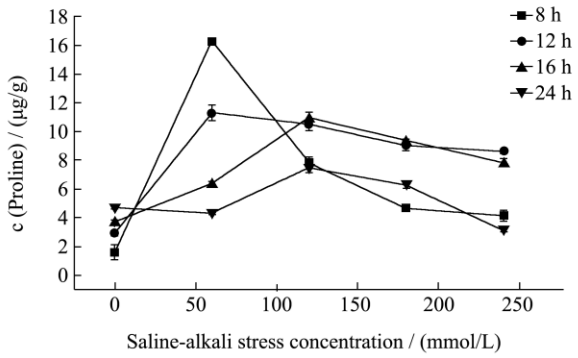


图 9 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞 Pro 含量的影响

Fig.9 Effect of salinity-alkalinity on the proline content of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

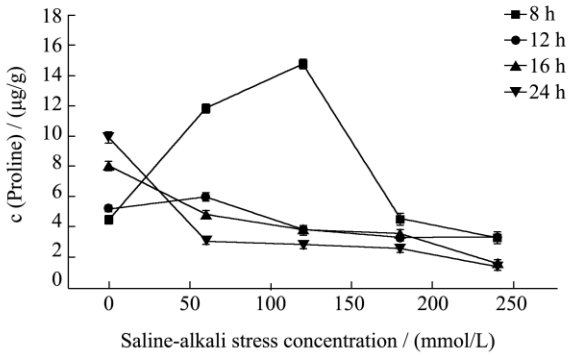


图 10 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞 Pro 含量的影响

Fig.10 Effect of salinity-alkalinity on the proline content of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

Pro 是生物体主要的渗透调剂物质之一。图 9 显示，随着盐碱浓度的提高，脯氨酸含量先增加后减少，盐碱浓度为 240 mmol/L 时，脯氨酸含量基本与对照持平；而 45 ℃处理 8 h 以后，脯氨酸含量开始呈逐渐下降的趋势，盐碱浓度增加到 60 mmol/L 时，脯氨酸含量开始低于对照水平，当处理浓度达最大时，脯氨酸含量相比对照下降 69.8%。

2.6 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞可溶性蛋白含量的影响

生物在逆境条件下通过增加可溶性蛋白合成，直接参与其适应逆境的过程，可溶性蛋白与细胞的渗透调节有关，高含量的可溶性蛋白可使细胞维持较低渗透势，抵抗渗透胁迫带来的伤害。在多种逆境条件下，生物体内正常的蛋白质合成受到抑制，但往往会有一些被诱导出的新蛋白出现使原有蛋白质的含量增加[14]。图 11 和图 12 表明，在 35 ℃和 45 ℃温度下，随着处理盐碱浓度的增加，发菜细胞可溶性蛋白含量先升高，然后基本维持稳定，始终高于同期对照；进一步比较 35、45 ℃盐碱处理下发菜细胞可溶性蛋白含量可以发现，45 ℃处理条件下的可溶性蛋白含量均低于 35 ℃。表明，在较低的温度下，可溶性蛋白在发菜细胞的高温盐碱交叉处理中起到更强的保护作用。在同一温度和盐碱浓度下，随着处理时间的延长，可溶性蛋白含量提高。

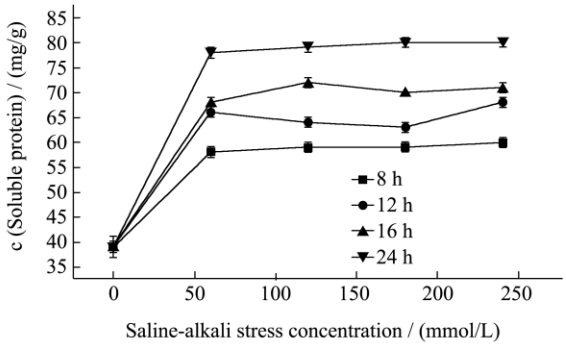


图 11 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞可溶性蛋白含量的影响

Fig.11 Effect of salinity-alkalinity on the soluble protein content of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

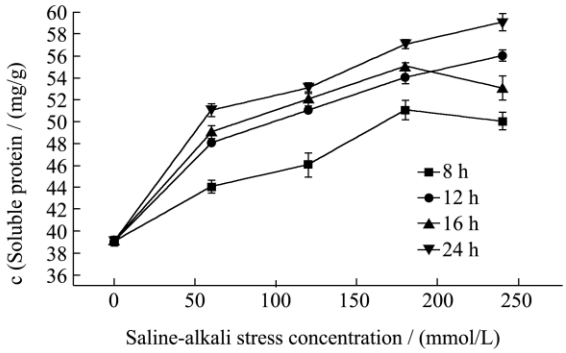


图 12 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞可溶性蛋白含量的影响

Fig.12 Effect of salinity-alkalinity on the soluble protein content of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

2.7 不同温度条件和盐碱处理对发菜细胞可溶性糖含量的影响

大量研究表明，可溶性糖是生物在逆境下的一种重要有机渗透调节物质，对细胞膜和原生质体有稳定作用，而且它还作为合成其它有机溶质的碳架和能量来源，在细胞内无机离子浓度过高时起保护酶类作用[15]，但也有研究认为可溶性糖是逆境条件下不稳定的调节剂[16]。图 13 所示，在 35 ℃培养温度下，随着盐碱浓度的增加，发菜细胞可溶性糖含量提高。而 45 培养温度下（图 14），在盐碱处理浓度为 0~120 mmol/L

时，随着盐碱浓度的增加，发菜细胞可溶性糖含量提高，当盐碱处理浓度大于 120 mmol/L 时，发菜细胞可溶性糖含量随着盐碱浓度的增加而降低。

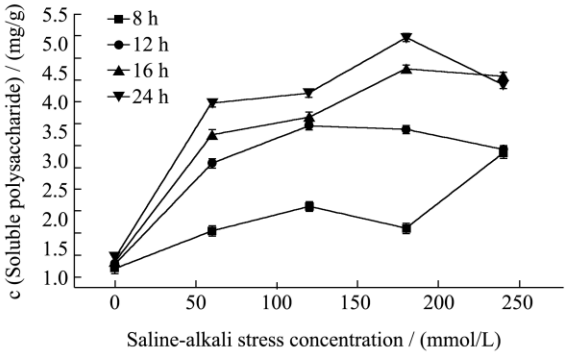


图 13 35 ℃下盐碱处理对发菜细胞可溶性糖含量的影响

Fig.13 Effect of salinity-alkalinity on the soluble polysaccharide content of *N. flagelliforme* cells at 35 ℃

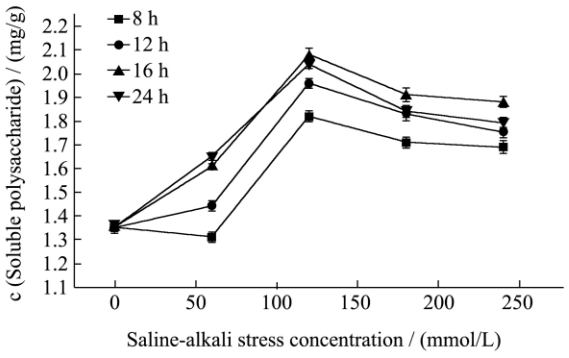


图 14 45 ℃下盐碱处理对发菜细胞可溶性糖含量的影响

Fig.14 Effect of salinity-alkalinity on the soluble polysaccharide content of *N. flagelliforme* cells at 45 ℃

3 结论

在温度和盐碱条件双重作用下，人工液体培养发菜产生了生理的应激响应，高温和高盐碱处理抑制了发菜生长，在发菜培养过程中，发菜细胞可溶性蛋白含量呈上升趋势，可溶性糖含量先上升后下降，可溶性蛋白和可溶性糖是发菜在逆境下的重要有机渗透调节物质。

参考文献

[1] Brüll L P, Huang Z, Thomas-oates J E, et al. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc (cyanobacteria)* with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides *Nostoc* commune [J]. Journal of Phycology, 2000, 36: 871-881

[2] Tester M, Davenport R. Na^+ tolerance and Na+ transport in higher plant [J]. Annals of Botany, 2003, 91(5): 503-527

[3] Gao X, Yang Y W, Ai Y F, et al. Quality evaluation of the edible blue-green alga *Nostoc* flagelliforme using a chlorophyll fluorescence parameter and several biochemical markers [J]. Food Chemistry, 2014(143): 307-312

[4] Gao K S, Ye C P. Culture of the terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme (Cyanophyceae)*, under aquatic conditions [J]. Journal of Phycology, 2003, 39: 617-623

[5] Chen X F, Jia S R, Wang Y, et al. Biological crust of Nostoc flagelliforme (cyanobacteria) on sand bed materials [J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23: 67-71

[6] Chen X F, Jia S R, Yue S J, et al. Effect of solid bed-materials on vegetative cells of *Nostoc* flagelliforme [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22: 341-347

[7] Ding Z, Jia S R, Han P P, et al. Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of Nostoc flagelliforme under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25: 1017-1021

[8] Gao K S, Yu A J. Influence of CO_2, light and watering on growth of *Nostoc* flagelliforme mats [J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12: 185-189

[9] 袁南南,贾士儒,戴玉杰,等.$NaHCO_3$ 对发状念珠蓝细菌光合作用及生长的影响[J].中国酿造,2012,31(1):34-36
YUAN Nan-nan, JIA Shi-ru, DAI Yu-jie, et al. Effect of $NaHCO_3$ on growth and photosynthesis of Nostoc flagelliforme cells [J]. China Brewong, 2012, 31(1): 34-36

[10] 贺韵雅,于海峰,杨蕾.盐胁迫下发状念珠藻膜脂的过氧化及抗氧化响应[J].青岛科技大学学报(自然科学版),2011, 32(6):626-629
HE Yun-ya, YU Hai-feng, YANG Lei. Assessment of salinity-induced lipid peroxidation and antioxidants of cyanobacterium Nostoc flagelliforme [J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2011, 32(6): 626-629

[11] 赵学敏,毕永红,秦山,等.发菜细胞培养物对盐胁迫的响应[J].西北植物学报,2005,25(11):2234-2239
ZHAO Xue-min, BI Yong-hong, QIN Shan, et al. The response of cultivated Nostoc flagelliforme to salt stress [J]. Acta Botanica Boreali-occidentlia Sinica, 2005, 25(11): 2234-2239

[12] 刘志礼,李鹏云.NaCl 胁迫对螺旋藻生长及抗氧化酶活性的影响[J].植物学通报,1998,15(3):43-47
LIU Zhi-li, LI Peng-yun. The effect of NaCl stress on the antioxidase activities and growth of *Spirulina* maxima [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1998, 15(3): 43-47

[13] 周亚维,焉婷婷,李朋富,等.盐度胁迫下盐生隐杆藻抗氧化防御系统的变化[J].海洋科学,2010,34(9):30-35
ZhOU Ya-wei, YAN Ting-ting, LI Peng-fu, et al. Changes in antioxidative defense systems of aphanothece halophytica in response to salt stresses [J]. Marine Sciences, 2010, 34(9): 30-35

[14] 李妮亚,高俊风,汪沛洪.小麦幼芽水分胁迫诱导蛋白的特征[J].植物生理学报,1998,24(1):65-71
LI Ni-ya, GAO Jun-feng, WANG Pei-hong. The characteristics of induced protein in shoots of wheat seedlings under water stress [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1998, 24(1): 65-71

[15] 赵文才,李慧,赵会杰,等.外源腐胺对干旱胁迫下小麦叶片渗透调节的影响[J].中国农学通报,2009,25(9):148-151
ZHAO Wen-cai, LI Hui, ZHAO Hui-jie, et al. Effects of exogenous polyamine osmotica regulation in wheat seedling leaves under drought stress [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(9): 148-151

[16] 杨佳明,赵兴华,屈连伟,等.花卉抗寒性研究进展[J].黑龙江农业科学,2009,5:160-162
YANG Jia-ming, ZHAO Xing-hua, QU Lian-wei, et al. Research progress in flower cold resistance [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2009, 5: 160-162

现代食品科技