

DOI: 10.13376/j.cblls/2019043

文章编号: 1004-0374(2019)03-0296-14

碳酸酐酶在大型海洋褐藻获取与利用无机碳过程中的作用

毕燕会^{1,2}, 卫宁宁¹, 李佳莉¹, 王震¹, 许玲¹, 周志刚^{1,3*}

(1 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3 上海海洋大学海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

摘要: 与大型海洋红藻和绿藻相比, 褐藻的生产力最大。碳是构成生物质的主要元素, 它在海水中的主要存在形式是 HCO_3^- ; 而 HCO_3^- 如何进入褐藻细胞而被光合同化为生物质, 是人们一直在探讨的问题。综述了迄今为止有关褐藻对无机碳利用的研究结果, 指出由碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 介导的 HCO_3^- 应是褐藻从海水环境中获取无机碳的主要途径。鉴于微藻细胞内不同细胞器之间存在无机碳转运的事实, 褐藻 CA 在此过程中也起着不可忽视的作用。基于对不同褐藻 CA 活性的检测结果推测, CA 应分布于细胞的不同部位, 至少存在于胞内和周质空间中, 以应对细胞内外环境的变化。对不同亚型的 CA 在褐藻细胞乃至组织中时空分布格局的研究, 是探讨褐藻细胞如何获取并高效利用无机碳的关键。

关键词: 褐藻; CO_2 ; 海水; 重碳酸盐; 碳酸酐酶; CO_2 浓缩机制; 亚细胞定位

中图分类号: Q557; S968.421 **文献标志码:** A

The role of carbonic anhydrase in inorganic carbon acquisition and utilization by brown seaweeds

BI Yan-Hui^{1,2}, WEI Ning-Ning¹, LI Jia-Li¹, WANG Zhen¹, XU Ling¹, ZHOU Zhi-Gang^{1,3*}

(1 Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources of Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2 National Demonstration Center for the Experimental Teaching of Fisheries Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3 International Research Center for Marine Biosciences of Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In comparison with red and green macroalgae, brown one has the largest biomass per unit area. Carbon is the main element of biomass. How inorganic carbon enters brown macroalgal cells and consequently is used for fixation by photosynthesis is an open problem that we want to know. Up to date, a large amount of investigations on the utilization of inorganic carbon by brown macroalgae have shown that HCO_3^- mediated by carbonic anhydrase (CA) should be the main way for brown macroalgae to obtain inorganic carbon from marine environment. The fact that inorganic carbon can be interconverted and transported through the organelle membrane in microalgae cells suggested that brown macroalgal CA might play an important role in this process. The detected CA activity in different brown macroalgae suggested that CA should be distributed in different compartments of the cell, at least in the intracellular and periplasmic spaces, thus in response to the intracellular and intercellular changes. At last, it was pointed out that the spatial and temporal distribution pattern of CA in brown macroalgal cells and tissues was the key to explore how to obtain and utilize inorganic carbon efficiently by brown seaweeds.

Key words: brown macroalgae; CO_2 ; seawater; bicarbonate; carbonic anhydrase; CO_2 concentrating mechanism; subcellular localization

收稿日期: 2018-11-02; 修回日期: 2018-12-18

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0901500); 国家自然科学基金项目(41376136); 国家“双一流”水产学科

*通信作者: E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

据估算, 每年大约有 2.0 Gt (2.0×10^{15} g) 的碳库存到海洋中^[1], 从而预示着海水是巨大的碳库。海水中的溶解性无机碳 (Ci) 浓度约为 2.2 mmol/L, 这些 Ci 包括 H_2CO_3 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 和 CO_2 等 4 种形式。在 pH = 8.2 及海水盐度为 35 的自然条件下, 当海水的溶解性 Ci 达到平衡时, 通过计算可知, $[\text{HCO}_3^-] = 1.889$ mmol/L, 占溶解性 Ci 浓度的 85.86%; $[\text{CO}_3^{2-}] = 0.299$ mmol/L, 占 13.59%; 而溶解的 CO_2 只有 0.012 mmol/L, 接近大气中的 CO_2 浓度 (0.015 mmol/L), 不足海水溶解性 Ci 浓度的 1%^[1]。这些数据表明, HCO_3^- 是海水溶解性 Ci 的最主要形式。已知碳是生物体最重要的元素, 它占植物体干重的 45%^[2], 其中至少 95% 的碳都是借助光合色素吸收的光能对 CO_2 进行光合碳还原反应而固定的^[3]。因此, 从碳源丰度来看, 生活在海水环境中的藻类若能够吸收并利用 HCO_3^- , 显然具有巨大的竞争优势^[4]。

1 CO_2 应是褐藻细胞的首选碳源

CO_2 可以通过扩散进出磷脂双分子层的细胞膜, 或借助水孔蛋白^[5] 跨过细胞膜进入细胞, 因所需能量少^[6-7], 从生物经济学的角度及光合碳固定酶所需的反应底物来分析, CO_2 应是褐藻生长的首选碳源。因而, 沟鹿角菜 (*Pelvetia canaliculata*)、瘤状囊叶藻 (*Ascophyllum nodosum*)、海黍子 (*Sargassum muticum*)、糖海带 (*Saccharina latissima*) 等 4 种受试褐藻的藻体所吸收的 CO_2 , 能够随着环境 CO_2 的浓度的增加而显著地增加^[8]。

通过海水 pH 的检测及红外交换气体分析, Jolliffe 和 Tregunna^[9] 推测 *Desmarestia munda* (一种酸藻) 可能只利用 CO_2 作为光合作用的底物; 但在同一属的刺酸藻 (*D. aculeata*) 中, Larsson 和 Axelsson^[10] 发现该藻的净光合作用速率在乙酰唑胺 (AZ)——一种胞外碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 抑制剂的作用下降低了 84%, 表明该藻胞外 CA 在无机碳的光合利用中起着重要作用。

当用 AZ 及阴离子通道蛋白抑制剂 4',4'-二巯代氰酸根合芪 -2,2'-二磺酸 (DIDS) 和 4-乙酰氨基 -4'-巯代氰酸 -2,2'-合芪 -二磺酸酯 (SITS) 等分别处理海带 (*Saccharina japonica*) 雌配子体, 岳国峰等^[11] 发现, 它们对配子体无机碳的利用能力均没有产生影响, 说明海带配子体只以海水中存在的游离 CO_2 为碳源, 预示着在大量培养配子体时,

需通空气以补充 CO_2 , 否则配子体极有可能会因碳限制而生长缓慢, 甚至停滞。

生长在潮间带的羊栖菜 (*Hizikia fusiforme*) 在干出并暴露于空中时, pH 达到 10, 这时干露的藻体还可以高效地进行光合作用, 甚至比浸在海水中的光合作用还强得多, 说明它可以利用空气中的 CO_2 ^[12]。同样的情况也出现在二列墨角藻 (*Fucus distichus*)^[13] 和齿缘墨角藻 (*F. serratus*)^[14] 等褐藻中。

迄今为止, 只利用海水中游离的 CO_2 作为唯一碳源的藻类主要集中报道在某些陆生绿藻和少数真红藻类 (florideophyte) 的大型红藻中。Raven 等^[15] 认为它们可能因某些不清楚的环境因素而失去了 CO_2 浓缩机制 (CO_2 concentrating mechanism, CCM) 的能力。2016 年, 在 106 种海藻藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 值的检测基础上, Cornwall 等^[7] 认为若 $\delta^{13}\text{C}$ 的偏差小于 -29‰, 该藻就存在 CCM; 当用这个标准来衡量时, 隶属于褐藻门 (Phaeophyta) 毛头藻目 (Sporochnales) 的 *Perithalia caudata*、*Sporochmus comosus* 和 *Bellotia eriphorum* 等 3 个物种则被认为不具有 CCM 的能力。鉴于环境, 如光线可能会影响藻体 CCM 的能力^[7], 因此, 有关这些褐藻以及海带配子体是否一定以海水中存在的游离 CO_2 为唯一碳源, 可能需要通过多方面研究以进一步证实。

2 大多数褐藻能将海水中的 HCO_3^- 作为碳源

可用 3 种方法来判断藻体能否吸收 HCO_3^- : 其一是利用 ^{13}C - ^{12}C 同位素示差法^[16], 虽然该方法的结果比较可靠, 但因需要专用设备, 目前并不常用; 其二 (利用 pH 漂移技术) 和其三 (检测藻体在 pH 大于 9 时的光合作用) 的原理差不多, 即当 pH 接近 9.0 时, 海水中的 CO_2 浓度接近 0, 若藻体只吸收水中的 CO_2 , 则海水的 pH 不会因碳的利用而进一步升高, 以达到 pH 或 Ci 的补偿点, 因此, 可利用 pH 漂移技术或检测藻体在 pH 大于 9 时是否进行光合作用来判断它们能否吸收 HCO_3^- 。其中, pH 漂移技术因操作简单而常用^[17-19], 尽管利用该技术所获得数据的可靠性还存在疑问。

Jolliffe 和 Tregunna^[9] 通过海水 pH 的检测及红外交换气体分析, 发现除 *D. munda* (褐藻门的一种酸藻) 和 *Porphyra schizophyllia* (红藻门的一种紫菜) 外, *Alaria* sp. (一种翅藻)、多肋藻 (*Costaria costata*)、*Fucus* sp. (一种墨角藻)、糖海带、腔囊藻 (*Nereocystis luetkeana*) 等褐藻及缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*)、

Ulva sp. (一种石莼) 等绿藻 (这2种隶属绿藻门) 都可以吸收利用 HCO_3^- 。

通过光合作用的检测, Sand-Jensen 和 Gordon^[20] 得出墨角藻 (*F. vesiculosus*) 及其他受检的2种红藻和3种绿藻都可以利用 HCO_3^- 这个结论, 并发现石莼 (*U. lactuca*) 和 *Enteromorpha* sp. (一种浒苔) 在 $\text{pH} = 10.5$ 时仍具有光合活性。在瘤状囊叶藻、齿缘墨角藻 (*F. serratus*)、墨角藻、掌状海带 (*Laminaria digitata*) 和 *L. longicuris* (一种海带) 等5种受试的褐藻及其他3种绿藻和6种红藻中, 通过气体交换分析, Bidwell 和 McLachlan^[14] 发现, 它们吸收的 Ci 常常是海水中的 HCO_3^- 而非 CO_2 。Cook 等^[21] 在比较不同海藻光合作用放氧速率后认为, 二列墨角藻 (*F. distichus*) 和小拟鹿角菜 (*Pelvetiopsis limitata*) 及其他受试的15种红藻都具有吸收 HCO_3^- 能力, 尽管在这些藻体中都没有检测到胞外 CA 的活性。通过对墨角藻目及海带目等10种褐藻在高 pH (9.4) 时的光合放氧速率进行比较后, Surif 和 Raven^[22] 发现, 它们均具有或高或低的放氧活性, 因而认为它们具有吸收 HCO_3^- 的能力; 不过墨角藻目6个物种在高 pH 时的放氧速率显著高于海带目 (除翅藻外), 且前者具有低的 CO_2 浓度补偿点, 表明墨角藻目物种对 HCO_3^- 的利用能力更强。

利用 pH 漂移技术对35种大型海藻进行检测, Maberly^[17] 发现, 除6种红藻外, 其他包括水云目、墨角藻目、海带目等12种褐藻在内的29种海藻均具有吸收利用 HCO_3^- 的能力。 HCO_3^- 的利用能力可能与它们所处的栖息地有关: 在不能吸收 HCO_3^- 的6种红藻中, 有5种是生活在被褐藻所遮盖的低光照强度水域, 它们没有一种是生活在无机碳易于耗尽的石沼 (rockpool) 中^[17]。在潮间带生长的螺旋墨角藻 (*F. spiralis*)、囊藻 (*Colpomenia sinuosa*)、网地藻 (*Dictyota dichotoma*)、囊链藻 (*Cystoseira tamariscifolia*) 和粉团扇藻 (*Padina pavonia*) 及其他5种红藻和6种绿藻的实验中, 通过提高 pH 抑制光合作用及光合放氧与 Ci 浓度关系的分析, Mercado 等^[23] 了解到在褐藻中, 螺旋墨角藻和囊藻吸收 HCO_3^- 的能力较强; 生活在高潮间带或石沼中的海藻, 吸收 HCO_3^- 的效率最高。在受检的11种褐藻 (表1)^[10,24-36]、13种绿藻和5种红藻中, 通过在培养基中添加 AZ 并检测这些藻体在高 pH 值情况下的光合作用, Larsson 和 Axelsson^[10] 了解到除了掌形藻 (*Palmaria palmata*) 外, 其他的海藻都能借助胞外 CA 吸收利用海水的

HCO_3^- 。

上述这些调查数据显示, 除了把 CO_2 作为首选碳源外, 绝大多数褐藻还可以吸收并利用海水中的 HCO_3^- 。正如本文开始所指出的, 由于受到海水中 CO_2 浓度的限制, 为了生存, 这些褐藻在长期的适应性进化过程中, 发展了能吸收并利用 HCO_3^- 的策略。

3 褐藻细胞获取 HCO_3^- 的策略

一般来说, 可利用 DIDS 及 SITS 等阴离子通道蛋白抑制剂^[37]、磺胺和 AZ 等 CA 抑制剂^[38]、钒酸盐等质膜型 H^+ -ATP 酶抑制剂^[39] 来处理海藻样品, 然后再检测这些样品的光合作用速率、碳吸收量或放氧量以及培养基 pH 值等来判断它们采用什么策略来吸收海水中的 HCO_3^- 。迄今为止, 大型褐藻细胞获得 HCO_3^- 的策略至少存在3条途径 (表1)^[31]。

3.1 通过阴离子通道蛋白直接吸收 HCO_3^-

Larsson 和 Axelsson^[10] 利用 DIDS 处理11种褐藻 (表1)、13种绿藻和5种红藻, 结果显示, 无论是受检的红藻还是褐藻, 在 AZ 存在的情况下 (需用 AZ 对藻体进行预先处理才能确信结果不是由胞外 CA 活动产生的), 这些藻体的光合作用都表现出对 DIDS 不敏感, 即这些褐藻不像某些绿藻那样存在利用阴离子通道蛋白直接吸收 HCO_3^- 的机制。当利用 DIDS 及 SITS 来同样处理海带幼孢子体时, 岳国峰等^[33] 发现这些离子通道抑制剂并不影响海带孢子体的无机碳利用。在羊栖菜^[26]、鹅肠菜 (*Endarachne binghamiae*)^[36] 及亨氏马尾藻 (*Sargassum henslowianum*)^[27] 等褐藻中也发现类似海带的结果。在长囊水云 (*Ectocarpus siliculosus*) 中, 红光饱和的光合作用会被蓝光激发而升高, 这种情况在 $\text{pH}=9.5$ 时也是如此; 由此, Schmid^[24] 推测长囊水云具有直接吸收 HCO_3^- 的能力。值得注意的是, 在另一种水云 (*Ectocarpus* sp.) 中, Larsson 和 Axelsson^[10] 利用 DIDS 来处理, 发现该藻并不具备直接吸收碳酸氢盐的能力。在掌状海带和糖海带中, Larsson 和 Axelsson^[10] 也没有发现它们具有直接吸收碳酸氢盐的能力; 但 Klenell 等^[29] 报道认为, 当用 DIDS 处理这2种藻体, 它们的 pH 补偿点将下降0.2个单位, 因而推测它们可直接吸收 HCO_3^- , 但只是在特殊情况, 如高 pH 条件下。在裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 中, DIDS 及 SITS 均可抑制配子体而不是孢子体的光合作用, 说

表1 部分大型褐藻获取HCO₃⁻的策略

物种	阴离子交换蛋白	胞外CA	质膜型H ⁺ -ATP酶	参考文献
酸藻目(Desmarestiales)				
刺酸藻(<i>Desmarestia aculeata</i>)	-	+	ND	[10]
水云目(Ectocarpales)				
长囊水云(<i>Ectocarpus siliculosus</i>)	+	+	ND	[24]
<i>Ectocarpus</i> sp.	-	+	ND	[10]
墨角藻目(Fucales)				
瘤状囊叶藻(<i>Ascophyllum nodosum</i>)	-	+	ND	[10]
齿缘墨角藻(<i>Fucus serratus</i>)	ND	+	ND	[25]
	ND	+	ND	[10]
螺旋墨角藻(<i>F. spiralis</i>)	-	+	ND	[10]
角长角藻(<i>Halidrys siliquosa</i>)	-	+	ND	[10]
羊栖菜(<i>Hizikia fusiforme</i>)	-	+	ND	[26]
亨氏马尾藻(<i>Sargassum henslowianum</i>)	-	+	±	[27]
海黍子(<i>S. muticum</i>)	-	+	ND	[10]
海带目(Laminariales)				
绳藻(<i>Chorda filum</i>)	-	+	ND	[10]
掌状海带(<i>Laminaria digitata</i>)	-	+	ND	[10]
	ND	+	+	[28]
	+	+	+	[29]
	ND	+	ND	[30]
<i>L. ochroleuca</i>	ND	+	ND	[30]
巨藻(<i>Macrocystis pyrifera</i>)	+	+	ND	[31]
<i>Phyllariopsis brevipes</i>	ND	+	ND	[30]
<i>P. purpurascens</i>	ND	+	ND	[32]
	ND	+	ND	[30]
海带(<i>Saccharina japonica</i>)	-	+	ND	[33]
糖海带(<i>S. latissima</i>)	ND	+	ND	[25]
	-	+	ND	[10]
	-	+	+	[34]
	+	+	+	[29]
<i>Saccorhiza polysiches</i>	ND	+	ND	[30]
裙带菜(<i>Undaria pinnatifida</i>)	+	+	ND	[35]
黑顶藻目(Sphacelariales)				
<i>Sphacelaria cirrosa</i>	-	+	ND	[10]
荳藻目(Scytosiphonales)				
鹅肠菜(<i>Endarachne binghamiae</i>)	-	+	+	[36]

“+”代表存在; “-”代表不存在; “±”代表不确定; ND (not determined), 待定。

明配子体可直接吸收利用 HCO₃⁻, 但以基于胞外 CA 催化吸收 HCO₃⁻ 的形式为主^[35]。利用 DIDS 处理巨藻 (*Macrocystis pyrifera*) 后, Fernández 等^[31] 发现, 巨藻的光合速率下降了 55%~65%, 表明这种褐藻主要是通过阴离子通道蛋白吸收 HCO₃⁻。总之, 利用阴离子通道蛋白直接吸收 HCO₃⁻ 的褐藻种类没有像绿藻那样普遍。

3.2 借助胞外CA

借助胞外 CA, 将海水中的 HCO₃⁻ 脱水成 CO₂,

后者可以经扩散或通过水孔蛋白穿过细胞膜进入胞质。这条途径在多数褐藻中都具有^[40-43](表 1), 海带也不例外。当用难以渗透到细胞内的 CA 抑制剂 AZ 处理海带孢子体时, 岳国峰等^[33] 发现 75% 无机碳的利用被抑制; 在游离 CO₂ 浓度接近于零, 即当 pH = 9.1 时, 幼孢子体的全部无机碳源均来自 HCO₃⁻ 脱水后形成的 CO₂。由此可以认为, 海带同时具有利用海水中游离 CO₂ 以及 HCO₃⁻ 的能力, 但以后者的吸收利用为主, 特别在高 pH 条件下, 几

乎都是借助胞外 CA 来达到利用 HCO_3^- 的目的。

3.3 质子泵即 H^+ -ATP酶协助CA

在糖海带^[34]、掌状海带^[28]等褐藻的细胞质膜上存在质子泵,即 H^+ -ATP 酶,它向胞外分泌 H^+ 以形成质子动力势,并使局部空间发生酸化,有利于加快胞外 CA 将 HCO_3^- 脱水成 CO_2 ,从而主动吸收 HCO_3^- 或 CO_2 。利用 H^+ -ATP 酶抑制剂硫酸盐处理鹅肠菜, Zou 和 Gao^[36] 发现该藻的光合放氧速率被抑制 26.7%,说明 H^+ -ATP 酶增加了鹅肠菜的光合作用。当利用质子缓冲剂 Tris 碱来处理亨氏马尾藻时,在 $\text{pH} = 8.1$ 时,亨氏马尾藻的净光合放氧速率没有明显的影响;但在 $\text{pH} = 9.0$ 时,当 Tris 的浓度达到 40 mmol/L 时,该藻的净光合放氧速率被抑制 80%^[27]。这些结果表明,亨氏马尾藻能借助质子泵或电子传递链将质子转运至膜的外侧,便于在高 pH 条件下自外界获得无机碳。

通过上述 3 个策略的比较可知,基于胞外 CA 来吸收利用海水中的 HCO_3^- 应是绝大多数褐藻所具备的能力(表 1),这也预示着 CA 在褐藻光合作用中起着重要的作用。

4 无机碳在褐藻细胞内转运

进入细胞质中的 CO_2 因膜的通透性,很容易再扩散到细胞外面,从而发生 CO_2 泄漏。为了避免这种现象,聪明的细胞又发展了新的策略。例如,利用蓝藻细胞的羧酶体(carboxysome)^[44]或绿藻的蛋白核(pyrenoid)^[45]在质体中浓缩 CO_2 ,这在单细胞的蓝藻和绿藻的模式生物中了解得非常清楚^[42]。但在褐藻中, Mercado 等^[46]认为可能在细胞质中进行 CO_2 的浓缩,不过确凿的证据还有待提供。

4.1 胞质中的Ci

借助在糖海带^[47]、海带^[48]等褐藻中早已得到证实的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK),通过在磷酸烯醇式丙酮酸上进行 β -羧化反应将细胞吸收的或呼吸释放的 CO_2 固定以形成草酰乙酸(OAA),同时产生 ATP;所产生的 OAA 可经脱氢反应快速转变成苹果酸或者通过转氨作用生成天冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸等物质而直接用于藻体生长^[49];产生的苹果酸也可能沿着类似高等植物的景天科酸代谢(CAM)途径贮存于液泡,与其他酸性物质一起使液泡保持酸性($\text{pH} = 5.5$)环境。例如,将墨角藻放在没有 CO_2 的空间中,它仍然能利用藻细胞中储存的碳进行光合作用,但 2 h 后就停止;若在该空

间中补充 CO_2 ,又可以使藻体储存可供光合作用需要的碳,但这种现象只出现在 CAM 的植物中^[50]。当用蓝光照射时,正如 Schmid 和 Dring^[51]所提出的,这些贮存的苹果酸再脱羧产生 CO_2 ,用于不依赖光的碳还原反应,以进一步提高藻体的光合作用效率。

借助胞质 CA,将进入胞质中的 CO_2 尽快地转换成 HCO_3^- ,而后者难以通过扩散逃出细胞;所形成的 HCO_3^- 可以借助液泡膜上的阴离子通道在液泡膜型 H^+ -ATP 酶协助下进入液泡^[3],也可以在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)作用下,产生 OAA 等物质,沿着上文所述的途径进行;但 PEPC 在海带等褐藻中极少报道,不过在海带全长转录组高通量测序的数据库^[52]以及在长囊水云的基因组数据^[53]中,都搜索到 PEPC 基因的全长序列。显然,有关褐藻 PEPC 的研究有待完善。鉴于细胞质的 pH 稳定在 7.2 左右,进入细胞的 CO_2 不可能都以 HCO_3^- 的形式贮存于胞质中,否则 pH 就会高于此值。由此推测,这些胞质 CA 可能与 C4 途径或 CAM 途径(因 PEPC 和 PEPCK 是高等植物 C4 途径或 CAM 途径的重要组分)协同作用,才能使海带细胞质达到 Ci 的贮藏目的,但褐藻是否存在 C4 或 CAM 途径,需要继续探索。

当然,胞质中的 Ci 还有可能来自线粒体呼吸作用产生的 CO_2 ,尽管这些 Ci 对褐藻生物量的贡献为零,甚至为负值,因为这些 Ci 是由光合固碳产物的降解而产生的,但细胞如果能利用这些呼吸作用产生的 CO_2 ,显然有助于生物量的增加。在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的线粒体中已报道 2 个 β -CA 和 3 个 γ -CA,其中 2 个 β -CA(CAH4 和 CAH5)虽定位于线粒体上,但它们在低 CO_2 条件下培养的藻体蛋白中却检测不到^[45],而低 CO_2 培养条件可诱导这 2 个基因在莱茵衣藻的线粒体中表达。因此,线粒体 CA 有可能在低 CO_2 条件下,通过呼吸作用以氧化光合作用所固定的碳,再为细胞光合碳循环提供碳源,维持细胞的生理活动,以适应环境。尽管在褐藻细胞中没有这方面的研究报道,但根据目前的预测数据(具体内容参见下文“CA 在褐藻细胞中的分布”)可知,在海带和长囊水云的线粒体中应有 CA 的分布,但结果是否如预期的那样,有待于进一步佐证。

4.2 Ci 进入叶绿体

藻类细胞吸收并储存的 Ci 是用来为在卡尔文

循环中起关键作用的 RuBisCo 酶提供反应底物——CO₂。RuBisCo 酶位于叶绿体的基质中, 这意味着细胞质中的 Ci 还需要跨越褐藻细胞的叶绿体被膜, 才能被利用。Ci 跨越叶绿体被膜, 据推测可能有多条途径: 其一是 CO₂ 因膜的通透性, 像经过质膜一样, 被扩散到叶绿体的基质中; 其二是借助在褐藻细胞叶绿体被膜上可能存在的主动运输 HCO₃⁻ 通道, 如硅藻的溶质载体 4 (SLC4) 家族成员^[54], 将 HCO₃⁻ 泵入叶绿体。但从已报道的海带、长囊水云等物种的转录组、基因组文库中, 没有搜索到 SLC4 家族的同源基因, 尽管存在 SLC12、SLC44、SLC35 等成员。因此, 在褐藻细胞的叶绿体被膜及叶绿体内质网膜上是否存在直接运输 HCO₃⁻ 的 SLC4 等载体, 显然需要进一步探索。

扩散进入叶绿体基质的 CO₂ 若在 RuBisCo 附近, 就会被立即固定利用; 若进入的 CO₂ 来不及被利用, 在 pH=8.0 的基质中, 可能在基质 CA 的作用下快速以 HCO₃⁻ 的形式临时储存起来, 以避免泄漏。Ye 等^[55] 曾在海带配子体细胞的叶绿体中定位 1 个 α -CA, 但该 CA 与 RuBisCo 有何关系, 至今仍未知。在具有蛋白核的绿藻, 如莱茵衣藻^[45] 和硅藻, 如三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*)^[54] 中, 叶绿体中的蛋白核是 CO₂ 浓缩和固定利用的场所; 但在同样具有蛋白核的海洋硅藻——假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 中, 由于在蛋白核中没有发现 CA 的存在, 推测它存在着严重的 CO₂ 泄漏现象, 但实际上该藻的 CCM 仍发挥着有效的生理学作用^[56]。因此, Hopkinson 等^[54] 认为假微型海链藻细胞质中的 C4 酸化合物可能有助于 Ci 的浓缩。对于蛋白核存在仍有悬念的某些褐藻, 如海带来说, 由于它们与硅藻、真眼点藻类等皆是二次内吞红藻后所衍生的后代, 鉴于 PEPCK 等的存在, 它们可能是在细胞质中利用类似的 C4 或 CAM 途径进行 Ci 浓缩; 对于存在蛋白核的褐藻来说, 它们是在叶绿体还是在细胞质中进行 Ci 浓缩, 诸如此类问题都有待实验结果来阐明。

5 褐藻CA的研究历史与现状

碳酸酐酶 (CA, EC 4.2.1.1) 由 Meldrum 和 Roughton^[57] 于 1933 年在牛的红血细胞中发现的。CA 是一种含锌金属酶 (现虽然也发现了极少以钴离子或镉离子取代锌离子的 CA, 但绝大多数还是以锌离子作为金属配合物), 能够催化 CO₂ 的可逆水合反应,

实现 CO₂ 与 HCO₃⁻ 之间的快速转化^[44-45,54,58]。

在哺乳动物 CA 报道后的次年, Brinkman^[59] 就在报道中提及齿缘墨角藻精子的 CA, 但遗憾的是没有检测到它的活性。来自日本的 Ikemori 和 Nishida^[38] 首次对大型海藻 CA 进行了研究报道, 他们在孔石莼 (*Ulva pertusa*, 一种绿藻) 的细胞中检测到 CA 的活性, 并探讨了磺胺和 AZ 等抑制剂对 CA 活性的影响。

迄今为止, 对蓝藻^[44]、绿藻^[45]、硅藻^[54,58] 等微藻, 从 CA 活性检测、生理生化分析、基因克隆、亚细胞定位及功能分析等多方面开展了系统性的研究, 但有关褐藻 CA 的信息, 特别有关它们的分子生物学知识, 与微藻 CA 相比, 却显得十分单薄。

Bowes^[60] 对生长于美国加利福尼亚州圣地亚哥市 La Jolla 海域的 10 种海藻 (含 4 种红藻、4 种绿藻和 2 种褐藻) 进行 CA 总活性的检测, 结果显示这 10 种待检的物种都表现出 CA 活性。

Graham 和 Smillie^[61] 在来自澳大利亚大堡礁海域的 13 种绿藻、4 种褐藻及 7 种红藻中都检测到 CA 的总活性; 这 4 种褐藻分别是网地藻、细弱团扇藻 (*Padina tenuis*) 和 2 种马尾藻 (*Sargassum* spp.), 它们的 CA 活性为 368~1 100 个相对酶单位 (REU)/mg 叶绿素, 该值可与陆生植物的相当。

在来自加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华岛西海岸及新不伦瑞克省芬迪湾生长的二裂墨角藻和小拟鹿角菜等 2 种褐藻及 14 种红藻中, Cook 等^[21] 利用电位滴定法 (potentiometric assay) 没有检测到胞外 CA 的活性, 可能是由于方法的灵敏度不够。Surif 和 Raven^[22] 对来自苏格兰阿布罗斯隶属于墨角藻目和海带目的 10 种褐藻进行了检测, 结果 (表 2) 表明它们均具有胞内、外 CA 的活性; 其中, 瘤状囊叶藻、齿缘墨角藻、螺旋墨角藻、墨角藻、沟鹿角菜等墨角藻目物种的 CA 总活性 (系胞内、外之和) 比海带目的高, 但胞外 CA 活性占总活性的百分比比较低 (墨角藻目 5 物种的均值为 4.08%), 而金翅藻 (*Alaria esculenta*)、掌状海带、极北海带 (*Laminaria hyperborea*) 和糖海带等海带目 4 物种的胞外 CA 活性所占比例较高 (均值 35.5%), 这些结果可能与墨角藻目物种具有较强使用 HCO₃⁻ 的能力有关。Giordano 和 Maberly^[62] 对生长在苏格兰圣安德鲁海域 34 种海藻的调查显示, 瘤状囊叶藻、齿缘墨角藻、螺旋墨角藻、墨角藻、角长角藻、*Himantalia elongata*、沟鹿角菜等 7 种褐藻 (表 2)

表2 部分褐藻的胞外CA活性及其占总活性的百分比

物种	CA活性(相对酶单位/mg叶绿素 $a+c$ 或相对酶单位/g鲜重*)		胞外占总的百分比(%)	参考文献
	胞外	总的		
索藻目(Chordariales)				
鞭状索藻(<i>Chordaria flagelliformis</i>)	[14.7 ± 0.9](3~5)*	ND	ND	[63]
黏膜藻(<i>Leathesia difformis</i>)	[-3.9 ± 0.6](4)*	ND	ND	[62]
酸藻目(Desmarestiales)				
刺酸藻(<i>Desmarestia aculeata</i>)	[18.8 ± 2.19](3~5)*	ND	ND	[63]
网地藻目(Dictyotales)				
网地藻(<i>Dictyota dichotoma</i>)	[3.16 ± 2.37](4~5)*	ND	ND	[23]
墨角藻目(Fucales)				
瘤状囊叶藻(<i>Ascophyllum nodosum</i>)	[27.5 ± 5.0](5)	[979 ± 114](3)	2.9	[22]
	[6.3 ± 3.1](5)*	[828 ± 77](3)*	0.8	[62]
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	[1.85 ± 0.64](4-5)*	ND	ND	[23]
二列墨角藻(<i>Fucus distichus</i>)	[8.4 ± 3.1](3-5)*	ND	ND	[63]
齿缘墨角藻(<i>F. serratus</i>)	[26.0 ± 7.0](4)	[490 ± 193](4)	5.3	[22]
	[11.3 ± 2.5](6)*	[780 ± 28](3)*	1.5	[62]
螺旋墨角藻(<i>F. spiralis</i>)	[30.8 ± 6.0](4)	[1407 ± 267](3)	2.2	[22]
	[5.8 ± 5.7](3)*	[1233 ± 70](3)*	0.5	[62]
	[2.55 ± 1.3](4~5)*	ND	ND	[23]
墨角藻(<i>F. vesiculosus</i>)	[55.0 ± 10.0](3)	[765 ± 188](4)	7.2	[22]
	[11.5 ± 8.7](5)*	[3111 ± 675](3)*	0.4	[62]
角长角藻(<i>Halidrys siliquosa</i>)	[31.0 ± 4.0](4)	[114 ± 25](3)	27.0	[22]
	[2.0 ± 1.4](4)*	[73 ± 15](3)*	2.7	[62]
<i>Himanthalia elongata</i>	[10.6 ± 1.9](4)*	[181 ± 16](6)*	5.9	[62]
羊栖菜(<i>Hizikia fusiforme</i>)	[17.3 ± 3.3](6)*	[344.2 ± 95.9](6)*	5.0	[26]
	[9.7 ± 7.4](3)*	[41.8 ± 19.0](3)*	23.2	[64]
沟鹿角菜(<i>Pelvetia canaliculata</i>)	[21.0 ± 10.0](3)	[742 ± 202](3)	2.8	[22]
	[8.6 ± 2.2](3)*	[2828 ± 147](4)*	0.3	[62]
海带目(Laminariales)				
金翅藻(<i>Alaria esculenta</i>)	[95.0 ± 19.0](3)	[315 ± 126](4)	30.0	[22]
	[1.6 ± 2.3](5)*	[-88 ± 22](6)*	-	[62]
	[26.8 ± 1.3](3~5)*	ND	ND	[63]
绒绳藻(<i>Chorda tomentosa</i>)	[32.0 ± 5.2](3~5)*	ND	ND	[63]
掌状海带(<i>Laminaria digitata</i>)	[69.0 ± 8.0](3)	[229 ± 68](4)	30.0	[22]
	[0.2 ± 4.6](5)*	[62 ± 59](3)*	0.3	[62]
极北海带(<i>L. hyperborea</i>)	[65.0 ± 31.](3)	[334 ± 124](4)	20.0	[22]
	[0.1 ± 1.6](5)*	[-21 ± 69](4)*	-	[62]
<i>L. ochroleuca</i>	[1.7 ± 0.6](3)	[6.4 ± 1.1](3)	27.7	[30]
<i>L. solidungula</i>	[21.8 ± 0.6](3~5)*	ND	ND	[63]
巨藻(<i>Macrocystis pyrifera</i>)	[5.28 ± 2.04](4)*	[14.05 ± 3.46](4)*	37.58	[19]
<i>Phyllariopsis brevipes</i>	[2.9 ± 0.7](3)	[6.7 ± 0.9]	43.4	[30]
	[6.18 ± 1.23](5)*	ND	ND	[65]
<i>P. purpurascens</i>	[3.2 ± 0.7](6)*	[7.3 ± 0.8](6)*	43.8	[32]
	[3.0 ± 0.7](3)	[7.1 ± 1.0](3)	43.3	[30]
糖海带(<i>Saccharina latissima</i>)	[87.0 ± 22.0](3)	[141 ± 98](4)	62.0	[22]
	[3.1 ± 3.0](5)*	[57 ± 42](4)*	5.4	[62]
	[23.6 ± 0.8](3~5)*	ND	ND	[63]
<i>Saccorhiza polysiches</i>	[1.3 ± 0.7](3)	[7.5 ± 0.7](3)	16.5	[30]
裙带菜(<i>Undaria pinnatifida</i>)	[45.3 ± 6.7](5)	[215 ± 56](5)	21.1	[35]

表2 续

物种	CA活性(相对酶单位/mg叶绿素a+c 或相对酶单位/g鲜重*)		胞外占总的百分比(%)	参考文献
	胞外	总的		
萱藻目(Scytosiphonales)				
囊藻(<i>Colpomenia sinuosa</i>)	[0.28 ± 0.10](4~5)*	ND	ND	[23]
鹅肠菜(<i>Endarachne binghamiae</i>)	[15.8 ± 5.1](5)*	[135.4 ± 19.4](5)*	11.7	[36]
萱藻(<i>Scytosiphon lomentaria</i>)	[5.44 ± 1.02](5)*	ND	ND	[65]
	[14.4 ± 2.4](3~5)*	ND	ND	[63]
黑顶藻目(Sphacelariales)				
帚状海翼藻(<i>Halopteris scoparia</i>)	[0.15 ± 0.22](6)*	ND	ND	[65]
<i>Sphacelaria plumosa</i>	[25.1 ± 0.6](3~5)*	ND	ND	[63]

“-”代表不存在; ND (not determined), 待定; 括号内的数据系检测的样品数或重复实验数。

及 15 种红藻、3 种绿藻均可检测到 CA 的总活性; 若存在胞外 CA (10 种海藻有), 其活性平均值只占细胞 CA 总活性的 2.7%; 一般来说, 红藻 CA 的活性高于绿藻和褐藻; 在褐藻中, 墨角藻目的 CA 活性比较高; 有意思的是, 在海带目的掌状海带、极北海带和糖海带等物种中没有检测到 CA 活性。

对西班牙南部加迪斯市 Punta Carnero 海域生长的 5 种绿藻、6 种红藻和 5 种褐藻 CA 进行了检测, Mercado 等^[23]发现 12 种 (包含螺旋墨角藻、*Cystoseira tamariscifolia*、网地藻、囊藻等 4 种褐藻, 表 2) 具有胞外 CA 活性, 且它们的活性强弱与 AZ 的抑制率有很好的一致性。

Gordillo 等^[63]在来自挪威 Kongsfjord 极地海域生长的刺酸藻、萱藻、二列墨角藻、金翅藻、鞭状索藻 (*Chordaria flagelliformis*)、绒绳藻 (*Chorda tomentosa*)、*Laminaria solidungula*、糖海带、*Sphacelaria plumosa* 等 9 种褐藻 (表 2) 及 4 种绿藻和 8 种红藻中都检测到胞外 CA 的活性; 总的来说, 绿藻的活性最高, 褐藻次之, 红藻最低; 褐藻中的 CA 活性在 8.4~32 个 REU/g 鲜重之间。Huovinen 等^[66]在智利 Valdivia 海岸带生长的 6 种褐藻和其他 17 种海藻中检测到 CA 的总活性, 其中位于潮下带 (infralittoral zone) 的巨藻及 *Lessonia nigrescens* 的 CA 活性在受检的褐藻中最高。

6 大型褐藻CA活性的检测及影响因素

从表 2 所列举的数据中不难发现, 不同藻体, 其 CA 活性差异较大; 甚至同一种藻, 因采样时间、地点不同, 或者研究者所采用的检测方法不同, 其 CA 活性差异也很明显。因此为了便于比

较, 所采用的 CA 检测方法显然需要一致或者标准化。

有关 CA 活性的检测, 虽然有压力法、比色法^[67]、质谱法、同位素不平衡法^[16]、氧电极法^[65]等间接方法, 但由 Wilbur 和 Anderson^[67]所建立的 pH 电极法因简单、直接, 仍是大型海藻 CA 活性检测常用且是标准方法^[19]。该方法是基于当 HCO_3^- 脱水产生 CO_2 的时候, 也产生质子, 使反应液的 pH 下降; 若存在 CA 时, 因它能加速该脱水反应, 从而加快了 pH 的下降。

6.1 影响褐藻CA活性检测的因素

如果把自藻体中提取的粗酶液加至已纯化的牛血红细胞 CA 中再检测后者的活性, Giordano 和 Maberly^[62]发觉 3 种藻 (浒苔、墨角藻和 *Phycodryas rubens*) 的提取液对牛血红细胞 CA 活性都有一定的抑制作用。据此, 他们认为, 藻体 CA 活性的真实值在检测时有可能被低估。由此推测, 海藻藻体的细胞匀浆中可能存在一些不利于 CA 活性检测的物质, 因此, Bowes^[60]在检测爱氏藻 (*Eisenia arbotrea*) 和巨藻这 2 种褐藻的 CA 活性前先进行透析。

当用磷酸缓冲液提取藻体 CA 时, 检测的酶活性较低^[62]; Tris- 硼酸缓冲液是 Graham 和 Smillie^[61]在比较 3 种不同提取缓冲液后所推荐的。作为巯基保护剂的二硫苏糖醇 (DTT), 尽管 Bowes^[60]认为它对藻体 CA 的活性既不是必需, 也不会促进酶活性, 但它仍作为提取缓冲液的一个常见组分。

在螯合剂邻菲罗啉 (*O*-phenanthroline) 存在下, 大齿心藻 (*Serraticardia maxima*) CA 的锌 (作为辅因子) 在 pH = 5 时可以从酶蛋白中可逆地解离出来; 解离后, CA 活性立即丧失; 但在添加 Zn^{2+} 后, 它的活性几乎可以 100% 地恢复^[68]。因此, 在配制酶

的提取缓冲液时,应避免这种螯合剂的存在。

墨角藻藻体中提取的 CA 粗酶液,在 5 °C 避光存放至 4 d,其酶活性基本不变^[62],表现出良好的稳定性。

通过对巨藻酶提取缓冲液的组成、pH 等进行比较研究,Fernández 等^[19]发现 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.5) 以及添加聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、DTT 等成分有利于获得稳定、可重复的巨藻 CA 数据,因而他们建议,检测各种褐藻的 CA 活性时,都需要适当的优化。

6.2 环境因素对褐藻 CA 活性的影响

当增加周围环境的 CO₂ 分压 (自 400 μatm 升至 1 200 μatm) 以降低海水的 pH (自 8.0 降至 7.59) 来模拟未来的海洋酸化 (ocean acidification),以探讨它对巨藻的影响,对既可以利用 HCO₃⁻ 也可以利用 CO₂ 的巨藻来说,无论其光合作用速率还是生长速率,酸化处理均没有引起显著的变化;同时还发现,藻细胞内外的 CA 活性也没有受到影响^[69]。研究人员推测,伴随着海洋酸化过程,其他因素如变化的温度及海水中可利用营养盐,甚至这些因素的组合,可能会使藻类产生相应的生理学响应^[69]。

羊栖菜在高 CO₂ 浓度 (10 000 μL/L) 下,其 CA 活性只有低 CO₂ 浓度 (20 μL/L) 下的 40%^[26]。但在较高 CO₂ 浓度 (700 μL/L) 下,羊栖菜的光饱和和光合速率、表观光合效率、暗呼吸速率等与正常海水中生长的藻体相比,几乎没有改变;但羊栖菜的氮吸收平均速率及硝酸还原酶活性在高 CO₂ 浓度下均显著增加,说明羊栖菜的氮同化水平提高,以致增加了它的生物量 (鲜重) 和平均相对生长速率^[70]。

对来自智利南部 Valdivia 海岸带的 25 种海藻进行研究,它们的 CA 活性在 42~65 REU/g 鲜重之间;UV 射线 (100~400 nm) 对海藻 CA 活性的影响取决于藻种,与分类地位、形态及栖息地没有直接关系;一般来说,栖息于潮上带 (supralittoral zone) 的绿藻,其 CA 对 UV 射线相对敏感^[66]。UV-A 射线 (315~400 nm) 可刺激螺旋墨角藻的 CA 活性,增强其光合作用^[71]。

对北极生长的两种褐藻 (金翅藻和糖海带) 同时进行酸化和 UV 射线处理,Gordillo 等^[72]发现增加的 CO₂ 在短期内并不抑制这两种藻胞外 CA 的活性,但中长期会抑制,所以他们推测这是藻类光合作用对环境的适应结果,而非 CO₂ 的直接抑制。与金翅藻相比,糖海带同时进行酸化和 UV 射线处

理时,因较高的碳与氮同化效率以及光合作用中的电子传递速率,而受益颇丰^[72],这预示着糖海带可能是未来北极酸化环境的赢家。

蓝光 (blue light) 信号在转导的过程中,可能借助一个蛋白激酶,通过磷酸化作用激活质膜型 H⁺-APT 酶的活性,外排质子,使得周质空间局部酸化,促进胞外 CA 的催化效率,这样也就提高了掌状海带以及糖海带吸收无机碳的能力以增强光合效率^[28-29]。因此,糖海带 CCM 的关键组分被认为是在它的细胞膜上,而不是在叶绿体中^[46]。

若用氮 (10 μmol/L NO₃⁻)、磷 (1 μmol/L PO₄³⁻) 等富集的海水来培养 9 种褐藻,Gordillo 等^[46]发现它们的胞外 CA 活性都呈现下降的趋势,其中金翅藻、刺酸藻、糖海带及 *Laminaria solidungula* 等 4 种褐藻的 CA 活性显著下降。

上述这些结果显示,环境中的 CO₂、pH、蓝光、UV 射线、N 素营养等因素都可能会影响大型褐藻 CA 的活性;鉴于 CA 的功能,笔者认为 CO₂、pH 应是褐藻 CA 活性的主要因素;这些因素也可能是造成表 2 中同一物种 CA 活性的检测结果为何相差明显的原因,但其影响效果及机制都有待于深入探讨。

7 CA 在褐藻细胞中的分布

Haglund 等^[73]将细基江蓠 (*Gracilaria tenuistipitata*) 先进行匀浆,然后超速离心 (100 000 g) 并分别收集上清液的可溶性部分及沉淀,再将沉淀部分高速离心 (10 000 g),获得绿色沉淀部分 (含叶绿体膜) 及上清部分 (含质膜);对这 3 部分分别进行 CA 活性检测,结果显示它们均有 CA 活性;其中,可溶性部分的 CA 酶活性占总活性的 90%,质膜及叶绿体膜部分的 CA 活性分别只占 2.6% 和 1.3%。相似的结果也出现在 *Porphyra leucosticta* (一种紫菜) 中,但各部分酶活性的比例相应为 80%、9% 和 8%^[74]。在 *Gracilaria* sp. (一种江蓠) 中也发现类似的结果,但在肠浒苔中,相应的比例则分别为 32.7%、25.5% 和 20%^[75]。Gómez-Pinchetti 等^[76]在 *Soliera filiformis* (一种红翎藻) 中发现,上清液中的 CA 活性为 7 REU/mg 蛋白,而在它的沉淀中,CA 活性则为 117 REU/mg 蛋白。尽管褐藻 CA 在细胞不同组分中的分布及活性至今未见报道,但从表 2 所列举的数据可知,绝大多数褐藻应都具有胞内和胞外的 CA,也就是说它们的 CA 至少分布于细胞

内部及周质空间; 结合大型红藻和绿藻的 CA 分布研究结果, 笔者推测褐藻细胞内也可能含有叶绿体或胞基质 CA, 以完成无机碳的储存并为光合还原碳的 RuBisCo 酶提供必需的反应底物 CO_2 。

1999年, Moulin 等^[77]在掌状海带中报道了1个 α -CA 的 cDNA 部分序列, 该片段是在拼接几个表达序列标签 (EST) 的基础上获得的。Northern 印迹杂交结果表明, 该 α -CA 基因在掌状海带的配子体和孢子体之间呈现不同的表达模式。这也是大型海藻 CA 基因的首次报道。2011年, 余贞等^[78]报道了海带配子体的1个 α -CA 基因, 它编码由290个氨基酸组成的前体蛋白, 在切除20个氨基酸组成的信号肽后, 成熟蛋白的相对分子质量为30.44 kD; 后来, Ye 等^[55]异源重组表达了该 α -CA 并制备了它的特异性抗体, 利用免疫胶体金电镜等手段, 发现它在海带叶绿体中起作用。这也是大型海藻 CA 亚细胞定位研究的首次报道, 也是迄今为止的唯一一例。在海带配子体基因组数据^[79]以及海带^[80-81]和糖海带^[82]高通量转录组数据及笔者前期工作^[55,78]的基础上, Bi 和 Zhou^[83]认为海带可能存在12个 CA 基因, 基于氨基酸序列的聚类分析结果表明它们隶属于 α (2个)、 β (7个) 和 γ (3个) CA 等3个家族。

2019年, Bi 等^[52]对海带配子体进行了全长转录组高通量测序分析, 明确了11个 CA 基因 (表3)。利用 WoLFPSORT、TargetP 等工具预测, 结果 (表3) 显示其中2个 α -CA (Sj α CA1 和 Sj α CA4) 可能位于叶绿体中, 3个 α -CA (Sj α CA2、Sj α CA3 和 Sj α CA5) 及1个 β -CA (Sj β CA1) 可能存在于分泌途径中, 3个 γ -CA (Sj γ CA1、Sj γ CA2 和 Sj γ CA3) 和1个 β -CA (Sj β CA2) 可能位于线粒体上, 1个 β -CA (Sj β CA3) 存在于其他位置。同时, 从长囊水云的基因组^[53]数据库中搜索到编码 CA 的6个基因序列 (表3), 经亚细胞定位预测分析可知, 1个位于分泌途径的 α -CA (Es α CA1), 2个 β -CA (Es β CA1 位于线粒体、Es β CA2 位于叶绿体或线粒体), 3个都位于线粒体的 γ -CA (Es γ CA1、Es γ CA2 和 Es γ CA3)。表3所列举的数据显示, 无论是分类地位比较低等的长囊水云还是比较进化的海带, 都像莱茵衣藻^[45]和三角褐指藻、假微型海链藻等硅藻^[54]一样, 具备多个亚型的 CA, 且这些 CA 在细胞中也可能存在着不同区域的空间布局, 从而完成各自的生理学功能, 使藻类细胞能够应对变化的环境。

8 褐藻CA研究中有待解决的问题及研究意义

从表3可以清楚地看到, 海带、长囊水云等褐藻细胞都具有多种亚型的 CA, 这些 CA 有什么特征; 其功能与原核的蓝藻、真核的衣藻及硅藻以及高等植物的 CA 相比, 有什么异同点; 这些 CA 具体存在于褐藻细胞的什么部位, 并以何种空间布局完成其功能; 它们在具有细胞分化的褐藻孢子体中, 又如何分布于表皮、皮层和髓部的组织中, 实现结构与功能的统一; 这些褐藻 CA, 在一天或一个生长季节内是如何变化; 又如何应对变化的外界环境 (如大气中 CO_2 增加、海水酸化、温度升高、UV 等), 从而为人类提供可持续利用的海洋生物资源及赖以生存的海洋环境, 等等诸如此类的问题, 都需要一一探讨。从我国海水养殖产业及海洋环境的角度来分析, 目前, 应该选择海带、裙带菜及羊栖菜等经济褐藻或引起“褐潮 (brown tide)”的马尾藻等物种入手, 有目标地选择具有相应研究基础的单位及研究团队, 进行5-10年的联合攻关, 可望在褐藻 CA 的基础生物学方面有所突破。

正如 Floryszak-Wieczorek 和 Arasimowicz-Jelonek^[84]所指出的, 植物 CA 除了参与如上所述的 C_i 吸收以及在胞内进行不同形式 C_i 的储存和转换以完成光合作用外, 还广泛参与了其他的生物学过程, 例如 pH 调控、气体和离子交换、提供回补反应 (anaplerotic reaction) 所需的 HCO_3^- 、脂类生物合成等。因此, 对褐藻 CA 的研究将有助于人们更清楚、更完整地了解海带等经济褐藻的基础生物学理论知识。

大型藻类每年固定约1 Gt 的碳, 虽只有全球初级生产力的1%, 但以单位面积来衡量, 它要远高于海洋浮游植物, 与陆地植物相近, 甚至比后者还高^[43]。例如, 海带在7个月的养殖时间内每 m^2 海面可生产15 000 g 干物质 (相当于150 t/ha), 而美国种植甘蔗的生产力是61~95 t 鲜重/ha/yr; 当把海带与甘蔗最大生产力进行比较时, 发现前者是后者的2.8倍^[85]。由此可以看出, 褐藻的光合作用效率 (6%~8%) 远高于陆地植物 (1.8%~2.2%)^[86]。因此, 通过 CA 的研究, 有助于了解海带等褐藻如何高效地把海水中的 C_i 运至光合碳固定的酶处以进行碳水化合物化合物的合成, 才能确保它们具有这么高的光合效率; 同时, 也有助于在未来酸化情况下, 从生理生化、分子生物学等角度来探讨海藻如何影响海洋碳汇等生态与环境问题。

表3 海带和长囊水云CA的基因信息及亚细胞定位预测结果

亚型	基因	基因长度(bp)	参考序列	同源性	基因号	开读框架长度(bp)	氨基酸长度	是否全长编码序列(Y/N)	预测的亚细胞定位
长囊水云(<i>Ectocarpus siliculosus</i>)									
α	EsaCA1	9 250	AEF33616.1 <i>Saccharina japonica</i>	49%	CBN76519.1	888	295	Y	分泌途径
β	Es β CA1	5 763	ARM53418.1 <i>S. japonica</i>	69%	CBN77745.1	1032	343	Y	线粒体
	Es β CA2	8 187	ARM53418.1 <i>S. japonica</i>	47%	CBN79693.1	1182	393	Y	叶绿体或线粒体
	Es γ CA1	3 267	BAF32946.1 <i>Pleurochrysis haptonemofera</i>	45%	CBJ49068.1	624	207	Y	线粒体
	Es γ CA2	3 645	XP_019226781.1 <i>Nicotiana attenuata</i>	47%	CBN75766.1	624	207	Y	线粒体
	Es γ CA3	6 005	OEU12936.1 <i>Fragilariopsis cylindrus</i> CCMP1102	45%	CBN79571.1	915	304	Y	线粒体
海带(<i>Saccharina japonica</i>)									
α	Sj α CA1	2 804	JF827608.1 <i>S. japonica</i>	100%	SJ18142	873	290	Y	叶绿体
	Sj α CA2	2 408	JF827608.1 <i>S. japonica</i>	68%	SJ13240	888	295	Y	分泌途径
	Sj α CA3	2 006	KP036914.1 <i>Lobosphaera incisa</i>	99%	—	861	286	Y	分泌途径
	Sj α CA4	2 346	AJ130777 <i>Laminaria digitata</i>	75%	—	633	210	Y	叶绿体
	Sj α CA5	1 496	AJ130777 <i>L. digitata</i>	82%	SJ18135	840	279	Y	分泌途径
β	Sj β CA1	1 427	KY038576.1 <i>S. japonica</i>	100%	SJ12311	945	314	Y	分泌途径
	Sj β CA2	1 186	KY038576.1 <i>S. japonica</i>	69%	SJ17783	462	153	N	分泌途径
	Sj β CA3	1 410	KP036916.1 <i>L. incisa</i>	99%	—	738	245	Y	其他区域
γ	Sj γ CA1	1 508	AY596511.1 <i>Helicosporidium</i> sp. ex <i>Simulium jonesii</i>	76%	SJ07587	918	305	Y	线粒体
	Sj γ CA2	1 370	XM_014674703.1 <i>Blastocystis</i> sp.	78%	SJ21158	741	246	Y	线粒体
	Sj γ CA3	1 143	XM_016851827.1 <i>Gossypium hirsutum</i>	96%	—	825	274	Y	线粒体

“—”代表在海带基因组的数据中没有找到。

[参 考 文 献]

- [1] Millero FJ. Chemical Oceanography [M]. 4th Ed. Boca Raton: CRC Press, 2013: 259-333
- [2] Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology [M]. 5th Ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2010: 67-83
- [3] Raven JA. Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. Adv Bot Res, 1997, 27: 85-209
- [4] Bartsch I, Wiencke C, Bischof K, et al. The genus

- Laminaria sensu lato*: recent insights and developments. Eur J Phycol, 2008, 43: 1-86
- [5] Uehlein N, Kai L, Kaldenhoff R. Plant aquaporins and CO₂ [M]// In: Chaumont F, Tyerman S eds. Plant aquaporins. Signaling and Communication in Plant. Switzerland: Springer International Publishing AG, Cham, 2017: 255-65
- [6] Raven JA, Beardall J, Giordano M. Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms. Photosynth Res, 2014, 121: 111-24
- [7] Cornwall CE, Revill AT, Hurd CL. High prevalence of diffusive uptake of CO₂ by macroalgae in a temperate subtidal ecosystem. Photosynth Res, 2015, 124: 181-90
- [8] Longphuir SN, Eschmann C, Russell C, et al. Seasonal and species-specific response of five brown macroalgae to high atmospheric CO₂. Mar Ecol Prog Ser, 2013, 493: 91-102
- [9] Jolliffe EA, Tregunna EB. Studies on HCO₃⁻ ion uptake during photosynthesis in benthic marine algae. Phycologia, 1970, 9: 293-303
- [10] Larsson C, Axelsson L. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. Eur J Phycol, 1999, 34: 79-86
- [11] 岳国峰, 戢勇骋, 王建飞, 等. 海带雌配子体对无机碳的利用. 海洋科学, 2000, 24: 33-6
- [12] Zou DH, Gao KS. Comparative mechanisms of photosynthetic carbon acquisition in *Hizikia fusiforme* under submersed and emersed conditions. Acta Bot Sin, 2004, 46: 1178-85
- [13] Quadir A, Harrison PJ, DeWreede RE. The effects of emergence and submergence on the photosynthesis and respiration of marine macrophytes. Phycologia, 1979, 18: 83-8
- [14] Bidwell RGS, McLachlan J. Carbon nutrition of seaweeds: photosynthesis, photorespiration and respiration. J Exp Mar Biol Ecol, 1985, 86: 15-46
- [15] Raven JA, Ball LA, Beardall J, et al. Algae lacking carbon-concentrating mechanisms. Can J Bot, 2005, 83: 879-90
- [16] Maberly SC, Raven JA, Johnston AM. Discrimination between ¹²C and ¹³C by marine plants. Oecologia, 1992, 91: 481-92
- [17] Maberly SC. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. J Phycol, 1990, 26: 439-49
- [18] 岳国峰, 王金霞, 朱明远, 等. 藻类无机碳的研究进展 (I)——研究起源及研究方法. 海洋科学, 2003, 27: 15-8
- [19] Fernández PA, Roleda MY, Rautenberger R, et al. Carbonic anhydrase activity in seaweeds: overview and recommendations for measuring activity with an electrometric method, using *Macrocystis pyrifera* as a model species. Mar Biol, 2018, 165: 88
- [20] Sand-Jensen K, Gordon DM. Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO₃⁻ and CO₂. Mar Biol, 1984, 80: 247-53
- [21] Cook CM, Lanaras T, Colman B. Evidence for bicarbonate transport in species of red and brown macrophytic marine algae. J Exp Bot, 1986, 37: 977-84
- [22] Surif MB, Raven JA. Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and *Laminariales* (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. Oecologia, 1989, 78: 97-105
- [23] Mercado JM, Gordillo FJL, Figueroa FL, et al. External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 221: 209-20
- [24] Schmid R. Photosynthesis of *Ectocarpus siliculosus* in red light and after pulses of blue light at high pH-evidence for bicarbonate uptake. Plant Cell Environ, 1998, 21: 523-9
- [25] Haglund K, Ramazanov Z, Mtolera M, et al. Role of external carbonic anhydrase in light-dependent alkalization by *Fucus serratus* L. and *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Phaeophyta). Planta, 1992, 188: 1-6
- [26] Zou D, Gao K, Xia J. Photosynthetic utilization of inorganic carbon in the economic brown alga, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae) from the south China sea. J Phycol, 2003, 39: 1095-100
- [27] Zou D, Gao K, Chen W. Photosynthetic carbon acquisition in *Sargassum henslowianum* (Fucales, Phaeophyta), with special reference to the comparison between the vegetative and reproductive tissues. Photosynth Res, 2011, 107: 159-68
- [28] Klenell M, Snoeijs P, Pedersén M. The involvement of a plasma membrane H⁺-ATPase in the blue-light enhancement of photosynthesis in *Laminaria digitata* (Phaeophyta). J Phycol, 2002, 38: 1143-9
- [29] Klenell M, Snoeijs P, Pedersén M. Active carbon uptake in *Laminaria digitata* and *L. saccharina* (Phaeophyta) is driven by a proton pump in the plasma membrane. Hydrobiologia, 2004, 514: 41-53
- [30] García-Sánchez MJ, Delgado-Huertas A, Fernández JA, et al. Photosynthetic use of inorganic carbon in deep-water kelps from the Strait of Gibraltar. Photosynth Res, 2016, 127: 295-305
- [31] Fernández PA, Hurd CL, Roleda MY. Bicarbonate uptake via an anion exchange protein is the main mechanism of inorganic carbon acquisition by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) under variable pH. J Phycol, 2014, 50: 998-1008
- [32] Flores-Moya A, Fernández JA. The role of external carbonic anhydrase in the photosynthetic use of inorganic carbon in the deep-water alga *Phyllariopsis purpurascens* (Laminariales, Phaeophyta). Planta, 1998, 207: 115-9
- [33] 岳国峰, 王金霞, 王建飞, 等. 海带幼孢子体的光合碳利用. 海洋与湖沼, 2001, 32: 647-52
- [34] Axelsson L, Mercado JM, Figueroa FL. Utilization of HCO₃⁻ at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. Eur J Phycol, 2000, 35: 53-9
- [35] Zhang X, Hu H, Tan T. Photosynthetic inorganic carbon utilization of gametophytes and sporophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae). Phycologia, 2006, 45: 642-7
- [36] Zou D, Gao K. Acquisition of inorganic carbon by *Enderachne binghamiae* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). Eur J Phycol, 2010, 45: 117-26
- [37] Drechsler Z, Sharkia R, Cabantchik ZI, et al. Bicarbonate uptake in the marine macroalga *Ulva* sp. is inhibited by

- classical probes of anion exchange by red blood cells. *Planta*, 1993, 191: 34-40
- [38] Ikemori M, Nishida K. Carbonic anhydrase in the marine alga *Ulva pertusa*. *Physiol Plant*, 1968, 21: 292-7
- [39] Karlsson J, Ramazanov Z, Hilttonen T, et al. Effect of vanadate on photosynthesis and the ATP/ADP ratio in low-CO₂-adapted *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta*, 1994, 192: 46-51
- [40] Johnston AM. The acquisition of inorganic carbon by marine macroalgae. *Can J Bot*, 1991, 69: 1123-32
- [41] 邹定辉, 高坤山. 大型海藻类光合无机碳利用研究进展. *海洋通报*, 2001, 20: 83-90
- [42] Badger MR. The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynth Res*, 2003, 77: 83-94
- [43] Raven JA, Hurd CL. Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynth Res*, 2012, 113: 105-25
- [44] Cannon GC, Heinhorst S, Kerfeld CA. Carboxysomal carbonic anhydrases: Structure and role in microbial CO₂ fixation. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 382-92
- [45] Moroney JV, Ma Y, Frey WD, et al. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynth Res*, 2011, 109: 133-49
- [46] Mercado JM, Andría JR, Pérez-Llorens JL, et al. Evidence for a plasmalemma-based CO₂ concentrating mechanism in *Laminaria saccharina*. *Photosynth Res*, 2006, 88: 259-68
- [47] Kremer BP. Metabolic implications of non-photosynthetic carbon fixation in brown macroalgae. *Phycologia*, 1981, 20: 242-50
- [48] 侯和胜, 姚南瑜. 海带磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的提取和特性. *植物生理学通讯*, 1991, 27: 100-3
- [49] Cabello-Pasini A, Alberte RS. Expression of carboxylating enzymes in *Laminaria setchellii* (Phaeophyceae). *Phycologia*, 2001, 40: 351-8
- [50] Kawamitsu Y, Boyer JS. Photosynthesis and carbon storage between tides in a brown alga, *Fucus vesiculosus*. *Mar Biol*, 1999, 133: 361-9
- [51] Schmid R, Dring MJ. Influence of carbon supply on the circadian rhythmicity of photosynthesis and its stimulation by blue light in *Ectocarpus siliculosus*: clues to the mechanism of inorganic carbon acquisition in lower brown algae. *Plant Cell Environ*, 1996, 19: 373-82
- [52] Bi YH, Li JL, Zhou ZG. Full-length mRNA sequencing in *Saccharina japonica* and identification of carbonic anhydrase genes. *Aquacult Fish*, 2019, 4: 53-60
- [53] Cock JM, Sterck L, Rouzé P, et al. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 2010, 465: 617-21
- [54] Hopkinson BM, Dupont CL, Matsuda Y. The physiology and genetics of CO₂ concentrating mechanisms in model diatoms. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 31: 51-7
- [55] Ye RX, Yu Z, Shi WW, et al. Characterization of α -type carbonic anhydrase (CA) gene and subcellular localization of α -CA in the gametophytes of *Saccharina japonica*. *J Appl Phycol*, 2014, 26: 881-90
- [56] Trimborn S, Wolf-Gladrow D, Richter K-U, et al. The effect of pCO₂ on carbon acquisition and intracellular assimilation in four marine diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2009, 376: 26-36
- [57] Meldrum NU, Roughton FJW. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol*, 1933, 80: 113-42
- [58] Tsuji Y, Nakajima K, Matsuda Y. Molecular aspects of the biophysical CO₂-concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J Exp Bot*, 2017, 68: 3763-72
- [59] Brinkman R. The occurrence of carbonic anhydrase in lower marine animals. *J Physiol*, 1934, 80: 171-3
- [60] Bowes GW. Carbonic anhydrase in marine algae. *Plant Physiol*, 1969, 44: 726-32
- [61] Graham D, Smillie RM. Carbonate dehydratase in marine organisms of the Great Barrier Reef. *Aust J Plant Physiol*, 1976, 3: 113-9
- [62] Giordano M, Maberly SC. Distribution of carbonic anhydrase in British marine macroalgae. *Oecologia*, 1989, 81: 534-9
- [63] Gordillo FJL, Aguilera J, Jiménez C. The response of nutrient assimilation and biochemical composition of Arctic seaweeds to a nutrient input in summer. *J Exp Bot*, 2006, 57: 2661-71
- [64] Zou D, Gao K. Photosynthetic acclimation to different light levels in the brown marine macroalga, *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Phaeophyta). *J Appl Phycol*, 2010, 22: 395-404
- [65] Mercado JM, Figueroa FL, Niell FX, et al. A new method for estimating external carbonic anhydrase activity in macroalgae. *J Phycol*, 1997, 33: 999-1006
- [66] Huovinen P, Gómez I, Orostegui M. Patterns and UV sensitivity of carbon anhydrase and nitrate reductase activities in south Pacific macroalgae. *Mar Biol*, 2007, 151: 1813-21
- [67] Wilbur KM, Anderson NG. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 1948, 176: 147-54
- [68] Okazaki M. Dissociable zinc as a cofactor of carbonic anhydrase from the marine red alga *Serraticardia maxima*. *Bot Mag*, 1973, 86: 235-9
- [69] Fernández PA, Roleda MY, Hurd CL. Effects of ocean acidification on the photosynthetic performance, carbonic anhydrase activity and growth of the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Photosynth Res*, 2015, 124: 293-304
- [70] Zou D. Effects of elevated atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). *Aquaculture*, 2005, 250: 726-35
- [71] Viñeña B, Segovia M, Figueroa FL. Effect of artificial UV radiation on carbon and nitrogen metabolism in the macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. *Hydrobiologia*, 2006, 560: 31-42
- [72] Gordillo FJL, Aguilera J, Wiencke C, et al. Ocean acidification modulates the response of two Arctic kelps to ultraviolet radiation. *J Plant Physiol*, 2015, 173: 41-50
- [73] Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, et al. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta*,

- 1992, 187: 275-81
- [74] Mercado JM, Viñeola B, Figueroa FL, et al. Isoenzymic forms of carbonic anhydrase in the red macroalga *Porphyra leucosticta*. *Physiol Plant*, 1999, 106: 69-74
- [75] Andría JR, Vergara JJ, Pérez-Lloréns JL. Fractionation of carbonic anhydrase activity in *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) and *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta): changes in the extracellular activity in response to inorganic carbon levels. *Aust J Plant Physiol*, 2000, 27: 1161-7
- [76] Gómez-Pinchetti JL, Ramazanov Z, Garcia-Reina G. Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis in the red alga *Soliera filiformis* (Gigartinales: Rodophyta). *Mar Biol*, 1992, 114: 335-9
- [77] Moulin P, Crépineau F, Kloareg B, et al. Isolation and characterization of six cDNAs involved in carbon metabolism in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *J Phycol*, 1999, 35: 1237-45
- [78] 余贞, 毕燕会, 周志刚. 海带配子体碳酸酐酶(CA)基因的克隆及其特征分析. *水产学报*, 2011, 35: 1343-53
- [79] Ye N, Zhang X, Miao M, et al. *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology. *Nat Commun*, 2015, 6: 6986
- [80] Deng YY, Yao JT, Wang XL. Transcriptome sequencing and comparative analysis of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) under blue light induction. *PLoS One*, 2012, 7: e39704
- [81] Wang WJ, Wang FJ, Sun XT. Comparison of transcriptome under red and blue light culture of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae). *Planta*, 2013, 237: 1123-33
- [82] Heinrich S, Valentin K, Frickenhaus S. Transcriptomic analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae). *PLoS One*, 2012, 7: e44342
- [83] Bi YH, Zhou ZG. Absorption and transport of inorganic carbon in kelps with emphasis on *Saccharina japonica* [M]// In: Najafpour MM ed. *Applied Photosynthesis-New Progress*. Croatia: InTech, 51000 Rijeka, 2016, 111-31
- [84] Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz-Jelonek M. The multifunctional face of plant carbonic anhydrase. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 112: 362-8
- [85] Gao K, McKinley KR. Use of macroalgae for marine biomass production—a review. *J Appl Phycol*, 1994, 6: 45-60
- [86] Ross AB, Jones JM, Kubacki ML, et al. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 6494-504