

钝顶螺旋藻富硒培养条件的优化

黄 峙^{1 3} 郑文杰² 郭宝江^{3 *}

¹(暨南大学生物工程学系² 化学系 广州 510632) ³(华南师范大学生物技术研究所, 广州 510631)

关键词 正交设计, 钝顶螺旋藻, 培养, 硒
中图分类号 Q656.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0373-04

硒是人和动物必需的微量元素,补硒可以防治多种疾病。有机硒具有低毒、高生物利用度的优点,目前主要寄希望于生物转化的途径来获得有机硒^[1]。植物对硒的生物有机化作用已有综述^[2],并开发有富硒酵母^[3]、富硒菇类^[4]、富硒大蒜、富硒黄芪、富硒西洋参、富硒麦芽、富硒茶以及富硒鸡蛋、富硒牛奶等^[5]。螺旋藻是一种很有开发利用前景的藻类,但其含硒量极微,实验报道富硒螺旋藻对⁶⁰Co- γ 射线胸部照射大鼠诱发肺炎和早期肺、肝纤维增生有防治作用^[6]。在培养液中添加亚硒酸钠可以实现藻类对硒的富集和转化,而且螺旋藻对无机硒有较强耐性,可作为生物富集转化硒的材料^[1,7]。本文在 Zarrouk 培养基基础上,采用正交设计对硒添加方法、硒添加浓度、硫浓度和碳酸氢钠浓度进行优化组合,以供大规模生产富硒螺旋藻参考。

1 材料与方法

1.1 藻种

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),由深圳蓝藻公司提供,本实验室保种。

1.2 培养条件

Zarrouk 培养基按处理及水平调整组份及浓度。藻种接种于 50 mL 三角瓶内,接种量 $OD_{560} = 0.10$,每瓶 30mL,液层厚度 2.8~3.2cm。温度 33~35℃;pH 8.8~9.5;光照强度 4000lx,光照时间 24h/d;150r/min 恒温摇床培养 6d,每天各瓶加蒸馏水 3 mL 调整蒸发损耗。

1.3 试验设计

本试验在华南师范大学生物技术研究所螺旋藻培养室内完成。试验按 4 因素 5 水平正交组合设计,选择 $L_{25}5^6$ 正交表。每个处理重复 3 次,并设相应对照(共 15 瓶)。

1.4 硒添加

配制含硒 100mg/mL 的亚硒酸钠母液,按表 1 添加硒。

表 1 硒添加方法

Table 1 Selenium adding method

Adding method	Time(n^{th} day)	Times	Adding quantity of per time
			(% of total)
I	1	1	100
II	1、4	2	50
III	1、3、5	3	33.3
IV	1、2、3、4	4	25
V	1、2、3、4、5	5	20

1.5 方法

1.5.1 OD_{560} 测定 藻液用 722 型分光光度计测定 OD_{560} 。

1.5.2 产量测定 藻液用干烤箱衡重的滤纸过滤,蒸馏水反复冲洗,再置干烤箱衡重,以差值计产量。

1.5.3 浮藻率测定:取均匀混悬藻液 10mL 于试管中,静置 4h 后,准确吸取上层 5 mL(务必将浮藻吸取完全)于另一试管中,加 5 mL 培养液,以采收时的滤液调零,测定 OD_{560} 与原藻液 OD_{560} 比值(%)计浮藻率。

1.6 器材与试剂

RF-5400 型荧光光度计、722 型分光光度计。2、3-二氨基萘(2,3-DAN)亚硒酸钠等试剂均为 AR 级。

2 结 果

2.1 螺旋藻富硒培养条件对产量的影响

Zarrouk 培养基是螺旋藻藻种保存和培养时的经典配方,其营养全面,维持藻的生长时间长达 15~20d^[8]。据我们前期研究,硒在一定的浓度范围内确有提高螺旋藻产量的作用^[7]。而且螺旋藻对硒毒有较强的耐受性,硒浓度达到 400mg/L 时才对螺旋藻产生致死效应^[9]。螺旋藻对硒毒的耐受随硒的添加方式而差异显著,通过分次添加硒可显著提高其对硒毒的耐受性,在硒添加总浓度达 500mg/L 时仍生长良

好^[10]。代谢假说认为,硒与硫之间有密切关系,有研究提示两者在代谢中存在竞争性^[11]。因此,在实验设计中,对常规培养条件予以固定,而设定硒浓度、硒添加方式、硫浓度和碳酸氢钠浓度 4 因子,并分别予以 5 个水平(见表 2)。根据实验所得结果(见表 3),对螺旋藻的相对产量[处理产量占对照产量的百分数(%)]进行直观分析。极差分析显示(见表 4 和图 1),各因素对螺旋藻产量的影响力依次为:D→B→A→C,即 碳酸氢钠浓度→硒添加方法→硒添加浓度→硫浓度。进一步方差分析表明(见表 5)因素 D、B、A 对螺旋藻产量均有显著影响,为关键因素。据此最佳螺旋藻富硒培养条件可定为:D₃B₃A₃C_x,即碳酸氢钠 16.8 g/L、分 3 次等量加硒、硒添加量 300mg/L。

表 2 处理因素及水平编码表

Table 2 The table of factors and levels numbered

Factors	Levels and number of treatments				
	1	2	3	4	5
A Content of Se/(mg/L)	100	200	300	400	500
B Adding method of Se	I	II	III	IV	V
C Content of S/(mg/L)*	70.4	140.8	211.2	281.6	352
D Content of NaHCO ₃ /(g/L)	5.6	11.2	16.8	22.4	28

* Content of S was regulated by adding different amount of K₂SO₄ which was deducted the S content (S₁, 27.3 mg/L) except K₂SO₄ from original Zarrouk's culture medium by the following formula

$$\text{K}_2\text{SO}_4(\text{mg/mL})=(\text{content of S}-\text{S}_1)\times\frac{\text{molecular weight of K}_2\text{SO}_4}{\text{atomic weight of S}}=$$
$$(\text{content of S}-\text{S}_1)\times5.43$$

表 3 L₂₅5⁶ 正交实验设计及产量指标

Table 3 The orthogonal combination design of trial (L₂₅5⁶) and relative yield

No. of treatment	Factors						Relative yield/%			
	A	B	C	D	E	F	I	II	III	Average
1	1	1	1	1	1	1	115.06	105.83	104.71	108.53
2	1	2	2	2	2	2	107.80	109.38	114.58	110.59
3	1	3	3	3	3	3	110.16	126.41	104.44	113.67
4	1	4	4	4	4	4	92.00	109.38	98.18	99.85
5	1	5	5	5	5	5	79.06	66.46	74.38	73.30
6	2	1	2	3	4	5	105.47	111.55	101.17	106.06
7	2	2	3	4	5	1	91.11	106.37	96.78	98.09
8	2	3	4	5	1	2	85.00	88.13	72.43	81.85
9	2	4	5	1	2	3	110.94	117.97	103.91	110.94
10	2	5	1	2	3	4	108.59	120.56	112.28	113.81
11	3	1	3	5	2	4	74.65	81.09	88.47	81.40
12	3	2	4	1	3	5	108.75	119.53	120.31	116.20
13	3	3	5	2	4	1	125.63	129.22	124.47	126.44
14	3	4	1	3	5	2	127.09	111.26	109.38	115.91
15	3	5	2	4	1	3	98.75	108.98	95.32	101.02
16	4	1	4	2	5	3	86.62	101.50	97.55	95.22
17	4	2	5	3	1	4	105.94	108.27	101.12	105.11
18	4	3	1	4	2	5	97.66	101.17	92.34	97.06
19	4	4	2	5	3	1	72.19	89.22	67.38	76.26
20	4	5	3	1	4	2	109.38	114.06	106.41	109.95
21	5	1	5	4	3	2	78.29	54.61	73.92	68.94
22	5	2	1	5	4	3	82.25	76.47	62.97	73.90
23	5	3	2	1	5	4	103.13	109.75	118.44	110.44
24	5	4	3	2	1	5	122.00	104.25	117.36	114.54
25	5	5	4	3	2	1	125.34	115.44	121.88	120.89
CK								100.00		

表 4 螺旋藻产量的极差分析

Table 4 The analysis of range of *S. platensis* yield

Factor	A	B	C	D	E	F
k ₁	101.19	92.03	101.84	111.21	102.21	106.04
k ₂	102.15	100.78	100.87	112.12	104.17	97.45
k ₃	108.19	105.89	103.53	112.33	97.78	98.95
k ₄	96.72	103.50	102.80	92.99	103.24	102.12
k ₅	97.74	103.79	96.95	77.34	98.59	101.43
Range	11.47	13.86	6.58	34.99	6.39	8.59

表 5 处理间方差分析

Table 5 The analysis of variance in different treatments

Source of variation	Deviation sum of square	Degree of freedom	Mean deviation sum of square	F value	Significance
A	1227.70	4	306.92	5.32	* *
B	1773.75	4	443.44	7.69	* *
C	399.13	4	99.78	1.73	
D	14697.57	4	3674.39	63.74	* *
E	488.38	4	122.09	2.12	
F	552.41	4	138.10	2.41	
Error	2882.37	50	57.65		

$F_{0.05}(4, 50) = 2.56$ $F_{0.01}(4, 50) = 3.72$
* * $F > 3.72$

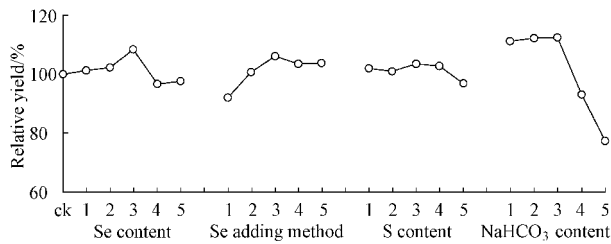


图 1 硒添加方法、硒、硫、碳酸氢钠浓度对螺旋藻产量的效应

Fig. 1 Effect of the factors : Se content , Se adding method , sulfur content and NaHCO₃ content on *S. platensis* relative yield

2.2 富硒培养条件对螺旋藻生长指标的影响

螺旋藻产量构成因素没有建立统一的标准,我们在研究中发现螺旋藻产量与其 OD_{560} 和浮藻率密切相关。通过对 OD_{560} 和浮藻率与其产量之间进行回归分析,建立因变量:产量(Y)与变量(OD_{560} : X_1 , 浮藻率: X_2)的回归方程。

二元线性回归方程: $Y = 0.452 + 0.600X_1 + 0.916X_2$

二元线性标准回归方程: $ZY = 0.699Z_{X_1} + 0.287Z_{X_2}$

二元线性回归方程的检验:复相关系数 $R_{Y,12} = 0.951$,通过查复相关系数界值表对实际计算出的复相关系数进行显著检验。当自由度 $df = n - k - 1 = 22$, $\alpha = 0.01$, $R_{Y,12}$ 的临界值为 0.585。由于实际计算出的 $R_{Y,12} = 0.951$,大于 $\alpha = 0.01$ 时 $R_{Y,12}$ 的临界值,则 $P < 0.01$,表示此复相关系数与总体零相关有显著性差异。同时也表明此回归方程具有显著性,这意味着因变量(螺旋藻产量)与两个自变量(OD_{560} 和浮藻率)之间存在着线性关系。

在此基础上,进一步对产量构成因素与产量之间进行相关分析,发现产量构成因素中的 OD_{560} 和浮藻率与产量均关系密切,其偏相关系数分别为 $r_{1y} = 0.938$, $r_{2y} = 0.868$ 。对偏相关系数进行显著性检验结果显示,当自由度 $df = n - k - 1 = 22$, $\alpha = 0.01$,查 t 值表, $t_{(22)0.01} = 2.819$ 。而实际计算的两个检验统计量分别是 $t_{b1} = 19.110$, $t_{b2} = 7.838$ 。 P 均小于 0.01。 OD_{560} 和浮藻率对螺旋藻产量均有极显著效应。

如图 2 所示,实验因素对螺旋藻产量的影响与对产量构成因素的影响相一致。 OD_{560} 除与螺旋藻生长密度有关外,还与藻体的色素蛋白有关,说明各因素影响了藻体蛋白的含量。而浮藻率反映了螺旋藻生长及代谢状况^[8],间接证明各

因素对螺旋藻产量的影响是通过干扰其生长代谢而起作用。

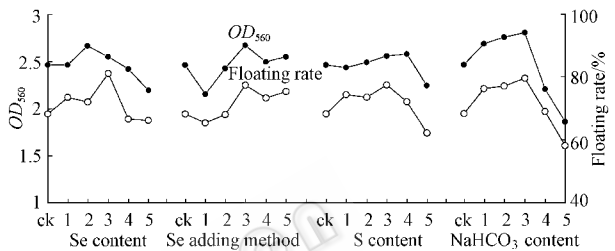


图 2 硒有机化培养 4 条件对螺旋藻 OD_{560} 及浮藻率的影响

Fig. 2 Effect of the four factors in *S. platensis* cultivating on the OD_{560} and *S. platensis* floating rate

3 讨论

由于螺旋藻具有高营养、高产量和对硒较强的耐受性,用螺旋藻作为硒生物有机化载体是适宜的,但有必要就培养条件进行优化,降低硒毒性,提高产量,实现规模化生产时有较高的硒生物转化水平。

本实验结果表明,碳酸氢钠浓度、硒添加方法、硒添加浓度是影响硒化螺旋藻产量的关键因素。螺旋藻硒化培养的最优组合为:硒添加浓度 300 mg/L,分 3 次等量加硒、碳酸氢钠浓度 16.8 g/L。碳酸氢钠除供给藻体碳源外,还可形成缓冲体系,保持介质的盐度和碱度有利于螺旋藻生长。分次加硒可使介质中硒不致大量剩余,缓解硒的氧化毒性,提高螺旋藻对硒毒的耐性,而且可促进硒的转化。在本实验设计的浓度范围内,硫浓度对螺旋藻产量无显著影响,可能硒与硫在代谢上有一定协同作用。硒浓度是硒毒性的决定因素,硒毒性的关键可能是与巯基化合物(如半胱氨酸、谷胱甘肽、辅酶 A 等)结合,生成三元硒硫化物($RS-Se-SR$)破坏了酶的天然结构,使酶失活^[12,13]。高硒浓度还可致使叶绿体被膜受到损伤,光合作用下降,物质合成受阻,细胞分裂减慢^[14]。在实验的硒浓度区间,未见藻丝体毒性反应,但对产量有较大影响。

OD_{560} 是测定螺旋藻生长密度的通用方法,可作为产量指标。此外,我们在实验中选用的藻种浮藻率与产量高度相关,也可作为产量构成因素。我们调查研究发现,适合生产的钝顶螺旋藻或极大螺旋藻多数为上浮性良好的品种,因沉藻、死藻较少而产品品质较优,并且采收率高。本实验浮藻率的简易测量法可适用于上浮性良好的螺旋藻品种,但因选

用藻种较单一,有必要进一步研究后推广。

通过优化培养条件后培养生产的富硒螺旋藻干粉,总硒含量达 $460\mu\text{g/g}$,其中有机硒占 80% 以上,与我们前期研究结果一致^[1]。有关硒的摄入量安全范围,国际通用标准为成人每天 $50\sim 200\mu\text{g}$,但在日本渔民和我国恩施高硒区居民日摄入量均大于 $500\mu\text{g}$,发现均无硒中毒现象。我国著名预防医学专家杨光圻教授取用不同安全因子得出高硒地区最大安全摄入量近 $500\mu\text{g/d}$,而一般地区为 $400\mu\text{g/d}$,这一数值逐步为国际所接受^[2]。鉴于目前螺旋藻的主要产品形式是药品、保健品、功能性食品等,服用量有严格要求,特别是富硒螺旋藻中大部分为有机硒,因此毒性弱,活性高,并可为进一步研究含硒活性成分的深加工提供可能,所以采用优化培养条件生产较高硒含量的富硒螺旋藻是适宜而稳妥的。

REFERENCES(参考文献)

- [1] WANG D X(王大志), GAO Y H(高亚辉). Effects of selenium on the growth, selenium accumulation and its distribution in *Dnualiella salina* and *D. bardawil*. *Acta Oceanologica Sinica* (海洋学报), 1997, **19**(2): 100 ~ 115
- [2] ZHENG W J(郑文杰), OUYANG Z(欧阳政). *Organic Selenium Compounds from Plants: Their Chemistry & Applications in Medicine*. Guang Zhou: Jinan University Press, 2001
- [3] Yoshida M, Fukunaga K, Tsuchita H *et al.*. An evaluation of the bio-availability of selenium in high-selenium yeast. *J-Nutr-Sci-Vitaminol-Tokyo*, 1999, **45**(1): 119 ~ 128
- [4] Spolar M R, Schaffer E M, Beelman R B *et al.*. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer Lett*, 1999, **138**(1-2): 145 ~ 150
- [5] HUANG Z(黄峙). Biological study and progress on dietary Se sources. *Food Science*(食品科学), 2001, **22**(5): 90 ~ 94
- [6] YANG Z H(杨陟华), ZHU J M(朱基茂), GONG Y H(龚诒芬) *et al.*. Preventive effect of selenium enriched-spirulina(SeSP) on early fibrous proliferation in lungs and livers of rats irradiated with ^{60}Co - γ -rays. *Chin J Radiol Med Prot*(中华放射医学与防护杂志), 1997, **17**(2): 80 ~ 83
- [7] ZHOU Z G(周志刚), LI P F(李朋富), LIU Z L(刘志礼) *et al.*. Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *Spirulina maxima*, *S. platensis* and *S. subsalsa*. *Oceanologia et Limnologia Sinica* (海洋与湖沼), 1997, **28**(4): 365 ~ 369
- [8] XU J H(徐洁红), GOU B J(郭宝江). Selection of culture medium for *Spirulina platensis* & *Spirulina maxima*. *Journal of South China Normal University: Natural Science* (华南师范大学学报:自然科学版), 1996, **4**: 32 ~ 34
- [9] ZHOU Z G(周志刚), ZHONG G(钟罡), LIU Z L(刘志礼). Effects of selenium on the growth and selenium contents of *Spirulina maxima*. *Marine Science*(海洋科学), 1997, **5**: 42 ~ 45
- [10] HUANG Z(黄峙), XIANG J J(向军俭), ZHENG W J(郑文杰) *et al.*. The accumulation and distribution of selenium in *Spirulina platensis*. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2001, **37**(1): 12 ~ 14
- [11] Legget J E, Epstein E. Kinetics of sulfate absorption by barley roots. *Plant Physiol*, 1956, **31**: 222 ~ 226
- [12] Ganther H E. Selenotrisulfides formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, 1968, **7**: 2898 ~ 2905
- [13] ZHOU Z G(周志刚). Physiology, biochemistry and molecular biology of selenium in plants. *Marine Science*(海洋科学), 1997, **1**: 29 ~ 33
- [14] SHANG Q M(尚庆茂), LI P L(李平兰), GAO L H(高丽红). Selenium uptake and inversion by hydroponic lettuce. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报). 1997, **24**(3): 255 ~ 258

Optimization of Cultivation Conditions in Se-enriched *Spirulina platensis*

HUANG Zhi^{1 3} ZHENG Wen-Jie² GUO Bao-Jiang^{3*}

(¹ Department of Biotechnology, ²Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632;

³Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Orthogonal combination design was adopted in examining the *Spirulina platensis* (*S. platensis*) yield and the influence of four factors (Se content, Se-adding method, S content and NaHCO_3 content) on algae growth. The results showed that Se content, Se-adding method and NaHCO_3 content were key factors in cultivation conditions of Se-enriched *S. platensis* with the optimal combination being Se at 300mg/L , Se-adding amount equally divided into three times and NaHCO_3 at 16.8 g/L . Algae yield had a remarkable correlation with OD_{560} and floating rate by linear regression analysis. There was a corresponding relationship between effects of the four factors on algae yield and on OD_{560} , floating rate too. In conclusion, OD_{560} and floating rate could be served as yield-forming factors.

Key words orthogonal combination design, spirulina platensis, cultivation, selenium

Received: 11-19-2001

This work was supported by Grant from Guangdong province & Guangzhou Science and Technology Project (No.96-904-06-06 & No.2001-J-010-01).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85210855; Fax: 86-20-85210855; E-mail: guobj@senu.edu.cn