

富硒螺旋藻培养技术研究

李志勇¹ 郭祀远² 李琳²

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240;

2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510641)

摘要: 采用富硒技术对钝顶螺旋藻培养进行强化, 对硒(IV)浓度和亚硫酸盐的影响, 以及硒的生物富集及其对藻细胞分子官能团结构的影响等进行了较为详细的研究, 并对相关的可能机理进行了讨论。研究发现, 硒对钝顶螺旋藻生长具有刺激或抑制的双重作用。在 0.02mg/L~411.00mg/L 浓度范围内, 硒不仅可以加快钝顶螺旋藻的生长, 而且还可以提高其生物量; 同时, 钝顶螺旋藻对硒的生物富集随着硒浓度的增加而增加, 较为缓慢的生长利于钝顶螺旋藻对硒的富集。研究还证实, Na_2SO_3 会减轻高浓度 Na_2SeO_3 对钝顶螺旋藻生长的毒性, 富硒培养不会对藻细胞分子官能团结构产生损害。实验得出钝顶螺旋藻富硒培养较佳的硒处理浓度在 10mg/L~40mg/L。

关键词: 钝顶螺旋藻; 硒; 强化培养; 生物富集

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0386-06

硒作为生命科学的研究对象起始于 19 世纪 60 年代, 近 20 年来它以旺盛的活力向生命科学的各个领域渗透。近年来人们对于一些海洋生物中硒的分布、吸收及其食物链传递开展了一些工作^[1, 2]。研究发现硒对一些藻类的生长有利并能改善其营养成分^[3]。

硒具有重要的生理保健功能, 如能抗氧化, 清除体内自由基; 解除或降低一些有毒金属如铅、镉、汞、砷等的毒性, 并可提高机体免疫功能等^[4]。国内 70 年代用硒(主要是亚硒酸钠)防治克山病取得了重大突破; 80 年代用硒防治大骨节病及肿瘤等又取得了重大进展。基于有机硒的低毒性与高吸收率(如当硒以硒蛋氨酸形态被人摄入时约 76%~100% 可被吸收), 目前已相继开发出一些富硒保健食品, 如富硒酵母、茶叶、灵芝等^[5]。

螺旋藻含有丰富的蛋白质及多种生理活性成分, 如 β -胡萝卜素、 γ -亚麻酸、藻蓝蛋白、多糖等, 具有极强的医疗保健功能^[6], 但螺旋藻中微量活性元素硒的含量极少(约为 0.16mg/kg)。目前, 有关硒作用下螺旋藻生长及营养成分的变化及其生物富集等均缺乏具体的研究。本文采用富硒技术使钝顶螺旋藻生长和营养保健价值得以强化, 并对相关可能机理进行探讨, 以期高附加值富硒螺旋藻产品的研制与开发奠定基础。

收稿日期: 2000-05-08; 修订日期: 2000-09-30

基金资助: 上海市博士后科研项目基金资助

作者简介: 李志勇(1969-), 男, 河南省潢川县人; 博士, 副教授; 主要从事海洋生物工程、生物化工、功能性食品、环境生物技术等方面的研究。E-mail: zyli@sh163a.sta.net.cn

1 材料与方法

1.1 藻种培养及装置 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* Nordst. Geitler), 由华南师范大学提供, 采用 Zarrouk 培养基^[7], 同文献^[8]的 1L 鼓泡柱式光生物反应器分批培养, 细胞干重测定和比生长速率计算同文献^[8]。

1.2 螺旋藻富硒培养及硒的测定 向 Z 氏培养基中添加一定浓度的 Na_2SeO_3 (化学纯) 溶液光自养分批培养钝顶螺旋藻, 达最大细胞干重时用绢布过滤藻液, 蒸馏水反复洗涤后制得藻泥, 置于冰箱中缓慢冻干, 然后用 DI-80 型真空干燥箱于 40°C 下干燥 2h, 研细后制得藻粉, 微波消化藻粉后采用 HITACHI 180-80 型原子吸收分光光度仪, 高强度灯测定钝顶螺旋藻中的硒含量。

1.3 螺旋藻红外吸收光谱测定 采用 N1730 型傅立叶红外光谱仪(PE 公司), KBr 压片测定富硒培养与非富硒培养的钝顶螺旋藻藻粉的红外吸收光谱, 用差谱法扣除水分影响。

2 结果

2.1 硒(IV)对螺旋藻生长的影响

在光强 $20 \times 10^3 \text{lx}$ 、温度 35°C 、接种浓度为 0.28g/L (d. w.) 的条件下, 不同硒(IV)浓度下进行钝顶螺旋藻富硒分批培养, 对比结果如图 1 所示。0.05mg/L 浓度的硒已能显著刺激钝顶螺旋藻的生长并能提高其生物量; 当硒浓度超过 499.42mg/L 时会产生抑制作用; 当硒浓度增至 684.82mg/L 时, 发现藻细胞生长几乎停止; 若硒浓度高于 908.04mg/L 后, 钝顶螺旋藻则很快死亡。由此可见, 硒对钝顶螺旋藻生长的影响与其浓度密切相关, 随浓度的变化而具有促进或抑制的双重作用。

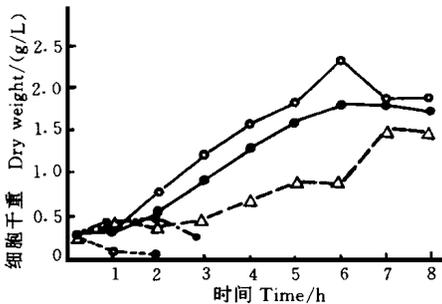


图 1 硒对钝顶螺旋藻生长的影响

Fig. 1 Effects of Se on the growth of *S. platensis*
 —○— 0.05mg/L —●— 0.0mg/L
 - - △ - - 499.42mg/L - - ○ - - 908.04mg/L
 - · - · 684.82mg/L

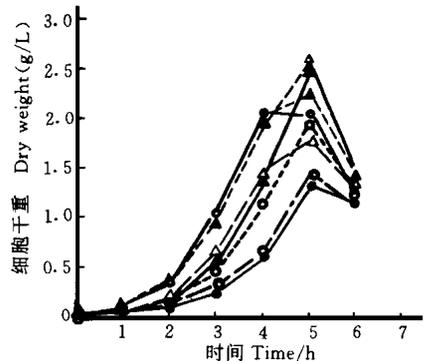


图 2 硒对钝顶螺旋藻生长的促进作用

Fig. 2 Stimulation of Se to the growth of *S. platensis*
 —○— 39.96mg/L - - ○ - - 410.89mg/L
 - - ▲ - - 17.12mg/L —●— 0.0mg/L
 - - △ - - 12.56mg/L —△— 104.3mg/L
 - - ○ - - 0.02mg/L —▲— 0.5mg/L

2.2 硒处理浓度范围的确定

在 25°C 、光强 $40 \times 10^3 \text{lx}$ 、接种量为 0.05g/L (d. w.) 的不同硒添加浓度下进行钝顶螺

螺旋藻分批培养, 结果如图 2 所示。在 $0.02\text{mg/L} < \text{Se(IV)} \leq 411.00\text{mg/L}$ 内 Na_2SeO_3 对螺旋藻生长有促进作用。研究还发现, 在温度 20°C 、光强 $10 \times 10^3\text{lx}$ 、接种量为 0.26g/L (d. w.) 螺旋藻非理想生长条件下, Na_2SeO_3 对螺旋藻生长的促进不明显, 但两种条件下得出的硒(IV) 浓度范围是基本一致的。

对应于图 2 的螺旋藻生长速率比较如图 3 所示。由图 3 结合图 2 可得出, 钝顶螺旋藻富硒培养的较佳浓度范围在 $10\text{mg/L} - 40\text{mg/L}$ 左右。在该浓度范围内, 硒不仅能显著加速钝顶螺旋藻的生长, 而且还能明显提高其生物量。

2.3 亚硫酸盐对高浓度硒毒性的缓解作用

在温度 35°C 、光强 $40 \times 10^3\text{lx}$ 、接种量为 0.30g/L (d. w.) 的条件下、 Na_2SeO_3 浓度为 542.15mg/L 时考察不同浓度 Na_2SO_3 的影响, 结果如图 4 所示。 Na_2SO_3 对高浓度 Se(IV) 的毒性会产生缓解作用, 并随着 Na_2SO_3 浓度的增加而变得较为明显。由于螺旋藻生长过程中藻液始终是碱性的, 因此排除了可能发生: $2\text{H}^+ + \text{Na}_2\text{SeO}_3 + 2\text{Na}_2\text{SO}_3 = \text{Se} + 2\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{Na}^+$ 反应, 而引起 Na_2SeO_3 浓度降低造成 Se(IV) 毒性缓解的可能。由于在其他条件相同时用 Na_2SO_4 代替 Na_2SO_3 没发现这种缓解现象, 由此可以认为, Na_2SO_3 对 Se(IV) 毒性的缓解作用与 Na_2SO_3 中 S(IV) 同 Na_2SeO_3 中 Se(IV) 之间存在一定的竞争有关。以上结果也从另一角度说明低硫(IV) 下硒(IV) 较易产生毒性。已有研究证实, 硫酸盐能抑制硒酸盐对某些微生物(如酵母)的毒性作用^[4]。与硒酸盐相比, 亚硒酸盐与硫化物之间的竞争性拮抗作用在此之前尚未被充分证实, 因此本结果具有一定理论价值。

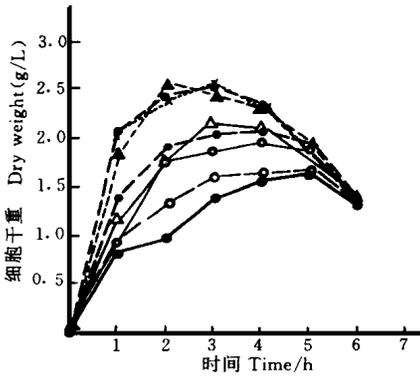


图 3 钝顶螺旋藻的比生长速率随时间变化曲线

—●— 0.0mg/L - - ○ - 410.89mg/L
 —○— 0.02mg/L - - ● - 0.5mg/L
 —△— 104.3mg/L - - ▲ - 12.56mg/L
 - - x - 17.12mg/L - - ● - 39.96mg/L

Fig. 3 Specific growth rates time curve of *S. platensis*

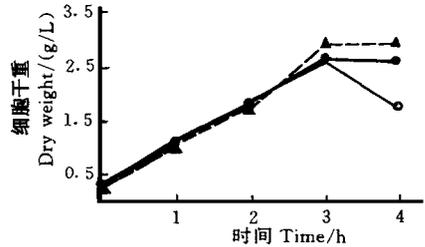


图 4 Na_2SO_3 对 Na_2SeO_3 毒性的影响

Fig. 4 Effect of Na_2SO_3 on Na_2SeO_3 toxicity

—▲— 参比 —●— 548.77mg/L —○— 1097.54mg/L

2.4 螺旋藻对硒的生物富集

相同于图 2 条件下, 于不同 Na_2SeO_3 添加浓度下进行钝顶螺旋藻的光自养分批培养, 第 5d 达最大细胞干重后收获, 按 1.2 方法进行处理和测定, 结果如图 5 中的系列 1 所示。

由图 5 可知,在一定 Na_2SeO_3 浓度范围内,钝顶螺旋藻对硒(IV)的生物富集会随着硒(IV)浓度增加而逐渐增加。如当培养基中硒浓度为 12.56mg/L 和 39.96mg/L 时,富硒培养的钝顶螺旋藻藻体中硒含量分别达 22.00mg/kg 和 35.50mg/kg,分别是非富硒培养时 0.16mg/kg 的 137.50 倍和 221.88 倍。

在 20°C 、 $10 \times 10^3\text{lx}$ 、接种量为 0.26g/L(d.w.) 生长条件下富硒培养钝顶螺旋藻(此时藻细胞生长比较缓慢,第 7d 才达最大细胞干重),藻体含硒量变化如图 5 系列 2。由图可见,系列 2 的钝顶螺旋藻中含硒量明显比系列 1 有所增加,如当硒处理浓度均为 39.96mg/L 时,系列 2 中钝顶螺旋藻的硒富集量可达 53.60mg/kg,是系列 1 时 35.50mg/kg 的 1.51 倍。由此可见,在相同硒浓度下,较缓慢生长的钝顶螺旋藻能更有效地生物富集硒。

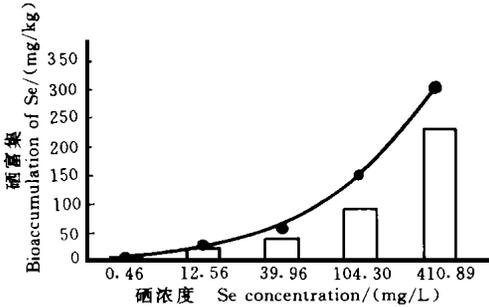


图 5 钝顶螺旋藻对硒的生物富集

Fig. 5 Bioaccumulation of Se in *S. platensis*

□ 系列 1 —●— 系列 2

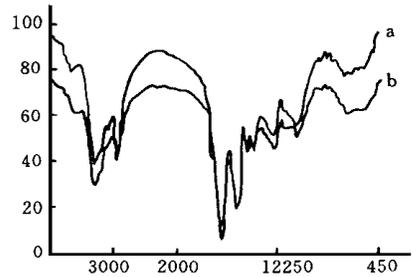


图 6 钝顶螺旋藻的红外吸收光谱

Fig. 6 IR spectrum of *S. platensis*

2.5 富硒培养对螺旋藻细胞分子官能团结构的影响

富硒培养(411.11mg/L)和非富硒培养的钝顶螺旋藻红外吸收光谱如图 6 所示(富硒培养为 Se(a)、非富硒培养为 Se(b))。图 6 表明,钝顶螺旋藻生物富集硒前后其细胞分子官能团结构并没有发生明显变化。

3 讨论

3.1 硒对螺旋藻生长影响及其生物富集机理的探讨

生物体内 GSH-PX 的活性中心是硒代半胱氨酸。由此作者认为,低浓度硒对螺旋藻生长的促进作用可能与其增加了谷胱甘肽过氧化物酶的活性以及硒的抗氧化性有关:硒在细胞内参与 GSH-PX 的合成,可在超氧化物歧化酶的协助下,有效地清除细胞内的活性氧自由基或其他过氧化物,从而增加细胞活力,延缓衰老,因此可促进螺旋藻的生长。

由于硒和硫性质相似,相当多情况下,硒在植物或微生物中的代谢基本上是沿着硫代谢的途径进行,即涉及相同的酶体系。现已基本达成的共识是硒往往是取代含硫氨基酸中的硫生成硒代氨基酸^[4],然后再被结合于蛋白质中。图 6 中非富硒培养时 628cm^{-1} 处 S-S 的吸收峰在富硒螺旋藻中消失,暗示了 Se 与 S 的某些取代信息;同时前面实验发现的 S(IV)与 Se(IV)之间的竞争性拮抗作用也从另一侧面证明了这一点。缓慢生长时螺

旋藻富硒效果比较快生长时更好,可能是较为缓慢的生长代谢过程更利于硒在藻体内的集聚。

对于高浓度硒(IV)对螺旋藻生长的抑制、甚至致死效应,作者认为这可能是硫与硒之间存在的一定差异所致。硒一旦过多取代蛋白质中半胱氨酸、胱氨酸或蛋氨酸中的硫,就有可能引起蛋白质空间结构和功能的明显改变,包括酶的失活,从而使正常生命活动紊乱,进而抑制藻细胞的生长。另一方面,有研究证明硒代谢过程中产生的硒化氢对细胞色素氧化酶也有强烈的抑制作用^[4]。

对于硒的这种双重作用,还有观点认为与活性氧形成的能力有关。硒化合物既可清除自由基,又能产生自由基。在较低浓度下可能以清除自由基为主要倾向,表现出有益的生理效应,即促进作用;而在高浓度下则以产生自由基(活性氧)为主,导致毒性作用^[4]。

除硒浓度这一因素外,硒对螺旋藻生长的影响还与藻种或生长条件等因素有关。如周志刚对于极大螺旋藻的研究结果发现当硒(IV)浓度超过60mg/L就有抑制作用^[9],而本实验条件下对于钝顶螺旋藻而言411.11mg/L的硒(IV)浓度下仍未对细胞生长产生抑制。前面研究已证实螺旋藻生长缓慢时硒的影响不明显;硒影响又与培养基中相应硫化物浓度水平有一定关系。

3.2 富硒螺旋藻的培养

与硒酸盐相比,亚硒酸盐具有较低的毒性和较快的吸收转化速率,因此宜作为螺旋藻富硒培养的硒源。虽然在一定浓度范围内,螺旋藻对硒的富集会随着硒浓度的增加而增加,但是对于螺旋藻的生长而言,较高浓度的硒又会对其生长产生抑制。考虑到硒(IV)浓度、螺旋藻生长及硒生物富集三者之间的关系,作者认为富硒螺旋藻培养较好的硒(IV)处理浓度范围应在10mg/L—40mg/L左右。

螺旋藻富硒培养,不仅可加速螺旋藻的生长、提高生物量,而且可制得富含微量活性元素硒的高附加值螺旋藻^[10],方便、高效,这对于改善目前较为低下的螺旋藻生产效率^[11],进一步提高螺旋藻自身的营养及医疗保健功能,增加其附加值,从而促进相关深加工产品的开发等都具有重要意义^[12]。

参考文献:

- [1] 杨逸萍. 硒在海洋浮游植物生化组分中的分布[J]. 海洋学报, 1994, (3): 143—148
- [2] Zhang G H Se Uptake and Accumulation in Marine Phytoplankton and Transfer of Se to the Clam *Puditapes Philippinarum*[J]. *Marine Environ. Res.*, 1990, **30**: 179—190
- [3] James R Pratt. Effect of Se on Microbial Communities in Laboratory Microcosms and Outdoor Streams[J]. *Toxic. Assess.* 1990, **5**: 293—307
- [4] 徐辉碧, 范华汉. 硒. 生命科学中的微量元素(第二版)[M]. 北京: 中国计量出版社. 1996: 620—668
- [5] 李志勇, 郭祀远, 李琳, 等. 富含微量元素的功能性食品[J]. 食品科技, 1997, (3): 12—14
- [6] 李志勇, 郭祀远, 李琳, 等. 功能性螺旋藻保健食品的研制与开发[J]. 粮食与饲料工业, 1997, (10): 37—39
- [7] Rejean Samson. Multistage Continuous Cultivation of Blue green Alga *Spirulina maxima* in the Flat Tank Photobioreactors with Recycle[J]. *Can. J. Chem. Eng.*, 1985, **63**: 105—112
- [8] 李志勇, 郭祀远, 李琳, 等. 鼓泡柱式光生物反应器培养螺旋藻的研究[J]. 食品工业科技, 1998, (5): 18—21
- [9] 周志刚. 硒对极大螺旋藻生长及含硒量的影响[J]. 海洋科学, 1997, (5): 42—45
- [10] 李志勇, 郭祀远. 高附加值微藻的高细胞密度培养[J]. 海湖盐与化工. 1999, (3): 7—10

- [11] 李志勇, 郭祀远, 李琳, 等. 螺旋藻的大规模工业化生产[J]. 海湖盐与化工. 1998, (1): 38—44
- [12] 李志勇, 郭祀远, 李琳, 等. 藻类对微量元素的生物富集及其应用[J]. 微生物学通报. 1997, (6): 368—369

A STUDY OF THE SE RICH CULTIVATION TECHNOLOGY OF *SPIRULINA PLATENSIS*

LI Zhiyong¹ GUO Siyuan² and LI Lin²

(1. College of Life Sciences, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240;

2. College of Food & Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract: In this paper, the cultivation of *Spirulina Platensis* was enhanced by Na_2SeO_3 addition in the medium. Some factors such as Se(IV) concentration, sulphite and Se bioaccumulation as well as its effect on the algal cell molecular functional group structure etc. were investigated in detail. In addition, the relevant mechanisms were discussed. It was found that Se(IV) had both stimulation & inhibition effects on the culture of *Spirulina platensis*. Within the concentration range of 0.02mg/L—411.00mg/L, Se(IV) not only can stimulate the growth speed of *Spirulina platensis*, but also can improve its biomass yield. Se bioaccumulation in *Spirulina platensis* will rise up with the increase of Se(IV) concentration and will benefit from the algal slow growth. The toxicity of higher concentration selenite on the growth of *Spirulina platensis* could be decreased by sulphite addition. There is no damage to the molecular functional group structure of *Spirulina platensis* during Se enrichment culture. On the basis of this study, the appropriate Se(IV) concentration range for *Spirulina platensis* cultivation is about 10mg/L—40mg/L.

Key words: *Spirulina platensis*; Se; Enhanced cultivation; Bioaccumulation