

水葫芦提取植物蛋白废液培养小球藻初步研究

吕富, 崔刚, 陈洪兴, 封功能, 余晓红

(盐城工学院 化学与生物工程学院, 江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室, 江苏 盐城 224051)

摘要:为提高小球藻培养的经济效益和高效资源化综合利用水葫芦,初步研究了水葫芦提取植物蛋白废液对小球藻生长、叶绿素和蛋白质含量的影响。研究表明,光照条件下,培养藻液中添加不超过6%体积的水葫芦废液,小球藻的生长速度及藻体叶绿素和蛋白质含量均随废液添加量的增加而提高,即使培养藻液中不添加任何营养元素而只添加1%~6%体积的废液,小球藻的生长速度及藻体叶绿素和蛋白质含量即可达到和超过基础营养液培养组的小球藻,说明水葫芦提取植物蛋白的废液可极大地提高小球藻培养的经济效益,甚至可完全替代营养盐的添加;但在无光条件下,添加废液对小球藻生长无效,说明未经处理的水葫芦废液尚不能作为小球藻异养培养的营养源。

关键词:小球藻;水葫芦;废液;培养

中图分类号:S963

文献标识码:A

文章编号:1671-5322(2012)01-0011-04

小球藻(*Chlorella vulgaris*)营养丰富,蛋白质含量一般占干重的50%左右,必需氨基酸含量丰富均衡,并且富含人体所需的多不饱和脂肪酸和各种维生素与矿物质元素,是人类理想的保健食品和营养源,其特有的多糖、糖蛋白和脂类等物质对多种疾病有良好的疗效,Tanaka等^[1]报道了小球藻的抗癌疗效,Yamaguchi^[2]报道了小球藻对贫血、高血压、糖尿病和营养不良等疾病的独特疗效,此外小球藻还广泛应用于水产养殖,主要作为水产动物饲料添加剂和苗种繁育的生物饵料。但目前小球藻培养所需的营养费用很高,为降低养殖成本,一些学者^[3-8]利用工农业废水和污泥培养小球藻,有效降低了培养成本,达到显著的环境效益和双重的经济效益。本研究采用水葫芦(*Eichhornia crassipes*)提取植物蛋白后的废液培养小球藻,以期小球藻的高效培养和水葫芦资源化综合利用提供理论指导。具体研究方法和结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基础营养液

采用改进后的湛水101号培养液作为实验基

础营养液,具体组成为每1 000 mL盐度20‰的消毒海水含 NaNO_3 0.04 g, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0.04 g, KH_2PO_4 0.01 g,1% $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.25 mL,维生素 B_1 200 μg ,维生素 B_{12} 200 ng。

1.1.2 水葫芦废液

水葫芦废液是将水葫芦打浆榨汁所得汁液加热至80℃持续10 min,然后静置8 h沉淀去除植物蛋白后的上清液,经测定其中干物质含量19.04 mg/mL,可溶性蛋白含量6.75 mg/mL。

1.1.3 藻种

实验所用小球藻由江苏省海洋研究所提供,在温度 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度4 000 lx连续光照条件下用基础营养液扩种培养至指数生长期。

1.2 方法

1.2.1 小球藻培养

根据培养基组成和光照与否,小球藻培养分为3种方式(I、II和III),I为基础培养液中接入藻种,II和III为盐度20‰的消毒海水中接入藻种,藻种接入量占培养总体积的25%,另外I和II培养过程中4 000 lx连续光照,III培养过程中遮光全暗。每种培养方式按废液添加量又分为6组,即水葫芦提取植物蛋白废液的添加量分别占培养总体积

收稿日期:2011-02-22

作者简介:吕富(1971-),男,江苏东台人,副教授,博士生,主要研究方向为水产养殖、苗种繁育和生物资源开发利用。

(对照)、0.5%、1%、2%、4%和6%,以上每组均设3个平行组,每个平行组培养总体积1 000 mL。3种方式均在温度(28±1)℃条件下培养10 d,期间每天分别于9:00、15:00和21:00各摇晃1次。

1.2.2 小球藻生长的测定

分别以基础培养液或20‰的消毒海水与相应比例的废液混合作为空白对照,使用 unico-2100 型分光光度计在400 nm波长下测定0(实验初始)、2、4、6、8和10 d时各组培养藻液的吸光度值 OD_{400} 。相对生长常数 $K = (\ln N_t - \ln N_0)/t$ (t 是培养时间, N_0 是培养初始时的 OD_{400} 值, N_t 是培养 t 时间后的 OD_{400} 值),倍增时间 $G = 0.301/K$ 。

1.2.3 小球藻叶绿素和蛋白质含量的测定

藻液培养10 d后,4 000 r/min离心5 min,获取藻泥后真空冷冻干燥,称取少量(0.020~0.040 g)藻粉加入80%的丙酮定容至10 mL避光抽提24 h取上清液分别在665 nm和649 nm波长下测定吸光光度值 OD_{665} 和 OD_{649} ,根据公式 $Chla = 13.7 OD_{665} - 5.76 OD_{649}$, $Chlb = 25.8 OD_{649} - 7.60 OD_{665}$ 计算10 mL溶液中叶绿素a和叶绿素b的含量再除以10 mL溶液中所含藻粉的质量即可算出每克藻粉中所含叶绿素a(Chla)和叶绿素b(Chlb)的质

量。称取少量(0.2~0.3 g)藻粉使用凯氏定氮法测定藻体粗蛋白(CP)含量。

2 结果与分析

2.1 水葫芦废液对小球藻生长的影响

水葫芦提取植物蛋白废液对小球藻生长的影响如表1所示,I和II中小球藻的生长速度随水葫芦废液添加量的增加而加快,小球藻的平均倍增时间则随废液添加量的增加而缩短,I中0.5%以下添加组从第8 d到第10 d的细胞密度变化不大,而1%~6%添加组培养至第8 d时,继续培养到第10 d时细胞密度仍提高很多;II中0%~4%添加组从第8 d继续培养到第10 d时细胞也几乎不增长,只有6%添加组继续培养仍不断增殖,另外0%和0.5%添加组培养期间藻细胞虽不断增多,但培养至第6 d时藻液逐渐变黄,表明这两组营养供应严重不足,藻细胞之所以仍能增长可能是依靠藻种细胞积聚的营养和藻种培养液带入的部分营养;比较I和II发现,相同废液添加组,I较II生长更快,但II中添加废液组均较I不添加废液组生长快,倍增时间短;III中各组只有前4 d有少许增殖,此后不增反降,藻体变黄沉淀。

表1 水葫芦废液对小球藻生长的影响

Table 1 Effect of Waste Solution of *Eichhornia crassipes* on the growth of *Chlorella vulgaris*

培养 方式	废液添 加量/%	OD_{400} 值						相对生长 常数 K	平均倍增 时间 G/d
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d		
I	0	0.344	0.944	1.255	1.472	1.637	1.638	0.156	1.929
	0.5	0.344	0.986	1.318	1.785	2.007	2.015	0.177	1.703
	1	0.344	1.016	1.326	1.865	2.051	2.232	0.187	1.610
	2	0.344	1.028	1.373	1.968	2.192	2.388	0.194	1.553
	4	0.344	1.043	1.493	1.984	2.483	2.669	0.205	1.469
	6	0.344	1.061	1.415	2.133	2.609	2.863	0.212	1.420
II	0	0.344	0.977	1.183	1.237	1.388	1.390	0.140	2.156
	0.5	0.344	0.994	1.377	1.574	1.694	1.702	0.160	1.883
	1	0.344	1.008	1.426	1.683	1.794	1.805	0.166	1.816
	2	0.344	1.057	1.458	1.729	1.974	2.006	0.176	1.707
	4	0.344	1.066	1.525	1.781	2.195	2.208	0.186	1.619
	6	0.344	1.125	1.578	1.859	2.317	2.613	0.203	1.485
III	0	0.344	0.358	0.373	0.339	0.325	0.276	-	-
	0.5	0.344	0.363	0.365	0.349	0.328	0.278	-	-
	1	0.344	0.375	0.373	0.351	0.337	0.283	-	-
	2	0.344	0.468	0.389	0.377	0.346	0.286	-	-
	4	0.344	0.644	0.431	0.384	0.344	0.295	-	-
	6	0.344	0.798	0.611	0.488	0.345	0.286	-	-

以上研究结果说明,小球藻指数生长期持续的时间长短与培养液中的营养含量和组成有很大关系,营养含量或组成不足会缩短指数生长时间,使藻类提前进入静止期,而适量添加水葫芦废液,不仅可促进小球藻的生长,延长小球藻的指数生长期,且可提高小球藻的培养密度,减少小球藻培养的营养成本和收获成本,甚至可完全替代营养盐的添加,大幅提高小球藻培养的经济效益,但未经处理的水葫芦废液尚不能作为小球藻异养培养的营养源。

2.2 水葫芦废液对小球藻叶绿素和蛋白质含量的影响

水葫芦提取植物蛋白废液对小球藻叶绿素和蛋白质含量的影响如表 2 所示, I 和 II 小球藻叶绿素和蛋白质含量均随水葫芦废液添加量的增加而提高,比较 I 和 II 发现,相同废液添加组, I 较 II 叶绿素和蛋白质含量更高,但 II 中 1% 以上废液添加组均较 I 中不添加废液组的叶绿素和蛋白质含量高,以上研究表明,水葫芦提取植物蛋白废液完全可满足小球藻的营养需求,非常适于小球藻

表 2 水葫芦废液对小球藻叶绿素和蛋白质含量的影响
Table 2 Effect of Waste Solution of *Eichhornia crassipes* on the chlorophyll and the protein content of *Chlorella vulgaris*

废液添加量/%	培养方式 I			培养方式 II		
	Chla/(mg · g ⁻¹)	Chlb/(mg · g ⁻¹)	CP/%	Chla/(mg · g ⁻¹)	Chlb/(mg · g ⁻¹)	CP/%
0	0.612 9	0.686 3	45.32	0.524 5	0.573 1	43.84
0.5	0.614 4	0.689 1	46.59	0.568 6	0.619 3	44.29
1	0.621 6	0.694 7	46.85	0.615 7	0.687 7	45.33
2	0.645 1	0.724 2	48.67	0.619 9	0.692 2	46.71
4	0.712 6	0.844 1	54.59	0.623 5	0.715 9	47.66
6	0.834 7	0.968 7	56.59	0.711 7	0.827 4	52.95

的兼养培养,培养液中适量添加水葫芦废液可提高小球藻的营养品质。

3 讨论

小球藻是一种适应能力非常强的普生性微藻,不仅可利用无机营养元素光合自养,而且可利用一些小分子有机物营兼养或异养生长繁殖。小球藻的这种营养特性现已开始广泛应用于工农业废水和污泥的净化,获得了显著的环境效益和双重的经济效益。如刘学铭等^[3]利用经过除菌体、石灰水沉淀除去硫酸根和调 pH 的味精废水添加适量有机碳异养培养小球藻,取得了非常好的培养效果;再如刘建强等^[8]利用未经处理的市政污水培养小球藻,经 10 d 培养,市政污水中氨氮(NH₄⁺ - N)、总磷(TP)和化学需氧量(COD)的去除率分别达到 50.0%、32.1% 和 26.0%,总悬浮固体(TSS)和挥发性悬浮固体(VSS)的日平均去除速率分别为 0.01 g/L 和 0.006 1 g/L,而小球藻总的生物质产量日均最大积累速率为 0.01 g/L,油脂含量为干质量的 18%,油脂的平均日产量为 0.001 g/L。本研究发现,培养液中适量添加水

葫芦提取植物蛋白废液,在光照条件下不仅可促进小球藻生长,延长指数生长的持续时间,提高小球藻培养密度,而且可提高小球藻的营养品质,但在无光条件下,添加废液未能促进小球藻生长,说明未经处理的水葫芦废液可供小球藻兼性营养,但尚不能作为小球藻异养培养的营养源。异养培养小球藻是大规模工业化生产小球藻的最可行方法,但培养成本高,需在自养培养基的基础上添加 10 ~ 40 g/L 的葡萄糖和其他一些营养成分^[9-10],因此,今后应对水葫芦提取植物蛋白的废液进行适当处理,如通过一些微生物的预处理,使其中的大分子有机氮和碳降解为小分子的有机氮和碳,以能够满足小球藻的异养培养所需。

4 小结

水葫芦废液可部分或全部替代营养盐供小球藻光合兼养,培养液中适量添加水葫芦废液,不仅可促进小球藻生长,而且可提高小球藻的培养密度和营养品质,但未经处理的水葫芦废液尚不能作为小球藻异养培养的营养源,今后应对水葫芦废液进行适当处理,以满足小球藻的异养培养所需。

参考文献:

- [1] Tanaka K, Konishi F, Himeno K, et al. Augmentation of anti-tumor resistance by a strain of unicellular green alga *Chlorella vulgaris*[J]. Cancer Immunol Immunother, 1984,17:90-94.
- [2] Yamaguchi K. Recent advanced in micro-algal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review[J]. Journal of Applied Phycology, 1997,8:487-502.
- [3] 刘学铭,余若黔,梁世中,等.味精废水异养培养小球藻的初步研究[J].环境污染与防治,1999,21(6):8-11.
- [4] Masil K, Naoto Y. Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM60[J]. Bio-resource Technology, 2008,99(3):575-582.
- [5] 叶林超,叶均安,徐国忠,等.动物蛋白酶解物与无机氮、磷的组合对小球藻(*Chlorella vulgaris*)生长与生化指标的影响[J].海洋与湖沼,2009,40(2):176-180.
- [6] 张聪,谢爽,孟范平.城市污水厂污泥替代营养盐培养海水小球藻的研究[J].环境工程学报,2010,4(5):186-190.
- [7] 王翠,李环,韦萍.沼液培养小球藻生产油脂的研究[J].环境工程学报,2010,4(8):1753-1758.
- [8] 刘建强,刘玉环,阮裕生,等.利用市政污水培养 *Chlorella vulgaris* 生产生物柴油[J].生物加工过程,2011,9(1):10-14.
- [9] 余若黔,刘学铭,梁世中,等.小球藻(*Chlorella vulgaris*)的异养生长特性研究[J].海洋通报,2000,19(3):57-62.
- [10] 吴正云,曲春波,史贤明.小球藻异养生长及叶黄素合成量影响因子的优化研究[J].上海交通大学学报:农业科学版,2007,25(1):6-11.

A Preliminary Study on the Culture of *Chlorella Vulgaris* with Waste Solution of *Eichhornia Crassipes*

LV Fu, CUI Gang, CHEN Hong-xing, FENG Gong-neng, YU Xiao-hong
(Yancheng Institute of Technology, Key laboratory of Aquaculture and Ecology of Coastal
Pool in Jiangsu Province, Yancheng Jiangsu 224051, China)

Abstract: In order to improve the economic benefits of *Chlorella vulgaris* culture and efficient utilization of *Eichhornia crassipes*, effect of waste solution of *Eichhornia crassipes* on the growth, the chlorophyll and the protein content of *Chlorella vulgaris* were studied preliminarily. The results showed that under light conditions, the growth, the chlorophyll and the protein content of *Chlorella vulgaris* increased with the increase of waste solution volume from 0% to 6%, and even if there is nothing but waste solution volume from 1% to 6% in the algae solution, the chlorella growth rate and chlorophyll and protein content could achieve or exceed the cultured in basic nutrient solution, which proved that the waste solution can greatly improve the economic benefits of chlorella culture, or even completely replace the nutrients; but without light conditions, it is invalid and can not act as nutrients source of heterotrophic.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; *Eichhornia crassipes*; Waste Solution; Culture

(责任编辑:沈建新)