

动物蛋白酶解物与无机氮、磷源的组合对小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长和生化指标的影响*

叶林超 叶均安 徐国忠 刘建新

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

提要 采用三因素不完全正交设计方法, 通过对细胞密度、干重、叶绿素和可溶性蛋白质含量的测定, 确定了 N、P 源与蛋白酶解物之间的最佳组合, 研究碳酸氢铵作为 N 源、磷酸二氢钠作为 P 源与动物蛋白酶解物之间的组合对小球藻生长和生化指标的影响。结果表明: (1) 动物蛋白酶解物与 N、P 源间存在互作效应——影响小球藻细胞密度、叶绿素的主要因素分别是 P 浓度、蛋白酶解物浓度; 而 N 浓度及蛋白酶解物浓度同时对小球藻的蛋白质含量起主要作用; (2) 同时添加 N 50mg/L、P 4mg/L、蛋白酶解物 12ml/L 能显著提高小球藻生物量, 促进叶绿素和藻体蛋白质的合成($P < 0.05$)。

关键词 蛋白酶解物, 氮源, 磷源, 小球藻

中图分类号 Q946

小球藻(*Chlorella vulgaris*)是一种普生型藻, 生长快, 营养丰富, 含有人体所需的 20 种氨基酸、多种维生素、小球藻多糖、以及亚麻酸、亚油酸等不饱和脂肪酸等营养成分。小球藻含有鱼类所需要的必需氨基酸及不饱和脂肪酸比其他单细胞藻高, 常作为轮虫、桡足类、枝角类等的强化培育饵料, 具有很高的经济价值, 又具有抗肿瘤、抗病毒、抗血栓及增强机体的免疫功能等药理作用(陈颖等, 1998)。对水产工作者来说, 如何提高小球藻生物量和体内活性物质一直是个重要的研究课题。然而, 目前对小球藻的研究还主要集中在无机氮源和磷源对小球藻生长的影响方面(刘学铭等, 1999; 沈颂东, 2003), 有关动物蛋白酶解物对小球藻生长的研究尤其对小球藻藻体蛋白含量的研究还很少。由于鱼类资源量大, 蛋白含量高, 其酶解物的作用近年来更受到了学者的广泛关注, 但大部分还只是对动物本身的直接作用(张晶等, 2006), 很少有对藻类的研究。本试验中研究了动物蛋白酶解物与无机氮源、磷源之间的不同组合对小球藻生长和生化指标的影响, 旨在为动物蛋白酶解物在藻类生长的研究提供方法, 也为小球藻的进一步大

规模有效生产和深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

1.1.1 小球藻 购自宁波大学藻种室, 编号为 nmluh015-2。

1.1.2 微量元素制剂 硫酸亚铁 7g, 硫酸锌 2g, 硫酸锰 3g, 硫酸铜 0.1g, 1%氯化钴 0.5g, 1%亚硒酸钠 0.5g。

1.1.3 蛋白酶解物的制取 取适量经绞碎的新鲜鱼虾, 1:1 加海水充分搅拌, 按 500:1 添加枯草杆菌酶(酶活力为 10 万 IU), 同时按 125:1 添加微量元素制剂, 密封置阴凉处 3 天, 离心取上清液。经实测上清液体干物质含量为 7.05%, 通过微量凯氏定氮法测定其干重的蛋白质含量为 70.09%。

1.2 试验设计

采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 设计见表 1。首先添加 N 质量浓度分别为 40、50、60mg/L 的碳酸氢铵作为氮源, 添加 P 质量浓度分别为 2、3、4mg/L 的磷酸二氢钠作为磷源(根据本课题组筛选出的小球藻最佳生长 N、

* 浙江省科技计划项目, 2005C22044 号。叶林超, 硕士, E-mail: yelinchao1982@163.com

通讯作者: 叶均安, 副教授, E-mail: yja@zju.edu.cn

收稿日期: 2007-11-12, 收修改稿日期: 2008-01-13

P 组合为 N 50mg/L、P 3mg/L), 同时分别添加 0、12、24ml/L 的蛋白酶解物进行正交组合, 通过对细胞密度、叶绿素、可溶性蛋白含量等生长生化指标的分析, 筛选出对小球藻生长效果较好的 N、P 与蛋白酶解物三者之间的最佳组合。共 9 个处理组, 每组设三个平行。

表 1 正交试验因素水平表 $L_9(3^4)$

Tab.1 Factor levels of the orthogonal factorization method for combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources

水平	因素		
	CP(ml/L)	N(mg/L)	P(mg/L)
1	0	40	2
2	12	50	3
3	24	60	4

注: CP 指蛋白酶解物, 下同

1.3 小球藻培养

购买市场上的“海水晶”配制人工海水, 比重为 1.022 ± 0.001 。使用 *f/2* 培养液(Guillard, 1975)(其中 N 源、P 源按本试验设计添加), 按 1 : 4 的比例将扩增培养到一定浓度并弃去原来培养液的藻种接种到经消毒处理的 250ml 锥形瓶中, 在智能光照培养箱内培养 9 天。温度为 (25 ± 1) , 光照强度为 (5000 ± 100) lx, L : D = 14h : 10h, pH 为 7.2 ± 0.1 , 静态培养, 每天定时摇 3 次。

1.4 测定指标和方法

1.4.1 生长指标 细胞密度 ($\times 10^5$ cells/ml): 每天定时取 0.2ml 藻液, 加 4ml 蒸馏水稀释摇匀, 用血球计数板在显微镜(400 倍)下计数。

比生长速率(k): $k = (\ln N_t - \ln N_0) / T$, 其中 N_t 和 N_0 分别为经过 T 天后细胞密度和初始细胞密度。

干物质重: 取适量藻样经离心后取藻沉淀于 105 下烘干至恒重。

1.4.2 生化指标 单位体积叶绿素: 每天定时取 2 ml 藻液于离心管中, 4000r/min 离心 5min, 弃去上清液, 加入 3ml 80%丙酮, 用超声波细胞破碎仪完全破碎藻细胞, 然后分别在 645nm 和 663nm 处测吸收波长。计算公式为叶绿素浓度(mg/L) = $(20.2 \times OD_{645} + 8.02 \times OD_{663}) \times$ 稀释倍数(Becker, 1994)。

可溶性蛋白质含量(李建武等, 1994) ($\mu\text{g/ml}$): 取超声波破碎后的小球藻上清液 0.1 ml, 加 5ml 考马斯亮蓝溶液混匀, 马上用紫外分光光度计在 595nm 处比色, 以零浓度溶液为参比, 测得标准曲线斜率为 y

$= 0.0074x - 0.0021, R^2 = 0.9869$ 。

1.5 数据分析

采用 SAS 软件和 Excel 方差分析。

2 结果与分析

2.1 对小球藻生长指标的影响

由图 1 和图 2 可以看出, 第四组(N 50mg/L、P 4 mg/L、CP 12ml/L)和第五组(N 40mg/L、P 3mg/L、CP 12ml/L), 小球藻的细胞密度以及比生长速率都明显好于其它处理组, 这两组的无机 N/P 比例分别为 12.5 和 13.3。结果显示, 第五组中小球藻在前 5 天呈显著的快速生长, 对于养殖生产来说, 这一优势对快速改变水体透明度、抑制养殖塘中大型藻类的生长具有重要意义。各组第 6 天后生长开始减缓, 可能与培养液中营养成分的消耗有关, 此时的细胞基本上处于生长的平衡期。

从生长速率来看, 添加蛋白酶解物组在第 1 天就

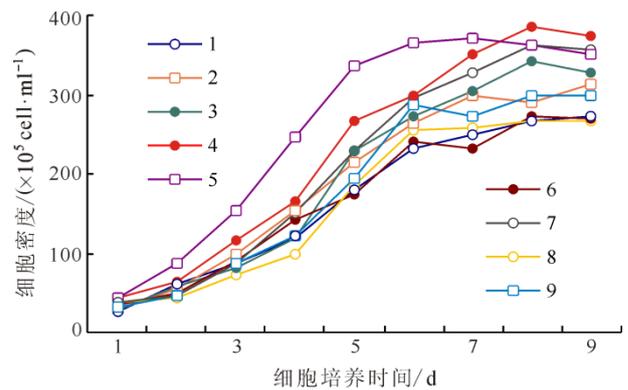


图 1 蛋白酶解物与 N、P 源组合对小球藻细胞密度的影响
Fig.1 Effect of combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources on the biomass of *C. vulgaris*

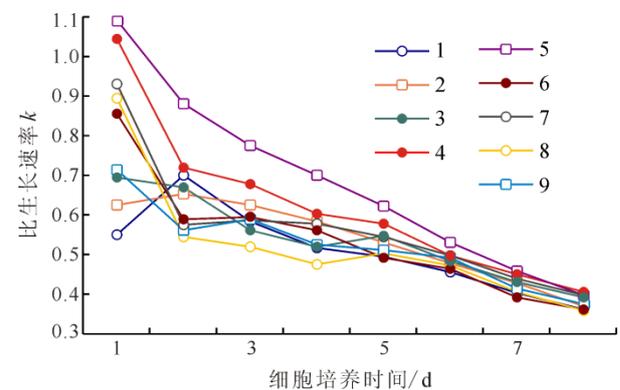


图 2 蛋白酶解物与 N、P 源组合对小球藻生长速率的影响
Fig.2 Effect of combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources on the growth rate of *C. vulgaris*

呈最大值,之后呈下降趋势,而未添加组趋势较平稳,总体上生长要慢于添加组。总的来看,生长速率曲线没有呈现低高低的抛物线形式,可能与接种细胞密度与培养液的体积比有关。

由表 3 可知,第五组在小球藻培养过程中其干重含量都明显大于其它各组($P < 0.05$),基本上与细胞密度指标反映的结果一致。

2.2 对小球藻生化指标的影响

由表 2 可知,添加蛋白酶解物后小球藻的叶绿素含量明显高于未添加组,添加浓度以 12ml/L 为佳,其中第四组和第五组效果最明显,而第六组(N 60 mg/L、P 2mg/L、CP 12ml/L)效果较差,可能与其无机 N/P 比例太大有关。结果还表明,添加蛋白酶解物浓度为 24ml/L 后小球藻生长反而减慢,其中第七组相对来说对小球藻生长效果较好,可能因为无机 N/P 比为 10,而其它两组(第八、九组)N/P 比例都比较大,分别为 20 和 25。说明了小球藻的生长可能与无机 N/P 比有关。总的来看,第五组效果最佳,在第 9 天叶绿素含量达到最大值 12.25mg/L。

表 2 蛋白酶解物与 N、P 源组合对小球藻总叶绿素含量的影响

Tab.2 Effect of combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources on the chlorophyll content of *C. vulgaris*

组别	叶绿素含量(mg/L)				
	1 天	3 天	5 天	7 天	9 天
1	0.57	1.93	3.06	4.74	5.43
2	0.83	2.20	3.63	4.61	6.39
3	0.50	2.49	4.23	6.55	8.38
4	0.98	4.16	7.86	10.94	11.66
5	0.94	4.00	8.86	11.54	12.25
6	0.97	3.40	6.36	9.87	10.07
7	0.99	3.64	7.81	10.59	11.18
8	0.90	2.99	6.04	9.74	10.11
9	0.92	2.93	6.05	10.21	10.93

从蛋白含量来看(表 3),也是第四组和第五组值最大,分别从第三天的 65.07 μ g/ml、67.09 μ g/ml 上升到第九天的 83.31 μ g/ml、85.34 μ g/ml,但是蛋白质占干重的百分比却分别由第三天的 4.97%、3.93%下降到第九天的 4.72%、3.71%。可能细胞生长过程中产生更多的其它营养物质有关。据杨海波等(2004)报道,胞内总糖是一种重要的代谢产物,主要产生于细胞生长的平衡期,小球藻在第 9 天总糖含量达到最高值 135mg/g 干重。总的来看,对小球藻生化指标促进作

用最明显的应该是第五组。

表 3 蛋白酶解物与 N、P 源组合对小球藻干重和蛋白质含量的影响

Tab.3 Effect of combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources on the dry matter and protein content of *C. vulgaris*

组别	干重(mg/ml)		蛋白质含量(μ g/ml)	
	3 天	9 天	3 天	9 天
1	0.49	0.98	61.01	67.09
2	0.53	1.02	61.01	69.12
3	0.57	1.13	63.04	73.18
4	1.31	2.12	65.07	83.31
5	1.42	2.30	67.09	85.34
6	0.63	1.51	65.07	71.15
7	1.01	1.79	63.04	77.23
8	0.67	1.51	65.07	67.09
9	0.92	1.66	63.04	71.15

2.3 蛋白酶解物与 N、P 源的互作效应

取培养到第 9 天后的小球藻,根据细胞密度、叶绿素和可溶性蛋白含量指标,作正交分析,见表 4。

从表 4 可以看出,影响小球藻细胞密度的主要因素是 P 浓度,可能因为培养液中添加的 N 充足(蛋白酶解物为有机氮,碳酸氢铵为无机氮),意味着 P 的限制;影响叶绿素的主要因素为蛋白酶解物浓度,可能与其中含有机碳等成分有关;影响小球藻蛋白含量的主要因素是添加的 N 浓度和蛋白酶解物浓度,原因可能是高 N/P 比与藻蛋白合成有关。而最佳的组合是 CP 12ml/L、N 40mg/L、P 4mg/L,由于此组合并未出现在本试验设计中,经后来验证试验,结果与本试验中第五组结果接近,所以选择第五组即 CP12 ml/L、N 50mg/L、P 4mg/L 为最佳组合。

3 讨论

3.1 N/P 比、蛋白酶解物对小球藻生长的影响

3.1.1 N/P 对小球藻生长的影响 小球藻(*Chlorella* spp.)属于绿藻门、绿藻纲、绿球藻目、卵孢藻科、小球藻属,是现代微藻生物技术领域的重要研究对象(胡开辉等,2005)。试验表明,无机 N/P 比例在 10—15 之间比较合适,大于 20 则对藻的生长不利。Redfield(1958)提出,海水中平均 N、P 原子比是 15:1,浮游植物在生长时 N 和 P 也以 15:1 的比例被吸收。但 Rhee(1978)、Hecky 等(1988)等国外学者的研究表明,不同的浮游植物有适合各自生长的最适 N/P 比,如中肋骨条藻的最适 N/P 比是 12:1。由于试

表 4 蛋白酶解物与 N、P 源组合的正交试验结果分析表

Tab.4 Results of the orthogonal factorization method for the combination of protein enzymatic hydrolysis, N and P sources

组别	因素			指标		
	CP	N	P	细胞密度	叶绿素	蛋白质
1	1	1	1	273.3	5.43	67.09
2	1	2	2	314.0	6.39	69.12
3	1	3	3	328.0	8.38	73.18
4	2	1	2	374.7	12.25	83.31
5	2	2	3	351.3	11.66	85.34
6	2	3	1	270.7	10.07	71.15
7	3	1	3	357.3	11.18	77.23
8	3	2	1	266.7	10.11	67.09
9	3	3	2	300.0	10.93	71.15
细	x_1	305.1 ^B	335.1 ^A	270.2 ^C		
胞	x_2	332.2 ^A	310.7 ^B	329.6 ^B		
密	x_3	308.0 ^B	299.6 ^C	345.6 ^A		
度	R	27.1	35.5	75.4		
叶	x_1	6.7 ^C	9.8 ^A	8.5 ^C		
绿	x_2	11.3 ^A	9.4 ^C	9.9 ^B		
素	x_3	10.7 ^B	9.6 ^B	10.4 ^A		
	R	4.6	0.40	1.90		
蛋	x_1	69.8 ^C	75.9 ^A	68.5 ^C		
白	x_2	79.9 ^A	73.9 ^B	74.5 ^B		
质	x_3	71.8 ^B	71.8 ^C	78.6 ^A		
	R	10.1	4.1	10.1		

注: 同列不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

验添加的蛋白酶解物中含有机氮(54.0 mg/L), 所以总 N/P 比较大, 在正交分析中, P 对小球藻的生长起到决定作用。Rhee(1978)、Darley(1982)也认为 N/P 比大于 30 则为磷限制。

3.1.2 蛋白酶解物对小球藻生长的影响 实际水产养殖中, 大部分低值鱼类只是被简单加工成经济效益极低的饲料鱼粉, 由于加工和回收手段落后, 产品使用价值低, 并造成大量营养成分流失, 资源浪费严重, 且污染环境。因此, 如何提高低值鱼类的利用价值具有重大的经济效益和环保意义。动物蛋白酶解物主要是一些小分子肽, 据冯俊荣等(2004)、高雯(1991)报道, 饲料中添加适量的小肽可以提高矿物质的利用率、促进体内蛋白质合成。大量研究表明, 以小肽形式作为氮源时, 整体蛋白质沉积高于相应的游离氨基酸日粮或完整蛋白质日粮(Infante, 1992; 乐国伟等, 1998)。何建军等(1994)报道, 鱼蛋白经酶降解后, 功能和品质可以得到提高。蛋白含量可以高达 85.1%, 必需氨基酸占总氨基酸的 40%(熊光权等,

1992)。试验结果表明, 添加 12 ml/L 的蛋白酶解物能显著提高小球藻的生物量($P < 0.05$), 当浓度为 24 ml/L 时其生长减缓。

3.2 N/P 比、蛋白酶解物对小球藻生化指标的影响

小球藻的粗蛋白含量可达 50% 以上, 必需氨基酸比例平衡, 同时其脂肪、糖类和粗纤维含量都很低, 是作为蛋白质补充饲料的理想选择(韦进钟, 2004)。氮是蛋白质、核酸的主要成分, 也是组成叶绿素的元素。刘学铭等(1999)报道, 在氮源丰富的情况下可将外界氮源合成叶绿素, 但有机碳源是形成叶绿体的抑制因子。王丽卿等(2002)报道, 在高氮磷的营养水平下培养的微绿球藻蛋白含量较高。所以只有添加适量的动物蛋白酶解物, 才能促进小球藻正常生长。试验结果表明, 添加 12 ml/L 的蛋白酶解物对小球藻叶绿素和可溶性蛋白含量产生最佳的效果。

4 结语

试验表明, 动物蛋白酶解物与 N、P 源之间存在

一定的互作效应,所以实际生产中必须考虑最佳的组合,添加最适的浓度才能充分发挥效应,促进小球藻正常快速生长和营养成分的积累。试验从 N/P 比角度来分析影响小球藻生长和生化指标存在一定缺陷,对于动物蛋白酶解液中的微量金属元素或小分子的氨基酸、肽等物质可能存在的影响机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- 王丽卿,黄旭雄,2002.不同营养盐浓度下微绿球藻的生长及水体中氮磷的变化.上海水产大学学报,11(3):215—218
- 韦进钟,2004.小球藻的营养价值及其开发利用简述.畜牧兽医科技信息,8:12—13
- 乐国伟,施用晖,1998.酶解酪蛋白与相应氨基酸混合物对雏鸡组织蛋白质合成的影响.畜牧兽医学报,29(1):10—16
- 冯俊荣,李秉钧,2004.合理进行营养调控缓解养殖水体富营养化.齐鲁渔业,21(10):3—6
- 刘学铭,王菊芳,余若黔等,1999.不同氮水平下异养小球藻生物量和叶绿素含量的变化.植物生理学通讯,35(3):198—201
- 李建武,萧能,余瑞元等,1994.生物化学实验原理和方法.北京:北京大学出版社,80—95
- 杨海波,于媛,刘艳等,2004.营养元素对小球藻生长及胞内蛋白质和多糖含量的影响.水产科学,23(1):6—9
- 何建军,张弘,1994.低盐液化鱼蛋白粉的研究.食品工业,5:50
- 沈颂东,2003.氮素对小球藻生长的影响.水利渔业,23(2):55—57
- 张晶,单安山,李牧等,2006.蛋白酶解物对早期断奶仔猪肠黏膜形态和生长性能的影响.动物营养学报,18(2):122—125
- 陈颖,李文彬,孙勇如,1998.小球藻生物技术研究应用现状及展望.生物工程进展,18(6):12—16
- 胡开辉,汪世华,2005.小球藻的研究开发进展.武汉工业学院学报,24(3):27—30
- 高雯,1991.食品酶学原理与分析方法.哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,350—356
- 熊光权,张弘,1992.低值淡水鱼的酶法水解.中国水产,8:37
- Becker E W, 1994. Microalgal Biotechnology & Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 56—62
- Darley W M, 1982. Algal Biology: A Physiological Approach. Oxford London: Black-well Scientific Publication, 168
- Guillard R L, 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith W L, Chanley M H ed. Culture of Marine Invertebrate Animal, Plenum: New York Press, 29—60
- Hecky R E, Kilham P, 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments. A review of recent evidence on the effects of enrichment. Limnology and Oceanography, 33(4): 796—822
- Infante J L Z, 1992. Nutritional rehabilitation of malnourished Fats by tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response. Journal of Nutritional Biochemistry, 3: 285—290
- Rhee G Y, 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. Limnol Oceanogr, 23: 10—25
- Redfield A C, 1958. The biological control of chemical factors in the environment. Am Sci, 46: 205—222

ANIMAL PROTEIN ENZYMATIC HYDROLYSIS, N, AND P SOURCES: COMBINATION EFFECT ON GROWTH AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *CHLORELLA VULGARIS*

YE Lin-Chao, YE Jun-An, XU Guo-Zhong, LIU Jian-Xin
(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310029)

Abstract The effects of different combinations of animal protein enzymatic hydrolysis and N (NH_4HCO_3), P (NaH_2PO_4) on growth and biochemical parameters of *Chlorella vulgaris* are studied. The optimal combinations were determined by the index of biomass, chlorophyll content and protein content by orthogonal design test. The results show that: (1) Interaction occurred among protein enzymatic hydrolysis, N, and P sources. The influencing factors on the biomass were P concentration and protein enzymatic hydrolysis, and those on the protein content of *C. vulgaris* was the combination of protein enzymatic hydrolysis and N concentration. (2) The optimal combination conditions ($P < 0.05$) to increase the biomass, chlorophyll content and protein content of *C. vulgaris* are: N concentration at 50mg/L, P at 4mg/L, and protein enzymatic hydrolysis at 12ml/L.

Key words Protein enzymatic hydrolysis, Nitrogen resource, Phosphorus resource, *Chlorella vulgaris*