

文章编号:1673-1689(2009)04-0569-04

太湖蓝藻培养单细胞蛋白的可行性

李克朗, 张玲, 刘洋, 丁明波, 王武, 杨海麟*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:以蓝藻原料为氮源发酵生产酵母单细胞蛋白,考察了碳源、维生素、微量元素、矿物质元素、培养温度、接种量、初始 pH、通气量等对酵母产量的影响,优化了发酵条件,1 g/dL(干重)的蓝藻培养基最终使酵母产量达到 6.2 g/L,并利用高效液相色谱法检测酵母产物胞内微囊藻毒素。结果表明,酵母中微囊藻毒素含量为 390 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词:太湖蓝藻;单细胞蛋白;微囊藻毒素

中图分类号:X 703;TQ 926.3

文献标识码:A

Study on the Single-Cell Protein Production by Taihu Cyanobacteria

LI Ke-lang, ZHANG Ling, LIU Yang, DING Ming-bo, WANG Wu, YANG Hai-lin*

(Key Laboratory of Industry Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:In this manuscript, the single-cell protein production with cyanobacteria resources as nitrogen source was investigated. With combination of the optimum nutritional and environmental conditions, 6.2 g/L yeast was achieved and 390 $\mu\text{g}/\text{kg}$ microcystin in it.

Key words: Taihu Cyanobacteria, single-cell protein, microcystin

蓝藻(Cyanobacteria)是一类进化历史悠久、革兰氏阴性、无鞭毛、含叶绿素 a、不形成叶绿体、能进行产氧性光合作用的原核生物,蓝藻中微囊藻(Microcystis)、鱼腥藻(Anabaena)、颤藻(Oscillatoria)和念珠藻(Nostoc)含有微囊藻毒素(Microcystin, MC),微囊藻毒素是一组环状七肽,有 60 多种异构体,其中含量较高的是 MC-LR, MC-RR 型毒素^[1]。近些年随着大量污染物流入太湖,太湖蓝藻爆发频繁^[2]。大量蓝藻打捞上来后,由于无锡土地资源有限,蓝藻处置较困难,利用蓝藻发酵生产沼气利用率较低,而焚烧蓝藻成本较高,且污染环境。而蓝藻有机物质含量很丰富,其中含有质量分数 50% 的粗蛋白、5%~15% 的藻蓝蛋白、40% 的藻多糖^[3],故可以蓝藻为主要原料发酵生产酵母单细胞蛋白,

得到的单细胞蛋白产物可作为蛋白类资源应用于饲料领域,从而达到将蓝藻变废为宝、保护环境的目的。研究中以太湖蓝藻为主要发酵原料,发酵生产酵母单细胞蛋白,优化了发酵工艺条件,获得较高的酵母产量;并利用反相高效液相色谱法检测了酵母产物的胞内微囊藻毒素含量。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

主要原料:太湖蓝藻。

菌种:酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G-05,作者所在实验室保存。

1.2 培养基

斜面活化培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖

收稿日期:2008-09-24

基金项目:江苏省太湖专项科技攻关项目(BS2007099)。

* 通讯作者:杨海麟(1971-),男,江苏无锡人,工学博士,副教授,主要从事发酵工程的研究。Email:19891996@sina.com

20,琼脂 20;自然 pH。摇瓶种子培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20;自然 pH。摇瓶发酵培养基(g/L):蓝藻 10(干重)。

维生素母液(g/L):维生素 B₁ 1,烟酸 0.4,吡哆醇 0.4,生物素 0.02,泛酸钙 2,核黄素 0.2,肌醇 1,对氨基苯甲酸 0.2。微量元素母液(g/L):H₃BO₄ 0.5,Mn₂SO₄·7H₂O 0.2,Zn₂SO₄·7H₂O 0.4,Cu₂SO₄·5H₂O 0.04,FeCl₃·6H₂O 0.1,Na₂MnO₄ 0.2。矿物质元素母液(g/L):KI 0.000 1,CaCl₂·2H₂O 0.000 1,K₂HPO₄ 0.15,KH₂PO₄ 0.85,Mg₂SO₄·7H₂O 0.5,NaCl 0.1;详见文献[4-5]。

1.3 方法

1.3.1 培养方法 将菌种移接到斜面活化培养基上,30℃下活化24h后接1环于摇瓶种子培养基中,在30℃下振荡培养约14h,然后按体积分数10%接种量接入装有100mL发酵培养基的500mL的三角瓶中,在30℃下振荡培养48h,摇床转速为180r/min。

1.3.2 细胞生物量测定 发酵液转入离心管,以3000r/min离心10min,自来水水洗两次,去上清液得湿菌体;将湿菌体烘干至恒重,电子天平称重。

1.3.3 还原糖和pH值的测定 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖^[6];pH计测定pH值。

1.3.4 蓝藻的预处理 对太湖打捞上来的2g/dL(干重)蓝藻先进行30min沉降处理,使蓝藻中泥沙沉降下来,再经纱布过滤,除去蓝藻中树叶等杂质。

1.3.5 蓝藻细胞破壁 配制1g/dL(干重)的蓝藻,在121℃处理10min。

1.3.6 酵母胞内微囊藻毒素提取 酵母在优化后的1g/dL(干重)的蓝藻培养基中培养,最终酵母产量为6.2g/L,取2L发酵液,在5000r/min的条件下离心10min,弃上清液,取酵母,将酵母用100倍的水稀释离心10次,以洗去酵母胞外微囊藻毒素,从12.4g酵母中取出10g酵母,加水500mL,在50kHz、200W的条件下超声破碎10min,之后按5%的体积比例加入冰乙酸,在冰水浴下搅拌抽提60min,在5000r/min离心10min,收集上层清液,离心后沉淀再抽提两次(条件同前),合并上清液并经0.45μm滤膜抽滤。

1.3.7 酵母胞内微囊藻毒素检测 高效液相色谱法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 培养基优化

2.1.1 添加碳源对发酵的影响 从太湖打捞出的万方数据

蓝藻质量浓度为2g/dL(干重),经高温破壁将其做成培养基,该培养基呈胶体状态,其中溶氧较困难,故将其稀释到1g/dL后进行培养基优化。蓝藻中碳氮质量比5.5/1,而酵母生长所需碳氮质量比为11.4/1^[8],故可在1g/dL(干重)蓝藻培养基加0.9g葡萄糖以调整碳氮质量比。1g/dL的蓝藻培养基残糖含量为0.26g,发酵12h后为0.172g,发酵16h残糖为0.075g,发酵20h为0.069g,发酵24h为0.057g。故可在培养20h后添加葡萄糖,葡萄糖添加量分别为0、2、4、6g/dL,此时培养条件为,温度30℃,摇床转速200r/min,500mL容器装液量为50mL,pH为6,接种量为体积分数10%。由图1可知,添加4g/dL的葡萄糖,酵母生物量最高,培养36h时酵母细胞量最高可达3.8g/L,此时残糖为0.169g,葡萄糖仍有残留,培养基可能还缺乏其它营养物质,可对其作进一步优化。过量添加葡萄糖可能产生抑制作用。

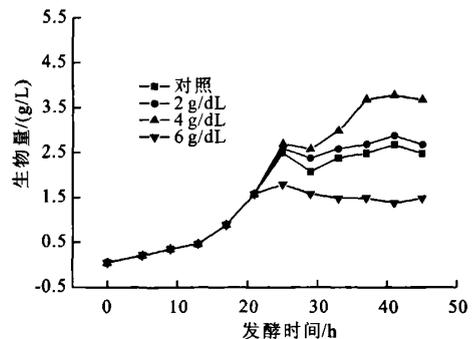


图1 葡萄糖对酵母生长的影响

Fig. 1 Effect of glucose on biomass of G-05

2.1.2 添加维生素、微量元素及矿物质元素对发酵的影响 在碳源优化的基础上,在培养基中添加维生素母液、微量元素母液及矿物质元素母液,考察其对发酵的影响,结果表明发酵36h酵母产量均达最大,结果见表1、2、3。由表可知,添加维生素母液1%(体积分数)可明显提高生物量,培养36h后,酵母产量达到5g/L,而添加微量元素及矿物质元素对酵母生物量无明显影响。

表1 不同维生素母液添加量对酵母生物量的影响

Tab. 1 Effect of different vitamin liquor concentration on biomass of G-05

维生素母液 体积分数/%	生物量/(g/L)
0.5	3.9
1	5.0
1.5	5.1

表 2 不同微量元素母液添加量对酵母生物量的影响

Tab. 2 Effect of different trace elements liquor concentration on biomass of G-05

微量元素母液 体积分数/%	生物量/(g/L)
0.5	3.8
1	3.9
1.5	3.78

表 3 不同矿物质母液添加量对酵母生物量的影响

Tab. 3 Effect of different minerals liquor concentration on biomass of G-05

矿物质母液 体积分数/%	生物量/ (g/L)
5	3.8
10	3.9
15	3.78

2.2 培养条件优化

2.2.1 发酵最适温度、培养基最适 pH 值及接种量的确定 在培养基优化的基础上,考察发酵温度、培养基初始 pH 值及接种量对发酵结果的影响,结果见表 4、5、6。

表 4 温度对酵母生物量的影响

Tab. 4 Effect of temperature on biomass of G-05

温度/℃	生物量/(g/L)
26	5.05
28	5.50
30	4.96

表 5 pH 值对酵母生物量的影响

Tab. 5 Effect of pH on biomass of G-05

pH	生物量/(g/L)
4	4.30
5	4.45
6	5.52
7	5.00

表 6 不同接种量对酵母生物量的影响

Tab. 6 Effect of inoculation on biomass of G-05

接种量(体积分数)/%	生物量/(g/L)
5	4.55
10	5.52
15	6.00
20	4.80

从表中可见,发酵最适温度为 28 ℃,最适培养基初始 pH 值为 6,最佳接种量为体积分数 15%。

2.2.2 发酵液中通气量对酵母生物量的影响 酵母是耗氧发酵菌种,溶解氧对酵母生物量有较大影响。通过改变 500 mL 的三角瓶装液量和摇瓶转速来考察通气量对菌体量的影响。选择 500 mL 的三角瓶装液量为 15、25、50、75、100 mL,摇床转速为 200 r/min 进行实验。

结果见图 2,500 mL 的三角瓶装液量为 25 mL 产量最高,培养 36 h 时酵母细胞量最高可达 6.2 g/L。

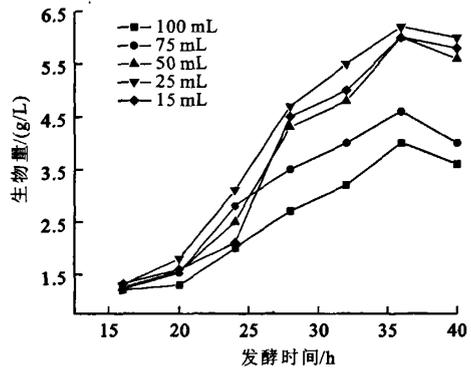


图 2 通气量对酵母生长的影响

Fig. 2 Effect of air on biomass of G-05

2.3 高效液相色谱法检测酵母胞内微囊藻毒素

2.3.1 微囊藻毒素 MC-LR 和 MC-RR 型标准工作曲线的绘制及线性分析 对系列质量浓度标准样品(0.1、0.25、0.5、1.0、2.5 μg/mL)及酵母样品毒素进样分析,酵母样品毒素色谱图如图 3 所示。对 MC-LR 和 MC-RR 分别进行标准工作曲线的绘制及线性分析,它们的标准曲线分别如图 4、图 5 所示。测得 MC-LR 型毒素和 MC-RR 型毒素标准曲线分别为: $y = 47.69x$, $R^2 = 0.9997$; $y = 28.181x - 0.5716$, $R^2 = 0.9996$ 。

2.3.2 酵母样品毒素检测 由图可计算得知,MC-LR 峰面积为 100.149 mAU·s, MC-RR 峰面积为 50.1542 mAU·s,故 10 g 酵母样品 MC-LR 毒素含量为 2.1 μg, MC-RR 毒素含量为 1.8 μg,共计 3.9 μg,故每千克酵母含 390 μg 微囊藻毒素,参照饮用水毒素质量浓度 ≤ 1 μg/L 安全标准^[9-10],可将酵母毒素安全标准定为 1 μg/kg,与该标准相比实验所得酵母毒素含量超出安全标准 390 倍。酵母中毒素的去除需做进一步研究。

3 结 语

通过实验研究初步确定酿酒酵母 G-05 利用

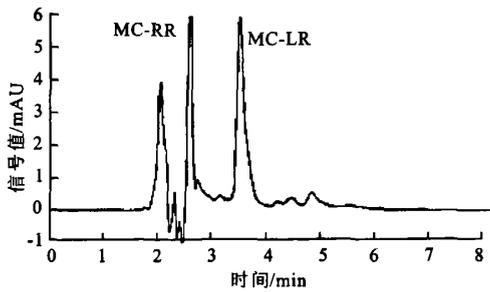


图3 酵母胞内藻毒素 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of microcystin of yeast cells

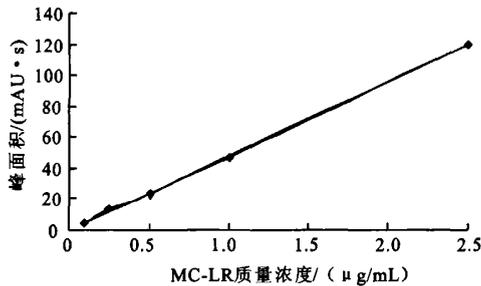


图4 MC-LR型藻毒素质量浓度与吸收峰面积的关系

Fig. 4 Relationship between MC-LR concentration and absorb area

1 g/dL的蓝藻产单细胞蛋白的摇瓶培养基组成和培养条件为:4 g/dL 葡萄糖、体积分数1%维生素母液, 28 ℃、摇瓶转速 200 r/min、500 mL 的三角瓶

参考文献(References):

- [1] 韩志国, 武宝干, 郑解生, 等. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展[J]. 暨南大学学报, 2001, 22(3): 129-135.
HAN Zhi-guo, WU Bao-gan, ZHENG Jie-sheng, et al. Advances research on cyanobacterial toxins in freshwater bodies (A review)[J]. *Journal of Jinan University*, 2001, 22(3): 129-135. (in Chinese)
- [2] 汪之和, 施文正. 蓝藻的综合开发利用[J]. 渔业现代化, 2003(2): 32-33.
WANG Zhi-he, SHI Wen-zheng. Comprehensive development and utilization of algae[J]. *Fisheries Modernization*, 2003 (2): 32-33. (in Chinese)
- [3] 范良民. 滇池蓝藻成分分析及利用途径探讨[J]. 云南环境科学, 1999, 18(2): 46-47.
FAN Liang-min, On contents of blue algae in dianchi lake and its utilization[J]. *Yunnan Environmental Science*, 1999, 18 (2): 46-47. (in Chinese)
- [4] 于景芝. 酵母生产及应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 100-101.
- [5] Greasham R L, Herber W K. Design and optimization of growth media[M]. *Applied Microbial Physiology*. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [7] 虞锐鹏, 戴军. 反相高效液相色谱法测定蓝藻中的微囊藻毒素[J]. 分析科学学报, 2005, 21(6): 613-615.
YU Rui-peng, DAI Jun. Determination of microcystins in cyanobacteria by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Analytical Science*, 2005, 21(6): 613-615. (in Chinese)
- [8] 伦世仪. 生化工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993: 166-167.
- [9] 生活饮用水卫生规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2001.
- [10] SHENG Jian-wu, HE Miao, SHI Han-chang. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 572: 309-315.

(责任编辑: 秦和平)

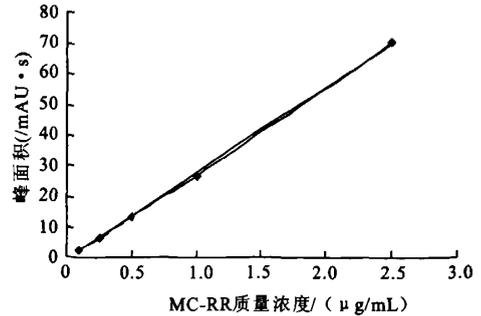


图5 MC-RR型藻毒素质量浓度与吸收峰面积的关系

Fig. 5 Relationship between MC-RR concentration and absorb area

液量 25 mL、初始 pH 值 6, 15% 接种量(体积分数)、培养 36 h, 在此优化后的营养和环境条件下, 酵母生物量可达 6.2 g/L。

通过检测得酵母胞内毒素含量为 390 μg/kg, 根据 GB5749-85 生活饮用水卫生标准, 毒素安全标准质量浓度 ≤ 1 μg/L。由于没有食品或饲料中微囊藻毒素的安全标准, 故可参照水体毒素标准, 制定出干酵母的毒素安全标准, 标准定为质量分数 1×10^{-9} 以下, 和该标准相比, 实验所得酵母中毒素含量超出安全标准 390 倍。酵母中毒素的去除需做进一步研究, 可考虑在发酵前通过筛选毒素降解菌对蓝藻原料进行毒素降解处理, 再以处理后的蓝藻为培养基发酵生产酵母。