

Effects of Aerobic Culture on Nutrients Content in the Cell of *Chaetoceros muelleri*

Yongmei Zhang¹, Jinfeng Zhou², Donghong Sun^{2,3}, Wenwen Cai², Ning Zou^{2,3*}

¹Yantai Automobile Engineering Professional College, Yantai Shandong

²College of Life Science, Ludong University, Yantai Shandong

³Microalgae Engineering Technology Research Center, Ludong University, Yantai Shandong

Email: *ningzou76@126.com

Received: May 5th, 2016; accepted: May 23rd, 2016; published: May 26th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Contents of lipids, proteins and carbohydrates in the cells of *Chaetoceros muelleri*, which cultivated in aerobic and anaerobic photobioreactors, were measured by the Soxhlet extraction method, Bradford method and Somogyi method, respectively. The results showed that the content of nutrimental substances in the cells of anaerobic cultures of *C. muelleri* is higher than them in the aerobic cultured cells. The content of lipid, protein and carbohydrate were 26.425%, 0.816%, and 10.7%, respectively in anaerobic cultured cells. While in the aerobic cultures they were 24.396%, 0.474%, and 7.84%, respectively.

Keywords

Chaetoceros muelleri, Cultivated Methods, Nutrients Content

通气对角毛藻营养组分的影响

张咏梅¹, 周金凤², 孙东红^{2,3}, 蔡雯雯², 邹宁^{2,3*}

¹烟台汽车工程职业学院, 山东 烟台

²鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台

³鲁东大学烟台市微藻工程技术研究中心, 山东 烟台

Email: *ningzou76@126.com

收稿日期: 2016年5月5日; 录用日期: 2016年5月23日; 发布日期: 2016年5月26日

*通讯作者。

摘要

采用索氏提取法、考马斯亮蓝法、Somogyi法分别对静止培养和通气培养的牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)内的脂肪、蛋白质、碳水化合物等营养组分的含量进行了测试分析。结果表明:静止培养的牟氏角毛藻营养物质含量高于通气培养的牟氏角毛藻营养物质含量。静止培养条件下牟氏角毛藻中脂肪含量为26.425%,蛋白质含量为0.816%,碳水化合物含量为10.7%;通气培养条件下牟氏角毛藻中脂肪含量为24.396%,蛋白质含量为0.474%,碳水化合物含量为7.840%。

关键词

牟氏角毛藻, 培养方法, 营养成分

1. 引言

近年来有关新能源的研发日趋增多,生物柴油作为一种可再生资源有着巨大的开发潜力和发展前景,牟氏角毛藻是微藻燃油技术研究中理想的生物柴油生产者[1]。且随着海参养殖的迅速发展,关于海参育苗关键环节的开口饵料——牟氏角毛藻越来越受到人们的重视。牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)隶属于硅藻门(Bacillariophyta)盒形藻目(Biddulphiales) [2]。为耐高温单胞藻类,具有细胞微小、细胞壁薄、生长快、营养丰富等优点,适于海参的摄食和消化[3]。牟氏角毛藻是一种小型的海洋浮游硅藻,细胞小、壁薄、多数单个生活,属广温广盐性藻类,在水温处于 20℃~30℃盐度为 30%左右的条件下生长最快,其最适光度为 1000~15000 Lux,最适 PH 为 8.0~8.9 [3],与其它单细胞藻相比生长快、营养高、适合大规模生产。其多不饱和脂肪酸的含量较高,在较好的培养条件下,其二十碳五烯酸(EPA)占总脂肪酸含量的 10.2%。牟氏角毛藻的生长过程中能够合成在医药、保健品行业中有着重要应用价值的亚麻酸、亚油酸、二十碳五烯酸(EPA)等不饱和脂肪酸,此外牟氏角毛藻还含有一定量的色氨酸。

牟氏角毛藻是良好的植物性生物饵料,生物饵料与人工配合饵料相比有如下优点[4]:生物饵料能在养殖水体中存活,且对养殖水体的水质影响较小;营养丰富,能满足水产动物的营养需求,而且生物饵料大多为未知的生物活性物质,对养殖对象的生长有利;生物饵料的大小可满足养殖对象饵料大小的需求,不同生物饵料可组合成系列饵料,满足养殖对象不同生长阶段的具体要求;生物饵料在水体中的分布特点有利于大多数水产动物更方便地摄食。

鱼、虾、蟹、海参等海产品是现代人们高质量生活永久的话题,人们对它们的需求量与日倍增,水产养殖随之兴起,达到前所未有的发展水平。生物饵料在许多水产动物的苗种生产中有着举足轻重的作用,牟氏角毛藻更是重中之重,可以投喂对虾、海参、双壳贝类、海胆、鲍等的幼虫[5],因此牟氏角毛藻具有很好的开发利用价值。

由此可见牟氏角毛藻具有很好的开发利用价值。

牟氏角毛藻的培养方法有通气培养法和静止培养法,本论文的目的是比较在这两种不同培养方法下的牟氏角毛藻中营养物质含量的高低。其意义在于寻找一种能使牟氏角毛藻生长既快,营养含量又高的培养方法。此外,本实验对牟氏角毛藻在其他方面的进一步开发与利用也具有一定的指导意义。

2. 材料与方法

2.1. 材料

牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)由鲁东大学烟台市微藻工程技术研究中心经济海藻种质库提供。

2.2. 牟氏角毛藻培养

采用平板封闭式光生物反应器对牟氏角毛藻进行分批式培养。反应器光径为 5 cm；培养条件为 20℃~25℃，pH 控制在 7~9；以散射自然光为光源。

2.3 粗脂肪的提取和测定[6]

2.3.1. 样品处理

将离心得到的牟氏角毛藻在 36℃烘箱中烘 12 小时，取出冷却后准确称取通气培养的牟氏角毛藻和静止培养的牟氏角毛藻各 0.80 g，研碎，将样品及因擦净研钵而带有残藻的脱脂棉一并脱脂滤纸包好。

2.3.2. 抽提

将洗净的索氏提取瓶在 105℃烘至恒重，记录重量 W_0 。将无水乙醚加至提取瓶内约体积的 1/2~2/3，将样品放入提取管中，把索氏提取器的各部连好，加热回馏 2~4 小时，回馏完毕，将提取管内的乙醚倒出，提取瓶内的乙醚完全蒸发，再将提取瓶置 105℃烘箱烘至恒重，记录重量 W 。

2.3.3. 计算

粗脂肪的含量 = $(W - W_0)/\text{样品重量} \times 100\%$

2.4. 蛋白质含量的测定[7]

2.4.1. 试剂

100 μg/mL 牛血清蛋白：称取 10 mg 牛血清白蛋白，溶于蒸馏水并定容至 100 mL，制成 100 μg/mL 的原液。

考马斯亮蓝 G-250 溶液：称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 的乙醇中，加入 100 mL 85% 的磷酸溶液，再用蒸馏水定容到 1 L，贮于棕色瓶中。

2.4.2. 标准曲线的绘制

取 6 支试管按表 1 加入试剂，混合均匀后向各管中加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液，摇匀，放置 2 分钟后，以 1 号管为对照，用 1 cm 光径 595 nm 下比色测定吸光度，测定在 1 小时内完成。

以蛋白质浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线如图 1。

2.4.3. 样品提取

将离心后的牟氏角毛藻放在 36℃的烘箱中烘 12 小时，冷却后，准确的称取通气和静止培养的牟氏角毛藻各 1.0 g，加 2 mL 蒸馏水在冰浴中研成匀浆，转移，定容至 30 mL，在 4000 r/min 冷冻离心 10 分钟，取上清液待测。

2.4.4. 样品中蛋白质含量的测定

取另 2 支试管，一支加入通气培养的牟氏角毛藻提取液 0.4 mL，另一支加入静止培养的牟氏角毛藻提取液 0.4 mL，再各加入 0.6 mL 蒸馏水和 5 mL 的 G-250 溶液，充分混合，放置 2 分钟后在 595 nm 下比色测定吸光度，静止条件下培养的藻的吸光值为 0.753，通气条件下培养的藻的吸光值为 0.448。通过标准曲线方程可算出蛋白质含量。

2.5. 碳水化合物含量的测定(Somogyi 法) [8]

2.5.1. 试剂

5%的硫酸锌溶液；5 mol/L 的 NaOH 溶液；2%的 HCL 溶液；

Table 1. The standard curve of protein measurement

表 1. 蛋白质标准曲线测定表

试剂	试管号	1	2	3	4	5	6
标准蛋白质溶液(ml)		0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水(ml)		1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
G-250 试剂(ml)		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质含量(ug)		0.0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0

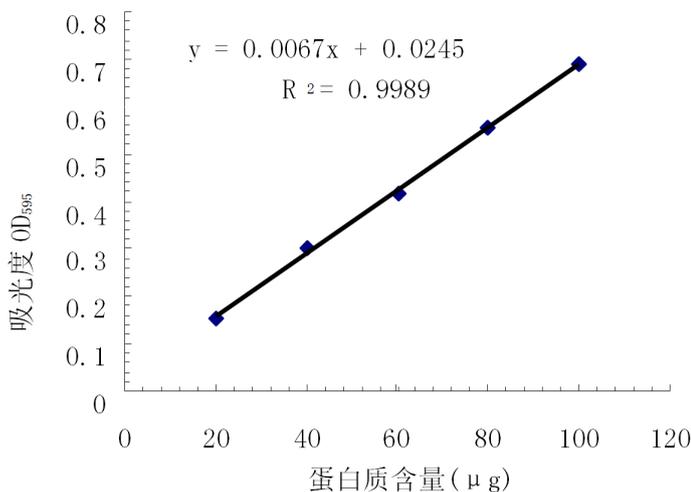


Figure 1. The standard curve of protein measurement

图 1. 蛋白质标准曲线

1%酚酞溶液：1 g 酚酞溶解在 100 mL 的 95% 的酒精溶液中。

饱和氢氧化钡溶液：将蒸馏水煮沸，除去水中的二氧化碳，冷却后加入固体 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 盖好，过夜，次日过滤。

铜碘试剂：

溶液 A：取硫酸铜 6.5 g 溶于 100 mL 水中。

溶液 B：取酒石酸钠 12 g，无水碳酸钠 20 g，碳酸氢钠 25 g，溶于 500 mL 水中。

溶液 C：取碘酸钾 0.8 g，碘化钾 10 g，草酸钾 18 g，溶于 200~300 mL 水中。

用时将溶液 B 倒入溶液 A 中，再倒入溶液 C 中，混合后稀释至 1000 mL 混匀。

2.5 mol/L 的 H_2SO_4 溶液：浓硫酸 143 mL 加入水中，稀释至 1000 mL，混匀。

淀粉指示剂：1g 淀粉溶解在 100 mL 水中，加热使之溶解即可。

0.005 mol/L 硫代硫酸钠标准液：首先制备近似 0.01 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液(称取 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.4823 g， Na_2CO_3 0.02 g，加新煮沸经冷却的蒸馏水至 1000 mL)，放暗处 8~14 天，然后标定。

比重 1.103 的 HCL 溶液：取浓盐酸 528 mL，加蒸馏水稀释成 1000 mL。

1.25% 硫酸溶液：取比重 1.84 的浓硫酸 13 mL 加水稀释至 1 L。

1.25% 氢氧化钠溶液：15 g 氢氧化钠溶解在 1 L 蒸馏水中，然后用标准酸来标定其准确程度，计算再应加蒸馏水的量，使其浓度准确为 1.25%。

2.5.2. 还原糖含量的测定

(1) 抽提

将离心后的牟氏角毛藻在 36℃烘箱中烘 12 小时。研碎，准确称通气培养的牟氏角毛藻和静止培养的牟氏角毛藻各 1.0 g，分别放入 250 mL 的三角烧瓶中，加入 80% 的酒精 50 mL，均放在 70℃水浴锅中抽提 3 小时，过滤，留滤液，再加入 20 mL 酒精，抽提过滤，如此 3~5 次，各合并所有滤液，定容至 500 mL。最后将残渣烘干，留作淀粉分析用。

(2) 澄清

分别吸取酒精提取液 25 mL，在水浴锅上蒸干。若溶液有酸性，可先用固体碳酸钠中和，以免酸对蔗糖的分解，蒸干后加入少量水，边搅边加入饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液 2~10 mL，沉淀完全后，加入 1 滴酚酞指示剂，边搅边滴入 ZnSO_4 溶液，以沉淀钡盐，滴至红色退去，再滴饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液，恢复淡红色为终点。过滤并用蒸馏水洗涤沉淀，将滤液放入 50 mL 容量瓶中稀释至刻度，便可测定还原糖和蔗糖的含量。

(3) 测定

分别吸取糖液 5 mL，放入带塞的试管中。分别加入 5 mL 铜碘试剂，盖塞，置沸水浴中保持 100℃ 15 分钟，取出放入 30℃水浴中，杯内温度与水浴温度相一致时为止。加入 2.5 mol/L 的 H_2SO_4 溶液 1 mL，盖好，放置 2 分钟，使沉淀物完全溶解，用水把盖上的碘冲洗下来。分别用 0.005 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定，边滴定边搅拌，滴至淡黄色时，加淀粉指示剂 1 mL，再滴至淡蓝色时为终点。

记录：通气培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 27.9 mL，静止培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 27.7 mL。另取蒸馏水和铜碘各 5 mL，做空白滴定，用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 28.15 mL。

2.5.3. 蔗糖含量的测定

分别吸取清洁后的可溶性糖液 10 mL，均放入 25 mL 容量瓶中，各加入比重 1.103 的 HCL 溶液 2 mL，煮沸 5 分钟，使之转化成还原糖后用 5 mol/L 的 NaOH 溶液中和，用酚酞为指示剂加至淡红色为止。中和后用水稀释至刻度，吸取 5 mL 测定其总可溶性糖含量。

记录：静止培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液为 27.2 mL，通气培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 27.5 mL。

2.5.4. 淀粉含量的测定

取酒精提取后的残渣 0.1 g，放入三角烧瓶中，加 2% HCL 溶液 25 ml，盖上，在沸水浴锅中沸腾 3.5 小时，用 5 mol/L 的 NaOH 溶液中和，再依照测定还原糖的方法加入清洁剂，过滤，稀释至 50 mL。吸取 5 mL 测定其还原糖含量。

记录：静止培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 24.1 mL，通气培养的牟氏角毛藻糖液用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液 26.0 mL。

2.5.5. 粗纤维含量的测定[9]

将两张滤纸分别放在 80℃~90℃的烘箱中烘干，称重，重量分别为 W_{01} 和 W_{02} 。

将离心后的牟氏角毛藻放在 36℃的烘箱中烘 12 小时，冷却后，准确的称取通气和静止培养的牟氏角毛藻各 1.0 g，研碎，分别放入 250 mL 三角烧瓶中。在烧瓶外壁上，相当 200 mL 容量处，作一记号，然后将 200 mL 的 1.25% 的硫酸溶液倒入瓶中，加热至沸腾后应继续加热 30 分钟，加热时为防止激烈沸腾，应经常搅拌。每 5 分钟要向瓶内倒入沸水，使其内容物达到记号，以保持酸的浓度不变。

煮沸之后，分别用烘干的滤纸过滤，并用热蒸馏水冲洗烧杯及漏斗 3~4 次。用 1.25% 氢氧化钠溶液将滤纸上的沉淀物完全洗入瓶内，将其加热至沸腾再继续 30 分钟(操作同上)。煮沸后冷却，分别用原来的所用滤纸过滤，用蒸馏水冲洗 2~3 次，再用酒精冲洗 2~3 次直至滤液无色为止。将带有沉淀的分别称重，在 80℃~90℃的烘箱中烘至恒重，称重，分别为 W_1 和 W_2 。

粗纤维的百分含量 = $(W - W_0)/\text{样品重量} \times 100\%$

3. 结果与讨论

3.1. 脂肪含量

通气培养的牟氏角毛藻的粗脂肪含量 = $(86.0569 - 85.8617)/0.80 \times 100\% = 24.396\%$;

静止培养的牟氏角毛藻的粗脂肪含量 = $(86.0470 - 85.8356)/0.80 \times 100\% = 26.425\%$ 。

由此可见，静止培养的牟氏角毛藻粗脂肪含量高于通气培养的牟氏角毛藻粗脂肪含量。

3.2. 蛋白质含量

静止培养的牟氏角毛藻蛋白质含量为 0.816%；通气培养的牟氏角毛藻蛋白质含量为 0.474%。可见，静止培养的牟氏角毛藻蛋白质含量高于通气培养的牟氏角毛藻蛋白质含量。

3.3. 还原糖含量

通气培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液中含还原糖 0.055 mg

静止培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液中含还原糖 0.085 mg

所以：通气培养的牟氏角毛藻还原糖含量为 1.1%，而静止培养的牟氏角毛藻还原糖含量为 1.7%。

4. 蔗糖含量

静止培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液总糖含量为 0.155 mg

通气培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液总糖含量为 0.105 mg

蔗糖量 = $(\text{总可溶性糖含量} - \text{还原糖含量}) \times 0.95$

由此：静止培养的牟氏角毛藻含蔗糖量为 3.325%，通气培养的牟氏角毛藻含蔗糖量为 2.375%。前者高于后者。

5. 淀粉含量

静止培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液中还原性糖含量为 0.495 mg

通气培养的牟氏角毛藻每 5 mL 糖液中还原性糖含量为 0.365 mg

葡萄糖含量 $\times 0.9 =$ 粗淀粉含量

由此：静止培养的牟氏角毛藻淀粉含量为 4.455%，通气培养的牟氏角毛藻淀粉含量为 3.285%。前者高于后者。

6. 粗纤维含量

静止培养的牟氏角毛藻粗纤维的含量为： $(36.3938 - 36.3816)/1.0 \times 100\% = 1.22\%$ ；

通气培养的牟氏角毛藻粗纤维的含量为： $(48.9681 - 48.9573)/1.0 \times 100\% = 1.08\%$ 。

静止培养的牟氏角毛藻碳水化合物含量高于通气培养的牟氏角毛藻碳水化合物含量

用以上方法测定的静止培养和通气培养的牟氏角毛藻营养物质含量如表 2。

由此可见：不同的培养方法对牟氏角毛藻细胞内的营养物质含量有一定的影响，静止培养的牟氏角毛藻营养物质含量高，通气培养的牟氏角毛藻营养物质含量低。

现已有报道表明：培养的环境条件对单细胞藻类的营养物质价值会产生影响[10]，实验结果与此基本一致。静止培养的牟氏角毛藻生长相对慢，理论上讲营养物质含量高，理论与实际也相符，说明本实验结果有一定的参考价值。

Table 2. The content of nutrimental substances in *Chaetoceros muelleri* of different methods
表 2. 不同培养方法牟氏角毛藻的营养物质含量

	脂肪含量(%)	蛋白质含量(%)	碳水化合物含量(%)	水含量(%)	矿物质含量(%)
静止	26.425	0.816	10.7	3.385	15-30
通气	24.396	0.474	7.84	5.043	15-30

由此可以得出结论：静止培养的牟氏角毛藻中脂肪、蛋白质等营养物质含量高于通气培养的牟氏角毛藻中脂肪、蛋白质等营养物质的含量。

目前，水产养殖与育苗领域对水产养殖动物开口饵料的不同培养方法的营养成分对比研究很少，本研究对该领域的生产工艺优化具有一定的指导意义，并对微藻燃油技术的发展有一定意义。

基金项目

山西省煤艺重点科技攻关项目，微藻燃油关键技术研发与中试(FT-2014-01)。

参考文献 (References)

- [1] 高影影, 王长海. 富油海洋微藻的筛选及营养条件对其生长和油脂积累的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [2] 金彬明, 曾国权. 牟氏角毛藻培养技术[J]. 中国水产, 2004, 45(10): 73-78.
- [3] 王道尊, 刘永发, 徐寿山, 等. 渔用饲料实用手册[M]. 上海: 上海科学出版社, 2004.
- [4] 郑严, 主编. 现代生物饵料培养及开发利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [5] 王志雄, 主编. 海洋生物基因与生物工程技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2001.
- [6] 丛峰松, 主编. 生物化学实验[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2005.
- [7] 陈毓荃, 主编. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 张志良, 主编. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [9] 孙清荣, 编. 食品分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
- [10] 郑忠明, 金春华, 冯坚. 牟氏角毛藻的生产性培养技术[J]. 水产科学, 2000, 24(5): 47-51.