

稀土元素应用于培养高含量 DHA 螺旋藻的试验研究^{*}

余绍蕾, 鸭 乔, 张 瑶, 万庆家

(云南绿 A 生物工程有限公司, 云南昆明 650106)

〔摘 要〕目的: 研究利用稀土元素培养高含量 DHA 螺旋藻的试验条件。方法: 以稀土元素: 镧 (La)、铈 (Ce)、钕 (Nd)、钐 (Sm) 为 4 个因素, 以每种稀土元素的 3 个不同添加剂量作为水平, 以采收时螺旋藻内 DHA 含量作为评价指标, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 并进行对比试验。结果: 在 $La^{3+} 10mg/L$, $Ce^{3+} 1mg/L$, $Sm^{3+} 2mg/L$, $Nd^{3+} 10mg/L$ 的条件下培养, 螺旋藻内 DHA 含量较高, 与未加稀土元素培养的螺旋藻相比, 螺旋藻内 DHA 含量提高 58.0%。结论: 在螺旋藻养殖过程中, 添加适量的稀土元素对于提高螺旋藻中 DHA 含量具有一定促进作用。

〔关键词〕螺旋藻; 稀土元素; DHA

中图分类号: S555+.6 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)02—0021—03

DHA 化学名称为二十二碳六烯酸, 是 $\Omega-3$ 不饱和脂肪酸家族中的重要成员, 是神经系统细胞生长及维持的一种主要元素, 俗称“脑黄金”, 具有预防和治疗心血管疾病、癌症和调节中枢神经、视觉系统的功能, 对胎儿、婴儿智力和视力发育尤为重要^[1]。目前虽对 DHA 的研究较多, 但富含 DHA 的天然功能性食品开发还较少, 因此, 开发富含 DHA 的天然功能性食品具有重要的社会意义和经济意义。天然 DHA 主要来源于鱼油、藻类、干果类等。其中, 鱼油受到产量、纯化工艺、气味等方面的影响, 难以广泛的应用^[2]。干果类中所含的 α -亚麻酸可在体内转化为 DHA, 但转化效率仅为 1% 左右, 难以被人体利用^[3]。藻类中富含 DHA, 且易于被人体吸收, 是人类补充 DHA 的一种重要饮食来源。云南绿 A 生物工程有限公司致力于藻类产品的开发, 近年来一直在研究培养富含 DHA 的螺旋藻, 以期开发出富含 DHA 的螺旋藻类产品, 从而扩大螺旋藻的应用范围, 并为社会提供更多、更好的富含 DHA 的天然功能性食品。

在前期研究中, 我们已从诸多的螺旋藻藻种中筛选出了适合我公司螺旋藻养殖基地养殖的富含 DHA 的螺旋藻藻种: Sp2002, 其中 DHA 含量为

7.88%。为了进一步提高该藻种中 DHA 的含量, 我们继续对其研究。稀土元素是元素周期表第Ⅲ族副族元素铈系、钇系和镧系元素共 17 种化学元素的合称, 国内外研究报道^[4-6], 添加适量的稀土元素, 如: 铈 (Ce)、钐 (Sm)、镧 (La)、钕 (Nd)、钇 (Y)、铒 (Er) 等对于部分微藻 (小球藻、隐甲藻等) 的生长及其 DHA 合成具有明显的促进作用。在此基础上, 我们也进行了在螺旋藻培养过程中添加稀土元素的研究, 结果发现, 添加适量且适合种类的稀土元素对螺旋藻中 DHA 含量的提高有促进作用, 反之, 则有抑制作用, 甚至影响螺旋藻的生长。目前, 多种稀土元素合用的研究还较少, 从理论上说, 多种稀土元素联合使用, 可发挥各自不同的作用, 促进螺旋藻的生长, 但由于稀土元素的特殊性, 控制其添加量对于螺旋藻的生长尤为重要。在本次研究中, 我们采用正交试验的方法对几种已筛选出来的稀土元素联合应用的用量进行了研究, 以期找到更合适培养高含量 DHA 螺旋藻的试验条件, 为开发出富含 DHA 的螺旋藻产品作准备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (NO: 2010AA023004)

收稿日期: 2012—01—10 修回日期: 2012—03—02

作者简介: 余绍蕾 (1983 ~), 女, 云南昆明人, 助理工程师, 主要从事中药新药及保健食品研究。

螺旋藻 Sp2002 藻种，螺旋藻培养液由云南绿 A 生物工程有限公司程海螺旋藻养殖基地提供； $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 由天津化工生产。

1.2 实验方法

1.2.1 螺旋藻的培养

在自然光照条件下通空气培养至对数生长期，光暗周期 12h：12 小时。

1.2.2 稀土元素添加量的筛选

以每一种稀土元素作为一个因素，各种稀土元素的不同添加量为水平，设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。

据文献报道^[6,7]， La^{3+} 含量在 5 ~ 20mg/L， Ce^{3+} 含量在 10mg/L 以下， Sm^{3+} 含量在 10mg/L 以下， Nd^{3+} 含量在 5 ~ 20mg/L 的条件下对微藻中 DHA 含量的升高有促进作用。我们在正交试验设计中选择各种能够促进螺旋藻中 DHA 含量提高的稀土元素添加量进行试验。正交试验设计见表 1。

表 1 稀土元素添加量正交试验设计

水平	A La^{3+} (mg/L)	B Ce^{3+} (mg/L)	C Sm^{3+} (mg/L)	D Nd^{3+} (mg/L)
1	5	1	2	5
2	10	2	4	10
3	20	4	8	20

1.2.3 DHA 含量的测定

参照国标 GB/T5009.168-2003 方法进行测定。
(1) 样品处理：取 10g 螺旋藻干粉，置于 60mL 分液漏斗中，用 60mL 正己烷分 3 次萃取，合并提取液，在 70℃ 水浴上挥至近干，用 2 ~ 3mL 正己烷分两次将其转移至 10mL 具塞比色管中，再加入 2mL 2mol/L 的氢氧化钠 - 甲醇溶液，充分震荡，并于 50℃ 水浴中加热 1 ~ 2min，再加入 2mL 2mol/L 的盐酸 - 甲醇溶液，充分震荡，并于 50℃ 水浴中加热 1 ~ 2min，定容至 1mL，待上机检测用。

(2) 标准溶液系列：精密称取 DHA 50.0mg，加入正己烷溶解并定容至 100mL，制成 DHA 标准溶液。准确吸取 DHA 标准溶液 1.0，2.0，5.0mL 分别移入 10mL 具塞比色管中，再加入 2mol/L 的盐酸 - 甲醇溶液 2mL，充分震荡，并于 50℃ 水浴中加热 2min，弃去下层液体，再加约 2mL 蒸馏水洗净并除去水层，用滴管吸出正己烷层，移至另一

装有无水硫酸钠的漏斗中脱水，将脱水后的溶液在 70℃ 水浴上加热浓缩，定容至 1mL，待上机测试用。

(3) 检测分析：检测系统：Agilent 6890 气相色谱仪；FID 检测器；色谱柱：玻璃柱 1m × 4mm (id)，填充涂有 10% DEGS/Chromosorb W DMCS 80 目 ~ 100 目的担体；载气与流速：氮气 50mL/min，氢气 70mL/min、空气 100mL/min；汽化室温度：250℃；检测器温度：300℃；进样量：1μl。

1.2.3 对比试验

采用常规培养方法，即不加稀土元素培养方法和正交试验确定的试验方法分别进行 3 批小试试验，比较两种方法培养的螺旋藻中 DHA 的含量。

2 实验结果

2.1 正交试验结果

正交试验结果及分析见表 2。

表 2 正交试验设计结果与分析

试验 编号	A	B	C	D	DHA 含量 (%)
1	1	1	1	1	12.46
2	1	2	2	2	10.95
3	1	3	3	3	8.12
4	2	1	2	3	11.23
5	2	2	3	1	11.08
6	2	3	1	2	10.98
7	3	1	3	2	10.06
8	3	2	1	3	8.44
9	3	3	2	1	7.92
K1	31.53	33.75	31.88	31.46	
K2	33.29	30.47	30.1	31.99	
K3	26.42	27.02	29.26	27.79	
R	6.87	6.73	2.62	4.20	

从实验结果可见，在 4 种稀土元素中， La^{3+} 对螺旋藻中 DHA 含量的提高作用影响最大， Sm^{3+} 对其影响最小。由极差分析可知，各因素对螺旋藻中 DHA 含量的提高作用影响的主次顺序为：A > B > D > C，即： $\text{La}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Nd}^{3+} > \text{Sm}^{3+}$ 。根据正交试验确定的最佳条件为： $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_1\text{D}_2$ ，即各稀土元素浓度分别为： La^{3+} 10mg/L， Ce^{3+} 1mg/L， Sm^{3+} 2mg/L， Nd^{3+} 10mg/L。

2.2 对比试验结果

在原培养方法的基础上按 La^{3+} 10mg/L, Ce^{3+} 1mg/L, Sm^{3+} 2mg/L, Nd^{3+} 10mg/L 的剂量添加稀土元素, 试验结果表明, 添加稀土元素后, 螺旋藻中 DHA 含量有明显提高, 较原培养方法培养出的螺旋藻中 DHA 含量提高 58.0%, 经 t 检验, 结果有显著性差异。比较结果见表 3。

表 3 对比试验结果

实验方法	DHA 含量 (%)			
	批次 1	批次 2	批次 3	平均
原方法	7.86	7.92	7.89	7.89
加入稀土元素方法	12.51	12.46	12.44	12.47 *

* 与原方法比较, $P < 0.01$

3 讨论

本次研究的结果表明, 几种稀土元素配合使用, 对于螺旋藻内 DHA 含量的升高有明显的促进作用, 其中, 在 La^{3+} 10mg/L, Ce^{3+} 1mg/L, Sm^{3+} 2mg/L, Nd^{3+} 10mg/L 的条件下培养, 螺旋藻内 DHA 含量较高。其作用可能是通过以下几个方面来实现的: ①多种低浓度的稀土元素诱导螺旋藻体内形成核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶及其活化酶的复合体, 提高 CO_2 的同化效率, 促进螺旋藻光合碳同化, 从而提高了螺旋藻的光合效率, 增加了藻内脂质的积累, 从而使 DHA 含量升高; ②稀土元素取代 Ca^{2+} 作为生物体的第二信使, 通过钙调蛋白参与一系列酶活性调节, 参与细胞分裂, 连结稳定膜结构中磷脂与蛋白质; ③清除藻内

自由基, 保护藻细胞免受伤害; ④稀土元素与蛋白质、酶、多糖和核酸等生物大分子紧密结合, 生成配合物, 利于脂质和蛋白的积累; ⑤稀土元素对某些致病菌起到抑制作用, 提高螺旋藻的质量和产量。通过以上途径, 稀土元素促进了螺旋藻的生长和其中营养物质的富集, 从而提高其中 DHA 的含量。目前, 对于稀土元素促进螺旋藻内 DHA 含量升高的作用机理尚不完全明确, 还有待于进一步的研究发现; 稀土元素用于大规模培养富含 DHA 的螺旋藻也还有待于进一步的研究, 以寻找出最好的大规模培养条件。

[参考文献]

[1] 郭玉华, 李钰金. 水产品中 EPA 和 DHA 的研究进展 [J]. 肉类研究, 2011, (1): 82-86.

[2] 吴忠兴, 庄惠如, 陈坚, 等. 利用微藻培养生产 DHA 的研究进展 [J]. 江西农业大学学报 (自然科学), 2002, 24 (5): 737-740.

[3] 李棉棉. DHA 知多少 [J]. 时尚育儿, 2011, (10): 134-135.

[4] 杨革, 孔庆娥. 钼与钨对隐甲藻的生长、DHA 合成及固氮活性的影响 [J]. 中国稀土学报, 2002, 20 (12): 168-170.

[5] 李哲, 蔡明刚, 黄水英, 等. 稀土元素 Ce 对雨生红球藻生长及虾青素积累影响的研究 [J]. 海洋科学, 2008, 32 (9), 37-39.

[6] 周正朝, 张希彪, 上官周平. 植物对稀土元素的生理生态响应 [J]. 西北农业学报, 2004, 13 (2): 119-123.

[7] 鞠宝, 陈永岷, 温少红. 几种稀土元素对螺旋藻生长的影响 [J]. 海洋通报, 2000, 19 (4): 92-96.

(编辑: 迟 越)

Study on Using Rare Earth Elements to Cultivate Spirulina with High-content DHA

YA Qiao, YU Shao-lei, ZHANG Yao, WAN Qing-jia

(Yunnan Green A Biological Project Co., Ltd, Kunming Yunnan 650106)

[ABSTRACT] Objective: To study the test condition of using rare earth elements to cultivate Spirulina with high-content DHA. Methods: L_9 (3^4) orthogonal test was used to do the study. Four kinds of rare earth elements, such as lanthanum (La), cerium (Ce), neodymium (Nd) and samarium (Sm) were set as the four factors while each factor set three levels. The content of DHA in Spirulina was detected as index to appraise the effect. Comparison test was done between the new method and the old method. Results: Spirulina had a high content of DHA under the condition of La^{3+} 10mg/L, Ce^{3+} 1mg/L, Sm^{3+} 2mg/L, Nd^{3+} 10mg/L, which was 58.0% higher than that of cultivating spirulina without rare earth element. Conclusion: An appropriate amount of rare earth element has a promoting effect on increasing the content of DHA in Spirulina.

[KEY WORDS] spirulina; rare earth element; DHA