

大规模异养发酵培养小球藻 USTB-01 研究

景建克¹, 许倩倩¹, 刘 硕¹, 陈 灏², 闫 海¹

(1. 北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083;

2. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要:采用异养小球藻 USTB-01, 分别在 50 L、500 L 和 5 000 L 发酵罐逐级放大进行异养发酵培养的优化控制研究。结果表明, 随着小球藻异养培养过程中生物量的增大, 按照 3 个不同阶段逐渐加大葡萄糖和硝酸钾(C/N 质量比为 20:1) 分别作为碳源和氮源的流加量, 可以大幅度提高小球藻 USTB-01 的生长速度。72 h 内, 分别在 50 L、500 L 和 5 000 L 发酵罐进行异养发酵培养小球藻 USTB-01 过程中, 都获得了质量浓度 40 g/L 以上的藻细胞干重, 在培养物中保持低浓度的葡萄糖和硝酸钾在支持小球藻快速生长方面发挥了重要作用。无论在培养规模, 还是在最终培养获得的藻生物量上, 均取得了非常重要的研究进展。

关键词: 小球藻 USTB-01; 异养发酵培养; 优化控制

中图分类号: Q914.82

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)12-0067-04

Heterotrophic mass culture of *Chlorella* USTB-01 in fermentor

JING Jian-ke¹, XU Qian-qian¹, LIU Shuo¹, CHEN Hao², YAN Hai¹

(1. Department of Biological Science and Technology, School of Applied Science, Beijing University of Science and Technology, Beijing 100083, China; 2. Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The optimal control for the heterotrophic mass culture of *Chlorella* USTB-01, is studied in 50 L, 500 L and 5 000 L fermentors, respectively. The results show that the growth of *Chlorella* USTB-01 is greatly improved by continuous feeding the mixture of glucose as a carbon source and nitrate as a nitrogen source (the mass ratio of carbon to nitrogen is 20) at three different rates according to different microalgal growth phases. The maximum dry weight concentration (DWC) of microalgal cells within 72 hours could reach as much as more than 40 g/L in 50 L, 500 L and 5 000 L fermentors, respectively. Keeping low concentrations of glucose and nitrate in the cultured solution plays a very important role in supporting the rapid growth of microalga. The advance in this way is achieved in both the culture scale and the great biomass of *Chlorella* USTB-01 obtained. Such a high microalgal biomass obtained in such a short period as within 72 hours has not been previously reported in the world.

Key words: *Chlorella*-USTB-01; heterotrophic culture; optimal control

小球藻是单细胞绿藻, 属于低等植物, 是一种简单的光合作用有机体。小球藻富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、叶黄素、虾青素和多种维生素等, 对提高人体的免疫力和促进生物的生长都有良好的效果^[1]。近年来, 研究发现小球藻生长因子具有诱发干扰素、激发人体防御和免疫组织中的巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞的功能, 又具有促进人体对环境污染有害物质解毒和排泄的作用^[2-3], 因此小球藻在食品、医药、化工和环保等领域的研究探索已经越来越引起人们的普遍重视。

目前, 小球藻生产主要采用类似于农业的大型水泥池自养培养方式^[4], 然而存在藻生物量低、培养周期长和小球藻产品质量差等缺点^[4-6]。1953 年, Lewin^[7]首先发现了一些藻类能利用有机物作为唯

一的碳源和能源进行异养生长, 从而引起了单细胞藻类培养的一次重要革命。近年来对于小球藻的异养培养研究越来越受到众多学者的重视, 特别是通过高细胞浓度异养发酵培养技术的研究与探索, 大幅度提高了小球藻的生长速度, 使小球藻异养培养的工业化生产成为可能。Shi 等^[8]研究了异养发酵培养小球藻的控制条件, 获得了藻细胞干重质量浓度 31.2 g/L 的较高藻生物量。Liang 等^[9]应用流加工艺在 5、50、200、800 L 和 4 000 L 机械搅拌发酵罐中大规模异养培养小球藻, 最高细胞干重质量浓度达到了 43.3 g/L。2004 年笔者成功地从天然水体中筛选到一株可以异养快速生长的小球藻种 USTB-01, 批量培养 5 天获得 26 g/L 藻细胞干重^[10], 另外, 围绕小球藻高产叶黄素的培养控制及叶黄素的提取

收稿日期: 2008-08-12; 修回日期: 2008-10-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(20537020); 北京市科委产业孵化资助项目(06KW1028)

作者简介: 景建克(1981-), 男, 硕士生; 闫海(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为藻类和微生物学, 通讯联系人, 010-62333177, haiyan@sas.ustb.edu.cn。

提纯等方面笔者也进行了探索^[11-13]。

为了使小球藻更快更有效地实现工业化生产, 必须进一步提高其培养规模和效率, 为此该研究分别在 50、500 L 和 5 000 L 发酵罐进行逐级放大异养发酵培养实验, 72 h 内都获得了质量浓度 40 g/L 以上的藻细胞干重, 大幅度提高了培养规模和培养效率, 取得了具有明显创新性的研究结果, 至今除笔者外尚未见有在如此短时间内获得如此大量小球藻生物量的研究报道, 此研究成果为异养培养小球藻的工业化生产奠定了坚实的基础。

1 实验部分

1.1 实验材料

实验用小球藻 USTB-01 系笔者于 2004 年从天然水体中获得^[11], 具有极好的异养生长特性和培养潜力。采用食品级葡萄糖和分析纯硝酸钾分别作为小球藻生长的碳源和氮源, 其他所用试剂均为分析纯, 实验前没有经过进一步纯化。

1.2 培养条件

小球藻 USTB-01 的工业化大规模培养实验在北京某制药公司发酵厂进行。首先采用三角瓶, 在温度 30℃ 和摇床转速 200 r/min 条件下异养批量培养小球藻 USTB-01, 培养 3 d 后收获直接作为 50 L 全自控发酵罐的藻种。在逐级放大发酵培养过程中, 50、500 L 和 5 000 L 发酵罐的实际培养体积分别为 20、250 L 和 2 500 L, 前一级发酵培养获得的小球藻发酵液直接作为藻种转入下一级进行进一步扩大培养。

在批量和发酵培养过程中所用培养基均由笔者自主研制, 初始 pH 为 6.50 左右, 已经获得国家发明专利。根据小球藻的不同生长期, 采用碳氮质量比为 20:1 的 600 g/L 葡萄糖和硝酸钾混合溶液进行 3 个阶段不同流速的流加, 0~12 h 流加葡萄糖量为 1.0 g/(L·h), 12~24 h 流加葡萄糖量为 1.5 g/(L·h), 24~48 h 流加葡萄糖量为 2.0 g/(L·h)。

实验所用培养基和容器均经过 121℃、20 min 的高温、高压灭菌, 发酵培养的控制条件是: 温度为 30℃; 50、500 L 和 5 000 L 发酵罐的曝气量分别为 2、25 m³/(L·h) 和 250 m³/(L·h); 通过自动流加 10% 盐酸始终控制 50 L 发酵罐培养 pH 为 7.0, 初始搅拌转速为 200 r/min, 每间隔 6 h 将转速提高 75 r/min, 直至达到 500 r/min 为止。500 L 和 5 000 L 发酵罐中培养不控制 pH, 搅拌转速始终分别控制在 260 r/min 和 245 r/min。在发酵培养过程中, 分不同时间间隔

进行取样分析, 分别测定反映藻生物量的光密度 (OD_{680 nm})、还原糖浓度和 pH。

1.3 分析测定方法

采用分光光度计, 在波长 680 nm 下以去离子水作为参比, 分别测定稀释不同倍数小球藻发酵液的光密度, 以此代表小球藻的生物量。采用 pH 计直接测定小球藻发酵液的 pH。小球藻发酵液中的葡萄糖浓度和硝酸根浓度分别采用碘量法^[14]和离子色谱法测定。

2 结果与分析

2.1 50 L 发酵罐培养结果

图 1 是在 50 L 发酵罐中, 采用流加葡萄糖和硝酸钾方式或将葡萄糖和硝酸钾全部加入到初始培养基中 2 种不同条件下, 小球藻的生长、发酵液中葡萄糖浓度和硝酸钾浓度的变化过程。

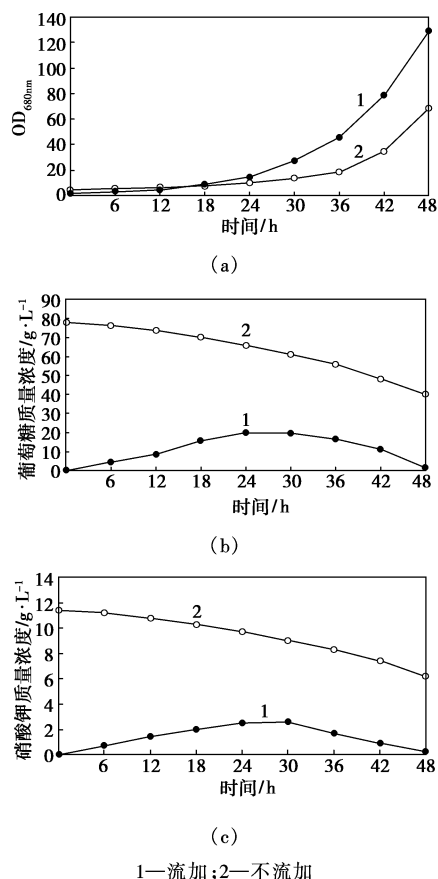


图 1 50 L 发酵罐流加和不流加 2 种条件下培养结果

图 1(a) 显示, 与初始将培养基所有成分全部加入相比, 根据小球藻不同生长期分 3 个速率流加葡萄糖和硝酸钾, 可以明显提高小球藻的生长速度。采用不流加方式培养, 初始 OD_{680 nm} 为 4.3, 48 h

OD_{680 nm} 为 68.6, 对应的平均生长速率为 1.3 OD_{680 nm}/h。而采用流加方式培养, 初始 OD_{680 nm} 为 1.7, 48 h OD_{680 nm} 为 128.8, 对应的平均生长速率为 2.6 OD_{680 nm}/h, 同比提高 100%, 说明采用流加方式是高效快速培养出小球藻的优化控制条件。根据建立的小球藻 USTB-01 的细胞干重浓度与 OD_{680 nm} 之间的线性关系 [细胞干重浓度 (g/L) = 0.357 OD_{680 nm}] 计算^[11], 培养 48 h 采用不流加碳、氮源方式获得小球藻细胞干重质量浓度为 24.5 g/L, 而根据小球藻的不同生长期, 分 3 个阶段流加碳、氮源方式培养获得小球藻细胞干重质量浓度 46.0 g/L, 至今尚未发现有在如此短时间培养获得如此高藻生物量的研究报道。

图 1(b) 显示了流加与不流加葡萄糖 2 种条件下, 发酵液中葡萄糖浓度的变化。采用不流加方式培养, 初始葡萄糖质量浓度达到 78 g/L, 培养 48 h 后降低到 40 g/L, 较高的葡萄糖浓度严重抑制了小球藻的生长^[9,11]。而根据小球藻不同生长期, 采用逐渐加大葡萄糖流加量方式培养, 发酵液中葡萄糖质量浓度经历了前 24 h 逐渐增加到 19.8 g/L, 此后逐渐降低到 48 h 的 1.4 g/L 的先增加后降低的变化过程, 但始终维持在 20.0 g/L 以内。实验 48 h 结束时葡萄糖已经基本消耗利用完, 既保证了小球藻生长的碳源所需, 又没有对小球藻生长产生明显的抑制, 因此采用分 3 个不同速率、逐渐增加葡萄糖流加量是一种非常有效的小球藻异养发酵培养控制方式。

图 1(c) 显示了在流加与不流加硝酸钾条件下硝酸钾浓度的变化过程, 其变化趋势与葡萄糖浓度的变化类似。在不流加条件下, 硝酸钾质量浓度从初始的 11.4 g/L 逐渐降低到 48 h 的 6.2 g/L。而在流加条件下, 硝酸钾质量浓度在前 30 h 逐渐增加到 2.6 g/L, 以后逐渐降低, 48 h 降低到 0.3 g/L 以下。采用流加方式既可以保证小球藻生长的氮源供给, 同时也不会有较高浓度的硝酸钾积累而抑制小球藻的生长。

2.2 500 L 发酵罐培养结果

图 2 是 500 L 发酵罐采用葡萄糖和硝酸钾流加方式下, 小球藻生长 (OD_{680 nm}) 和 pH 的变化过程。

由图 2 可知, 小球藻的生长基本经历了前 12 h 的生长延迟期、从 12 h 到 48 h 的生长指数期和从 48 h 到 54 h 的生长稳定期 3 个阶段, 从初始 OD_{680 nm} 12.8 生长到 48 h 的 130.5, 平均生长速率为 2.5 OD_{680 nm}/h, 对应藻细胞干重质量浓度为 46.6 g/L, 达

到了很高的藻生物量。图 2 显示在培养 42 h 内发酵液的 pH 基本呈现缓慢增加趋势, 而 42 h 以后出现下降, 在 54 h 整个培养过程中, pH 始终控制在 6.6~7.9 的适合小球藻生长范围。

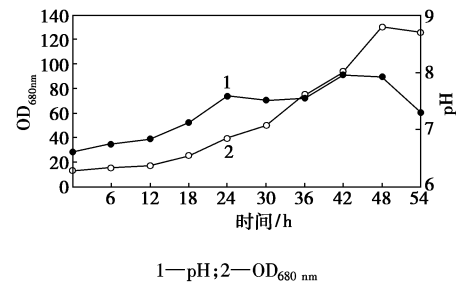


图 2 500 L 发酵罐小球藻 USTB-01 培养结果

pH 为中性是小球藻的最适生长范围, 当 pH 过高或过低都会严重影响小球藻的生长, 一般发酵培养都要控制发酵液的 pH 以达到小球藻的快速生长^[8,10,15]。影响小球藻发酵液 pH 的主要因素由提供小球藻生长的碳源和氮源化合物种类决定, 本研究采用葡萄糖作为碳源可以产生某些有机酸和二氧化碳, 导致 pH 降低, 而氮源硝酸钾可以使发酵液的 pH 升高, 综合上述 2 种因素决定了发酵液 pH 产生波动, 但变化范围不大 (6.6~7.9), 不会严重影响小球藻的快速生长。在工业化培养小球藻阶段, 如果能够不流加酸碱控制 pH 也能够保持 pH 基本稳定, 不仅可以节约成本, 而且能够避免流加酸碱过程中的染菌机会。

2.3 5 000 L 发酵罐培养结果

图 3 是 5 000 L 发酵罐采用葡萄糖和硝酸钾流加方式培养条件下, 小球藻生长和 pH 的变化过程。

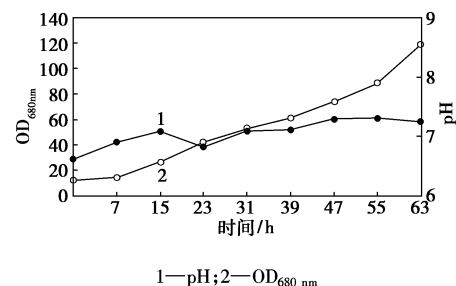


图 3 5 000 L 发酵罐小球藻 USTB-01 培养结果

由图 3 可知, 小球藻生长结果与 500 L 发酵罐培养结果基本类似 (图 2), 但生长速度有所下降。在大规模培养小球藻 USTB-01 条件下, 小球藻生长也经历了生长延迟期和指数期 2 个阶段, 由初始 OD_{680 nm} 的 11.8 生长到 63 h 的 118.8, 平均生长速率为 1.7 OD_{680 nm}/h, 对应获得藻细胞干重质量浓度为 42.4 g/L。发酵液 pH 的变化也与 500 L 发酵罐培养

的结果类似(图 2),变化范围为 6.6~7.3,没有对小球藻 USTB-01 的生长产生明显影响。

目前,在小球藻异养发酵培养已经有一些研究^[8,16],以前报道的最大培养规模为 4 000 L 发酵罐培养^[9],而该研究更进一步将培养规模提高到了 5 000 L 发酵罐培养,为小球藻异养培养工业化生产更前进了一步。该研究结果表明随着小球藻生物量的逐渐增加,分 3 个阶段逐渐提高葡萄糖和硝酸钾分别作为碳源和氮源的流加量,不仅可以大幅度提高小球藻的生长速度,最高获得了干重质量浓度 46.6 g/L 的藻生物量,而且能够有效地利用提供的碳氮源营养物质,同时还可以保持发酵液 pH 的基本稳定。从容积 50、500 L 和 5 000 L 连续放大培养结果显示,随着培养规模的增大,小球藻 USTB-01 的生长速度从 2.6 OD_{680 nm}/h 下降到 1.7 OD_{680 nm}/h,呈现逐渐减小趋势,其原因可能主要与随着培养规模的增加、培养基中的溶解氧逐渐降低有关,因此有必要根据不同培养规模更进一步深入研究流加葡萄糖和硝酸钾的控制战略,以达到更有效培养出超高小球藻细胞浓度的目的。

3 结语

本文采用小球藻 USTB-01 作为藻种,分别在 50、500 L 和 5 000 L 发酵罐逐级放大异养发酵培养方面进行了探索,得出的主要结论如下:

(1) 根据小球藻 USTB-01 不同生长期,按照 3 个速率分别逐渐加大流加葡萄糖和硝酸钾量,可以将小球藻 USTB-01 生长速度提高 1 倍。在不同规模培养条件下,72 h 以内均获得了质量浓度 40 g/L 以上的藻细胞干重,是一种高效、大规模异养培养小球藻的优化控制战略。在如此短时间获得如此大量的小球藻生物量,除笔者之外尚未见有文献报道,具有非常好的工业化生产小球藻前景。

(2) 从 50 L 到 5 000 L 发酵罐逐级放大培养,随着培养规模的增加,小球藻 USTB-01 的生长速度逐渐从 2.6 OD_{680 nm}/h 下降到 1.7 OD_{680 nm}/h,培养基溶解氧不足可能是导致小球藻生长速率下降的主要原因。

(3) 在小球藻异养发酵培养过程中,流加碳氮质量比为 20:1 的高浓度葡萄糖和硝酸钾溶液,不仅能够明显提高小球藻 USTB-01 的生长速度,而且可以维持发酵液的 pH 基本稳定。

参考文献

- [1] 周华伟,林炜铁,陈涛.小球藻的异养培养及应用前景[J].氨基酸和生物资源,2005,27(4):69-73.
- [2] Yamaguchi K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review[J]. Journal of Applied Phycology, 1996, 8(6): 487-502.
- [3] 韩士群,张振华,刘海琴.小球藻生长因子对免疫功能的影响[J].中国生化药物杂志,2004,25(1):5-7.
- [4] 李师翁,李虎乾,张建军.小球藻大规模培养研究的进展[J].植物学通报,1998,15(4):45-50.
- [5] Wang H Y, Guo S Y, Zheng B S. Growth and biochemical components of *Chlorella Vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivations[J]. Journal of South China University of Technology, 2004, 32(5): 47-50.
- [6] 闫海,张宾,王素琴,等.小球藻异养培养的研究进展[J].现代化工,2007,27(4):18-21.
- [7] Lewin J C. Heterotrophy in diatoms[J]. Gen Microbiol, 1953(9): 305-313.
- [8] Shi X M, Liu H J, Chen F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. Process Biochemistry, 1999, 34(4): 341-347.
- [9] Liang S Z, Zhu M J, Meng H H. Heterotrophic mass cultures of *Chlorella Vulgaris* with glucose feeding in fermenters[J]. Journal of South China University of Technology, 2000, 28(12): 66-70.
- [10] 闫海,周洁,何宏胜,等.小球藻的筛选和异养培养[J].北京科技大学学报,2005,27(4):408-412.
- [11] 王素琴,闫海,张宾,等.不同氮源形态和植物激素对小球藻 USTB01 生长及叶黄素含量的效应[J].科技导报,2005(12): 37-40.
- [12] 王素琴,李雅文,闫海,等.小球藻 USTB-01 的异养培养和叶黄素的生产[J].北京科技大学学报,2007,29(8):766-769.
- [13] 刘硕,许倩倩,张宾,等.从异养小球藻 USTB-01 中提取纯化叶黄素研究[J].现代化工,2007,27(2):392-394.
- [14] 陈晓红.碘量法测定葡萄糖含量微型实验研究[J].光谱实验室,2006,23(6):1265-1266.
- [15] Chen F, Jonhs M R. Effect of C/N ratio and aeration on fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*[J]. J Appl Phycol, 1991(3): 203-209.
- [16] Cheng F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth[J]. Trends in Biotechnol, 1996, 14(3): 421-426. ■

《现代化工》“海外纵横”栏目征稿启事

《现代化工》“海外纵横”主要介绍国外某一国家或地区热点科研领域的开发应用状况、开发方向,或某一行业的发展现状、发展方向和问题探讨,以及有突出表现的国外公司的科研动态和研发经验等。

如有合适选题,请与“海外纵横”栏目编辑童志勇联系,以确定合适的主题和格式。联系电话:010-64444105-839, Email: tongzy@cheminfo.gov.cn。(本刊编辑部)