

操作模式和光生物反应器类型对湛江等鞭金藻生长和油脂积累的影响

董学卫¹, 何庆芳^{2,3}, 彭振英², 于金慧², 边菲², 毕玉平^{2*}, 李有志^{1*}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 山东省农业科学院生物技术中心, 山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室, 农业部黄淮海作物遗传改良与生物技术重点开发实验室, 山东济南 250100; 3. 美国阿肯色大学应用科学系, 美国小石头城 72204)

摘要: 对分批和半连续模式下柱式和平板式光生物反应器中湛江等鞭金藻的生长和油脂积累特征进行了评估。分批培养时平板式反应器可获得更高生物质质量浓度(2.06 g/L)、生物质产率[228.89 mg/(L·d)]和油脂产率[83.34 mg/(L·d)], 且操作简单, 易于放大, 适于工业化培养。平板式反应器半连续培养虽然稳定期生物质质量浓度低于批次培养, 但可获得更高生物质产率[342.83 mg/(L·d)]。气相分析结果表明, 湛江等鞭金藻含有大量多不饱和脂肪酸。结果表明, 平板式反应器中批次培养有利于湛江等鞭金藻油脂积累, 半连续培养有利于生物质积累, 可为工业化生产提供借鉴。

关键词: 湛江等鞭金藻; 半连续培养; 柱式光生物反应器; 平板式光生物反应器; 产率

中图分类号: Q949

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)09-0114-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2016.09.027

Effects of different culture systems and operation regimes on the growth and lipid accumulation of microalgae *Isochrysis zhanjiangensis*

DONG Xue-wei¹, HE Qing-fang^{2,3}, PENG Zhen-ying², YU Jin-hui², BIAN Fei², BI Yu-ping^{2*}, LI You-zhi^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop, Animal and Poultry of Shandong Province, Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Huanghuaihai, Ministry of Agriculture, Jinan 250100, China; 3. Department of Applied Science, University of Arkansas, Little Rock, Arkansas 72204, US)

Abstract: The effects of various cultivation modes of *I. zhanjiangensis* in different photobioreactors are studied to achieve sustainable high biomass and lipid productivity. The kinetic culture characteristics and lipid accumulation of the microalgae *I. zhanjiangensis* are evaluated in column and flat plate photobioreactor in batch and semi-continuous mode. The cells achieve higher biomass concentration (2.06 g/L), biomass productivity [228.89 mg/(L·d)] and lipid productivity [83.34 mg/(L·d)] in flat plate photobioreactor than that in column photobioreactor under batch systems. The cultivations in flat plate photobioreactor under semi-continuous mode result in higher biomass productivity [342.83 mg/(L·d)], although the steady state cell density is lower than that obtained from the batch one. The results show the potential of batch cultivation of *I. zhanjiangensis* in flat plate photobioreactor for lipid production and semi-continuous for biomass production.

Key words: *Isochrysis zhanjiangensis*; semi-continuous cultivation; column photobioreactor; flat plate photobioreactor; productivity

湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 属于金藻门, 富含促进鱼类生长和免疫功能所必需的多不饱和脂肪酸 (n-3 polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 广泛应用于水产养殖, 但成本高, 一直无法与鱼油竞争^[1]。光生物反应器作为典型的封闭式系统, 可更好地控制培养环境, 提高光、CO₂ 和其他物质利用率, 获得高细胞密度, 用于食品和药物生产^[4], 但技

术要求高, 初期投资大, 经济性不如开放式, 阻碍了商业化应用^[5]。为解决上述问题, 研究人员设计了不同的反应器用于微藻培养, 如管式光生物反应器、平板式光生物反应器和鼓泡塔光生物反应器等^[3,6]。

笔者自制了柱式和平板式 2 种光生物反应器, 并对湛江等鞭金藻进行放大培养, 研究了其生长和

收稿日期: 2016-03-15

基金项目: 国家国际科技合作项目 (2012DFA30450); 泰山学者海外人才基金资助专项 (tshw20091014); 国家自然科学基金项目 (30871541); 高校院所自主创新计划项目 (20100404)

作者简介: 董学卫 (1982-), 男, 博士, 工程师, 主要从事微藻工业化生产的研究, dxwsd@163.com; 毕玉平 (1961-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微藻工业化和基因工程的研究, 通讯联系人, yupingbi@vip.sina.com; 李有志 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事微生物资源及其利用的研究, 通讯联系人, dyzl@gxu.edu.cn。

产油特性。随后,利用更适于湛江等鞭金藻生长的平板式反应器进行半连续培养,以探索经济性更好的培养方式,为海洋微藻工业化生产提供理论依据。

1 实验部分

1.1 藻种

湛江等鞭金藻购自中国科学院典型培养物保藏委员会下属的海藻种质库。

1.2 光生物反应器

实验在2种不同的光生物反应器中进行,如图1所示。 $\phi 8\text{ cm} \times 120\text{ cm}$ 的柱式反应器由5 mm厚玻璃制成,工作体积约4 L;光照由垂直环列于反应器四周的3支日光灯管提供;8 cm光径平板式反应器的工作体积约40 L,使用20 mm玻璃制成。平板式反应器的底部、中部和两边使用不锈钢固定,防止玻璃被气泡和机械力打破。正面和背面(光路)间直径为8 cm,正面和背面区域设计为80 cm(长)、60 cm(高),光源系统由10根日光灯管组成,水平排列,固定在垂直支架上,通过改变灯架与水槽的距离调节光强 $[0 \sim 400\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$,并可自动开启/关闭以模拟控制光暗周期;空气和 CO_2 的供气系统由泵、输气管、调节阀组成。

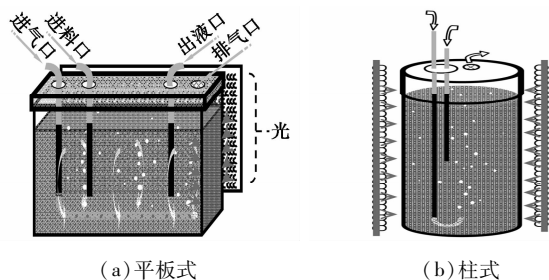


图1 光生物反应器示意图

1.3 光生物反应器的灭菌

反应器先利用次氯酸钠(5 mL/L)化学法灭菌24 h,随后用空气流提供2 h的硫代硫酸钠(0.1 g/L)以中和剩余的氯。最后,在接种和添加培养基前对反应器用灭菌的蒸馏水洗涤2次。

1.4 柱式和平板式反应器分批和半连续培养

分批培养时将处于对数生长期的湛江等鞭金藻调整到细胞密度约为 $7.7 \times 10^6\ \text{cells}/\text{mL}$,充入含 CO_2 空气(体积分数为2%)以提供碳源和防止细胞沉淀。空气和 CO_2 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 膜过滤除菌。 $f/2$ 培养基中加入葡萄糖(0.2 g/L),光强为 $100\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期比为14:10, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养9 d;半连续培养从第8 d开始,更新率为35%,更新周期为1 d。将收获的体积置换为新鲜培养基,温度、光照、光周

期和充气等条件不变,测定细胞密度、干重、总脂质量分数,计算比生长速率(μ)、生物质产率和油脂产率。

1.5 微藻生长和生化成分评估

微藻细胞个数采用奥林巴斯 IX71 显微镜(Olympus, 日本)直接镜检计数。比生长速率(μ)计算式为:

$$\mu = [\ln(X_2/X_1)] / (t_2 - t_1)$$

其中: X_1 (cells/mL)为微藻 t_1 (d)时细胞密度; X_2 (cells/mL)为微藻在 t_2 (d)时细胞密度。

微藻细胞通过离心分离(转速为 $6\ 000 \times g$, 5 min),蒸馏水洗涤2次,放入预干燥和称重的培养皿 40°C 干燥至恒重,测干重。总脂采用重量法提取并称重^[6]。多糖通过苯酚-硫酸法以葡萄糖为标准测定^[7]。蛋白质质量分数由考马斯亮蓝染色法测定,以牛血清白蛋白为标准^[8]。采用Dong等方法将藻类生物质直接甲酯化^[9],用气相色谱分析脂肪酸甲酯组成。

1.6 生物质产率和油脂产率的测定

生物质产率(P_{biomass})计算式为:

$$P_{\text{biomass}} = \text{微藻干重}(\text{g}) / (\text{培养体积}(\text{L}) \times \text{培养时间}(\text{d}))$$

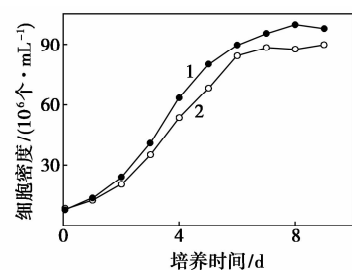
油脂产率(P_{lipid})计算式为:

$$P_{\text{lipid}} = (\text{微藻干重}(\text{g}) \times \text{脂类含量}(\%)) / (\text{培养体积}(\text{L}) \times \text{培养时间}(\text{d}))$$

2 结果与讨论

2.1 柱式和平板式反应器中批次培养湛江等鞭金藻

相同操作条件柱式和平板式反应器生长曲线如图2所示。当接种浓度为 $7.7 \times 10^6\ \text{cells}/\text{mL}$,藻细胞经过1 d适应后快速生长直至第8 d,平板式反应器最大细胞密度和比生长速率分别为 $99.66 \times 10^6\ \text{cells}/\text{mL}$ 和 $0.32\ \text{d}^{-1}$,高于柱式反应器的 $87.56 \times 10^6\ \text{cells}/\text{mL}$ 和 $0.30\ \text{d}^{-1}$ 。影响微藻生长的主要因



1—平板式光生物反应器;2—柱式光生物反应器

图2 湛江等鞭金藻在平板式和柱式反应器中生长曲线

素是光照,随藻液浓度升高,柱式反应器单个藻体受到光照变少,限制其生长,培养后期藻细胞死亡率较大。平板反应器培养后期藻细胞密度基本不变,可避免大量死亡,利于控制收获时间。

生物质产率是评估微藻生产可行性的一个重要参数之一。不同反应器和培养模式下湛江等鞭金藻生物质、油脂之间的比较如表 1 所示。由表 1 可以看出,在混养培养条件下,葡萄糖和 CO₂ 作碳源,平板式反应器中湛江等鞭金藻生物质质量浓度为 2.06 g/L,生物质产率为 228.89 mg/(L·d),高于柱式反应器生物质质量浓度(1.75 g/L)和生物质产率(194.44 mg/(L·d))。李志勇等^[10]培养螺旋藻的研究中也发现平板式反应器中生物质质量浓度比柱式高。

表 1 湛江等鞭金藻生物质、油脂之间的比较

反应器及培养方式	生物质质量浓度/(g·L ⁻¹)	生物质产率/[mg·(L·d) ⁻¹]	脂类质量分数/%	脂类产率/[mg·(L·d) ⁻¹]
柱式批次培养	1.75	194.44	38.05	73.99
平板式批次培养	2.06	228.89	36.41	83.34
平板式半连续培养	1.21	342.83	22.74	77.96

不同反应器中和培养模式下有机物质质量分数如表 2 所示。由表 2 可知,柱式和平板式反应器培养的湛江等鞭金藻有机物的质量分数并不一致。与柱式相比,平板式反应器中湛江等鞭金藻多糖和蛋白质质量分数略高。这是由于平板式反应器更利于藻体接受光照, Vonshak 等发现光强增加会导致多糖质量分数的上升^[11],但没有明确证据证明光照和多糖积累间有正相关^[12]。由于生物质质量浓度高,尽管脂类质量分数略低,平板式反应器仍具有更好的生物质产率和油脂产率。鉴于上述结果,且平板式反应器更易于放大及半连续操作,选择平板式反应器对湛江等鞭金藻进行半连续培养,探索获得更大生物质产量的可能。

表 2 湛江等鞭金藻有机物质质量分数 %

反应器及培养方式	总脂	蛋白质	多糖	其他
柱式批次培养	38.05	19.99	30.61	11.35
平板式批次培养	36.41	21.46	35.40	6.73
平板式半连续培养	22.74	27.06	41.57	8.63

2.2 平板式反应器中半连续培养湛江等鞭金藻

半连续培养在批次实验最佳条件基础上进行,生长曲线如图 3 所示。由图 3 可以看出,湛江等鞭金藻收获细胞密度约为 60 × 10⁶ cells/mL,比批次培

养要低。半连续培养时生物质和有机物质质量分数如表 1、表 2 所示。生物质质量浓度为 1.21 g/L,生物质产率为 342.83 mg/(L·d),比批次培养高,这与前人培养结果一致^[13-14]。批次培养虽然最终细胞浓度高,但最初生长缓慢,且最后的系统清洗过程浪费时间,因此可以利用半连续培养提高湛江等鞭金藻生物质产率。半连续培养湛江等鞭金藻的总脂质量分数为 22.74%,油脂产率为 77.96 mg/(L·d),与批次培养[83.34 mg/(L·d)]相当,这与脂类质量分数下降有关。Adasm 等在培养 *N. oleoabundans* 时也发现,半连续培养比批次培养油脂产率低^[15],这是由于新鲜培养基的加入提供了更多氮源,不利于脂类积累,Chen(2013)和 Sun(2014)等在研究中证实,氮缺乏可有效提高微藻脂类质量分数^[16-17]。Ho 等研究发现,半连续培养的微藻中脂类质量分数也出现下降,但由于半连续培养极大地增加了生物质产率,总体上脂类产率比批次培养出现提升^[18]。

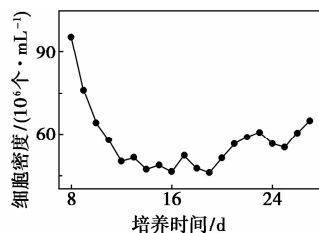


图 3 湛江等鞭金藻在平板式反应器中半连续培养生长曲线

2.3 脂肪酸组成

不同反应器中批次培养 9 d 和半连续培养 19 d 时湛江等鞭金藻主要脂肪酸组成变化如表 3 所示。湛江等鞭金藻含有 29.16% ~ 32.27% 的 PUFA。主要脂肪酸为棕榈油酸 (palmitoleic acid, 16:1)、EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5n3)、棕榈酸 (palmitic acid, 16:0) 和肉豆蔻酸 (myristic acid, 14:0), 占总脂肪酸的 90% 以上。而硬脂酸 (stearic acid, C18:0)、油酸 (oleic acid, 18:1)、亚油酸 (linoleic acid, 18:2)、γ-亚麻酸 (γ-linolenic acid, 18:3n6, GLA)、α-亚麻酸 (Alpha Linolenic Acid, 18:3n3, ALA) 和 DHA (docosahexaenoic acid, 22:6n-3) 属于微量组分。平板式反应器培养的湛江等鞭金藻的多不饱和脂肪酸组分质量分数(占总脂肪酸的 31.36%)略低于柱式反应器中多不饱和脂肪酸组分质量分数(占总脂肪酸的 32.27%)。批次和半连续培养得到的脂肪酸分布相似(如表 3 所示),这与 Zhou 等^[19]研究结果一致,但是 Cerón-García 等^[20]对 *Phaeodactylum tri-*

cornutum 的研究表明,半连续培养造成结构性或存储性脂类的变化,并最终改变脂肪酸组成。

表3 湛江等鞭金藻脂肪酸组成

<i>w</i> (脂肪酸)/%	柱式批次培养	平板式批次培养	平板式半连续培养
C14:0	14.69 ± 0.66	15.10 ± 0.43	16.01 ± 0.22
C16:0	23.46 ± 1.39	18.26 ± 0.52	18.28 ± 0.31
C16:1	26.11 ± 1.05	32.00 ± 1.99	32.82 ± 1.10
C18:0	0.62 ± 0.13	0.48 ± 0.07	0.76 ± 0.10
C18:1	2.86 ± 0.20	2.80 ± 0.14	2.97 ± 0.30
C18:2	0.39 ± 0.09	0.45 ± 0.11	0.39 ± 0.08
ALA	0.54 ± 0.05	0.54 ± 0.09	0.55 ± 0.13
GLA	0.29 ± 0.07	0.34 ± 0.12	0.34 ± 0.06
C20:5	25.98 ± 1.31	25.18 ± 1.06	23.40 ± 0.89
C22:6	5.07 ± 0.25	4.85 ± 0.38	4.48 ± 0.33
SFA	38.77 ± 1.41	33.84 ± 0.60	35.05 ± 0.49
MUFA	28.97 ± 2.63	34.8 ± 0.96	35.79 ± 1.30
PUFA	32.27 ± 1.27	31.36 ± 0.81	29.16 ± 1.10
UFA	61.24 ± 1.41	66.16 ± 0.60	64.95 ± 0.49

注:SFA,饱和脂肪酸(saturated fatty acid);UFA,不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acid);MUFA,单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid);PUFA,多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid)。

3 结语

湛江等鞭金藻可积累大量生物质和油脂。利用不同体积(4、40L)和不同类型(平板式和柱式)的反应器,均可实现微藻的高密度培养,生物质质量浓度可达到1.75~2.06 g/L。平板式反应器批次培养可获得较高油脂产率,而半连续培养可获得较高生物质产率,平板式反应器的短光路设计使其光能利用率高,溶氧易释放,造价低,可简单通过增加反应器的长度扩大规模,适合室外大规模培养。

参考文献

[1] 陈艳梅,石阳,王明兹,等. 海洋养殖饵料微藻开发利用进展[J]. 生物技术通报,2015,31(9):60-65.

[2] Dogaris I, Welch M, Meiser A, et al. A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198:316-324.

[3] Kunjapur A M, Eldridge R B. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, 49(8):3516-3526.

[4] 朱俊英,荣峻峰,宗保宁. 影响微藻规模化培养的因素[J]. 催化学报,2013,34(1):80-100.

[5] 袁桃,梁斌,李茂涛,等. 管道式微藻光生物反应器设计[J]. 现代化工,2013,33(5):104-107.

[6] Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959,

37(8):911-917.

[7] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3):350-356.

[8] Liu J, Sommerfeld M, Hu Q. Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11):4785-4798.

[9] Dong X W, He Q F, Peng Z Y, et al. Production of γ -linolenic acid and stearidonic acid by *Synechococcus* sp. PCC7002 containing cyanobacterial fatty acid desaturase genes. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-016-4369-x>.

[10] 李志勇,郭祀远,李琳,等. 不同类型光生物反应器的螺旋藻培养特性研究[J]. 广西大学学报(自然科学版),1998,3:290-293.

[11] Vonshak A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology[M]. London: Taylor & Francis, 2002:135-165.

[12] Carvalho A P, Monteiro C M, Malcata F X. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(5):543-552.

[13] Fuentes-Grünwald C, Bayliss C, Zanain M, et al. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 189:357-363.

[14] Ho S H, Xie Y, Chan M C, et al. Effects of nitrogen source availability and bioreactor operating strategies on lutein production with *Scenedesmus obliquus* FSP-3[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184:131-138.

[15] Adams C, Godfrey V, Wahlen B, et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 131:188-194.

[16] Chen C Y, Zhao X Q, Yen H W, et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 78:1-10.

[17] Sun X, Cao Y, Xu H, et al. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155:204-212.

[18] Ho S H, Chen C N, Lai Y Y, et al. Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 163:128-135.

[19] Zhou X P, Ge H M, Xia L, et al. Evaluation of oil-producing algae as potential biodiesel feedstock[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 134:24-29.

[20] Cerón-García M C, Fernández-Sevilla J M, Sánchez-Mirón A, et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147:569-576. ■