

产烃葡萄藻在气升式光生物反应器中的分批补料培养

王军, 杨素玲, 丛威, 蔡昭铃

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 在 3 L 气升式光生物反应器中进行了产烃葡萄藻的培养。批式培养时, 葡萄藻消耗氮、磷的速度较快, 培养液中氮、磷营养盐的缺乏限制了藻细胞进一步生长和增殖。采取分批补料方式, 使培养液中 KNO_3 和 K_2HPO_4 浓度分别维持在 100 和 30 mg/L, 可克服氮、磷限制问题。与批式培养相比, 生物量从 1.3 g/L 增加到 1.9 g/L, 烃含量从占细胞干重的 22% 提高到 29%, 从而使烃产量从 0.286 g/L 增加到 0.551 g/L, 提高了 92.6%。

关键词: 葡萄藻(*Botryococcus braunii*); 气升式光生物反应器; N; P; 分批补料

中图分类号: Q949.21 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)04-0366-06

1 前言

呈串状集落生的葡萄藻(*Botryococcus braunii*, 又译丛粒藻)是一种世界性广布的淡水单细胞绿藻, 其含烃量占细胞干重的 15%~75%(因藻种和培养条件而异)^[1], 大大高于其它微生物的产烃量, 在一些石油沉积中几乎全部的有机质都是该藻形成的^[2], 故又被称为“油藻”。鉴于该藻有可能提供无污染、可再生的替代能源, 自 20 世纪 70 年代石油危机爆发后, 日益受到重视, 美、日、法等国家相继开展了利用该藻生产可再生能源的研究^[3]。

对葡萄藻生理生化的研究表明, 氮和磷是细胞的重要组成成份, 活跃参与细胞的许多生理生化反应^[4,5]。氮源和磷源的浓度对葡萄藻生长有显著影响, 在一定范围内适当增加培养基中硝酸盐和磷酸盐的起始浓度, 可加快葡萄藻的生长, 提高最终生物量和产烃量^[6,7]。但初始硝酸盐和磷酸盐浓度过高不仅会对藻细胞产生一定的抑制^[8], 而且还易与其它无机盐相互作用形成沉淀。目前对葡萄藻的研究主要处于摇瓶培养阶段, 反应器中氮、磷对葡萄藻生长和产烃的影响至今未有报道。本文于 3 L 气升式光生物反应器中培养葡萄藻, 考察了氮、磷营养盐的供给和消耗对葡萄藻生长、叶绿素积累和产物生成的影响, 并采取分批补料方式补充氮、磷源。

2 材料与amp;方法

2.1 藻种与培养基

葡萄藻(*Botryococcus braunii* 357)由中国科学院水生生物研究所提供。

培养基采用改进的 Chu13×2 培养基^[9], 用 KOH 调节 pH 到 7.5。

2.2 3 L 气升式光生物反应器

反应器由罐体、气体提升管、气体分布器组成。整体是由耐热耐压的硅硼玻璃制成, 可进行高压蒸汽灭菌。罐体直径 100 mm, 高 450 mm, 提升管与外罐体同心, 直径 70 mm, 高 360 mm。反应器底部为弧形构造, 气体分布器由孔径约 80 μm 的玻砂制成, 设置于底部正中央。反应器总体积 3 L, 工作体积 2.8 L。培养过程中, 整个反应器置于 HPG-280B 光照培养箱中(哈尔滨东联技

术开发有限公司)以控制光强、温度及光照时间. 空气和 CO_2 定量混合后经孔径为 $0.2 \mu\text{m}$ 的空气过滤器除菌, 通过气体分布器进入反应器.

2.3 培养方法

藻种培养: 300 ml 三角瓶中装入 200 ml Chu13×2 培养基, 灭菌后挑单藻落置于摇床培养 25 d, 摇床顶部自设荧光灯提供光照. 培养条件 温度 25°C , 三角瓶瓶口处光强为 $2.5 \text{mW}/\text{cm}^2$ (持续光照), 转速 120 r/min.

批次培养: 将藻种液低速离心浓缩至 100 ml 后, 接到装有 2.7 L Chu13×2 培养基的气升式反应器中, 使反应器中培养初始细胞干重在 $0.01 \text{g}/\text{L}$ 左右. 培养温度 25°C , 反应器外壁光强为 $4.2 \text{mW}/\text{cm}^2$ (持续光照), 通空气量为 $400 \text{ml}/\text{min}$, 其中含 $1\%(\varphi)\text{CO}_2$. 定时取样分析.

一次补料培养: 批次培养过程中, 当培养液中 KNO_3 浓度降低到低于 $50 \text{mg}/\text{L}$, 且 K_2HPO_4 浓度降到 $0 \text{mg}/\text{L}$ 时, 补加 50 ml KNO_3 和 K_2HPO_4 混合溶液, 使此时培养液中 KNO_3 和 K_2HPO_4 浓度分别提高到 600 和 $200 \text{mg}/\text{L}$ 左右. 其它培养条件同批次培养.

分批补料培养: 批次培养过程中, 当培养液中 KNO_3 浓度降到 $50 \text{mg}/\text{L}$ 、而 K_2HPO_4 浓度降到 $0 \text{mg}/\text{L}$ 时, 开始补加 20 ml KNO_3 和 K_2HPO_4 混合溶液. 隔 1 d 补加 1 次, 使培养液中 KNO_3 和 K_2HPO_4 浓度分别保持在 100 和 $30 \text{mg}/\text{L}$ 左右. 其它培养条件同批次培养.

2.4 分析方法

细胞干重的测定: 取 10 ml 培养液于 $4000 \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min, 用蒸馏水洗涤后, 于 80°C 干燥 24 h, 称其干重.

叶绿素含量分析: 取一定量的藻液离心, 弃上清液, 加入 90% 的丙酮超声波破碎后离心, 收集丙酮提取液, 测其在 730, 664, 647, 630 nm 处的光吸收值, 按公式^[10]计算叶绿素 a, b 的浓度, 两者之和即为总的叶绿素含量.

烃的测定: 取一定量的藻液于 $4000 \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min, 用蒸馏水洗涤后, 于 60°C 干燥 24 h, 加 50 ml 正己烷超声破碎 30 min 后离心, 收集正己烷提取液, 在旋转蒸发仪上于 30°C 蒸发掉正己烷, 余下即为烃, 称其质量^[11].

NO_3^- 浓度测定: 参照文献[12] 绘出 NO_3^- 浓度标准曲线. 取一定量藻液以 $4000 \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, 上清液适当稀释后测定 220 nm 吸光值, 对照标准曲线得出 NO_3^- 浓度.

HPO_4^{2-} 浓度测定: 用比色法^[13] 绘出 HPO_4^{2-} 浓度标准曲线. 取一定量藻液以 $4000 \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, 上清液适当稀释, 加入显色剂, 测定 885 nm 吸光值, 对照标准曲线得出 HPO_4^{2-} 浓度.

3 结果与讨论

3.1 葡萄藻在气升式光生物反应器中批次培养

在 3 L 气升式光生物反应器中批次培养葡萄藻, 细胞生长、叶绿素积累和氮、磷营养盐浓度变化情况如图 1 所示. 由图可看出, 在气升式反应器中, 葡萄藻经过较短的延滞期后在第 3 d 进入对数生长期, 在第 8 d 进入减速生长期, 在第 13 d 细胞干重达到最大值 $1.30 \text{g}/\text{L}$, 此时烃产量为 $0.286 \text{g}/\text{L}$, 占细胞干重的 22%. 随后细胞开始衰亡, 生物量迅速下降. 与细胞生长相对应, 培养液中叶绿素浓度在前 3 d 无明显变化, 随后迅速增加, 在第 10 d 达到最大值 $6000 \mu\text{g}/\text{L}$, 此后叶绿素浓度稍有下降. 与典型摇瓶培养^[14]相比, 气升式光生物反应器培养葡萄藻, 培养周期从 30 d 缩短至 15 d 左右, 生物量从 $0.95 \text{g}/\text{L}$ 提高到 $1.3 \text{g}/\text{L}$, 产烃量从 $0.19 \text{g}/\text{L}$ 提高到 $0.286 \text{g}/\text{L}$, 表明气升式光生物反应器适合大规模培养葡萄藻. 由图 1(b)可看出, 在气升式光生物反应器中培养葡萄藻, 氮

源、磷源的消耗均较快,在前 10 d, NO_3^- 以 55 mg/(L·d)的速率迅速被消耗,在第 13 d,当生物量达到最大值时, NO_3^- 浓度降到最小值,后期由于细胞的破裂导致培养液中氮含量略有上升; HPO_4^{2-} 在前 6 d 以 22 mg/(L·d)的速率迅速消耗,此后消耗速率减慢,到第 13 d,培养液中 HPO_4^{2-} 几乎降为 0. 整个培养过程中,由于通气中配入的 CO_2 对培养液的 pH 有调节和缓冲作用, pH 一直维持在 7.1~7.7,变化不大. 以上结果表明,由于葡萄藻在气升式反应器中生长较快,相应地对氮、磷的利用也加快,培养液中氮、磷营养盐浓度迅速降低,当生长进行到一定时间,氮、磷营养盐的缺乏可能成为限制藻细胞进一步生长和增殖的原因.

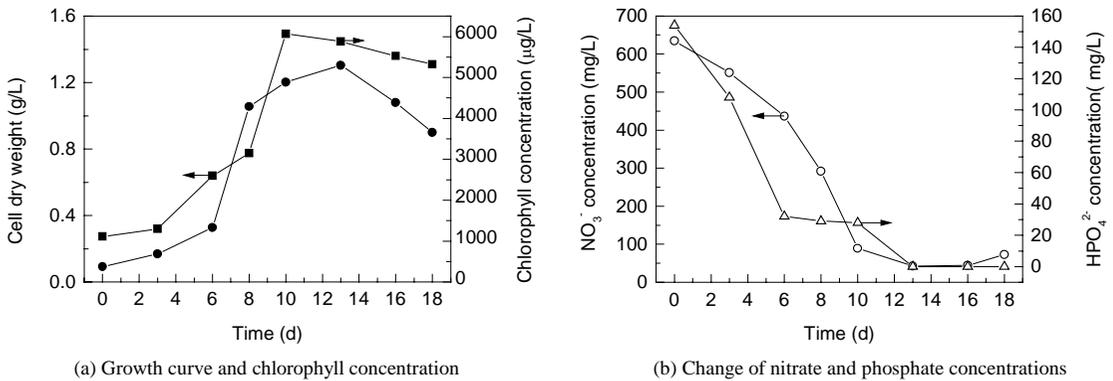


图 1 葡萄藻在气升式反应器中批次培养

Fig.1 The batch culture of *Botryococcus braunii* in air-lift photobioreactor

3.2 一次性补充氮源和磷源对葡萄藻生长的影响

为证实缺乏氮源、磷源是引起葡萄藻迅速衰亡的原因,在葡萄藻进入减速生长期后期时,向培养液中加入高浓度的 KNO_3 和 K_2HPO_4 溶液,其对葡萄藻生长和叶绿素积累的影响以及氮、磷营养盐的消耗情况如图 2 所示.

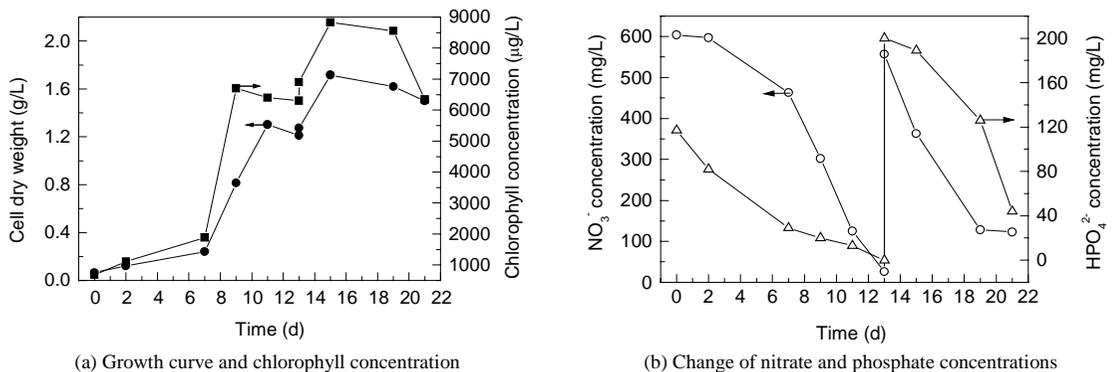


图 2 一次性补加氮源和磷源对葡萄藻生长的影响

Fig.2 Effect of feeding nitrate and phosphate one time on the growth of *Botryococcus braunii* in air-lift photobioreactor

在培养的第 13 d,葡萄藻进入减速生长期后期,细胞干重为 1.30 g/L, KNO_3 浓度低于 50 mg/L, K_2HPO_4 浓度接近 0,此时补充 KNO_3 和 K_2HPO_4 ,使培养液中 KNO_3 和 K_2HPO_4 浓度分别提高到 600 和 200 mg/L 左右. 3 h 后取样测定,培养液中叶绿素浓度和细胞干重均明显增加. 在第 15 d 细胞干

重和叶绿素浓度达到最大值,分别为 1.75 g/L 和 9000 $\mu\text{g/L}$,均高于补料前的数值,随后细胞开始衰亡,而此时培养液中氮磷的浓度仍在较高水平.以上结果表明,在细胞生长进入减速生长期后,向培养液中加入适量氮、磷营养盐,已经停止生长的葡萄藻细胞恢复了活力,又开始生长,证实了缺乏氮、磷营养是引起葡萄藻过早衰亡的原因;补氮、磷后,藻液中叶绿素浓度和生物量迅速提高,叶绿素是含氮光合色素,这表明补加氮源和磷源后,氮、磷立即被细胞同化,合成组成细胞成份的有机物质;培养后期一次性补加高浓度的氮源和磷源,虽能提高葡萄藻的生物量,但提高的幅度不大,并且氮、磷利用也不完全.

3.3 葡萄藻在气升式反应器中分批补料培养

采取分批补料方式培养葡萄藻,使培养液中氮、磷盐浓度维持在 1 个相对恒定水平,结果如图 3 所示.在培养的第 10 d,葡萄藻进入减速生长期后期,此时第 1 次补加氮源和磷源,以后每隔 1 d 补加 1 次,使 KNO_3 和 K_2HPO_4 分别维持在 100 和 30 mg/L 左右.从图 3 可看出,自补加氮、磷开始,培养液中叶绿素浓度和细胞浓度持续上升,在第 16 d 达到最大值,叶绿素浓度为 10000 $\mu\text{g/L}$,细胞干重为 1.9 g/L .从图 3 还可看出,每次补加氮源和磷源后,隔 3 h 取样测定,叶绿素浓度和细胞干重明显增加,这与前面的结果相符合,表明葡萄藻对氮源和磷源的利用不经过一个适应期,氮和磷迅速被同化.

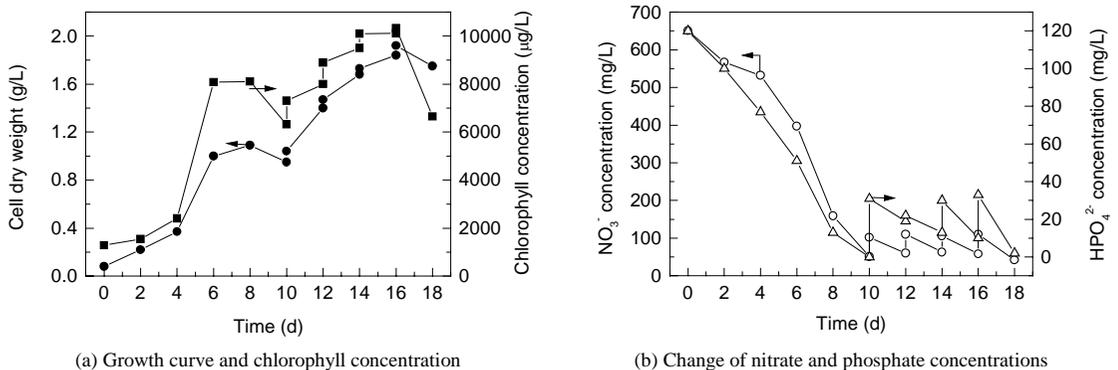


图 3 分批补料培养葡萄藻

Fig.3 The fed-batch culture of *Botryococcus braunii* in air-lift photobioreactor

分批补料与批式培养的最大生物量和产烃量的比较如表 1 所示.与批式培养相比,分批补料培养使生物量从 1.3 g/L 增加到 1.9 g/L ,烃含量从占细胞干重的 22% 提高到 29%,从而使烃产量从 0.286 g/L 增加到 0.551 g/L ,提高了 92.6%.由此可见,氮、磷分批补料培养可在一定程度上解决葡萄藻在气升式反应器中培养氮、磷源限制问题,提高培养密度和细胞含烃量,从而较大幅度提高产烃量.

表 1 不同培养方式对葡萄藻生物量和产烃量的影响

Table 1 The effect of different cultivation modes on biomass of <i>Botryococcus braunii</i> and hydrocarbon production			
Cultivation mode	Cell dry weight (g/L)	Hydrocarbon production (g/L)	Hydrocarbon content (% DW)
Batch culture	1.3	0.286	22
Fed-batch culture	1.9	0.551	29

4 结论

产烃葡萄藻在气升式光生物反应器中培养,藻细胞生长较快,相应地对氮、磷营养的利用也

加快, 培养液中氮、磷营养盐浓度迅速降低, 当生长进行到一定时间, 氮、磷营养盐的缺乏限制了藻细胞进一步生长和增殖; 采取分批补料培养方式, 使培养液中氮、磷浓度维持在适当的水平, 可在一定程度上解决葡萄藻在气升式反应器中培养氮、磷源限制问题, 提高生物量和细胞含烃量, 从而大幅度提高产烃量。

参考文献:

- [1] Largeau C, Casadevall E, Berkalf C. Sites of Accumulation and Composition of Hydrocarbons in *Botryococcus braunii* [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19(6): 1043–1051.
- [2] Wake L V, Hillen L W. Study of a “Bloom” of the Oil-rich Alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, 22(8): 1637–1656.
- [3] 唐赢中, 黄利群, 严国安. 藻类产烃研究进展 [J]. *生物工程进展*, 1997, 17(2): 23–26.
- [4] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用 [M]. 北京: 农业出版社, 1983. 124–137.
- [5] Lupi F M, Fernandes H M L. Influence of Nitrogen Source and Photoperiod on Exopolysaccharide Synthesis by the Microalga *Botryococcus braunii* UC 58 [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16(7): 546–550.
- [6] Wolf F R, Nemethy E K, Bassham J A. Biosynthesis of Unusual Acyclic Isoprenoids in the Green Alga *Botryococcus braunii* [J]. *Photochemistry*, 1985, 24(4): 733–737.
- [7] Casadevall E, Dif D, Largeau C. Studies on Batch and Continuous Cultures of *Botryococcus braunii* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, 27(3): 286–295.
- [8] Weetal H H. Studies on Nutritional Requirements of the Oil Producing Alga *Botryococcus braunii* [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1985, 11(5): 377–391.
- [9] Brown A C, Knights B A. Hydrocarbon Content and Its Relationship to Physiological State in the Green Alga *Botryococcus braunii* [J]. *Phytochemistry*, 1969, 8(3): 543–547.
- [10] 纪明侯. 海藻化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 466–482.
- [11] Sawayama Shigeku, Minowa Tomoaki, Dote Yutaka. Growth of the Hydrocarbon Rich Microalga *Botryococcus braunii* in Secondly Treated Sewage [J]. *Appl. Microb. Biotech.*, 1992, 38(2): 135–138.
- [12] Collos Y, Mornet F, Sciandra A. An Optical Method for the Rapid Measurement of Micromolar Concentrations of Nitrate in Marine Phytoplankton Cultures [J]. *J. Appl. Phycol.*, 1999, 11(2): 179–184.
- [13] 帕森斯 T R. 海水分析的化学和生物学方法 [M]. 陈慈美, 陈于望, 译. 厦门: 厦门大学出版社, 1991. 24–27.
- [14] 杨廉婉, 王修垣. 纱布固定丛粒藻细胞产烃的研究 [J]. *微生物学报*, 1989, 29(6): 427–431.

Fed-batch Cultivation of *Botryococcus braunii* in an Air-lift Photobioreactor

WANG Jun, YANG Su-ling, CONG Wei, CAI Zhao-ling

(State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China)

Abstract: The culture of *Botryococcus braunii* was carried out in a 3 L air-lift photobioreactor. The batch cultivation results showed that the concentration of nitrate and phosphate ions decreased quickly by algal consumption, which limited the growth of *Botryococcus braunii*. Therefore, the fed-batch cultivation mode in which nitrate and phosphate were maintained in a certain range of concentration by multiple feeding in the late stage of fermentation was tested. Compared with batch cultivation, the cell concentration increased from 1.3 g/L to 1.9 g/L, hydrocarbon content increased from 22% to 29% on dry weight basis and the yield of hydrocarbon was greatly improved from 0.286 g/L to 0.551 g/L.

Key words: *Botryococcus braunii*; air-lift photobioreactor; nitrate; phosphate; fed-batch