

通气量和 CO₂ 对 *Nannochloropsis* sp. 在光生物反应器中的生长和 EPA 合成的影响

徐芳, 胡晗华, 丛威, 蔡昭铃, 欧阳藩

(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: 实验考察了在气升式内环流光生物反应器中通气量、CO₂ 含量等培养条件对 *Nannochloropsis* sp. 生长及 EPA 合成的影响. 结果表明, 在气升式内环流光生物反应器中培养, *Nannochloropsis* sp. 生长速率显著提高. 培养 8 d, *Nannochloropsis* sp. 生物量(干重)可达 857 mg/L, 是摇床培养的 2 倍. 在一定范围内, *Nannochloropsis* sp. 的生长速率随通气量的增加而增加, 在本实验条件下, 通气量为 500 mL/min 时生长最快, 而过高的通气量则对 *Nannochloropsis* sp. 的生长没有促进作用. 在通气中含 1%(φ) CO₂ 时, 可加快藻细胞的生长, 最大生长速率可达不配加 CO₂ 时的 1.8 倍. 通气量和 CO₂ 对 *Nannochloropsis* sp. 细胞内总脂肪酸及 EPA 的积累有显著影响. 在通气量为 400 mL/min 及 CO₂ 含量为 0.5% 时, 培养液中 EPA 产量最高, 达到 39.0 mg/L.

关键词: *Nannochloropsis* sp.; 气升式光生物反应器; 通气流量; CO₂ 浓度; EPA

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2004)05-0457-05

1 前言

多不饱和脂肪酸(PUFAs)对人体有重要的生理作用, 特别是二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)对防治心脏疾病、动脉硬化、癌症、风湿关节炎、哮喘和糖尿病等疾病有明显的效果^[1]. 海洋微藻中 PUFAs 含量较高, 是海洋食物链中 PUFAs 最基本的生产者^[2]. 由于从微藻中提取 EPA 工艺简单, 因此微藻日渐成为人们获取 EPA 的重要来源. *Nannochloropsis* sp. 是从中国东海海域采集并分离得到的一株黄绿色单细胞超微型藻(品系为 PP983), 经鉴定是真眼点藻纲的一个新种^[3]. 该藻具有生长快、抗逆性较好、EPA 含量高优点, 具有潜在的开发应用价值.

利用封闭式光生物反应器培养微藻是微藻大规模养殖的发展趋势, 光生物反应器具有培养条件控制性好、光利用效率高、传质效果好等优点, 特别适合于高附加值微藻的高密度纯种培养. 自 20 世纪 80 年代以来, 国外光生物反应器的研究工作发展迅速, 已设计的用于微藻培养的光生物反应器有各种形式和特点^[4,5]. 气升式内环流光生物反应器通过鼓入气体带动藻液循环, 可避免机械搅拌造成的藻体损伤, 达到一种更为柔和、均匀、稳定的混合效果, 有利于促进藻细胞的生长, 提高生物量^[6]. 本研究初步探讨了 *Nannochloropsis* sp. 在气升式光生物反应器中的生长特性以及通气量和补加 CO₂ 对藻细胞生长和 EPA 合成的影响, 以优化培养工艺, 为大规模培养 *Nannochloropsis* sp. 生产 EPA 提供基础条件.

2 材料与方法

2.1 藻种及培养基

Nannochloropsis sp. 由中国科学院水生生物所赠送, 采用改进的 f/2 培养基^[7].

2.2 培养方法

2.2.1 摇瓶培养

摇瓶培养实验在HZQ-Q光照摇床(哈尔滨市东联电子技术公司)中进行,摇床转速为120 r/min.培养温度为 $(23\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$,采用日光灯为光源,连续光照,瓶口处光照强度为 $78.6\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.采用250 mL三角瓶培养,装液量为150 mL,初始接种浓度为60.6 mg/L(干重,下同).

2.2.2 3 L 气升式光生物反应器培养

反应器由罐体、气体提升管、气体分布器组成.整体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.空气和 CO_2 定量混合后经孔径为0.2 μm 的空气过滤器除菌,通过气体分布器进入反应器.连续光照由固定在罐体周围的日光灯提供,罐体外表面的平均光强为 $70.8\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,循环水控制培养温度为 $(23\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$.反应器总体积为3 L,实验时加入培养基2.5 L,初始接种浓度为63.2 mg/L.

2.3 生长的测定

取50 mL藻液装入预先称重的离心管中,以4000 r/min离心10 min,沉淀用蒸馏水洗3次,于 60°C 烘干至恒重,称重,定义为细胞干重.

生长速率 $r=(X_2-X_1)/(t_2-t_1)$,式中 X_2 和 X_1 分别为取样时间为 t_2 和 t_1 时样品的干重.取 r 的最大值即为最大生长速率 r_{max} .

2.4 脂肪酸的测定(气相色谱法)

2.4.1 脂肪酸的提取与甲酯化

收获反应器中培养6 d的藻液离心、洗涤,将藻泥冷冻干燥后,称取约0.3 g冷冻干燥的藻粉,加入2 mL石油醚-乙醚(1:1)提取3 h.再加入0.4 mol/L氢氧化钾-甲醇溶液1 mL甲酯化3 h,反应完成后加水分层,取上清液注入气相色谱仪(Varian CP-3800 GC)分析.

2.4.2 色谱分析

色谱柱为毛细管柱(30 m \times 0.25 mm),进样口温度 250°C .氢火焰离子化检测器(FID), 280°C .实验采用程序升温:150 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;150~220 $^{\circ}\text{C}$,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$;220~280 $^{\circ}\text{C}$,20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$;280 $^{\circ}\text{C}$ 33 min.载气为高纯氮,流速2 mL/min.

用面积归一法得到各脂肪酸组分的相对含量,内标法测定EPA甲酯的含量,用 C_{17} 脂肪酸甲酯作为内标.

3 结果与讨论

3.1 *Nannochloropsis* sp.的气升式光生物反应器培养与摇瓶培养的比较

Nannochloropsis sp.在通气量为400 mL/min的气升式光生物反应器和摇瓶中的生长情况如图1所示.气升式光反应器由于能提供较好的气液传递及混合效果,较大的表面积与体积比,更有利于藻细胞对光能的吸收,因此显著促进藻细胞的生长,可提高生物量^[8].由图1可见,在气升式光生物反应器内,*Nannochloropsis* sp.生长较快,较早进入对数生长期.培养8 d后细胞浓度可达857.1 mg/L,为摇瓶培养(432.9 mg/L)的2倍.

3.2 通气量对 *Nannochloropsis* sp.生长和EPA合成的影响

适宜的通气量可以改善藻液的混合状况,从而更好地促进藻细胞对营养的吸收及对光能和 CO_2 的利用,同时也有利于排除光合作用产生的氧,避免过高的溶氧对细胞生长的抑制,并能降

低藻体间的相互遮荫现象^[6]。在一定的范围内，增加通气量能加速藻细胞的生长，但过高的通气量会产生较大的剪切力，对藻细胞造成损伤，不利于细胞的生长^[9]。由图 2 可见，当通气量为 500 mL/min 时，*Nannochloropsis* sp. 细胞生长最快，其最大生长速率可达 178.5 mg/(L·d)。

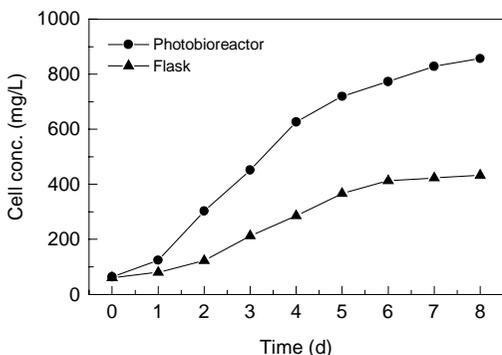


图 1 *Nannochloropsis* sp. 在气升式光生物反应器和摇瓶中的生长曲线

Fig.1 The growth curves of *Nannochloropsis* sp. in the airlift photobioreactor and flask

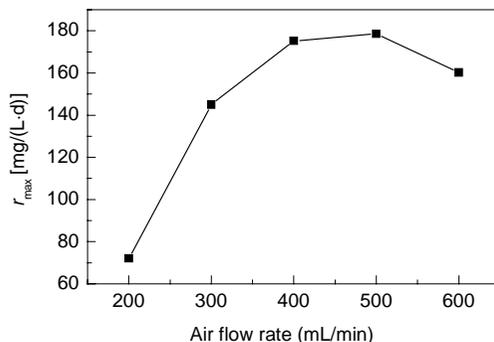


图 2 通气量对 *Nannochloropsis* sp. 在气升式光生物反应器中生长的影响

Fig.2 Effect of air flow rate on the growth of *Nannochloropsis* sp. in the airlift photobioreactor

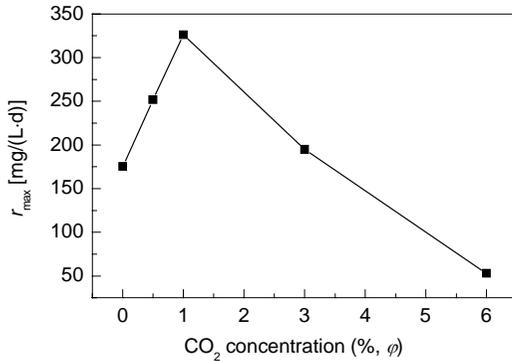
通气量对 *Nannochloropsis* sp. 细胞内脂肪酸组成的影响见表 1。由表可见，在实验的通气量范围内，*Nannochloropsis* sp. 细胞内脂肪酸含量丰富，其主要脂肪酸均为棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、油酸(C18:1)及 EPA(C20:5) 其含量约占脂肪酸总量的 80%~90%。随通气量增加，14:0, 16:0, 16:1, 18:1 等饱和、单不饱和脂肪酸在总脂肪酸中的比例增加，而 20:4 和 20:5 等多不饱和脂肪酸在总脂肪酸中的比例则降低。生物体内长链脂肪酸的合成都是从 16:0 开始，通过一系列脱氢酶、加氧酶和链延长酶类作用，向长链多不饱和脂肪酸转化^[10]。反应器中通入的气体可能改变了藻细胞内与此过程有关的酶的动力学环境，使有关酶的结构状态和活性受到影响，从而影响微藻生长和脂肪酸合成。在不同的通气量下，EPA 在藻细胞培养液中的含量也不同，当通气量为 400 mL/min 时，EPA 的含量最高，可达 36.7 mg/L。

表 1 通气量对 *Nannochloropsis* sp. 脂肪酸组成和 EPA 合成的影响
Table 1 Effects of air flow rate on fatty acid composition and EPA content of *Nannochloropsis* sp.

Air flow rate (mL/min)	Fatty acid composition (%)										Total fatty acid (%)	EPA yield (mg/L)
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	20:5	22:6	Others		
200	4.3	20.8	28.8	1.3	8.9	1.8	3.3	28.6	0.3	2.7	16.9	23.6
300	4.5	22.1	28.5	1.3	9.6	1.8	3.3	25.9	0.3	2.7	18.5	32.8
400	4.5	24.1	29.7	1.2	10.6	1.7	2.5	23.2	0.2	0.8	20.3	36.7
500	4.9	25.2	29.3	1.1	13.6	1.1	1.0	22.6	-	1.2	17.3	30.8
600	5.6	23.3	31.2	1.2	14.4	1.3	1.3	19.8	0.2	1.7	16.6	23.8

3.3 通气中的 CO₂ 浓度对 *Nannochloropsis* sp. 生长和 EPA 合成的影响

CO₂ 是光合自养微藻进行光合作用的碳源，适量供应 CO₂ 能显著促进微藻生长。但海洋微藻对 CO₂ 的利用和吸收能力有一定的限度，而且过量的 CO₂ 会降低培养液的 pH 值，所以 CO₂ 浓度过高会抑制藻细胞的生长。通气量为 400 mL/min 时，CO₂ 含量对藻细胞生长的影响见图 3。由图可见，在通气中含 1% CO₂ 时藻细胞生长最快，其最大生长速率可达不配加 CO₂ 时的 1.8 倍。

图3 CO₂浓度对 *Nannochloropsis* sp.生长的影响Fig.3 Effect of CO₂ conc. on the growth of *Nannochloropsis* sp.

CO₂含量对不同的微藻细胞内不饱和脂肪酸的积累产生不同的效应^[11,12]. CO₂不仅参与藻细胞的生理代谢活动,而且改变培养液的pH,影响细胞内酶的活性.由表2可见,CO₂浓度升高,*Nannochloropsis* sp.细胞内EPA在总脂肪酸中的比例呈上升趋势,而总脂肪酸在细胞中的含量却随着CO₂浓度的升高而降低.在通入空气中CO₂浓度为0.5%时,培养液中EPA的含量最高,为39.0 mg/L.

表2 通气中CO₂含量对 *Nannochloropsis* sp.脂肪酸组成和EPA合成的影响Table 2 Effect of CO₂ concentration on fatty acid composition and EPA content of *Nannochloropsis* sp.

CO ₂ (% φ)	Fatty acid composition (%)										Total fatty acid (%)	EPA yield (mg/L)
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	20:5	22:6	Others		
0	4.5	24.1	29.7	1.2	10.6	1.7	2.5	23.2	0.2	0.8	20.3	36.7
0.5	5.4	26.9	30.7	0.7	13	1.0	0.7	22.7	0.1	1.8	18.7	39.0
1	4.9	24.1	32.7	1.3	7.8	1.4	1.6	23.6	0.3	2.3	14.5	34.3
3	5.5	21.1	36.5	1.1	7.2	1.1	1.2	24.2	-	2.1	9.9	19.8
6	3.9	23.6	30.4	1.3	3.5	1.1	3.4	30.8	-	2	10.6	12.3

4 结论

与传统振荡培养相比,采用气升式反应器培养 *Nannochloropsis* sp.可以大大提高其生物量.通气量和通入空气中的CO₂浓度会影响藻细胞的生长和细胞内EPA的合成,在通气量为500 mL/min、CO₂含量为1%时,*Nannochloropsis* sp.生长最快;在通气量为400 mL/min、CO₂含量为0.5%时,藻细胞单位培养液中EPA产量最高,达到39.0 mg/L.

参考文献:

- [1] Tan C K, Johns M R. Screening of Diatoms for Heterotrophic Eicosapentaenoic Acid Production [J]. J. Appl. Phycol., 1996, 8: 59-64.
- [2] 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻培养生产ω-3多不饱和脂肪酸 [J]. 海洋科学, 1997, 21(6): 18-20.
- [3] 胡晗华. 饵料微藻的特征及其与CO₂浓度变化的关系研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2001. 73-74.
- [4] Chini Z G, Lavista F, Bastianini A, et al. Production of Eicosapentaenoic Acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in Outdoor Tubular Photobioreactors [J]. J. Biotech., 1999, 70: 299-312.
- [5] Richmond A, Zhang C W. Optimization of a Flat Plate Glass Reactor for Mass Production of *Nannochloropsis* sp. Outdoors [J]. J. Biotech., 2001, 85: 259-269.
- [6] 康瑞娟, 蔡昭铃, 施定基. 用于微藻培养的气升式光生物反应器 [J]. 化学反应工程与工艺, 2001, 17(1): 44-49.
- [7] Harrison P J, Waters R E. A Broad Spectrum Artificial Seawater Medium for Coastal and Open Ocean Phytoplankton [J]. J. Phycol., 1980, 16: 28-35.
- [8] Contreras A, García F, Molina E, et al. Interaction between CO₂-mass Transfer, Light Availability, and Hydrodynamic Stress in the Growth of *Phaeodactylum Tricornutum* in a Concentric Tube Airlift Photobioreactor [J]. Biotech. Bioeng., 1998, 60: 317-325.
- [9] Merchuk J C. Shear Effects on Suspended Cells [J]. Adv. Biochem. Eng., 1991, 44: 65-95.
- [10] Yongmanitchai W, Ward O P. Omega-3 Fatty Acids: Alternative Sources of Production [J]. Process Biochem., 1989, 24: 117-124.

- [11] Yongmanitchai W, Ward O P. Growth and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricorutum* under Different Culture Conditions [J]. Appl. Environ. Microbio., 1991, 57: 419–425.
- [12] Tsuzuki M, Ohnuma E, Sato N, et al. Effects of CO₂ Concentration during Growth on Fatty Acids Composition in Microalgae [J]. Plant Physiol., 1990, 93: 851–856.

Effects of Air Flow Rate and CO₂ Concentration on the Growth of *Nannochloropsis* sp. and EPA Accumulation in an Airlift Photobioreactor

XU Fang, HU Han-hua, CONG Wei, CAI Zhao-ling, OUYANG Fan

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

Abstract: The effects of air flow rate and concentration of CO₂ on the growth of *Nannochloropsis* sp. cells as well as EPA content in an airlift photobioreactor were investigated. The results show that *Nannochloropsis* sp. grew faster in the airlift photobioreactor than in the flask. After 8 d culture, the biomass of *Nannochloropsis* sp. in the airlift photobioreactor reached 857 mg/L, which was 2-fold of that obtained in the flask. The growth rate increased with the increase of air flow rate. *Nannochloropsis* sp. grew the fastest at the air flow rate of 500 mL/min and no positive effect on the cell growth was observed above this flow rate. 1% (φ) CO₂ added in the air promoted the growth of *Nannochloropsis* sp. significantly, thereby the maximal growth rate was 1.8-fold of that without CO₂ addition. The highest EPA yield of the culture, 39.0 mg /L, was obtained at the air flow rate of 400 mL/min with 0.5% (φ) CO₂.

Key word: *Nannochloropsis* sp.; airlift photobioreactor; air flow rate; CO₂ concentration; EPA