

产油微藻自养培养条件调控

文锦 孙远 李宝硕 朱瑞雪 蒋云江 温皓程 张永奎*

(四川大学化工学院制药与生物工程系 四川 成都 610065)

摘要: 作为新兴生物燃料的生物柴油近年来发展迅速,以微藻为代表的第二代生物能源是解决能源危机的长远之计,但如何提高其产量仍是研究的热点问题。以提高产油自养微藻生物量和油脂含量为目的,在气升式光反应器中运用均匀设计实验方法进行了条件优化试验。分别得出了氮原子浓度、通气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度 4 个因素对小球藻 C2 生物量积累和油脂含量影响的显著回归方程和反应器优化培养条件。以生物量为指标的优化培养条件是:氮原子浓度 0.178 g/L,通气速率 5 L/min,二氧化碳体积浓度 3% (V/V),光照强度 6000 lx。该优化条件下,生物量为 2.11 g/L,即生产速率为 0.352 g/(L·d),比测试实验中检测到的最高生物量[1.88 g/L,即生产速率为 0.313 g/(L·d)]提高了 12.2%;以油脂含量为指标的优化培养条件是:进气速率 0.400 L/min,二氧化碳体积浓度 1.94% (V/V),得到油脂含量为 22.4%,比测试实验中检测到的最高油脂量(20.7%)提高 7.7%。

关键词: 生物柴油, 小球藻, 生物量, 油脂含量

Optimization of the Major Culture Conditions of Autotrophic Microalgae for Lipid Production

WEN Jin SUN Yuan LI Bao-Shuo ZHU Rui-Xue JIANG Yun-Jiang
WEN Hao-Cheng ZHANG Yong-Kui*

(Department of Pharmaceutical and Bioengineering, School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: Biodiesel, as a new form of bio-fuel, has developed greatly in recent years. The second generation of bio-energy represented by the lipid from microalgae is one of the long-term strategies to solve energy crisis in the future. However, improving its productivity is still the hotpot in recent years. The aim of this work was to improve the biomass and lipid content of autotrophic microalgae. In this study, we used uniform design to optimize the major culture conditions of autotrophic microalgae in the air-lift bioreactor. The significant regression equations which showed the effects of these conditions on biomass and lipid content of *Chlorella* C2 were concluded, respectively. According to the significant regression equations, the optimized culture conditions of biomass were: 0.178 g/L the concentration of N⁵⁺, 5 L/min air rate, 3% (V/V) CO₂ and 6000 lx light intensity. The biomass and productivity attained were 2.11 g/L and 0.352 g/(L·d), 12.2% higher than the highest biomass and productivity obtained

基金项目: 成都兴华信创业科技信息有限公司资助项目(No. 08H0019); 国家大学生创新计划项目(No. 091061047)

* 通讯作者: Tel: 86-28-85408255; 信箱: zhangyongkui@scu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-17; 接受日期: 2010-10-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

[1.88 g/L and 0.313 g/(L·d)] in those experiments. The optimized culture conditions of lipid content were: 0.400 L/min air rate and 1.94% (V/V) CO₂. Lipid content attained from the optimized culture condition was 22.4%, 7.7% higher than the highest lipid content (20.7%) obtained in those experiments.

Keywords: Biodiesel, *Chlorella vulgaris*, Biomass, Lipid content

生物柴油作为化石能源的替代燃料已在国际上得到广泛应用。至今生物柴油的原料主要来自油料植物,但与农作物争地的情况以及较高的原料成本限制了生物柴油的进一步推广。微藻作为高光合生物有其特殊的原料成本优势,微藻的脂类含量最高,可达细胞干重的80%^[1],而且其在生长积累油脂过程中吸收利用二氧化碳^[2],对缓解温室效应具有不可忽视的作用。可见,用微藻生产生物柴油有着重要的意义。微藻中,小球藻适应性强,普遍存在于自然界并且油脂含量较高,是目前研究生产生物柴油的热点藻种之一。据研究表明^[3],小球藻细胞组成中蛋白质的含量为7.3%–88%,碳水化合物占5.7%–38%,脂类占4.5%–86%。小球藻细胞中脂类含量的增加主要是由于脂肪酸的积累。通过生长过程中的营养胁迫或培养环境的改变,小球藻油脂含量能够得到增高。本研究旨在通过均匀设计法,以小球藻的生物量和油脂含量为双指标从氮原子浓度、通气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度4个方面优化其在气升式反应器中的培养条件,探寻工业化大面积生产的途径,为进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试藻种及培养基

1.1.1 藻种:前期从水样中筛选的普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)^[4]。

1.1.2 培养基:实验中采用SE培养基,其组成配比如表1所示。

表1 SE培养基
Table 1 SE culture medium

成分 Composition	浓度 Concentration (g/L)	成分 Composition	体积 Volume (mL)
NaNO ₃	0.250	Fe-EDTA	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.025	A ₅ solution	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	Soil extraction	40
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.005	Distilled water	958
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.075		
KH ₂ PO ₄	0.175		
NaCl	0.025		

1.2 培养方法

根据前期实验结论设计^[4],当三角瓶批式培养达到对数生长期后,按10%的接种量接到气升式反应器内^[5–8],初始OD₆₈₀值约0.350。依据操作表控制反应条件连续培养6 d,藻液生长刚进入稳定期时收集藻液进一步检测生物量和油脂含量。

气升式反应器(Air-lift bioreactor,简称ALR)是用于气-液两相或气-液-固三相过程的接触性反应装置。将其应用于生物化工生产,为细胞生长提供足够的溶解氧或二氧化碳的同时,又将底物与细胞混合均匀。这类反应器主要优点是结构简单、无机械搅拌、流场分布均匀、气液传质性能好、有利于无菌操作等^[9]。它有助于微藻有效地吸收和利用二氧化碳,同时较好地移除光合成氧,十分适合作为培养载体。本实验所采用的内循环气升式反应器主要结构参数如下:罐体直径(外径)80 mm,提升管直径(内径)50 mm,管提高800 mm,提升管高500 mm,高径比(H/D)10,总体积4 L,工作体积2.5 L。

1.3 分析方法

1.3.1 藻生物量的测定:将藻液于TDL-5-A型离心机中离心,倒去上清液,加入等量蒸馏水洗1次,将湿藻体放入65℃烘箱中烘干12 h以上,再用95℃烘2 h至恒重,以g干藻体/L培养液表示藻体生物量。

1.3.2 藻体油脂的提取及测定:采用氯仿-甲醇法对干藻体进行油脂提取^[10],油脂含量为藻体油脂量占藻体生物量的百分数。

1.4 实验设计

在微藻培养过程中,氮原子浓度是影响微藻油脂积累的最主要因素之一^[11]。通过一系列前期实验发现^[4],硝酸钠为小球藻生长和产油的优势氮源。本实验主要通过调节培养过程中的碳氮比优化小球藻的培养基组成。在培养条件方面,光照强度和进气速率都是影响微藻生长的重要因素。因此实验中选取氮原子浓度、进气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度这4个因子为研究对象,以藻体生物量和油脂含量为响应值,安排了12组水平条件进行试验。

试验设计过程采用均匀设计法(Uniform Design), 仅考虑试验点的“均匀分散”性, 试验次数可明显减少^[12]。试验设计、数据分析及模型建立由中国数学学会均匀设计分会方开泰和杜明亮开发设计的均匀设计软件 UD3.0 给出具体方案, 见表 2。

序号 Trial No.	氮原子浓度 The concentration of N ⁵⁺ (g/L)	通气速率 Air rate (L/min)	二氧化碳体 积浓度 CO ₂ (% V/V)	光照强度 Light intensity (lx)
1	0.041	1.24	1.09	4000
2	0.055	2.49	2.46	2000
3	0.109	3.75	0.27	4000
4	0.164	5.00	1.64	2000
5	0.218	0.82	3.00	6000
6	0.273	2.07	0.82	2000
7	0.327	3.33	2.18	6000
8	0.338	4.58	0.00	2000
9	0.437	0.40	1.36	6000
10	0.491	1.65	2.72	4000
11	0.546	2.91	0.55	6000
12	0.600	4.16	1.91	4000

2 结果

2.1 以生物量为指标的优化

2.1.1 实验结果及回归方程和模型分析: 根据均匀设计实验表进行了 12 组实验, 实验结果见图 1。

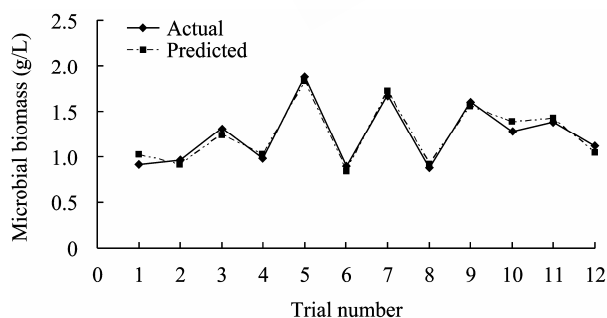


图 1 培养条件均匀设计实验小球藻生物量的实测值与预测值的比较

Fig. 1 Microbial biomass variation of culture conditions uniform design experiment

使用 UD3.0 软件, 采用后退法回归分析, 以生物量为考察对象, 对均匀设计实验数据进行回归拟合, 获得生物量对氮原子浓度、进气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度的四元回归方程:

$$Y = 0.095 + 0.8X_1 + 0.028X_2 - 0.044X_3 + 0.000091X_4 - 1.1X_1^2 - 0.084X_1X_2 + 0.0019X_2^2 + 0.03X_3^2 \quad (1)$$

用标准回归系数代入则回归方程为:

$$Y = 0.89X_1 + 0.25X_2 - 0.25X_3 + 0.91X_4 - 0.76X_1^2 - 0.37X_1X_2 + 0.093X_2^2 + 0.55X_3^2 \quad (2)$$

其中, Y 为生物量的预测值(g/L), X_1 为氮原子浓度(g/L), X_2 为进气速率(L/min), X_3 为二氧化碳体积浓度(% V/V), X_4 为光照强度(lx)。

由式(1)进一步计算偏回归平方差得出, 光照强度对小球藻的生物量有显著影响, 氮原子浓度影响较明显, 进气速率、二氧化碳体积浓度有一定影响, 此外氮原子浓度与进气速率的交互作用也有一定影响。

该模型的方程方差分析如表 3, 样本容量 $N = 12$, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 检验值 $F_t = 9.985$, 临界值 $F(0.05, 8, 3) = 8.845$, $F_t > F(0.05, 8, 3)$, 回归方程显著。

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	均方比 F value
回归 Model	0.310	8	0.038	9.985
剩余 Error	0.011	3	0.038	
总和 Total	0.320	11		

$R = 0.9817$ $R^2 = 0.9638$

由表 3 可知, 该模型显著, 回归方程能够解释 96.38% 的生物量产物。

2.1.2 试验条件优化及因素分析: 通过软件计算分析, 给出优化实验条件: 氮原子浓度 0.178 g/L, 进气速率 5 L/min, 二氧化碳体积浓度 3% (V/V), 光照强度 6000 lx。在此条件下, 获得预期生物量指标的最大值为 2.20 g/L, 即生产速率为 0.367 g/(L·d)。预期生物量最大值比实验中检测到最高生物量 1.88 g/L, 即生产速率为 0.313 g/(L·d), 提高 17%。

以优化条件为初始点, 结合回归方程分别考察在实验取值范围内各因素对生物量的影响, 结果如图 2-5。

由图 2-5 可以看出, 在实验取值范围内, 小球藻的生物量随通气速率、光照强度的增加而增大,

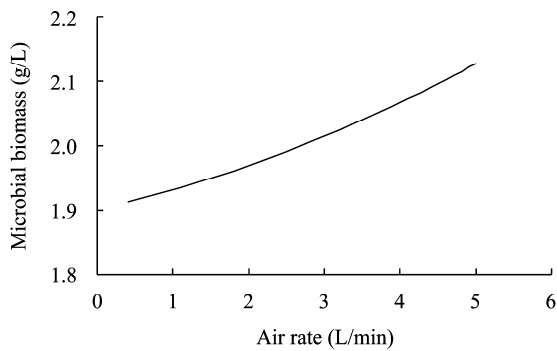


图2 通气速率对小球藻生物量的影响

Fig. 2 The effect of air rate on microbial biomass

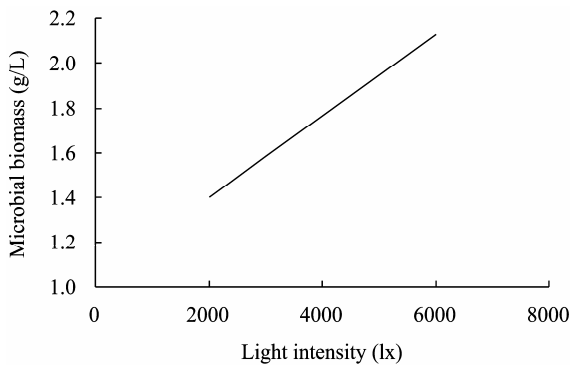


图3 光照强度对小球藻生物量的影响

Fig. 3 The effect of light intensity on microbial biomass

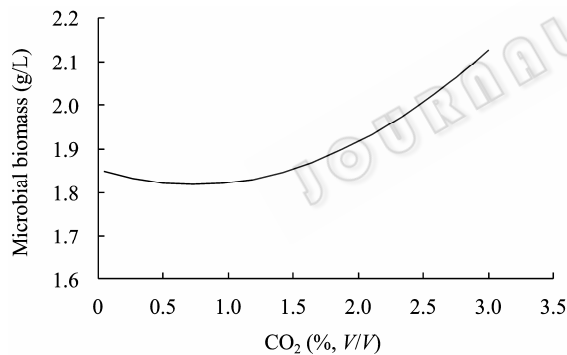


图4 二氧化碳体积浓度对小球藻生物量的影响

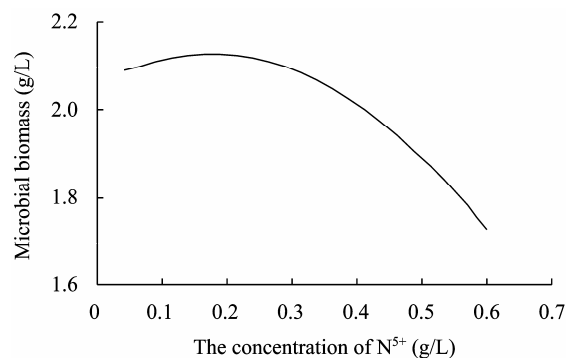
Fig. 4 The effect of CO₂ (% V/V) on microbial biomass

图5 氮原子浓度对小球藻生物量的影响

Fig. 5 The effect of the concentration of N⁵⁺ on microbial biomass

因而增大这两个影响因素对其生物量积累有促进作用;二氧化碳体积浓度在 1% (V/V)以下时,生物量随二氧化碳体积浓度的变化不大,对生物量积累无促进作用,当二氧化碳体积浓度高于 1% (V/V)时,生物量随其增加而显著增大;在给出的优化条件下,氮元素对生物量的提高存在一个最优浓度值,即当氮原子浓度高于这一浓度值时,反而不利于生物量的积累。

2.1.3 验证性试验:综合不同氮原子浓度、进气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度对 C2 小球藻产油的影响及均匀设计的结果,以氮原子浓度 0.178 g/L,进气速率 5 L/min,二氧化碳体积浓度 3% (V/V),光照强度 6000 lx 为优化的培养条件,将优化的培养基和培养条件与原培养基相比较,测定终点生物量,结果见表 4。

表 4 培养条件优化前后生物量比较
Table 4 Comparison of biomass under initial and optimized culture conditions

	生物量 Biomass (g/L)	生物含量 Biomass productivity [g/(L·d)]
未优化培养条件 Initial condition	1.88	0.313
预测值 Predicted maximum	2.20	0.367
优化培养条件 Optimized condition	2.11	0.352

以软件计算分析所给实验优化条件进行验证实验,得到实际生物量是预测值的 95.9%。比均匀实验中检测到的最高生物量(1.88 g/L)提高了 12.2%。

2.2 以油脂量为指标的优化

2.2.1 实验结果及回归方程和模型分析:根据实验设计表 1 进行了 12 组实验,其结果见图 6。

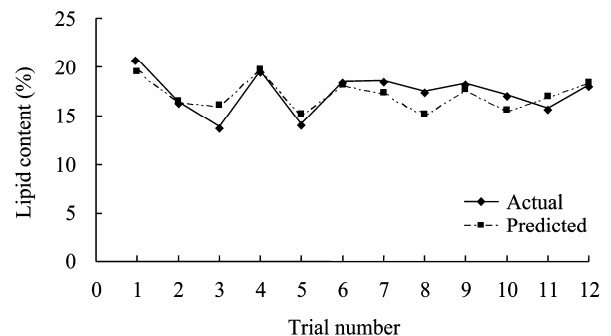


图6 培养条件均匀设计实验小球藻油脂含量的实测值与预测值的比较

Fig. 6 Cellular lipids content variation of culture conditions uniform design experiment

以油脂含量为考察对象, 利用 UD3.0 软件根据实验数据进行回归拟合获得油脂含量对氮原子浓度、进气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度的四元回归方程:

$$Y = 0.89X_1 + 0.25X_2 - 0.25X_3 + 0.91X_4 - 0.76X_1^2 - 0.37X_1X_2 + 0.093X_2^2 + 0.55X_3^2 \quad (3)$$

用标准回归系数代入则二元回归方程为:

$$Y = 0.0812X_1 + 0.992X_2 + 5.08X_3 - 0.148X_4 - 1.53X_2X_3 - 3.67X_3^2 \quad (4)$$

通过对该模型的方程方差分析, 第一方程项 $[X_1]$ 及第三方程项 $[X_4]$ 对回归的贡献极小, 对其进行显著性检验, 需要剔除。经过计算剔除不显著方程项, 并用标准回归系数代入, 得到最终回归方程:

$$Y = 0.955X_2 + 4.73X_3 - 1.39X_2X_3 - 3.46X_3^2 \quad (5)$$

其中, Y 为油脂含量预测值(%), X_2 为进气速率(L/min), X_3 二氧化碳体积浓度(% V/V)。

从该方程的方差分析表 5 可见, 样本容量 $N = 12$, 显著性水平 $\alpha = 0.05$, 检验值 $F_t = 26.62$, 临界值 $F(0.05, 4, 7) = 4.120$, $F_t > F(0.05, 4, 7)$, 回归方程显著, 能够解释 93.83% 的油脂含量。

表 5 培养条件均匀设计实验方差分析

Table 5 ANOVA for the regression equation of culture conditions uniform design experiment

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	均方比 F value
回归 Model	296.0	4	74.10	26.62
剩余 Error	19.5	7	2.78	
总和 Total	316.0	11		

$R = 0.9687 \quad R^2 = 0.9383$

上述方程的回归系数显著性检验表明: 实验中的 4 个因素中进气速率及二氧化碳体积浓度对油脂的合成起到主要的影响。

2.2.2 以油脂含量为指标的试验条件优化和因素分析: 通过软件计算最终得到优化实验条件: 进气速率和二氧化碳体积浓度值分别为 0.400 L/min 和 1.94% (V/V) 时, 获得预期油脂含量指标的最大值为 23.2%。

考察在实验范围内各因素对生物量的影响(起始点为优化条件), 可以得出图 7 和图 8。

由图 7 和图 8 可以看出, 降低通气速率对油脂积累有促进作用; 一定范围内提高二氧化碳体积浓度有利于积累油脂, 但高浓度二氧化碳不利于油脂的积累。

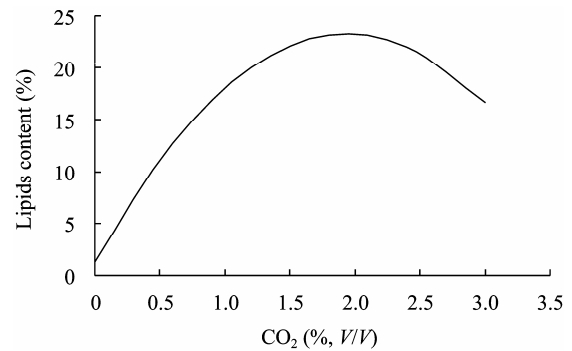


图 7 二氧化碳体积浓度对小球藻油脂含量的影响

Fig. 7 The effect of CO₂ (% V/V) on cellular lipids content

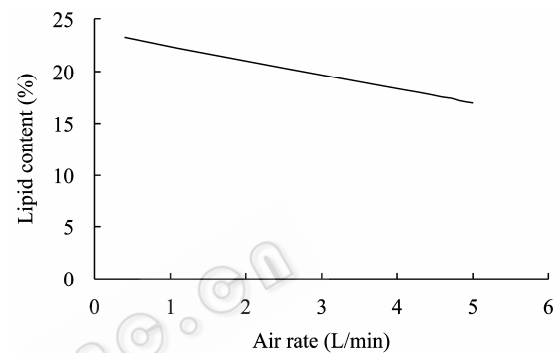


图 8 通气速率对小球藻油脂含量的影响

Fig. 8 The effect of air rate on cellular lipid content

2.2.3 验证性试验: 综合不同氮原子浓度、进气速率、二氧化碳体积浓度和光照强度对小球藻 C2 产油的影响及均匀设计的结果, 以氮原子浓度 0.327 g/L, 进气速率 0.400 L/min, 二氧化碳体积浓度 1.94% (V/V), 光照强度 6000 lx 为优化的培养条件, 发酵终点测定油脂量。将优化后的培养基与原培养基条件下的油脂量和油脂含量相比较, 结果见表 6。

表 6 培养条件优化前后油脂含量比较

Table 6 Comparison of lipid content under initial and optimized culture conditions

	生物量 Biomass (g/L)	油脂量 Lipids (g/L)	油脂含量 Lipid content (%)
未优化培养条件 Initial condition	0.947	0.196	20.8
预测值 Predicted maximum	—	—	23.2
优化培养条件 Optimized condition	1.629	0.365	22.4

以软件计算分析所给实验优化条件进行验证实验, 得到实际油脂含量是预测值的 96.6%。比均匀实验中检测到的最高油脂含量(20.8%)提高了 7.7%。

3 讨论

光照强度对小球藻生物量的影响高度显著,反应器中小球藻积累的生物量随二氧化碳体积浓度和通气速率的上升而增高,氮原子浓度对小球藻生物量的影响不明显。优化实验获得小球藻实际生物量为 2.11 g/L,即生产速率为 0.352 g/(L·d),是预测值的 95.9%。比测试实验中检测到的最高生物量提高了 12.2%。

进气速率和二氧化碳体积浓度值对小球藻的油脂含量影响高度显著,而且它们的交互影响作用显著。优化实验获得小球藻实际油脂含量为 22.4%,是预测值的 96.6%。比测试实验中检测到的最高生物量提高了 7.7%。

小球藻细胞生长快,油脂积累少。本实验对小球藻的重要培养条件进行了调控,使其生物量和油脂含量均有所提高。浙大吕建明、程丽华等^[13]对小球藻培养条件进行调控获得油脂量为 40 mg/(L·d),Illman 等^[14]对缺氮条件的小球藻进行研究获得油脂量为 14.9 mg/(L·d),而本实验优化条件下获得的小球藻油脂量为 60.83 mg/(L·d),约为吕建明等人研究所得的 1.5 倍, Illman 等人研究所得的 4.1 倍。

自养藻类较异养藻类产油量低,但其生产过程不会增加大气负担,可在一定程度上缓解温室效应,更加符合人与自然和谐相处的理念,其发展前景非常广阔、光明。

参考文献

[1] 宋东辉, 候李君, 施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用. 生物工程学报, 2008, 24(3): 341-348.

- [2] Cheng LH, Zhang L, Chen HL. Advances on CO₂ fixation by microalgae. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(2): 177-181.
- [3] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Tibtech*, 1997(15): 401-409.
- [4] 王立柱, 温皓程, 邹渝. 产油微藻的分离、筛选及自培养氮源、碳源的优化. 微生物学通报, 2010, 37(3): 336-341.
- [5] 康瑞娟, 蔡昭玲, 施定基. 用于微藻培养的气升式光生物反应器. 化学反应工程与工艺, 2001, 17(1): 44-49.
- [6] 王长海, 鞠宝, 董言梓, 等. 光生物反应器及其研究进展. 海洋通报, 1998, 17(6): 79-86.
- [7] 汤立新, 吕效平, 孔黎明. 气升式环流反应器研究与应用进展. 化工进展, 2002, 21(11): 814-819.
- [8] Sanchez Miron A, Garcia Camacho F, Contreras Gomez A, et al. Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE Journal*, 2000, 46(9): 1872-1887.
- [9] 高平, 刘书志. 生物工程设备. 北京: 化学工业出版社, 2006: 60-63.
- [10] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of the total lipid extraction and purification. *Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911-917.
- [11] Liliana R, Graziella CZ, Niccolò B, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Bio-technology and Bioengineering*, 2008, 102(1): 100-112.
- [12] 方开泰. 均匀设计及其应用. 数理统计与管理, 1994, 13(1): 6-63.
- [13] Lv JM, Cheng LH, Xu XH, et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 2010(101): 6797-6804.
- [14] Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(8): 631-635.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25