

光生物反应器中环境因子对蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*)生长和油脂积累的影响*

丛峰^{1,2} 孙雪^{1,2} 徐年军^{1,2} 蔡西栗^{1,2}

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211; 2. 浙江省海洋生物工程重点实验室 宁波 315211)

提要 采用气升式光生物反应器培养系统,进行了通气速率、氮浓度、Fe³⁺浓度、IAA浓度、CO₂补充量等环境因子对蛋白核小球藻生长和油脂积累影响的研究。结果表明,通气速率为2.0L/min时小球藻的生长速率和油脂产量最大分别为6.17mg/(L·d)和1.77mg/(L·d);实验范围内氮浓度对小球藻油脂产量影响规律性不强;Fe³⁺浓度为0.1mmol/L时小球藻的生长速率最大为7.29mg/(L·d),Fe³⁺浓度为1.0mmol/L时小球藻油脂产量最高为2.54mg/(L·d);IAA浓度为1.0mg/L时小球藻的生长速率为7.47mg/(L·d),油脂产量为2.89mg/(L·d),二者都达到最大值;CO₂补充量为6000mL/d时小球藻的生长速率最大为9.88mg/(L·d),补充量为4000mL/d时小球藻油脂产量最高为3.86mg/(L·d)。经过条件优化,小球藻油脂产量得到了显著的提高。

关键词 蛋白核小球藻;光生物反应器;环境因子;生长速率;油脂积累

中图分类号 S96

小球藻(*Chlorella*)是绿藻门、Trebouxiophyceae纲、Chlorellaceae目、小球藻属的一类微型藻类,以自养繁殖为主,生态分布广,生长速度快,可通过光合作用将CO₂转化为多糖、蛋白质和油脂等生物活性物质(Walter *et al.*, 2005)。小球藻作为一种具有较大经济价值的微藻,从基础分子生物学到产业化研究相关的报道较多(Li *et al.*, 2007; 邓意龙等, 2012),作为一种油脂含量较高的微藻,将其应用于生物柴油的制取也逐渐成为研究热点(Spolaore *et al.*, 2006; 缪晓玲等, 2007)。有研究者认为在未来的10—15年内,通过技术革新以解决微藻制备生物柴油存在的原料供应和制备成本过高等限制因素,有望实现微藻制备生物柴油的产业化生产(Williams, 2007; Wijffels *et al.*, 2010)。

光生物反应器是一种微藻高效、稳定培养的方式。相对于室外开放式跑道池培养,光生物反应器培

养具有不易污染、培养条件易控制、光能利用率高等特点。目前光生物反应器培养逐渐成为微藻培养的研究热点。潘双叶等(2002)较早进行光生物反应器培养等鞭金藻,分别采用一次性培养、定时补充培养盐、增加新鲜培养基等3种模式培养,结果新鲜培养基补充的半连续培养模式下微藻生产量大。张齐等(2011)研究了鼓泡式光生物反应器中,CO₂浓度和通气速率对小球藻生长、叶绿素含量和油脂积累的影响。张俊杰等(2012)研究了吨级封闭式光生物反应器中,小球藻每日采收30%培养水体,结果得到的小球藻浓度为0.378g/(L·d)。

本文研究了气升式光生物反应器培养系统中,不同通气速率、氮浓度、Fe³⁺浓度、IAA浓度、CO₂补充量等环境因子对小球藻生长和油脂积累的影响,探究小球藻在光生物反应器中培养条件的优化,以期光生物反应器高效培养能源微藻提供理论依据。

* 浙江省科技厅公益性研究项目, 2010C33066号; 浙江省创新团队项目, 2009R50012-6号; 宁波市科技攻关项目, 2010C10022号; 宁波市科技局国际合作项目, 2010D10012号。丛峰, 硕士研究生, E-mail: fenger19871221@126.com

通讯作者: 徐年军, 博士, 研究员, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-26, 收修改稿日期: 2013-05-16

1 材料与amp;方法

1.1 藻种与培养

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* F-9)由宁波大学海洋生物工程重点实验室提供。小球藻在光生物反应器中培养,培养温度 25℃,光照强度 3000 lx,光暗比 12h/12h,通气培养 14d,采用 BG-11 培养基(欧阳嵘等, 2010)。BG-11 培养基各组分浓度(mg/L 蒸馏水): NaNO₃(100), K₂HPO₄·3H₂O(40), MgSO₄·7H₂O(75), CaCl₂·2H₂O(36), Fe-Citrate(6), Citrate acid(6), EDTA·Na₂(1), Na₂CO₃(20), 微量元素母液 1.0mL/L。实验中所用的光生物反应器设备包括 5 组柱状培养器、通气泵、空气过滤器、通气流量控制装置及光照系统等,总容积为 100L,基本结构参见徐志标等(2005)。

1.2 小球藻细胞浓度的检测

每天取小球藻藻液,用 752N 紫外可见分光光度计在 680nm 波长下检测藻液的吸光度(OD₆₈₀),通过多次检测,由藻细胞浓度和 OD₆₈₀ 关系得出标准曲线: $y = 3.5528x + 0.0302$ ($R^2 = 0.9994$)计算出小球藻的细胞浓度 x (单位 mg/L), y 为 OD₆₈₀。

1.3 小球藻生长速率的测定

小球藻 14d 的平均生长速率由以下公式计算:

$$\text{小球藻生长速率} \mu = (N_2 - N_1) / t$$

式中, μ 为生长速率[mg/(L·d)], N_1 和 N_2 分别为藻液细胞浓度的起始浓度和最终浓度, t 为生长时间。

1.4 油脂含量的测定

小球藻油脂含量的测定参照丛峰等(2012)的方法。简述如下:取 20mL 小球藻藻液,离心收集藻细胞,氯仿-甲醇法提取油脂 2 次。加入 0.5mL 浓硫酸,100℃水浴 10min,冷却后加入 1.978g/L 香草醛磷酸试剂 2.5mL,反应 2h 后,检测 528nm 处吸光度。根据香草醛比色法标准曲线,计算氯仿提取液中油脂含量。

小球藻油脂含量百分含量计算按照以下公式:

$$C = [(C_1 \times V_1) / (B \times V_2)] \times 100$$

式中, C 为小球藻油脂含量(%), C_1 为氯仿提取液中油脂含量(mg/mL), V_1 为实验中所用氯仿体积 1mL, B 为小球藻细胞浓度(mg/mL), V_2 为实验小球藻藻液体积 20mL。

1.5 油脂产量的计算方法

小球藻油脂产量由以下公式计算:

$$P = (B \times C) / t$$

式中, P 为小球藻油脂产量[mg/(L·d)], B 为小球藻细胞浓度(mg/L), C 为小球藻油脂的百分含量(%), t 为油

脂积累时间(d)。

1.6 实验设计

1.6.1 通气速率实验 采用 BG-11 培养基对小球藻进行培养,5 组中通气速率分别为: 0、0.05、0.2、0.5、2.0L/min。

1.6.2 氮浓度实验 采用 BG-11 培养基中,除 NaNO₃ 外其他成分浓度不变,5 组培养基中 NaNO₃ 的浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4g/L,通气速率为 2.0L/min。

1.6.3 Fe³⁺浓度实验 采用 BG-11 培养基对小球藻进行培养,培养 4 天后添加 Fe³⁺,5 组中 Fe³⁺浓度分别为: 0、0.05、0.1、0.5、1.0mmol/L,通气速率为 2.0L/min。

1.6.4 IAA 浓度实验 采用 BG-11 培养基对小球藻进行培养,选用吲哚乙酸(IAA)为添加激素,5 组中 IAA 浓度分别为: 0、0.1、0.5、1.0、2.0mg/L,通气速率为 2.0L/min。

1.6.5 补充 CO₂ 实验 采用 BG-11 培养基对小球藻进行培养,培养基中添加 1.0mmol/L Fe³⁺ 和 1.0mg/L IAA,通气速率为 2.0L/min,每天 12:00 时补充 100mL/min CO₂。5 组分别补充: 0、10、20、40、60min/d,即 5 组 CO₂ 补充量分别为 0、1000、2000、4000、6000mL/d。

1.7 统计分析

采用 Excel 软件(2003)对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 不同通气速率对小球藻生长和油脂的影响

由图 1a 可见,小球藻的细胞浓度在前 4 天相差不大,第 5 天开始通气组比对照组生长速率加快。在实验范围内小球藻的生长速率随着通气速率的增加而加快,通气速率为 0.5L/min 和 2.0L/min 时小球藻的生长速率明显快于其它 3 个组。5 种不同通气速率条件下小球藻的生长速率分别是 3.32、4.07、4.49、5.87 和 6.17mg/(L·d)。由图 1b 可见,通气对小球藻的油脂积累有促进作用,通气速率为 2.0L/min 时小球藻的油脂含量最高达 21.4%,比对照组提高了 32.1%。小球藻的最终油脂产量分别为 0.87、1.16、1.26、1.61 和 1.77mg/(L·d)。由此可见,通气培养可以促进小球藻的生长和油脂积累。

2.2 不同氮浓度对小球藻生长和油脂的影响

由图 2a 可见,实验前 3 天小球藻细胞浓度相差不大,第 4 天开始小球藻细胞浓度差异加大。氮浓度

较高(0.4g/L)时, 小球藻生长最快, 对数生长期延长。氮浓度较低(0.05g/L)时, 小球藻生长缓慢, 在第 11 天之后细胞浓度基本不再增加。实验范围内小球藻的细胞浓度与氮浓度呈正相关。最终小球藻的生长速率分别为 4.54、5.14、5.91、7.28、9.05mg/(L·d)。由图 2b 可见, 氮浓度为 0.05g/L 时小球藻油脂积累最快, 在第 10 天小球藻开始变黄, 油脂含量迅速增加, 这可

能是氮消耗引起小球藻对逆境的响应引起的, 培养结束后小球藻的油脂含量达藻体干质量的 28.3%。计算得 5 组氮浓度中小球藻油脂含量分别为: 1.95、1.52、1.58、1.79、1.91mg/(L·d), 由此可见培养基中氮浓度对小球藻的油脂产量影响一方面由于影响生长速率, 另一方面通过影响油脂含量, 其最终规律性不是很强。

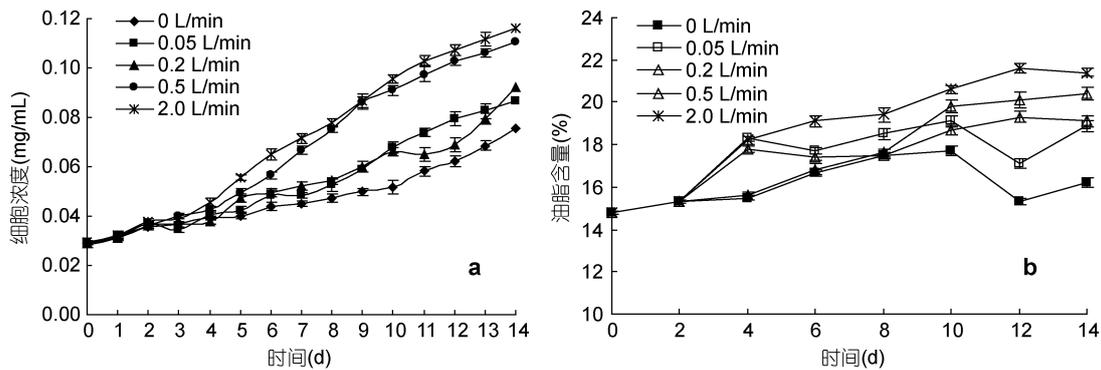


图 1 不同通气速率对蛋白核小球藻生长速率和油脂含量的影响

Fig.1 The effect of different air aeration rate on the growth rate and lipid content of *C. pyrenoidosa*

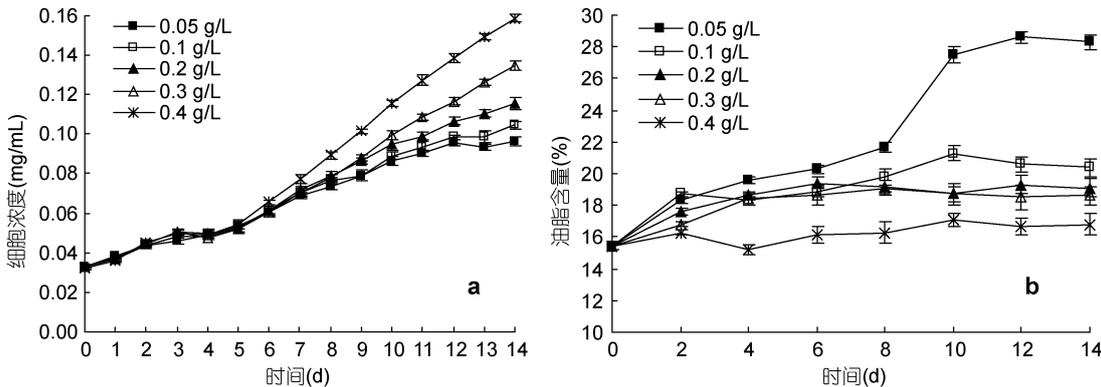


图 2 不同氮浓度对蛋白核小球藻生长速率和油脂含量的影响

Fig.2 The effect of different nitrogen concentration on the growth rate and lipid content of *C. pyrenoidosa*

2.3 不同 Fe^{3+} 浓度对小球藻生长和油脂的影响

由图 3a 可见, 培养基中添加 0.05—1.0mmol/L Fe^{3+} 对小球藻的生长都有促进作用, 最终小球藻的生长速率分别为: 5.77、6.64、7.29、6.59、6.27mg/(L·d), 其中添加 0.1mmol/L Fe^{3+} 时, 小球藻生长速率最快。由图 3b 可见, 对照组中小球藻的油脂含量在 15.4%—20.1% 之间, 变化不大, 而实验范围内小球藻的油脂含量随 Fe^{3+} 浓度的增加而增加, 在 Fe^{3+} 浓度为 1.0mmol/L 时有最大值 31.2%。计算得 5 组 Fe^{3+} 浓度培养下小球藻油脂产量分别为: 1.56、2.06、2.31、2.44、2.54mg/(L·d)。由此可见, 培养基中添加一定量的 Fe^{3+}

既可以促进小球藻的生长又可以提高小球藻的油脂产量。

2.4 不同 IAA 浓度对小球藻生长和油脂的影响

由图 4a 可见, 添加 0.1—2.0mg/L IAA 均能促进小球藻的生长。在浓度较低(0.1mg/L)时, IAA 对小球藻生长的促进作用不是非常显著, 当浓度增加到 1.0mg/L 时小球藻的生长速率最快, 继续提高 IAA 浓度对小球藻的促进作用有所减弱。由图 4b 可见, IAA 对小球藻的油脂积累也有促进作用, IAA 浓度为 1.0mg/mL 时小球藻的油脂含量最高为 26.5%。计算得添加 IAA 时小球藻油脂的最终产量分别为 1.52、

1.76、2.16、2.89、2.36mg/(L·d)。由此可见，实验范围内 IAA 浓度为 1.0mg/mL 时，小球藻同时达到最佳的生长和油脂积累状态。

2.5 CO₂ 补充量对小球藻生长和油脂的影响

由图 5a 可见，小球藻培养过程中补充 CO₂ 对小球藻的生长有较大的促进作用，实验范围内随着 CO₂

补充量的增加小球藻的生长速率加快。前 4 天各组藻细胞浓度基本一致，补充 CO₂ 6000mL/d 组在第 5 天时小球藻细胞浓度增长加快，明显高于其它 4 组。由图 5b 可见，补充 CO₂ 在 1000—4000mL/d 的范围内可以促进小球藻的油脂含量，当补充 2000mL/d 时小球藻的油脂含量最高为 39.1%，CO₂ 补充量超过

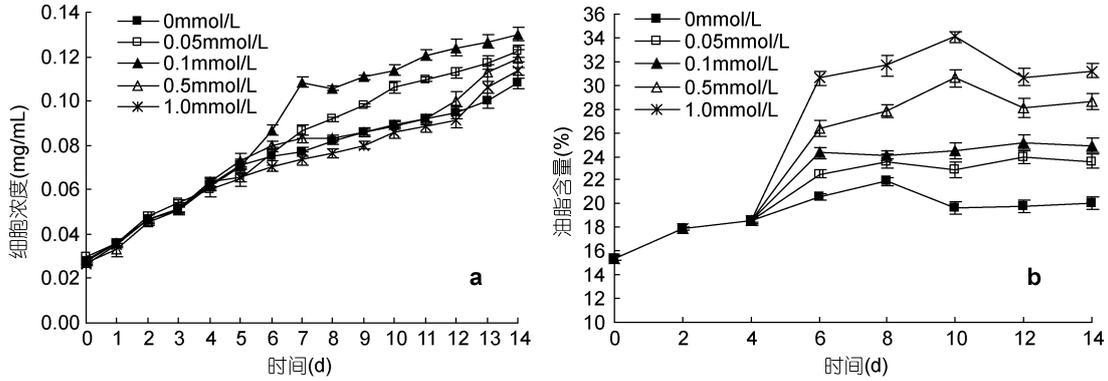


图 3 不同 Fe³⁺ 浓度对蛋白核小球藻生长速率和油脂含量的影响

Fig.3 The effect of different Fe³⁺ concentration on the growth rate and lipid content of *C. pyrenoidosa*

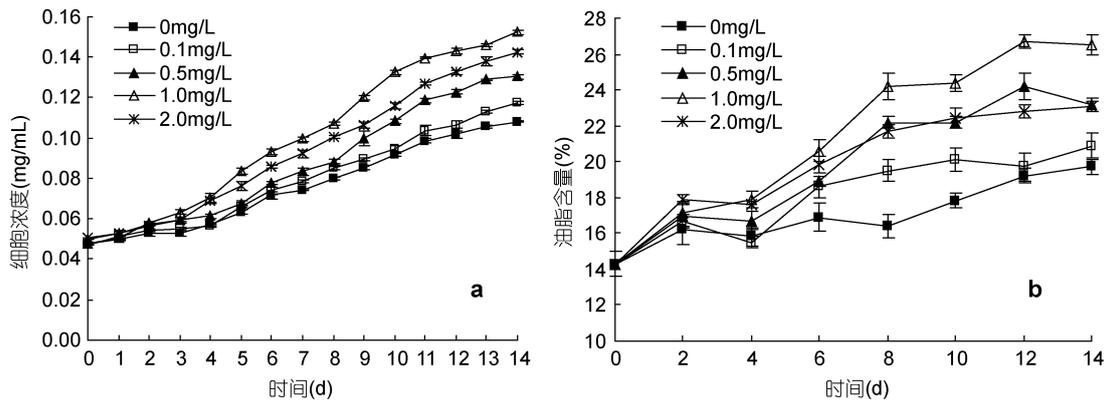


图 4 不同 IAA 浓度对蛋白核小球藻生长速率和油脂含量的影响

Fig.4 The effect of different IAA concentration on the growth rate and lipid content of *C. pyrenoidosa*

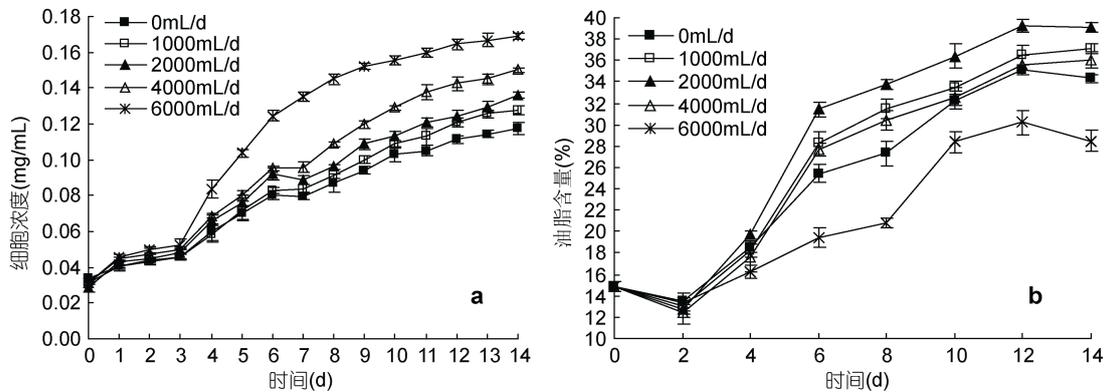


图 5 不同 CO₂ 补充量对蛋白核小球藻生长速率和油脂含量的影响

Fig.5 The effect of different CO₂ supply volume on the growth rate and lipid content of *C. pyrenoidosa*

6000mL/d 时小球藻油脂积累表现出抑制作用。5 组中小球藻油脂的总产量分别为 2.94、3.37、3.80、3.86、3.45mg/(L·d)。

3 讨论

通气培养可促进小球藻的生长速率。本实验是在 20L × 5 规模的简易光生物反应器中对小球藻进行培养, 最适通气速率是 2.0L/min。通气培养不但为小球藻提供充足的碳源, 还可以使藻液在反应器中流动起来以避免藻细胞沉底和附壁, 使营养物质均匀分布以促进小球藻生长。黄冠华等(2011)研究发现在 150mL 小摇瓶中通气速率为 1.0L/min 时蛋白核小球藻 FACH B-9 生长最快, 这可能是由于实验体系不同, 本实验在 20L × 5 的反应器体系中需要较大的通气速率才能促进反应体系中营养物质的供应。同时, 在光生物反应器中生长速率也较三角瓶中慢。

氮是小球藻生长的必须营养元素。小球藻在高氮条件下生长速率快, 在缺氮条件下生长较慢而油脂积累增加(Attilio *et al.*, 2009)。江怀真等(2011)报道在一定范围内, 增加氮源浓度能提高小球藻生长速率, 随着氮、磷浓度的降低, 小球藻总脂和中性脂含量均逐渐增大, 在低氮胁迫下获得了最高的细胞总脂含量, 氮源浓度为 0.441mmol/L 时小球藻的油脂产率最高, 为(10.58 ± 0.29)mg/(L·d)。微藻在缺氮条件下为了度过不利的生长环境而积累油脂等次生代谢物质, 表现出一种抗逆生理反应。本实验缺氮组在第 11 天小球藻开始变黄, 油脂积累急剧增加。虽然缺氮条件下小球藻的油脂含量有所提高但其生长速率过慢, 因此单纯的缺氮培养不能达到提高小球藻油脂产量的目的。高密度培养后进行缺氮胁迫的两步法培养可有效提高小球藻的油脂产量(黄冠华等, 2008), 将两步法应用于能源微藻的培养可以很好得解决油脂产量低的问题。

铁作为小球藻生化酶和氧化还原蛋白的辅助因子, 是其油脂合成的重要影响因子。Liu 等(2008)报道添加 0.012mmol/L Fe³⁺可以使海水小球藻油脂含量提高到 56.6%。张桂艳等(2011)发现 Fe³⁺对小球藻生长没有显著影响, 总脂含量随铁离子浓度升高呈上升趋势, 铁离子浓度为 0.75mmol/L 时油脂产量最高。本实验中促进油脂积累的最适浓度为 1.0mmol/L, 并且发现添加适当浓度的 Fe³⁺可促进小球藻生长, 但高浓度反而不利于油脂的积累。

植物激素 IAA 是一种典型的生长激素, 可活化

质膜上的 ATP 酶, 促进细胞壁酸化增加其可塑性, 从而增加细胞渗透吸收能力使细胞体积增大。杨凯等(2009)发现 IAA 对微藻(*Oedocladium* sp. TH6)的生长与脂肪酸含量都有促进作用, 其中添加 1.0mg/L IAA 最有利于微藻 TH6 的生长和总脂肪酸积累, 比对照组生长速率提高了 44.3%、总脂肪酸含量提高了 2.41 倍。本实验中添加 IAA 浓度为 1.0mg/L 时, 比对照组小球藻生长提高了 72.1%、油脂含量提高了 34.5%, 小球藻油脂产量最大。

补充 CO₂ 对小球藻的生长有较明显的促进作用。张丽莉等(2008)发现, 补充 1000μL/L CO₂ 可促进小球藻的生长, 延长指数生长期, 但降低了蛋白质含量。本实验中补充 CO₂ 在前 4 天中对小球藻的生长影响不显著, 第 5 天开始促进作用逐渐增强。表明在初期藻量少的情况下 CO₂ 未成为藻生长的限制因子, 随着藻量的增加 CO₂ 逐渐成为小球藻生长的限制因素, 额外补充 CO₂ 就可以促进小球藻的生长。补充少量 CO₂ 可以提高小球藻的油脂含量, 但过高的 CO₂ 补充量对小球藻的油脂积累产生了抑制作用。

本实验在简易气升式光生物反应器中, 依次优化了通气速率、氮浓度、铁离子浓度、IAA 浓度和 CO₂ 补充量等环境因子, 按照前一个实验优化的条件进行后面的实验, 最终的优化条件为: 通气速率 2.0L/min, Fe³⁺浓度 0.1mmol/L, IAA 浓度 1.0mg/L 时, CO₂ 补充量 4000mL/d。氮浓度增加提高了小球藻的生长速率, 但抑制了小球藻的油脂积累, 因此后续的实验中没有对氮浓度进行调整。最终小球藻的油脂产量最高为 3.86mg/(L·d), 比优化前条件下有了显著的提高。

参 考 文 献

- 邓意龙, 孙 雪, 徐年军等, 2012. 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) Rubisco 活化酶基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 43(1): 41—46
- 丛 峰, 孙 雪, 徐年军, 2012. 几种小球藻油脂含量检测方法的比较及优化. 宁波大学学报(理工版), 25(1): 20—23
- 江怀真, 张 维, 刘中天等, 2011. 氮、磷浓度对小球藻生长及油脂积累的影响. 食品工业科技, 32(6): 204—208
- 杨 凯, 史全良, 2009. 不同浓度 IAA 对微藻 TH6(*Oedocladium* sp.)生长及脂肪酸含量的影响. 植物资源与环境学报, 18(2): 80—83, 96
- 张 齐, 高 振, 黄 和等, 2011. 氧化铝气体分布器应用小球藻培养的研究. 中国生物工程杂志, 31(3): 61—65
- 张丽莉, 吴 垠, 孙建明等, 2008. 补充 CO₂ 对光生物反应器培养小球藻生长和光合作用的影响. 水产科学, 27(11):

570—573

- 张俊杰, 袁晓雄, 林建等, 2012. 大规模封闭式光生物反应器培养小球藻效果试验. 盐业与化工, 41(10): 28—29, 32
- 张桂艳, 温小斌, 梁芳等, 2011. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响. 生态学报, 31(8): 2076—2085
- 欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红等, 2010. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响. 武汉植物学研究, 28(1): 49—55
- 徐志标, 裴鲁青, 骆其君等, 2005. 绿色巴夫藻的光生物反应器半连续培养研究. 海洋水产研究, 26(4): 64—69
- 黄冠华, 任庆功, 何环等, 2011. 通气对光合自养培养下蛋白核小球藻生长和有机碳成分含量的影响. 可再生能源, 29(5): 94—98
- 黄冠华, 陈峰, 魏东, 2008. 两步培养法提高蛋白核小球藻的油脂含量. 华南理工大学学报(自然科学版), 36(12): 97—101
- 缪晓玲, 吴庆余, 2007. 微藻油脂制备生物柴油的研究. 太阳能学报, 28(2): 219—222
- 潘双叶, 陈焯, 张华军等, 2002. 应用光生物反应器高密度培养等鞭藻. 宁波大学学报(理工版), 15(3): 33—38
- Attilio C, Alessandro A, Casazza D *et al*, 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing, 48(6): 1146—1151
- Li X F, Xu H, Wu Q Y, 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 98(4): 764—771
- Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C, 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology, 99(11): 4717—4722
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E *et al*, 2006. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng, 101: 87—96
- Walter T, Purton S, Becker D K *et al*, 2005. Microalgae as bioreactor. Plant Cell Rep, 24: 629—641
- Wijffels R H, Barbosa M J, 2010. An outlook on microalgal biofuels. Science, 329(13): 796—799
- Williams P, 2007. Biofuel: Microalgae cut the social and ecological costs. Nature, 450(7169): 478

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF *CHLORELLA PYRENOIDOSA* IN PHOTOBIOREACTOR

CONG Feng^{1,2}, SUN Xue^{1,2}, XU Nian-Jun^{1,2}, CAI Xi-Li^{1,2}

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Marine Biotechnology Key Laboratory of Zhejiang Province, Ningbo, 315211)

Abstract The effects of air aeration rate, nitrogen, Fe³⁺, IAA concentration, and CO₂ supply volume on growth and lipid accumulation of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* in airlift photobioreactor were studied. Results show that when the air aeration rate was 2.0L/min, the growth rate of *C. pyrenoidosa* was 6.17mg/(L·d) and the lipid production was 1.77mg/(L·d). During the experimental time, the nitrogen concentration did not affect the algal lipid production significantly. The optimal conditions of other factors were: Fe³⁺ concentration at 0.1mmol/L for the best growth rate [7.29mg/(L·d)], and 1.0mmol/L for best lipid production [2.54mg/(L·d)]; IAA concentration at 1.0mg/L for both the growth rate and lipid production [7.47 and 2.89mg/(L·d), respectively]; CO₂ supply volume at 6000mL/d for the growth rate [9.88mg/(L·d)], and at 4000mL/d for the lipid production [3.86mg/(L·d)]. In this experiment, the lipid production in the optimal conditions is significantly higher than the control group.

Key words *Chlorella pyrenoidosa*; photobioreactor; environmental factors; growth rate; lipid accumulation