

光生物反应器中螺旋藻培养条件的优化

陈必链, 江贤章, 王娟, 王明兹, 陈小兰

(福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 利用正交实验对搅拌式光生物反应器中钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* Geitl)的培养条件即搅拌速度、通气量和光照强度进行优化。实验结果表明:当培养温度为30℃时,通过正交实验所获得的最佳培养条件为搅拌转速120 r·min⁻¹,通气量80 L·h⁻¹,光照强度5 000 lx。在最佳培养条件下,收获时螺旋藻的干重为1.922 g·L⁻¹。根据回归模型得到相应的优化条件为:光照强度5 000 lx,通气量150 L·h⁻¹,搅拌转速111.70 r·min⁻¹,收获量(干重)的预测值为2.293 g·L⁻¹。另外,10%的接种量有利于螺旋藻的生长。

关键词: 螺旋藻;搅拌式光生物反应器;正交实验;培养条件;优化

中图分类号: S968.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)02-0019-04

Optimization of cultural conditions of *Spirulina platensis* in stirred photobioreactor CHEN Bi-lian, JIANG Xian-zhang, WANG Juan, WANG Ming-zi, CHEN Xiao-lan (College of Bioengineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(2): 19-22

Abstract: The optimum cultural conditions of *Spirulina platensis* Geitl including agitation rate, aeration rate and light intensity were selected in the stirred photobioreactor by means of the orthogonal experiment. The best cultural condition was agitation rate 120 r·min⁻¹, aeration rate 80 L·h⁻¹ and light intensity 5 000 lx. The harvest yield (dry weight) was 1.922 g·L⁻¹ under the best cultural condition. The optimum cultural conditions were obtained according to the regression model, namely light intensity 5 000 lx, aeration rate 150 L·h⁻¹ and agitation rate 111.70 r·min⁻¹ and forecast value of harvest yield (dry weight) reached to 2.293 g·L⁻¹. In addition, the inoculation rate of 10% is suitable for the growth of *S. platensis* in the stirred photobioreactor.

Key words: *Spirulina platensis* Geitl; stirred photobioreactor; orthogonal experiment; cultural condition; optimization

螺旋藻(*Spirulina* Turpin spp.)是成功开发并实现产业化生产的丝状多细胞微藻。国内外多数螺旋藻生产工厂都采用开放式跑道池培养系统,由于开放式培养系统存在许多不足之处,许多学者都在探索采用不同的封闭式培养系统生产螺旋藻,如螺旋管式光生物反应器半连续培养^[1];封闭式太阳能管式光生物反应器^[2];或将小管成排安装在2个南北朝向的光生物反应器上,采用太阳辐射能光自养生产螺旋藻^[3];还有的学者建立了由121个反应和134个代谢物组成的代谢网络,提出螺旋藻自养生长的全面新陈代谢网络结构^[4]。

机械搅拌式生物反应器是广泛用于规模培养微生物的生物反应器,具有技术条件成熟、易于控制等优点,只要配套光源,就可成为培养微藻的光生物反

应器,因此可利用现有发酵工程技术开展微藻的研究开发工作,国内外许多学者在这方面都做了尝试^[5-7]。本研究采用搅拌式光生物反应器,通过正交实验法对螺旋藻培养过程中搅拌转速、通气量和光照强度等培养条件进行优化组合,获得搅拌式光生物反应器中螺旋藻的最佳培养条件,并通过DPS软件对正交实验结果进行二次多项式分析并建立相应的回归方程,为该反应器在微藻规模培养中的推广应用提供理论基础。

收稿日期: 2004-10-29

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B0001002)

作者简介: 陈必链(1963-),男,福建周宁人,博士,副教授,主要从事发酵工程和应用微生物的教学和科研工作。

1 材料和方法

1.1 藻种来源

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis* Geitl) 引自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 采用 Zarrouk 培养基, 500 mL 三角瓶中培养液装量 200 mL, 光照强度 2 500 lx (日光灯提供光源), 连续光照, 培养温度 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。将活化培养至对数期的藻做为藻种, 以一定的接种量移入 5 L 玻璃搅拌式光生物反应器^[8]中培养, 10 d 为 1 个培养周期。光生物反应器装量 3.5 L (接种后体积), 反应器内表面的光照强度为 1 100 ~ 5 000 lx, 连续光照, 培养温度 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 搅拌转速 0 ~ 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 通气量 0 ~ 150 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。实验于 2001 年 3 月至 2001 年 12 月和 2003 年 8 月至 2003 年 12 月在福建师范大学生物工程学院进行。

1.2.2 正交实验设计 在保持搅拌式光生物反应器中培养温度恒定的条件下, 选取搅拌转速、通气量和光照强度 3 个因素, 每个因素各选出 3 个水平, 以收获时藻体干重为考察指标, 选用正交表 $L_9(3^4)$ 进行实验, 所选取的因素和水平见表 1。

对正交实验结果采用 DPS 软件数据处理系统进行二次多项式逐步回归分析, 建立相应的回归方程并得出优化结果。

表 1 螺旋藻培养条件的正交实验各因素和水平表
Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment for cultural conditions of *Spirulina platensis* Geitl

水平 Level	因素 Factor		
	X_1 光照强度/lx Light intensity	X_2 通气量/ $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ Aeration rate	X_3 搅拌转速/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ Agitation rate
1	5 000	150	200
2	1 100	80	120
3	3 000	0	0

1.2.3 干重测定 取培养 10 d 的藻液, 用 300 目筛绢过滤, 藻泥用蒸馏水洗涤 3 ~ 4 次, 70°C 干燥, 电子天平称重。

1.2.4 叶绿素 a 和 β -胡萝卜素的测定 参照文献 [9] 的方法进行。

2 结果和分析

2.1 优化培养条件的确定

对搅拌式光生物反应器中螺旋藻的培养条件即搅拌转速、通气量和光照强度通过正交实验进行优化, 实验结果见表 2。

根据实验所得结果对螺旋藻的收获量(干重)进行直观分析和极差分析, 结果显示, 搅拌转速对螺旋藻收获量(干重)的影响最显著, 其次为通气量, 而光照强度的影响最弱。通过正交实验获得搅拌式光生物反应器中螺旋藻的最佳培养条件为: $X_11 X_22 X_32$, 即光照强度 5 000 lx, 通气量 $80 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 搅拌转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 在该条件下进行螺旋藻培养, 收获时藻的干重达到 $1.922 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 光生物反应器中螺旋藻培养条件的正交实验结果及分析
Table 2 Results of the orthogonal experiment for the cultural conditions of *Spirulina platensis* Geitl in stirred photobioreactor

实验号 No.	因素 Factor			干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Dry weight
	X_1 光照强度/lx Light intensity	X_2 通气量/ $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ Aeration rate	X_3 搅拌转速/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ Agitation rate	
1	5 000	150	200	1.875
2	5 000	80	120	1.922
3	5 000	0	0	0.322
4	1 100	150	120	0.958
5	1 100	80	0	0.912
6	1 100	0	200	0.904
7	3 000	150	0	1.158
8	3 000	80	200	1.305
9	3 000	0	120	1.320
K_1	4.119	3.991	4.084	
K_2	2.774	4.139	4.200	
K_3	3.783	2.546	2.392	
K_1'	1.373	1.330	1.361	
K_2'	0.925	1.380	1.400	
K_3'	1.261	0.849	0.797	
R	0.448	0.531	0.603	

2.2 回归方程的建立

根据正交实验的结果, 以收获量(干重)为指标, 运用 DPS 软件对表 2 的实验结果进行二次多项式模型分析和拟合, 并对该模型和回归系数进行显著性检验, 结果见表 3。

以收获时的干重为指标,建立的回归模型为:

$$Y = 0.94424 + 0.01003X_3 - 0.24909 \times 10^{-7}X_1^2 - 0.39792 \times 10^{-4}X_2^2 - 0.52532 \times 10^{-4}X_3^2 + 0.29481 \times 10^{-5}X_1X_2 + 0.042350 \times 10^{-6}X_1X_3 - 0.27361 \times 10^{-5}X_2X_3$$
 式中 Y 代表目标函数即收获量(干重),相关系数 $R = 0.99987$, $F = 537.7428$, 显著水平 $P = 0.0332$, 剩余标准差 $S = 0.02306$ 。说明该方程能很好地拟合螺旋藻在搅拌式光生物反应器中的生长过程。以收获时的干重为目标时的优化结果为:光照强度 5000 lx , 通气量 $150 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 搅拌转速 $111.70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 收获量(干重)的预测值为 $2.293 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由表3的 P 值可看出, X_1 和 X_3 、 X_1 和 X_2 、 X_2 和 X_3 之间存在交互作用,即光照强度和搅拌转速、光照强度和通气量、通气量和搅拌转速之间存在交互作用。

表3 螺旋藻培养条件正交实验结果的显著性分析
 Table 3 The significance analysis of the orthogonal experiment for the cultural conditions of *Spirulina platensis* Geitl

因素 ¹⁾ Factor ¹⁾	偏相关系数 Partial correlation	t -检验 t -test	显著水平 P Significance level P
X_3	0.99811	16.24948	0.00377
X_1^2	-0.99782	15.10260	0.00436
X_2^2	-0.99206	7.88597	0.01570
X_3^2	-0.99885	20.87176	0.00229
X_1X_2	0.99728	13.53532	0.00541
X_1X_3	0.93199	2.57109	0.12380
X_2	-0.65344	0.86321	0.47900

¹⁾ X_1 : 光照强度 Light intensity (lx); X_2 : 通气量 Aeration rate ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$); X_3 : 搅拌转速 Agitation rate ($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)

2.3 接种量对螺旋藻生长的影响

利用正交实验所获等的最佳培养条件,研究不同接种量对螺旋藻生长的影响,测定收获期螺旋藻的干重、叶绿素 a 和 β -胡萝卜素含量,结果见表4。

表4 搅拌式光生物反应器中接种量对螺旋藻干重及叶绿素 a 和 β -胡萝卜素含量的影响
 Table 4 Effect of inoculation rate on the dry weight, contents of chlorophyll a and β -carotene of *Spirulina platensis* Geitl in stirred photobioreactor

接种量/% Inoculation rate	干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Dry weight	含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Content	
		叶绿素 a Chlorophyll a	β -胡萝卜素 β -carotene
5	1.447	10.98	7.50
10	1.925	14.46	9.24
20	1.462	11.59	8.96

由表4可知,10%接种量较有利于螺旋藻的生长。同时在整个培养过程,随着培养时间的延长,培养液的 pH 值缓慢上升。

3 讨 论

Iqbal 等^[10]发现,机械搅拌和通过玻璃管或烧结玻璃供气的培养体系,搅拌的形式对紫球藻 (*Porphyridium cruentum* Naegeli) 生长和胞外多糖的产生有一定的影响,当通过烧结玻璃供气时获得最高的多糖产量。螺旋藻细胞为丝状体,搅拌转速增大,搅拌叶片剪切速度随之增大,细胞容易受到损伤,从而影响螺旋藻的正常生长代谢。正交实验极差分析和二次多项式分析结果表明搅拌转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 有利于螺旋藻的生长。提高通气量意味着能使更多的 CO_2 溶解在培养液中和促进培养液中 O_2 的释放,藻类的光合作用过程总是伴随着 CO_2 的消耗和 O_2 的释放,即使 CO_2 的浓度保持高水平,当 O_2 浓度水平高于空气饱和度时许多藻类的光合作用也会受到抑制^[11]。而当用搅拌式光生物反应器培养紫球藻,通气量对紫球藻生物量和胞外多糖产量的影响比搅拌转速和光照强度明显,通过改变通气量和搅拌转速,可以降低紫球藻细胞壁周围的液膜阻力,促进藻的生长^[12,13]。

不同的光生物反应器培养螺旋藻所获得的生物量有较大的差别。采用螺旋管式光生物反应器通过半连续培养螺旋藻获得的最大生产能力为 $5.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11];通过流加和以 $\text{NaHCO}_3 + \text{CO}_2$ 为碳源在内环流气升式光生物反应器中培养螺旋藻所获得的最大生产能力为 $3.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]。不同的培养系统室外培养钝顶螺旋藻的生产能力分别为跑道式循环培养池 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、管道式泵混合反应器 $0.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、管道式气升式反应器 $4.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、管道式泡柱反应器 $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、直立平板式反应器 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[15]。在 LED 光电板式光生物反应器中,当光辐射强度为 $137.80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,采用红光 LED 集成光辐射板、白色日光灯光组和红蓝光 LED 集成光辐射板,螺旋藻的生产力分别为 1.56 、 0.95 和 $1.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;而当光辐射强度为 $275.90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,采用红光 LED 集成光辐射板、白色日光灯光组和红蓝光 LED 集成光辐射板,螺旋藻的生产力分别为 2.48 、 1.25 和 $2.89 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16]。与上述报道相比,

搅拌式光生物反应器培养螺旋藻的生产力比开放式跑道池培养体系高,但与有些封闭式光生物反应器相比存在一定的差距,因此有必要通过半连续培养或补料分批培养进一步提高其生产力。

接种量的大小与螺旋藻在生物反应器中生长繁殖的速度有关。采用大接种量,藻种进入生物反应器后容易适应,而且由于藻液中含有一定的酶,有利于其对培养液的利用。大接种量还可以缩短生物反应器中藻体繁殖至高峰期所需的时间,使产物合成速度加快。但是过大的接种量会使藻种生长过快,造成由于营养物质缺乏或 CO₂ 供应不足而最终不利于藻体生长的现象。接种量过小,则会使藻体在培养前期生长缓慢,培养周期延长,生物量减少。因此在螺旋藻的培养过程中采用合适的接种量有利于生物量的提高。

参考文献:

- [1] Travieso L, Hall D O, Rao K K, et al. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2001, 47(3): 151-155.
- [2] Masojidek J, Papacek S, Sergejevova M, et al. A closed solar photobioreactor for cultivation of *Spirulina* under supra-high irradiance[J]. J Appl Phyco, 2003, 15: 239-248.
- [3] Carozzi P. Dilution of solar radiation through "culture" lamination in photobioreactor rows facing south-north: A way to improve the efficiency of light utilization by cyanobacteria (*Arthrospira platensis*) [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 81(3): 305-315.
- [4] Cogne G, Gros J B, Dussap C G. Identification of a metabolic network structure representative of *Arthrospira (Spirulina) platensis* metabolism[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84(6): 667-676.
- [5] Huang Y M, Rorrer G L. Cultivation of microplantlets derived from the marine red alga *Agardhiella subulata* in a stirred tank photobioreactor[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(2): 418-427.
- [6] Su W W, Li J, Xu N S. State and parameter estimation of microalgal photobioreactor cultures based on local irradiance measurement[J]. J Biotechnol, 2003, 105(1-2): 165-178.
- [7] 刘世名, 孟海华, 梁世中, 等. 生物反应器高密度异养培养小球藻[J]. 华南理工大学学报, 2000, 28(2): 81-86.
- [8] 陈必链, 王明兹, 黄 键, 等. 新型封闭式冷白荧光光生物反应器[P]. 中国专利: ZL 01230843.9, 2004-03-10.
- [9] 王明兹, 施巧琴, 陈必链, 等. 紫球藻生长周期可见光吸收光谱与生化变化[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 23-26.
- [10] Iqbal M, Zafar S I. Strategies toward optimization of cultural conditions of *Porphyridium cruentum* for higher polysaccharide production[J]. Acta Microbiologica Polonica, 1993, 42(1): 71-82.
- [11] Aiba S. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms [J]. Adv Biochem Eng, 1982, 23: 85-165.
- [12] Chen Bilian, Huang Jian, Liang Shizhong, et al. Culture of *Porphyridium cruentum* in stirred photobioreactor and its effect on hypolipidemia[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4): 432-436.
- [13] 陈必链, 梁世中, 王 娟, 等. 搅拌式光生物反应器培养紫球藻的条件优化[J]. 福建师范大学学报, 2004, 20(2): 91-96.
- [14] 王长海, 钟 响, 鞠 宝, 等. 螺旋藻的光生物反应器高密度培养[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(4): 7-10.
- [15] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003. 170.
- [16] 徐明芳, 李贻玲. 钝顶螺旋藻在LED光电板式光生物反应器中的培养研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(2): 42-45.

(责任编辑: 惠 红)

《植物资源与环境学报》启事

为了扩大科技期刊的信息交流,充分实现信息资源共享,《植物资源与环境学报》已先后加入“中国学术期刊(光盘版)”、“中文科技期刊数据库”和“万方数据——数字化期刊群”等数据库,因此,凡在本刊发表的论文将编入数据库供交流、查阅及检索,作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另付。如作者不同意将文章编入数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《植物资源与环境学报》编辑部
2005-04-10