

平板式光生物反应器中紫球藻培养条件的优化

游文朗, 陈必链^①, 王娟

(福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007)

摘要: 研究了平板式光生物反应器中紫球藻(*Porphyridium cruentum* Naegeli)的培养条件,运用均匀设计法对光照强度、通气速率、装液量、接种密度以及 pH 等影响紫球藻生长的因素进行优化,获得了在平板式光生物反应器中培养紫球藻的最佳条件:光照强度 10 000 lx、通气速率 350 L·h⁻¹、装液量 6 L、藻细胞接种密度 1.1 × 10⁶ mL⁻¹、pH 9.0。在最佳条件下藻体的生物量产率和生物量产量分别达到 0.431 g·L⁻¹·d⁻¹和 3.240 g·L⁻¹,最大生长速率达 0.652 g·L⁻¹·d⁻¹,胞外多糖含量高达 0.665 g·L⁻¹。另外,在培养过程中隔天补充培养液有利于紫球藻生物量的增加和胞外多糖的产生。

关键词: 紫球藻;平板式光生物反应器;均匀设计;培养条件;优化

中图分类号: Q949.2; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)01-0030-04

Optimization of culture conditions of *Porphyridium cruentum* in the flat plate photobioreactor

YOU Wen-lang, CHEN Bi-lian^①, WANG Juan (College of Bioengineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(1): 30-33

Abstract: The effects of culture conditions on growth of *Porphyridium cruentum* Naegeli in the flat plate photobioreactor was investigated by means of the uniform design method, which included light intensity, aeration rate, liquid volume, inoculation density and pH value. The optimal culture conditions were obtained as follows: light intensity 10 000 lx, aeration rate 350 L·h⁻¹, liquid volume 6 L, inoculation density 1.1 × 10⁶ mL⁻¹ and pH 9.0. Under the optimal culture conditions, the biomass production rate and biomass reached to 0.431 g·L⁻¹·d⁻¹ and 3.240 g·L⁻¹ respectively, maximal growth rate was 0.652 g·L⁻¹·d⁻¹ and exopolysaccharide content was 0.665 g·L⁻¹. In addition, the replenishment of fresh medium added every two days was beneficial to enhance the biomass production and exopolysaccharide content.

Key words: *Porphyridium cruentum* Naegeli; flat plate photobioreactor; uniform design; culture condition; optimum

紫球藻(*Porphyridium cruentum* Naegeli)在生长过程中能合成藻红蛋白、高不饱和脂肪酸和紫球藻多糖等多种具有广阔应用前景的生物活性物质,其藻粉具有多种生理功能^[1-3];其产生的胞外多糖具有体外抗乙肝病毒特性^[4]和抗氧化作用^[5]。近年来对紫球藻培养^[3]、藻胆蛋白的分离纯化^[6,7]和藻粉的生理功能等进行了多方面的研究。

紫球藻对培养条件要求不高、生长繁殖快,可利用光生物反应器对其进行大规模培养。本实验在前期实验的基础上,就在玻璃平板式光生物反应器中一些培养因素对紫球藻生长的影响进行了探讨,同时,采用均匀设计法对这些影响因子进行优化实验^[8],获得平板式光生物反应器中紫球藻的最佳培养条件,使紫球藻生物量和胞外多糖含量得到较大

幅度提高,为实现紫球藻的大规模培养打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种来源 紫球藻(*Porphyridium cruentum* Naegeli)引自中国科学院海洋研究所。

1.1.2 培养基与接种物 采用 KOCH 培养基^[9],

收稿日期: 2005-07-18

基金项目: 福建省发展和改革委员会基金资助课题(闽计投资[2003]203号)

作者简介: 游文朗(1979-),男,福建龙岩人,硕士研究生,主要从事海洋微藻资源开发研究。

^① 通讯作者 E-mail: chenbil@fjnu.edu.cn

将培养至对数期的紫球藻培养液作为藻种。

1.1.3 平板式光生物反应器 光反应器由3部分组成,受光反应部分由六块平板玻璃组成长方体容器(长50 cm、宽30 cm、高15 cm);光源为40 W日光灯,通过调节日光灯数量控制光照强度;通气装置由通气泵和气石组成。反应器总体积(容积)22.5 L,表面积与体积比(S/V)为 6.67m^{-1} ,光照强度 $2\,000\sim 10\,000\text{lx}$ 。

1.2 方法

1.2.1 藻细胞干重的测定 紫球藻培养液于 $4\,500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心7~8 min后弃上清液,蒸馏水洗涤,60℃烘至恒重后用精密电子天平称量。

1.2.2 胞外多糖含量测定 苯酚硫酸法^[10]。

1.2.3 藻细胞生长的测定 用721型分光光度计在波长560 nm处测量藻液的光密度值。采用最小二乘法,以线性回归求斜率的方法计算藻体细胞的生长速度。

1.2.4 均匀设计试验

1.2.4.1 因素与水平的确定 选择影响紫球藻生长的5个主要因素作为研究对象,包括光照强度(X_1)、通气速率(X_2)、装液量(X_3)、接种密度(X_4)和pH值(X_5)。根据已有的实验结果^[11]及预实验结果确定各因素的水平,见表1。

表1 平板式光生物反应器中紫球藻培养条件优化实验的均匀设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of the uniform design experiment about the culture conditions of *Porphyridium cruentum* Naegeli in the flat plate photobioreactor

水平 Level	因素 ¹⁾ Factor ¹⁾				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	2 000	150	6	0.8	5
2	4 000	200	7	1.2	6
3	6 000	250	8	1.6	7
4	8 000	300	9	2.0	8
5	10 000	350	10	2.4	9

¹⁾ X_1 : 光照强度(lx) Light intensity; X_2 : 通气速率($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) Aeration rate; X_3 : 装液量(L) Liquid volume; X_4 : 接种密度($\times 10^6\text{mL}^{-1}$) Inoculation density; X_5 : pH.

1.2.4.2 目标函数的选择 以紫球藻培养过程中所能达到的最大生物量产率(Y)作为目标监测值。

1.2.5 验证试验 按均匀设计试验获得的优化条件培养紫球藻并观测其生物量和胞外多糖含量变化。

1.2.6 分批补料实验 以优化条件为初始条件,采

用4种不同的补料方式(A、B、C、D)培养紫球藻,补料量以保持反应器中培养液体积恒定为基准。A:每日补充新鲜培养基(KOCH培养基);B:每日补充无菌水;C:第2、4、6日补充新鲜培养基(KOCH培养基);D:第2、4、6日补充无菌水。

2 结果和分析

2.1 均匀设计试验结果

采用DPS软件设计的5因素5水平均匀设计表及试验结果见表2。在不同培养条件下,紫球藻的生物量产量为 $0.323\sim 1.473\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表2 平板式光生物反应器中紫球藻培养条件的均匀设计试验结果¹⁾

Table 2 Results of the uniform design experiment about the culture conditions of *Porphyridium cruentum* Naegeli in the flat plate photobioreactor¹⁾

实验号 No.	各因素的水平 Level of factor					生物量产率/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Biomass production
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	6 000	350	9	1.2	5	1.050
2	4 000	250	10	2.0	9	0.554
3	2 000	150	7	1.6	6	0.323
4	8 000	300	6	2.4	7	1.473
5	10 000	200	8	0.8	8	0.722

¹⁾ X_1 : 光照强度(lx) Light intensity; X_2 : 通气速率($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) Aeration rate; X_3 : 装液量(L) Liquid volume; X_4 : 接种密度($\times 10^6\text{mL}^{-1}$) Inoculation density; X_5 : pH.

2.2 回归分析及各因素的影响情况

根据表2中的生物量产率(Y)的实验结果,经DPS数据处理系统的多项式逐步回归分析,结果见表3。

表3 用逐步回归法处理的数据结果

Table 3 Results treated by the stepwise regression method

因素 ¹⁾ Factor ¹⁾	偏相关系数 Partial correlation	t -检验 t -test	P
X_5	0.999 67	38.963 97	0.000 66
X_1X_2	1.000 00	335.762 28	0.000 01
X_1X_3	-0.999 99	183.658 02	0.000 03

¹⁾ X_1 : 光照强度(lx) Light intensity; X_2 : 通气速率($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) Aeration rate; X_3 : 装液量(L) Liquid volume; X_4 : 接种密度($\times 10^6\text{mL}^{-1}$) Inoculation density; X_5 : pH.

以生物量产率(Y)为指标得回归方程: $Y = 0.119\,98 + 0.032\,06 X_5 + 0.176\,64 \times 10^{-4} X_1X_2 - 0.345\,423 \times 10^{-3} X_1X_3$,相关系数 $R = 1.000\,00$,剩余标准差 $S = 0.002\,26$,显著水平 $p = 0.003\,2$, F 值 =

52 866.369 8, $R^2 = 1$, 回归方程拟合效果极好。按表 3 中各变量显著性检验 P 值的大小, 各因素或其交互作用对生物量产生影响的强弱程度为: $X_1 X_2 > X_1 X_3 > X_5$ 。在 5 个因素中, pH 值、光照强度和通气速率、光照强度和装液量之间的交互作用对藻体的生长有显著影响。通过采用均匀设计法, 在试验次数较少的情况下, 得到了较满意的试验结果, 经回归分析, 获得的优化条件为: 光照强度 10 000 lx、通气速率 350 L · h⁻¹、反应器装液量 6.0 L、接种密度 1.1 × 10⁶ mL⁻¹、pH 9.0, 优化条件下生物量的预测值为 2.260 g · L⁻¹。

2.3 优化的培养条件对紫球藻生长的影响

根据所得的优化条件, 采用平板式光生物反应器培养紫球藻, 其藻体干重和胞外多糖 (EPS) 含量的变化如图 1 所示。

由图 1 可见, 在整个培养周期中藻体的生物量 (干重) 和胞外多糖含量随培养时间的延长同步增长, 至第 8 天生物量增长速度减缓, 第 9 天之后培养液中出现裂解的细胞, 紫球藻生长开始衰退, 生物量降低; 而胞外多糖含量在培养后期并不降低, 基本维持稳定。藻体的生物量产率和生物量产量分别达到

0.431 g · L⁻¹ · d⁻¹ 和 3.240 g · L⁻¹, 最大生长速率达 0.652 g · L⁻¹ · d⁻¹, 胞外多糖含量高达 0.665 g · L⁻¹, 藻细胞密度达 2.42 × 10⁷ mL⁻¹。对实验结果进行 t -检验, 表明生物量产量无显著性差异, 紫球藻生物量产量为 3.240 ± 0.0511 g · L⁻¹, 明显超过预测值 (2.260 g · L⁻¹), 说明经过均匀设计实验优化获得的培养条件合理可行。

2.4 分批补料对紫球藻生长的影响

在平板式光生物反应器中紫球藻生长快、藻体密度高, 相应地对培养液中营养成分的利用也加快, 浓度迅速降低, 当生长到一定时期, 培养液中营养成分的缺乏可能成为限制藻细胞进一步生长和增殖的原因。以优化条件为初始条件, 采用 4 种不同的补料方式培养紫球藻, 结果见表 4。

由表 4 可以看出, 在培养过程中补充培养液比补充无菌水更有利于藻的生长和胞外多糖的产生, 隔天补充培养液比每天补充培养液的效果更好。采用隔天补料方式可以使培养液维持更适宜的营养环境, 从而更有利于藻细胞的生长及胞外多糖的积累。与优化验证实验相比, 补料实验生物量单位产量降低, 但单批培养所得生物量总量增加。

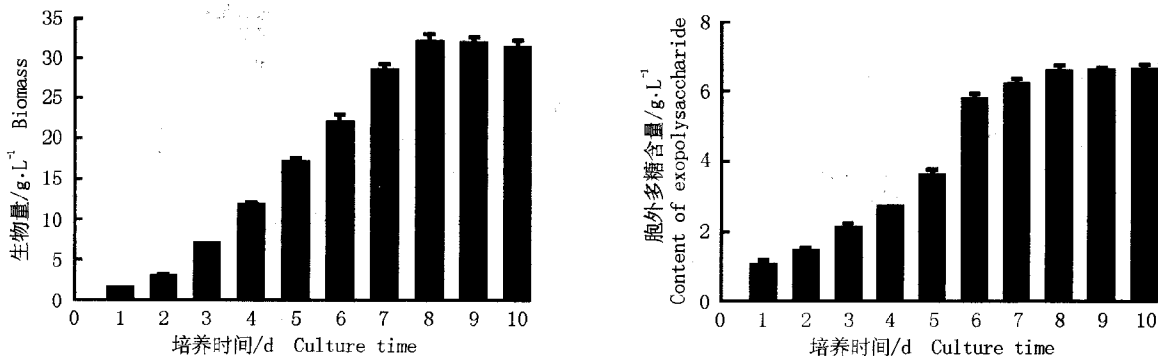


图 1 优化的培养条件对平板式光生物反应器中紫球藻生长的影响

Fig. 1 Effects of optimal culture conditions on the growth of *Porphyridium cruentum* Naegeli in flat plate photobioreactor

表 4 不同补料方式对紫球藻生物量及多糖含量的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 4 Effects of different methods of feed batch on biomass and polysaccharide production of *Porphyridium cruentum* Naegeli ($\bar{X} \pm SD$)

方法 Method	生物量/g · L ⁻¹ Biomass	总产量/g Yield	多糖含量/g · L ⁻¹ Content of polysaccharide	多糖总产量/g Yield of polysaccharide
每日补充培养基 Fresh medium added every day	2.103 ± 0.080 6	11.987 ± 0.459 0	0.494 ± 0.004 24	2.816 ± 0.024 2
每日补充无菌水 Water added every day	1.261 ± 0.021 2	7.188 ± 0.121 0	0.338 ± 0.005 66	1.927 ± 0.032 2
隔天补充培养基 Fresh medium added every two days	2.457 ± 0.012 7	13.268 ± 0.068 7	0.530 ± 0.009 90	2.862 ± 0.053 5
隔天补充无菌水 Water added every two days	1.465 ± 0.015 6	7.911 ± 0.084 0	0.395 ± 0.004 24	2.133 ± 0.022 9

3 讨 论

紫球藻的规模培养可以采用开放池、管式生物反应器、气升式光生物反应器、鼓泡柱式反应器、玻璃平板式反应器^[3]和搅拌式光生物反应器等。与采用气升式内环流反应器和搅拌式光生物反应器时收获的紫球藻生物量相比($1.51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12]及 $2.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13]),采用玻璃平板式光生物反应器,紫球藻的生物量有较大幅度的提高。在搅拌式光生物反应器^[13]和玻璃平板式反应器^[14]中培养的紫球藻收获时胞外多糖含量分别为 557 和 $547 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而采用本实验所用的玻璃平板式光生物反应器培养紫球藻,其胞外多糖产量有一定的提高。Iqbal等曾采用不同的反应器进行实验,其中采用呼吸瓶(Aspirator bottle)、平板式反应器、Techne反应器和气升式反应器进行培养,培养液中胞外多糖的含量达到 $760 \sim 2\,619 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[15],但上述实验中紫球藻的培养周期均在 20 d 以上,而本实验的培养周期仅为 8 d ,培养周期较短。

均匀设计法在各行各业的应用越来越广泛,在藻类的培养方面也有一定的应用^[16-19]。本实验采用DPS软件对均匀设计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,获得相应的模型方程能很好地拟合紫球藻在玻璃平板式光生物反应器中培养时生物量产生的过程。根据该模型,以生物量为目标时的最优培养条件为光照强度 $10\,000 \text{ lx}$ 、通气量 $350 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 、装液量 6.0 L 、接种密度 $1.1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 、pH 9.0 。上述优化条件中,有些因素的水平值为极端值,如装液量、光照强度等,将在后续实验中对这些范围设立新的水平,使结果更接近最优方案。

参考文献:

[1] 刘丽平, 黄 键, 陈必链, 等. 紫球藻对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的调节作用[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(4): 18-20.
 [2] Chen B L, Huang J, Liang S Z, et al. Culture of *Porphyridium cruentum* in photobioreactor and its effects on hypolipidemia[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10: 432-436.

[3] 陈必链, 黄 键, 梁世中. 紫球藻的研究进展[J]. 海洋通报, 2002, 21(5): 75-80.
 [4] 黄 键, 陈必链, 游文朗. 紫球藻胞外多糖的分离及体外抗乙型肝炎活性的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(5): 18-21.
 [5] Tannin-Spitz T, Bergman M, Dorit van-Moppes, et al. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. [J]. J Appl Phyco, 2005, 17: 215-222.
 [6] Jorge B, Marco R P. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*[J]. J Chromatography B, 2004, 807: 33-38.
 [7] Ma S H, Wang G C, Sun H B, et al. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum* [J]. Plant Sci, 2003, 164: 253-257.
 [8] 方开泰, 王 元. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 1-5.
 [9] 华汝成. 单胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986. 457.
 [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第2版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 11-12.
 [11] 王 娟, 陈必链, 王明兹, 等. 培养条件对紫球藻生长及代谢产物产生的影响[J]. 福建师范大学学报, 2004, 20(3): 63-66.
 [12] 王长海, 欧阳藩. 紫球藻的光生物反应器培养[J]. 化工冶金, 2000, 21(1): 47-51.
 [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] Singh S, Arad (Malis) S, Richmond A. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors[J]. J Appl Phyco, 2000, 12: 269-275.
 [15] Iqbal M, Zafar S I, Stepan-Sarkissian G, et al. Indoor mass cultivation of red alga *Porphyridium cruentum* in different types of bioreactors: effect of scale-up and vessel shape[J]. J Ferment Bioeng, 1993, 75(1): 76-78.
 [16] 朱艺峰, 郭小强. 不同氮磷硅含量和接种密度对三角褐指藻生长的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 7(4): 47-51.
 [17] 薛巧如, 伊鸿萍, 王 旻, 等. 均匀设计优化盐藻多糖提取工艺[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(5): 20-22.
 [18] 沙珍霞, 石晓勇, 张学成, 等. 用均匀设计方法优化螺旋藻培养基配方的研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(2): 41-47.
 [19] 徐年军, 张学成, 范 晓. 均匀设计在后棘藻培养基中的应用[J]. 海洋科学, 2003, 27(1): 38-42.