

10 L 容积光生物反应器批次培养盐藻的初步研究*

姜建国 朱跃辉 黄 洋

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州, 510640)

摘 要 设计和制作了容积为 10L 的螺旋管式光生物反应器, 螺旋管光照单元为 16 个, 光照比表面积增大为 95 m^{-1} , 反应器外观设计为 3 层框架式结构, 缩小了占地面积。用此光生物反应器进行了盐藻的批次培养试验, 确定批次培养的最佳接种量为 $OD_{630} = 0.15$, 最佳藻液循环流量为 630 mL/h , 并对此光生物反应器批次培养的生长情况和 β -胡萝卜素产量进行了数学曲线拟合, 生物量近似为一次曲线 $C_X = 0.0919 + 0.0364t$; β -胡萝卜素产量近似为二次曲线 $C_X = 0.3848t^2 - 1.1693t + 1.7338$ 。

关键词 盐藻, 光生物反应器, 批次培养, β -胡萝卜素

目前世界上商业化大规模培养盐藻生产 β -胡萝卜素一般是在水平浅池中或者是利用天然湖泊、环湖礁等进行。采用露天培养系统培养微藻主要存在以下几个缺点^[1]: (1) 由于培养面积大, 蒸发作用会造成水分大量损失, 无疑会增加循环用水和水泵的费用。(2) 由于外界培养环境的影响, 难以保持最适培养温度, 不利于微藻的旺盛生长。年培养时间、培养地点亦受到限制。(3) 会受到灰尘、昆虫、杂菌的污染甚至其他生物的取食, 不易保持高质量的单藻培养。(4) 虽然培养池已经很浅, 但其光照表面积与体积之比仍很低 ($< 10 \text{ m}^{-1}$), 实际上水平池式反应器的最佳藻液层厚度仅为 7 cm, 因此光能利用率和 CO_2 利用率不高, 无法实现高密度培养, 藻产率低。(5) 重金属等有害物质会在藻体内积累, 导致有害物质超标。由于藻生物量浓度低, 导致收获费用高。

本研究的目的是设计可人工控制各种培养条件的光生物反应器来培养盐藻以生产 β -胡萝卜素, 为盐藻的密闭式光生物反应器养殖提供理论依据和实践经验。

1 材料和方法

1.1 藻种及其培养

第一作者: 博士, 副教授。

* 广东省科技攻关项目(99M01410G)

收稿时间: 2004-05-19, 改回时间: 2004-08-11

盐藻 (*Dunaliella salina*) 为本实验室保藏种类, 基本培养方法参见文献^[2,3]。

1.2 生物量和细胞数测定

生物量测定: 根据测定的 OD 值与干藻体生物量 (细胞干重 g/L) 的关系式: 生物量 (干重) = $0.75 OD_{630} + 0.0146$, 只需测 OD_{630} 值便可计算藻体生物量。

细胞数测定: 根据测定的 OD 值与细胞数 ($\times 10^4$): 细胞数 = $899.08 OD_{630} - 12.544$, 只需测 OD_{630} 值便可计算样品的细胞数。

1.3 β -胡萝卜素含量测定

将纯品 β -胡萝卜素用纯丙酮配成不同浓度的标准溶液, 453 nm 测定 OD_{453} , 以 β -胡萝卜素浓度 C (mg/L) 为横坐标, OD_{453} 为纵坐标, 绘制出 β -胡萝卜素标准曲线, 相关分析关系式为: $OD_{453} = -0.0037C^2 + 0.1082C$, $R^2 = 0.9901$ 。 β -胡萝卜素的提取参见文献^[2], 提取的 β -胡萝卜素在其特征吸收波长 453 nm 测 OD , 根据上面的关系式计算 β -胡萝卜素含量 (mg/L)。

2 10 L 容积光反应器尺寸设计计算

2.1 反应器的外围设计

反应器设计为 3 层, 上层为螺旋管光照区,

由 16 根螺旋管和日光灯架组成,螺旋管间由密闭橡胶管串连;中层放置储藻罐、蠕动泵,并安装红外保温灯。储藻罐、蠕动泵与螺旋管间也采用密闭橡胶管连接;下层放置调压器、温度控制仪、电源插座等。

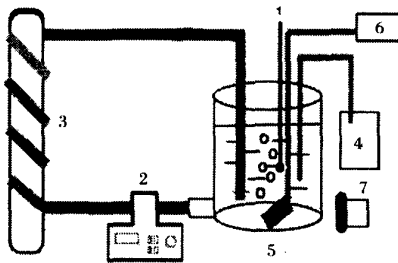
2.2 反应器系统组成

密闭反应器部分:包括 16 个螺旋管光照单元、10 L 容积储藻罐,罐上口分别有藻液入口、取样口、空气泵入口、温度计插口等。储藻罐底侧开有藻液出口,通过橡胶管与蠕动泵相连。动力系统:包括蠕动泵及电路系统,藻液流量通过蠕动泵的换挡来完成。电路系统由开关控制板、调压线路构成。参数控制系统:包括蠕动泵、调压器、温度控制仪、溶氧测定仪、酸度计等。

2.3 螺旋管尺寸设计

螺旋管内径 7.5 mm,管壁厚度 1 mm,螺旋直径 32 mm,螺间距 20 mm,螺旋个数 25,每根螺旋管的容积 60 mL,表面积为 $946\ 521.6\text{ mm}^2$ 。反应器总比表面积 = 表面积(S_f)/藻液体积(V) = $946\ 521.6/(10 \times 10^6)\text{ mm}^{-1} = 0.095\text{ mm}^{-1} = 95\text{ m}^{-1}$ 。

2.4 螺旋管光反应器培养流程



1-温度计;2-恒流泵;3-螺旋管光照区;
4-取样;5-储藻罐;6-鼓气泵;7-红外灯

图1 反应器结构流程图

反应器流程见图1。将接种好的培养液装入储藻罐内,开启电源,调节温度控制仪至所需温度,启动蠕动泵,调节藻液流速至要求的流量,藻液通过蠕动泵被输送到螺旋管光照区,接受光合作用所需的光照,依次流过串连的螺旋

管后,进入储藻罐,在气泵的作用下搅拌并与空气中的 CO_2 充分接触,以提供藻类光合作用所需之碳源。

3 结果和讨论

3.1 批次培养接种量的确定

在微藻的培养中,适宜的接种量能有效地缩短细胞延迟生长期的时间,使细胞更快进入对数生长期,对于工业化的光反应器培养而言,培养周期的缩短,能够提高生产率,降低生产成本。试验中选用几个常用接种量进行光反应器批次培养比较,结果见图2和图3。

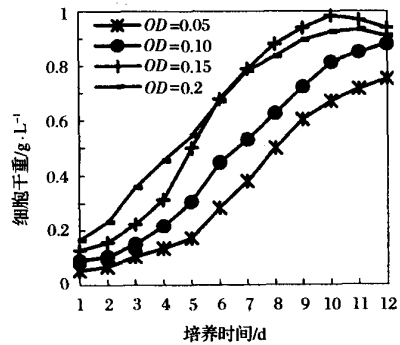


图2 不同接种量下的生长情况

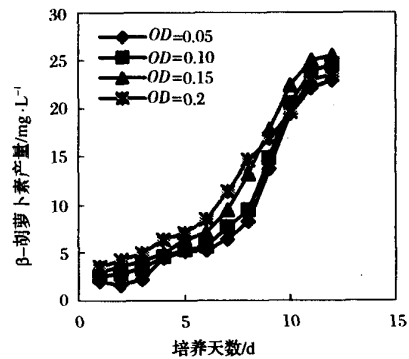


图3 不同接种量下的β-胡萝卜素产量

从图2可以看出,当接种量较低(如 $OD_{630} = 0.05$ 和 $OD_{630} = 0.10$)时,藻液生长处于延迟期较长,在对数生长期生物量的积累不如接种量较大($OD_{630} = 0.15$ 和 $OD_{630} = 0.20$)时多;接种量为 $OD_{630} = 0.15$ 时,第2~10天生生物量的增加值达到 0.83 g/L ,增幅超过其他3

种接种量下的增加值。当接种量为 $OD_{630} = 0.20$ 时,虽然藻细胞的生长几乎没有延迟期就进入了对数生长期,但其生长的停滞期也来得早,这对于以获得最大生物量为目的的先期培养是不利的。

图 3 表明,在几种接种量下, β -胡萝卜素的积累都随培养时间增加,但增加幅度存在差异,较高接种量下获得的 β -胡萝卜素含量也较高,接种量 $OD_{630} = 0.15$ 和 $OD_{630} = 0.20$ 的 β -胡萝卜素产量高于接种量为 $OD_{630} = 0.05$ 和 $OD_{630} = 0.10$ 的产量,但差距不大,在 5 mg/L 范围以内。虽然接种量为 $OD_{630} = 0.20$ 在培养前期 β -胡萝卜素增加量比接种量较小的快,但在生长后期被低接种量超过,这说明批次培养中,接种量过高并不利于 β -胡萝卜素的累积,可能是因为高接种量使细胞过早进入平衡期,细胞数量的增加有限,导致单位培养体积 β -胡萝卜素产量不高。综合生物量和 β -胡萝卜素产量的增加情况,试验中选择 $OD_{630} = 0.15$ 的接种量。

3.2 最佳循环流量的确定

光反应器培养盐藻的循环流量是由蠕动泵来调节的,流量的改变将直接影响藻液在螺旋管光照区的停留时间,从而影响生物量和 β -胡萝卜素的积累,为确定最佳循环流量,选择不同的流量进行试验。试验结果如图 4 和图 5。

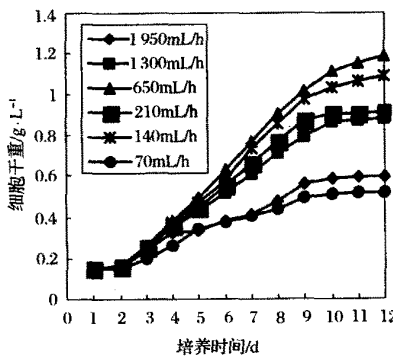


图 4 流量与生物量的关系

图 4 表明,藻液循环流量对盐藻生物量有较大影响,当流量为 650 mL/h 时,藻细胞生物

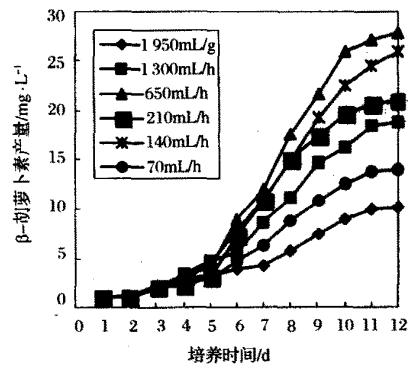


图 5 流量与 β -胡萝卜素产量的关系

量增幅最大,培养 12 d 后,细胞干重为 1.18 g/L 。流量为 1950 mL/h ,培养 12 d 后,细胞干重仅为 0.60 g/L ; 1300 mL/h 流量 12 d 后的细胞干重为 0.87 g/L ,循环流量太大,虽然单位时间内接受光照的频率增加,但每次循环藻细胞在光照区的停留时间太短,得不到充足的光能,光合作用受到影响;当流量分别为 210 、 140 、 70 mL/h 时,培养 10 d 后,细胞干重分别为 0.90 、 1.01 、 0.52 g/L 。流量太小,循环周期过长,处于黑暗区的藻细胞过多,无法进行光合作用,也会影响总的生物量。

藻液循环流量对 β -胡萝卜素累积的影响和对生物量的影响有近似之处(图 5),各循环流量下培养 12 d 后, β -胡萝卜素累积量分别为 10.3 、 18.72 、 27.71 、 20.91 、 25.99 、 13.92 mg/L ,高流量虽然使得藻液接受光照的频率增大,但每次在光照区停留的时间太短,光照时间不足, β -胡萝卜素产量不高;低流量虽然使得藻液在螺旋管光照区有充足的停留时间,光照区藻液 β -胡萝卜素的积累会高出很多,但在任一培养时刻,处于光照区的藻液只有大约 1 L ,而其他 9 L 藻液处于光照较弱的储藻罐内,所以整个藻液的 β -胡萝卜素累积量不高。适宜的循环流量既能满足藻液在光照区接受充足的光照,又能保持光照频率相对较高。试验中确定 650 mL/h 的流量为最佳选择。

3.3 光反应器批次培养生物量与时间的关系

用光反应器批次培养盐藻的培养条件为:

反应器系统装液量为 10 L, 培养光照强度为 15 000, 培养温度为 28~30℃。藻液循环流量为 650 mL/h, 接种量为 0.12 g/L(细胞干重), 培养周期为 10 d, 每天定时测定藻液生物量和 β-胡萝卜素产量, 培养结果见图 6。

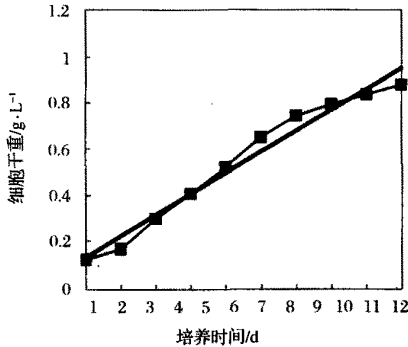


图 6 光反应器批次培养生长情况

从图 6 可以看出, 在培养条件优越的光反应器内, 盐藻的生长几乎不受底物浓度的限制, 其生物量与培养时间的关系可以近似为线性, 生长过程接近一级反应, 可以用如下数学模型表示: $C_X = a_0 + a_1 t$, 式中, C_X : 盐藻生物量浓度(g/L), t : 培养时间(d), a_0 、 a_1 为待定系数。试验数据经线性回归得到: $a_0 = 0.0919$, $a_1 = 0.0364$, 相关系数 $R^2 = 0.9736$ 。即盐藻在光反应器内生长情况可简单表示为方程式: $C_X = 0.0919 + 0.0364t$

3.4 光反应器批次培养 β-胡萝卜素累积量与时间的关系

光反应器批次培养盐藻 β-胡萝卜素累积量与时间的关系如图 7。

β-胡萝卜素在盐藻内的累积随培养条件有很大差异, 其最大的影响因素是独立于培养液体系的外界光照强度, 这一特点与发酵反应器有很大差别。就藻细胞的各个生长阶段而言, 在延迟期和对数生长前期, β-胡萝卜素累积量较少, 对数生长后期, 累积量加大。虽然 β-胡萝卜素是盐藻的次级代谢产物, 但 β-胡萝卜素的

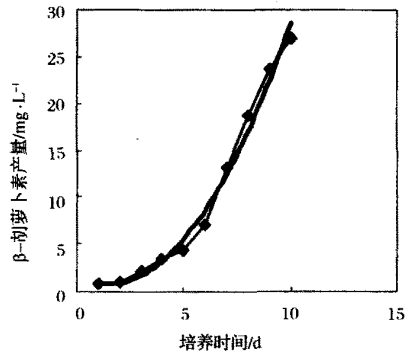


图 7 光反应器批次培养 β-胡萝卜素的累积

累积并不是在细胞停止生长后才开始的, 所以也不能用代谢产物动力学中的非相关模型来进行模拟, 针对这一特点, 最好的方法就是用试验实测值来进行拟合。

由图 6 可知, 在光反应器内培养的盐藻 β-胡萝卜素累积量随培养时间的分布近似于二次曲线, 可用二次多项式拟合, 拟合出的方程式为

$$C_X = 0.3848t^2 - 1.1693t + 1.7338$$

式中, C_X : β-胡萝卜素累积量(mg/L), t : 培养时间(d), 相关系数 $R^2 = 0.9865$ 。

此方程在较稳定的批次培养条件下预测光反应器培养中 β-胡萝卜素累积量有一定的参考性。

参 考 文 献

- 1 王富平, 郭连城. 盐藻野外大面积养殖及其在吉兰泰和塘沽地区的应用[J]. 海湖盐与化工, 1994, 23(4): 8~10
- 2 Yuan-Kun Lee. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential[J]. Journal of Applied Phycology, 2001(13): 307~315
- 3 姜建国, 姚汝华. 五种盐藻生化组成及 β-胡萝卜素异构体分析[J]. 华南理工大学学报, 1997(7): 38~41
- 4 姜建国, 姚汝华. 氮磷比对盐藻生长及甘油和色素累积的影响[J]. 热带海洋, 1999(1): 69~72

Studies on the Batch Cultivation of *Dunaliella salina* Using a Photobioreactor with a Volume of 10 Liter

Jiang Jianguo Zhu Yuehui Huang Yang

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

ABSTRACT A photobioreactor with volume of 10 L were designed and make up. The illumination units helix were 16, which brings to the augment of illuminate surface area to 95m^{-1} . For reducing floor space, the facade of the reactor was designed as three-layer frame. By doing experiments of batch cultivation with this photobioreactor, optimum inoculum volume was determined at $\text{OD}_{630} = 0.15$ and the optimum circulation rate at 630 mL/h in batch culture. With the help of mathematic tool, the growth of *D. salina* in batch culture can be simulated as curve equation $C_x = 0.0919 + 0.0364t$, and the output of β -carotene was calculated as $C_x = 0.3848t^2 - 1.1693t + 1.7338$.

Key words *Dunaliella salina*, photobioreactor, batch cultivation, β -carotene

市场
动态

我国 6 类食品在法国市场有较大商机

根据商务部统计,近 10 年来我国对法国出口的农产品价值总额在 1~1.6 亿美元左右。此间,中国食品土畜进出口商会和中国农科院的专家分析,尽管目前我国对法国出口的市场份额还不高,但我国的 6 类食品在法国具有较大市场机会。

(1) 新鲜及冷藏鱼类和海产品。法国是海产品的净进口国且市场正不断扩大。目前我国鱼类及海产品市场在法国份额接近 1%。近 3 年,我国向其出口的海产品主要是冻鱼片,我国的冻鱼片在法国市场上很畅销。另外,法国对龙虾、扇贝及新鲜包装鱼的需求正在增长,并将为此类产品提供一个有潜力的市场。

专家提醒出口企业,根据有关规定,只有符合欧盟认证标准的海产加工品才被允许进入欧盟及法国市场。另外,出口的法国的鱼类产品不能含三磷酸钠。

(2) 经加工的水果及蔬菜,包括果汁。果汁和软饮料是目前法国非酒精类饮料中增长最快的一部分。人均果汁消费量估计可达 20 L/年。目前法国进口的该类产品主要来源于美国,其他强有力的竞争者分别是巴西、以色列和西班牙。我国果汁和软饮料在法国份额不大,但增长势头较快。目前,我国出口法国的蔬菜、水果制品以罐头类食品居多,主要是番茄酱罐头、菜豆罐头和芦笋罐头。

(3) 包括矿泉水、啤酒、葡萄酒和烈酒在内的饮料。目前法国有 24 家啤酒酿造厂,销售总额为 1.215 亿欧元,占整个酒精及非酒精类饮料销售额的 16%,在整个食品和饮料销售中占 2%。法国人均年啤酒消费量估计为 39L。我国出口法国的饮料很少,占进口总额的份额很小,且出口法国的饮料品种也较单一,啤酒占绝大部分,矿泉水的出口几乎为零。

(4) 新鲜水果和干果,包括坚果。法国进口水果种类达 55 种,其中柑橘、香蕉、葡萄、草莓、菠萝、甜瓜、柠檬、杏仁、梨的数量和金额占 50% 以上。法国从很多国家进口水果,西班牙是法国第 1 大水果进口国,占进口水果总量的 30% 以上。目前我国出口法国的新鲜水果总量不多。主要是梨、苹果、柚子,其中梨最多,约占出口鲜果总值的 70%,其中天津鸭梨在当地市场很受欢迎。

点心和坚果市场对我国出口商也很重要。出口商可以通过将其宣传为健康和高质量的产品而获利。

(5) 新鲜及脱水蔬菜。法国对西红柿、辣椒、豆角、土豆、萝卜、葱、蒜的需求较旺。我国出口法国的蔬菜在我国出口总额中占据较大比重,但当前中国出口的蔬菜种类过于集中,主要是蒜头、块菌、番茄和豆类蔬菜。

(6) 肉类和内脏。我国此类产品在法国市场上的份额很小,我国的大宗畜产品,如牛肉、猪肉尚未打进法国市场,畜产品种类主要是鸭肉、兔肉及其制品。