

# 流加培养对杜氏盐藻生物量的影响

王克明

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,浙江 杭州 310023)

**摘 要:** 将微生物工程中的流加培养技术嫁接引用到海洋微藻的培养,对海洋微藻杜氏藻(*Dunaliella salina*)进行了分批培养、恒速流加培养和变速流加培养三种方法的比较实验。在采用流加技术培养杜氏盐藻中,建立了流加数学模型控制流加。实验结果表明:采用恒速流加培养技术和变速流加培养技术均可明显提高杜氏盐藻的生物量,在变速流加培养方式中,当流加因子  $A=0.194$  时,变速流加培养比分批培养方式中杜氏盐藻的生物量增加 7~8 倍。

**关键词:** 杜氏盐藻;生物量; $\beta$ -胡萝卜素;流加培养

中图分类号: Q178.53;Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2005)03-0167-04

## Effect of fed-batch culture on biomass of *Dunaliella salina*

WANG Ke-ming

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of  
Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

**Abstract:** The *Dunaliella salina* was separately cultured with batch and fed-batch culture of both constant feed rate and various feed rate. A simple mathematical model was established to control the feed rate. The experiments showed that the biomass of *Dunaliella salina* was increased about 7~8 times than that of the batch culture when with the factor rate is 0.194 with the various feed-batch culture.

**Key words:** *Dunaliella salina*; biomass;  $\beta$ -carotene; fed-batch culture phosphate source

海洋是生命的摇篮,是全球生命支持的一个重要组成部分,是人类生存和发展在地球上最后一块待开发的疆域。海洋蕴藏着丰富的生物资源。某些海洋生物资源还具有可再生的特点,是人类食物和药物的重要来源之一。人类赖以生存的三大要素食物、环境改善和能源保护都可通过海洋的研究、开发和利用得到解决。面对人口爆炸、环境恶化和能源短缺三大危机的严峻挑战,丰富多彩的海洋生物是人类研究和开发利用海洋生物资源的重要库源。随着陆地资源开发利

用日趋达到极限,世界各沿海国家都把注意力集中到海洋生物资源的研究、开发、利用上来。研究和开发利用海洋资源已成为当今世界的一股强劲的潮流。我国是一个海洋大国,有 18 000 km 以上的海岸线,海区面积 470 万  $\text{km}^2$  以上,海洋渔场面积 2.8 亿  $\text{hm}^2$  (42 亿亩),海水可养殖面积 4.87 万  $\text{hm}^2$  (73 万亩),发展海洋生物工程产业有着极大潜力。

$\beta$ -胡萝卜素是一种广泛存在于光合生物中的脂溶性捕光色素。天然  $\beta$ -胡萝卜素分子呈顺式与反式混合

收稿日期: 2005-02-01

作者简介: 王克明(1943—),男,辽宁大连人,教授,主要从事生物技术与微生物发酵工程的研究。



构型,摄入人体后,一部分转化为维生素 A 分子,另一部分具有淬灭体内自由基,防止衰老及癌变的生物学活性。 $\beta$ -胡萝卜素是当今世界推崇的功能保健品之一,具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。单细胞藻——盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)在人工控制和胁迫条件下,能大量合成和积累 $\beta$ -胡萝卜素,是生产天然 $\beta$ -胡萝卜素的理想资源。有许多国家,如澳大利亚、美国、日本等国相继开展了大规模盐藻 $\beta$ -胡萝卜素生产性研究,并已进入商品化。我国拥有 18 000 km 以上的海岸线及众多的内陆盐湖,具有发展以盐藻生产 $\beta$ -胡萝卜素的极大优势;利用环境优势,提升我国的海洋微藻的培植技术水平,开发海洋资源有着极其重要的经济和社会意义。

近年来,国内外有关杜氏盐藻有大量的研究报道,但大多数集中在培养基营养成分的筛选和培养条件的优化方面,而有关采用流加培养技术培养杜氏盐藻的报道尚未见报道。流加培养技术是指在生物培养过程中向培养基中加入一种或多种营养物质,直至最终取得产物。采用流加培养技术,可以有效地消除底物和产物的抑制、毒害作用,促进细胞生长和代谢,从而取得较高的生物量和代谢产物<sup>[2]</sup>。该项技术已广泛应用于微生物的培养中,近年来,在动物、植物细胞的培养中也有采用流加培养技术的报道<sup>[3]</sup>,但在海洋藻类的培养中采用流加技术却鲜有报道。单细胞藻类除具有光合器官外,其他方面与陆地微生物有很多相似之处,故有些微生物培养技术也适用于微藻的培养。目前,国内外以生产 $\beta$ -胡萝卜素为目的盐藻的培养通常采用二步法培养,即第一步采用盐藻生长最适长件进行培养以期获得最大的盐藻生物量,然后进行第二步培养;第二步培养是采用人工形成胁迫条件促使盐藻大量合成和积累 $\beta$ -胡萝卜素。氮和磷是对盐藻生长和积累 $\beta$ -胡萝卜素具有重要影响的元素<sup>[4~6]</sup>。本研究将微生物工程中的流加培养技术嫁接到海洋微藻的培养中,在杜氏盐藻的二步法培植的第一阶段即盐藻的生物量培养过程中,对氮、磷元素的分批与不同流加方式培养进行了初步探索研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

盐生杜氏藻 KM101,由中国科学院海洋研究所提供。

### 1.2 盐藻培养基及培养条件

培养装置采用 6 个 20 cm×25 cm 的玻璃方槽,以超级水浴器控制温度在 28℃,光源采用荧光灯,

光强 5 000 lx, L:D = 12:12。培养过程定期搅拌。盐藻基本培养液成分:NaCl 120 g/L, KNO<sub>3</sub> 0.3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 1.0 g/L, NaEDTA 0.19 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.24 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.61 mg/L, ZnCl<sub>2</sub> 41 μg/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.38 mg/L, CuSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 60 μg/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 51 μg/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 41 μg/L。pH 值用 HCl 或 NaOH 调至 7.5 左右,海水经陈化后,用 0.45 μm 的滤膜过滤后,高压消毒。

取对数生长期的藻种,经 4 000 r/min 5 min 离心去掉原培养液后加入到新培养液中,接入到培养基,使盐藻的初始细胞浓度达到 10<sup>5</sup> cell/mL。进行不同条件实验时,依实验目的要求不同,改变营养的浓度及加入方式。每组实验做 3 个平行重复,取其平均值为实验结果,在恒速流加及变速流加实验中对 5 次实验值进行平均值,ds±5。

### 1.3 细胞计数

藻细胞计数采用血球板(XB-K-25),在光学显微镜下(BH-2, OLYMPUS)直接计算藻细胞数量(cell/mL),同时,测定同样品的吸光度 OD<sub>700 nm</sub>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氮对盐藻生长的影响

大多数藻类能有效地利用硝酸盐、亚硝酸盐或铵盐中的氮。氮在细胞中是形成氨基酸、嘌呤、嘧啶、氨基糖和氮化合物等的基本元素,因而氮是盐藻生长最重要的营养元素。对于盐藻生长,硝酸态氮是一种最佳氮。为了考察不同氮浓度对盐藻生长的影响,本试验以 KNO<sub>3</sub> 为氮源,设置了 5 种不同氮浓度的试验组:0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90 g/L, 每组 3 个重复,经过 10 d 的培养,生长情况如图 1 所示。从图 1 的结果可以看出,最适于盐藻生长的氮浓度为 0.60 g/L,其生长速率最快,生物量可达约 1.4×10<sup>6</sup> cell/mL。当氮浓度低于此值时,盐藻生长缓慢;高于这个浓度,生长速率也有所下降。这说明氮盐的浓度过高会起抑制作用,使盐藻生长代谢受到抑制<sup>[7]</sup>。

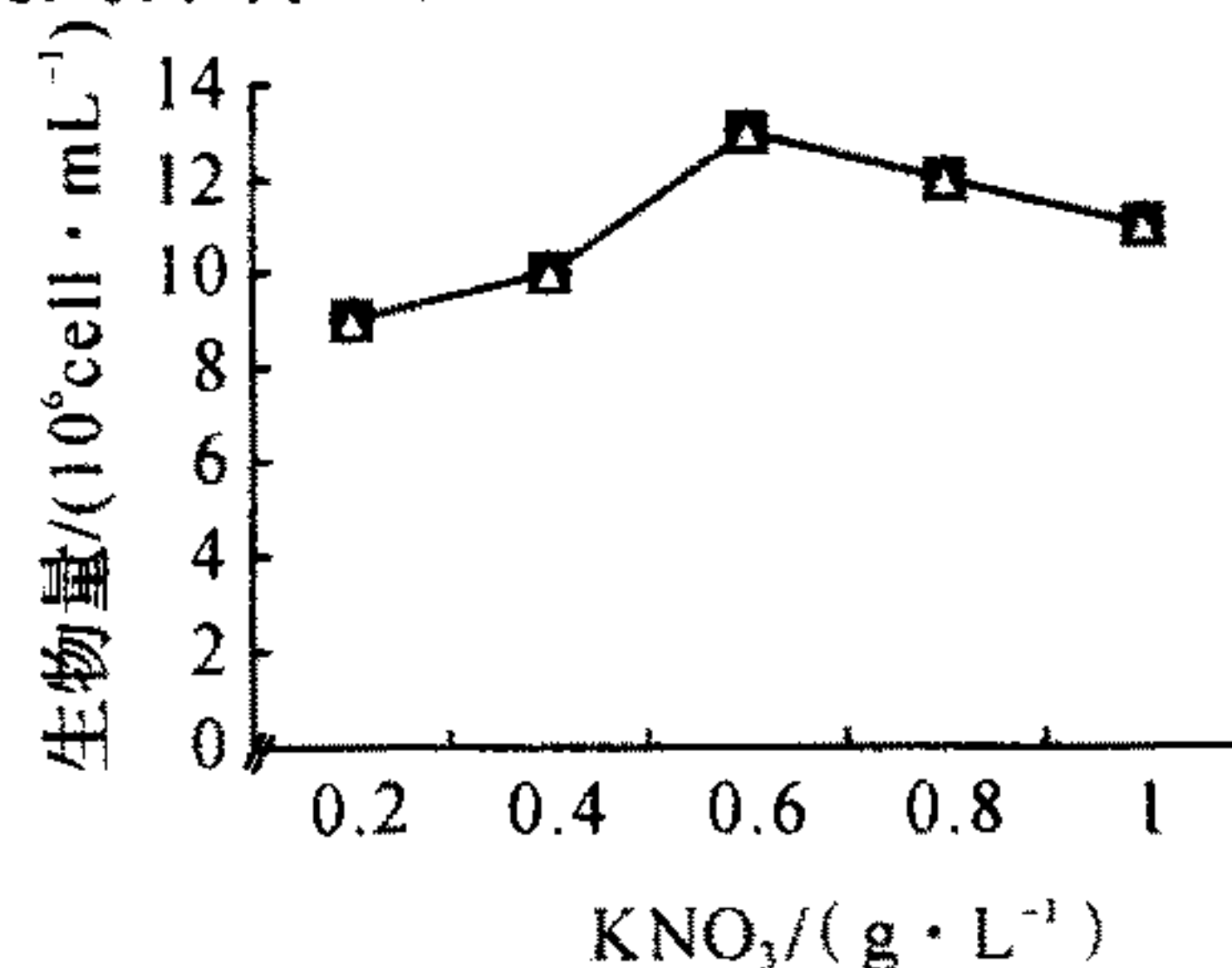


图 1 氮对盐藻生长的影响



2.2 磷对盐藻生长的影响

磷在生物体内是合成 ATP、GTP、核酸、磷脂、辅酶等的基本元素,所以,磷是盐藻生长的另一种主要营养元素,磷主要以  $\text{HPO}_4^{2-}$  和  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  的形式被吸收。本试验以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为磷源,设置了 6 种不同磷浓度梯度的试验组:20,30,40,50,60,70 mg/L,每组设 3 个重复,经过 10 d 的培养,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,当磷浓度为 60 mg/L 时,杜氏盐藻生长速度最快,生物量可达约  $1.3 \times 10^6$  cell/mL。磷浓度低于此值时,藻生长缓慢;而高于此值时,生长速率呈下降趋势。这说明高浓度磷盐对藻的生长也存在抑制作用。

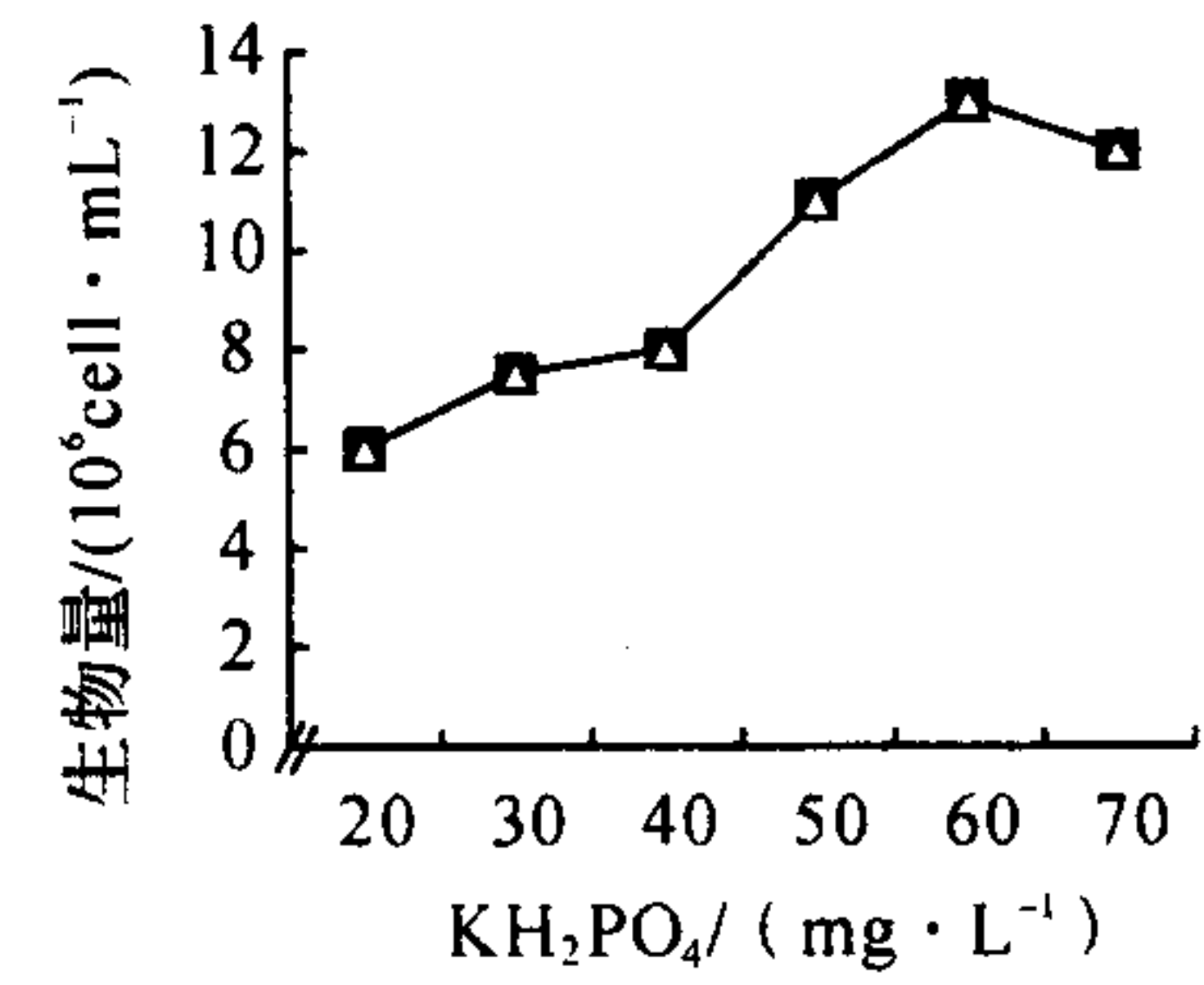


图 2 磷酸盐对盐藻生长的影响

2.3 恒速流加培养对盐藻生长的影响

从图 1 和图 2 可以看出,盐藻生长速率随着氮和磷浓度从低到高的增加而增加,这说明充足的氮和磷是盐藻迅速生长的物质基础;同时也可看出,当两种营养盐的浓度增大到一定程度时,盐藻生长速度明显下降。这给我们提出了一个至关重要的启示:从营养盐的角度来看,如何解决既提供较高浓度的氮和磷,使藻体可获得充足营养而以高生长速率生长,同时又不发生由高浓度营养盐所引起的抑制作用,是盐藻高密度培养的关键所在。为了考察流加技术培养盐藻消除高浓度营养盐所引起的抑制作用,首先进行了恒速流加培养试验,以一次性培养作为对照。从本文上述实验可知,当氮浓度大于 0.60 g/L,磷酸盐浓度大于 60 mg/L,盐藻生长速率下降,同时参考文献[7],故在接种量相等时,流加组和对照组的培养液中总氮浓度均取 0.90 g/L,磷的总浓度均取为 90 mg/L。一次性培养的培养液中氮和磷一次规定浓度;而流加培养组则初始氮浓度取为 0.10 g/L,初始磷浓度取为 10 mg/L,进行恒速流加富含氮和磷的培养液,使流加培养组的最终氮和磷的浓度分别达到与一次性培养组的培养液中氮和磷浓度相同。流加方案及培养结果如表 1 所示。

表 1 恒速流加培养试验方案及结果

培养方式	底液量/L	流加量/L	流加速率/(L · d <sup>-1</sup> )	生物量/(cell · mL <sup>-1</sup> )
一次性培养	20	0	0.000	6 × 10 <sup>5</sup>
恒速流加培养	15	5	0.015	18 × 10 <sup>5</sup>

从表 1 可以看出,在一次性培养组中,由于培养液的氮和磷浓度高,盐藻生长受到抑制,而采用恒速流加培养,盐藻的生长速率大大高于一次性培养方式。这说明流加培养可消除高浓度氮和磷所引起的抑制作用,使盐藻不断吸收充足营养而较长时期处于旺盛生长繁殖状态,从而取得高的生物量。

2.4 变速流加对盐藻生长的影响

恒速流加是以均匀的流加速度逐渐地向培养液内加入营养盐,而变速流加则是根据所培养生物的生长特点非线性地进行流加的一种培养方式。这种流加技术更适合于高密度培养。在对盐藻进行变速流加培养试验时,一次性培养的对照组和流加培养组的培养液中氮和磷的加入量同于恒速流加试验,只是流加时以变速流加的方式加入。

培养盐藻时采用变速流加技术,可建立一个简单的数学模型来控制流加速度,在流加区间内,设定:

$$F = dQ/dt = K(t - t_a)(t - t_b) \tag{1}$$

式(1)中: $F$  为流加速度, L/d;  $t$  为培养时间, d;  $t_a$ 、 $t_b$  为流加开始和流加结束时的培时间, d;  $K$  为流加控制因子;  $Q$  为流加总量, L。试验中,若在培养开始 2 d 后开始流加,培养停止前 2 d 停止流加,则  $t_a = 2$ ,  $t_b = 8$ 。对上式积分可得流加总量与流加控制因子  $K$  值的关系如下:

$$Q = 36K \tag{2}$$

当  $K$  值一定时,流加总量则随之确定,流加速度随时间的改变而改变。因此,可进行不同流加量下的盐藻的培养试验,设计方案及试验结果如表 2 所示。

表 2 变速流加培养盐藻方案及结果

培养方式	底液量/L	流加量/L	流加速率/(L · d <sup>-1</sup> )	生物量/(cell · mL <sup>-1</sup> )
一次性培养	20	0	0.000	6 × 10 <sup>6</sup>
恒速流加培养	15	5	0.015	18 × 10 <sup>6</sup>
变速流加培养	15	4	$K=0.111$	56 × 10 <sup>6</sup>

从表 2 可以看出,变速流加培养盐藻不仅优于一次性培养方式,也优于恒速流加培养方式。



在变速流加培养过程中,流加量的不同能直接影响到盐藻的生物量,改变流加量,会使营养物浓度发生化,从而对藻体的生长代谢的影响也不同。为了进一步提高盐藻的生物量,在不同流加量下进行了培养试验,结果如表 3。

表 3 不同流加量下的培养盐藻试验方案及结果

培养 批号	底液 量/L	流加 量/L	$K$	$F_{\max}/$ ( $L \cdot d^{-1}$ )	生物量/ ( $cell \cdot mL^{-1}$ )
1	10	10	0.278	2.50	$5.6 \times 10^7$
3	13	7	0.194	1.75	$5.5 \times 10^7$
4	15	5	0.138	1.24	$5.4 \times 10^7$
6	18	2	0.050	0.45	$4.9 \times 10^7$

从表 3 可以看出,在培养液量为 20 L 时,控制流加量在 5~7 L 之间,即控制流加数学模型中  $K$  值在 0.138~0.194 的范围内,可获得较高的生物量。同时也观察到,随着流加量的增加盐藻的生物量增加,当流加量大于 7 L 时,尽管盐藻生物量继续增加,但增加幅度变缓。考虑生产实况,可综合多方因素,将流加量控制在总培养液的 30%~40% 左右。

### 3 讨 论

流加氮( $KNO_3$ )、磷( $KH_2PO_4$ )对杜氏盐藻生长影响的研究结果说明,盐藻的生长依赖于适宜的氮、磷浓度。供给充足的氮、磷时,盐藻细胞可以快速地合成一系列含氮和磷的生命物质,控制细胞的正常生长与代谢过程。但如果培养液中氮、磷一次加入过高,将引起盐藻生长的抑制和毒害效应<sup>[8]</sup>。采用流加技术可以使氮、磷浓度维持在较低起始浓度,从而使藻体生长的延迟期大大缩短,同时,营养物的不断供给,可以调节培养过程中的底物浓度,使盐藻长时期处于对数生长期,以较快的速度增殖;采用流加技术可消除或缓冲藻体生长中代谢产物引起的培养

液老化<sup>[9,10]</sup>,尤其是变速流加,在盐藻生长至对数期,流加量加大可有效稀释代谢产物,降低其引起的抑制作用,维持藻体的高生长速率,获得高的藻体生物量,从而为以生产  $\beta$ -胡萝卜素为目的的盐藻培养法中的第二步以累积  $\beta$ -胡萝卜素为目的的培养奠定基础。通过本试验,说明在二次法培养盐藻生产  $\beta$ -胡萝卜素的过程中,使用流加技术可以较大幅度提高盐藻的生物量,在第一次以积累生物量为目的的盐藻培养中是可行的。

### 参考文献:

- [1] 刘建国,吴超元.盐藻和胡萝卜素述评[J].海洋与湖沼,1995,26(3):323-330.
- [2] Allan Whitaker. Feb-batch Culture[J]. Process Biochemistry, 1980,5:10-5.
- [3] Suznki T, Moci H. Automatic Supplementation of Minerals in Feb-batch Culture to High Cell Mass Concentration[J]. Biotechnol, 1985,27:2-7.
- [4] 高清潭,丁淑华.盐藻养殖生产  $\beta$ -胡萝卜素新方式[J].海湖藻与化工,1997,7(26):25-27.
- [5] Grant B R, Gen J. Optimizatio of an Microalgae Fermentation [J]. Microbiol, 1968,54:327-336.
- [6] Milko E S. Modeling the Effects of Temperature, Light, and Nutrints on Biomass of *Dunaliella salina* [J]. Microbiol,1989,32:299-307.
- [7] 陈晗华,钱凯先.氮、磷对盐藻生长及  $\beta$ -胡萝卜素积累的影响[J].浙江大学学报:自然科学版,1997,31(6):731-735.
- [8] 焦改志.单胞藻培养过程中接种和添加培养液应注意的几个问题[J].海洋学报,1993,(6):15-16.
- [9] 湛江水产专科学校编.海洋饵料生物培养[M].北京:农业出版社,1980.69-95.
- [10] 杨雪梅.培养密度和培养液“老化”对盐藻生长和  $\beta$ -胡萝卜素累积的影响[J].海洋科学,1996,(6):39-43.

(上接第 166 页)

### 参考文献:

- [1] Chatterjt S D. Some elemeatary characterizations of the Poisson distribution [J]. Aun Math Statist, 1964, 35(3):1014-1017.
- [2] 宗序平,李朝晖,李淑锦.概率论与数理统计[M].北京:机械工业出版社,2003.62-63,69.
- [3] Kingman J F C. Poisson conts for random sequentces of events[J]. Aun Math Statist, 1961,32(1):904-905.
- [4] LEO BREIMAN. The poisson tendency in traffic distribution[J]. Aun Math Statist, 1963,34(1):308-311.
- [5] Skorokhod A V. Lectures on the stochastic processes [M]. The Nethersland. Koninklijke wöhrmann BV, 1996. 4-7.
- [6] 《现代应用数学手册》编委会.现代应用数学手册·概率统计与随机过程卷[M].北京:清华大学出版社,2000.93-95,586-588.
- [7] 魏宗舒.概率论与数理统计教程[M].北京:高等教育出版社,1983.101.