

雪藻高密度连续培养中生物量 和花生四烯酸的高产率*

刘建国 刘伟

(中国科学院海洋研究所海洋生物技术研究发展中心 青岛 266071)

Zvi Cohen, Amos Richmond

(Microalgal Biotechnology, The Jacob Blaustein Institute for Desert Research,
Ben-Gurion University of the Negev, Sede Boker Campus 84993, Israel)

提要 以 1.4cm 和 2.8cm 光径的平板光生物反应器, 恒定高光强[$2400\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$], 通气、无菌高密度连续培养雪地绿藻(简称雪藻)。连续采收并补充等量新鲜培养液, 当藻体生物量(以去灰分干重表示, AFDW)达恒态时, 研究雪藻比生长速率(SGR)、藻体的生物产量、总脂肪酸(TFA)和花生四烯酸(AA)产率。结果表明, 尽管随着比生长速率增加, 雪藻高密度连续培养体系的 AA/TFA、TFA/AFDW 和 AA/AFDW 三个指标有不同程度的降低, 但生物产量、总脂肪酸及其花生四烯酸产出都相当高。2.8cm 光径的平板光生物反应器中, 雪藻 SGR 为 0.2d^{-1} 时, 每平方米光照面积日获 35.3g AFDW 的高产量; SGR 0.135d^{-1} 时, TFA 产率最大, 为 $7.0\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$, 此时 AA 产率也最高, 达 $2.6\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 。尽管 1.4cm 光径的反应器的培养体积比前者下降了 50%, 但细胞浓度明显提高, 单位光照面积的 AFDW 和 TFA 最大日产率只下降了 37.3% 和 10%, 分别为 22.1 和 $6.3\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$, 而 AA 的最大日产率也是 $2.6\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 。结果还表明, 氮或磷营养亏缺能明显提高雪藻 AA 含量的各项指标, 同时高光强也有利于雪藻累积 AA。

关键词 雪藻, 高密度培养, 平板光生物反应器, 花生四烯酸, 产率, 比生长速率
中图分类号 Q945.1

ω_3 和 ω_6 系列长链多不饱和脂肪酸(PUFAs)在维持细胞膜结构和功能、流动性等方面具有独特作用, 对某些疾病也有特殊疗效, 因此它被认为是人类营养的重要组成部分(Pascaud, 1993)。二十碳 ω_6 四烯酸(花生四烯酸, 简称 AA)就是多不饱和脂肪酸(PUFAs)中的一员。从结构上讲, AA 是前列腺素的前体, 在二种加氧酶的作用下形成前列腺素, 维持人类的正常生理代谢活动, 任何 AA 代谢失调都不可避免地会诱发系列疾病(Rubin-Bernard, 1999)。对比研究 AA 和二十二碳 ω_3 六烯酸(DHA)强化食品对成年人和婴幼儿的影响结果表明: 幼儿(特别是那些没有得到母乳哺育的幼儿)在进食 AA 和 DHA 后受惠最大(Xiang *et al.*, 1999), 这是由于 AA 和 DHA 是组成脑细胞膜磷脂中的主要酰基成分。

* 国家自然科学基金资助项目, 39500114 号, 39970575 号; 国际科学基金项目, A/2786-1 号, A/2786-2 号。刘建国, 男, 出生于 1964 年 6 月, 博士, 研究员, E-mail: jliu@ms.qlio.ac.cn

而AA和DHA在乳汁中的含量,随着哺乳过程而逐渐下降(Xiang *et al.*, 1999)。同时幼儿从其他PUFA转化成AA和DHA的能力又很弱,需要增加AA和DHA才能促进生长和神经系统的发育(Agostoni *et al.*, 1997; Bougle *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1997; Wibert *et al.*, 1997)。

AA广泛存在于动物体中,多数动物能从乙酰-CoA合成AA。商业AA主要来源于猪肝,但浓度较低,一般低于干重的0.2%,开发费用很高。鉴于AA的药学价值、对人类健康的作用,加之其资源非常有限,促使人们寻找富含AA的生物再生资源。一种新近分离的雪地绿藻(简称雪藻, *Parietochloris incisa*)被认为最有希望成为AA新资源(Watanabe *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002a),但是目前仍限于实验室阶段,尚未进行室外和工业化培养。作者利用光生物反应器和相当于太阳光的强光照,对该藻进行了高密度连续培养,研究了其生物日产量和AA日产率。

1 材料与方法

1.1 实验材料和培养条件

雪藻(*Parietochloris incisa*)隶属绿藻,原采集于日本富山市区 Oyama 山中雪地(Wanatabe *et al.*, 1996)。将处于对数生长期的无菌藻种,经离心去除旧培养液后,重新悬浮到2倍BG-11营养的新鲜培养液中,然后接种到已经用70%的乙醇消毒处理的平板光生物反应器反应室中培养。反应室光径为1.4cm和2.8cm。以碘钨灯和4只平行的荧光灯管为光源,分别置于平板反应器的前后面提供连续光照,到达藻液表面的光强分别为2200和200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ [总光强为2400 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]。在平板光生物反应器的反应室与碘钨灯光源之间有一个大型控温用循环水箱,分别由加热系统(主要是光源)和冷却系统(电扇和冷却水)的平衡来维持25℃的恒温。碘钨灯和水流受温度传感器信号自动控制开关,温度传感器探头置于循环水箱中循环水上部。反应室布有通气管道,连续输送CO₂和空气的混合气体,流速为每升培养液0.7L/min,补充光合作用消耗的碳源,并形成涡流有效地搅拌藻液。藻液pH维持在7.5—8.0之间。

1.2 生物产量的测定

取一定体积的藻液,经过抽滤到预先烘干、分别称好重量的GF/A滤纸上。每个样品有2个以上重复。用与藻液体积相等、pH为4.0的盐酸溶液冲洗上述藻样2次,在不破坏细胞的情况下,有效去除沉降在藻体上的矿物质盐分。然后在105℃条件下烘干过夜,置于干燥器中自然冷却至室温后称重。考虑到藻体内盐分会带来一定误差,上述称重后的样品置于带盖的坩埚中,在550℃马富炉焚烧2h。待温度降到100℃左右时再次放入干燥器中自然冷却,室温后称灰分(无机盐)重量。生物产量、藻体密度和比生长速率(SGR)等指标均以去灰分干重(AFDW)表示和折算。AFDW按下式计算:

$$\text{去灰分细胞干重} = \text{藻和纸的总重量} - \text{滤纸重量} - \text{灰分重量}$$

1.3 脂肪酸的分析

藻液在3500r/m(相当于2270g)条件下离心5min。弃去上清液,用蒸馏水重新将藻泥混匀。然后再次离心,弃去上清液。如此重复过程3次,尽量去除附着在藻体上的盐分等沉淀物。藻泥置于-20℃冰箱中保存和抽真空的-20℃真空冰冻机内干燥。取25mg冰冻干燥藻粉于带盖小瓶中,加入电磁棒和0.25mg的C₁₇脂肪酸(占1%)作为标准物(内

标), 然后加 2ml 含 2% 硫酸的甲醇溶液, 充氩气后, 放在备有 80 °C 沙浴的磁搅拌器上搅拌 1h。将结合的脂肪酸分子充分分解下来, 并甲基化。

向上述小瓶中分别加入 1ml 重蒸馏水和 1ml 正己烷, 充分搅拌混匀, 然后在 3500r/m 速度下离心 5min。收集上清液到另一带盖小瓶中, 氮气浓缩, 最后放入冰箱中待测。

样品经 30m × 0.32mm 二氧化硅柱和计算机自动控制的惠普 5890 II 气相色谱仪分析。利用标准参照样品标定各脂肪酸出峰时间和顺序(Sigma, St Louis, MO)。而脂肪酸含量以其峰面积参比内标准脂肪酸含量和面积进行计算, 并以占总脂肪酸和去灰分干重的高低表示(Adlerstein *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002b)。

2 结果与讨论

2.1 雪藻脂肪酸的组成特点

雪藻脂肪酸的气相色谱(图 1)表明: 该藻至少含 16 种脂肪酸, 含量一般占 AFDW 的 20% 以上, 有时高达 40% 左右。该藻除含软脂酸(16:0)和硬脂酸(18:0)外, 其他 14 种脂肪酸均为不饱和脂肪酸。其中以花生四烯酸(AA, 20:4 ω 6)含量最多, 约占 TFA 的 30%—40%, 藻粉去灰分干重(AFDW, 采用该指标的原因将在“2.5”中进一步讨论)的 4%—6%; 其次是亚油酸(18:2), 占 TFA 的 15%—20%; 另外还有 α -亚麻酸(18:3 ω 3)、 γ -亚麻酸(18:3 ω 6)、20 碳三烯酸(dihomo- γ -linolenic acid, 20:3 ω 6)和 20 碳五烯酸(20:5 ω 3)等 PUFAs。该藻不饱和脂肪酸占 TFA 的量也相当高, 为 80% 左右, 估计与该藻适应雪地冷冻环境, 保障细胞膜的流动性, 维持细胞膜的结构和功能发挥着密切关系。

目前已知许多水生植物、特别是其中的浮游藻类具有 ω 3 和 ω 6 系列链加长和去饱和能力, 从亚油酸, 经过 α -、 γ -亚麻酸合成 PUFAs。已经发现褐藻中的墨角藻(Kim *et al.*, 1996)、马尾藻(Wu *et al.*, 1995)和海带(Rorrer *et al.*, 1995), 红藻中的紫球藻(Cohen, 1990; Rorrer *et al.*, 1995; Akimoto *et al.*, 1998; Fabregas *et al.*, 1998)、江蓠(Sajiki, 1997)、硅藻中的角毛藻(Napolitano *et al.*, 1990), 绿藻中的微绿球藻(Petkov *et al.*, 1994)和石莼(Floreto *et al.*, 1994), 蓝藻中的螺旋藻(Dubacq *et al.*, 1993)、裸藻(Hayashi *et al.*, 1994)含有 AA。许多淡水藻类如栅藻、鱼腥藻也含 AA, 但是上述藻类 AA 含量很低, 一般在 0.06‰—0.2‰之间¹⁾。目前还没有发现哪一种生物象雪藻一样含如此多的 AA, 如何有效开发该资源需进一步探讨。

2.2 连续培养生物产量和 AA 产率
高密度连续培养下, 雪藻 SGR 和单位面积产量的关系表明, SGR 增加雪藻产量上升,

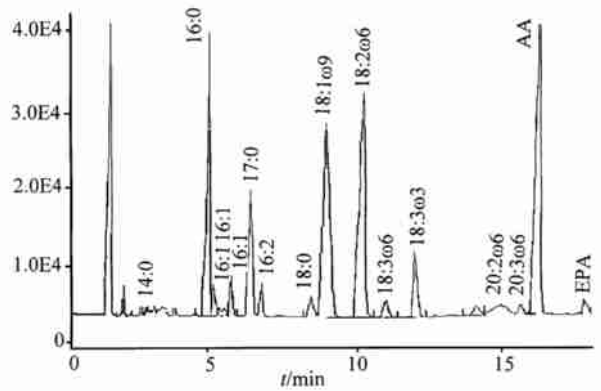


图 1 雪藻脂肪酸的气相色谱图

Fig.1 The gas chromatography of fatty acids extracted from *P. incisa*

1) Gumel Ahgren, 2000. 私人通讯

特别是 SGR 在 $0.14d^{-1}$ 以下时, 该趋势更为明显(图 2)。 SGR 在 $0.2d^{-1}$ 时生物产量最高, AFDW 为 $35.3g/(m^2 \cdot d)$ 的高产量! 同时图 2 还表明, 培养体系中雪藻 SGR 和营养状况呈明显正相关性, 但雪藻产量并不与营养增加同步上升。

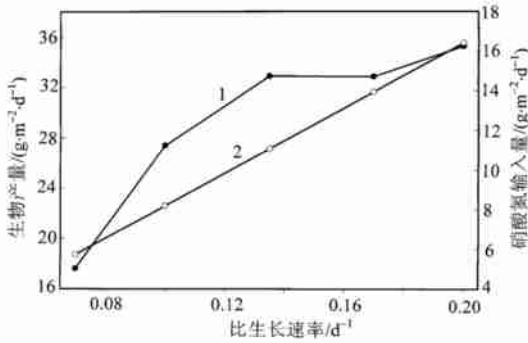


图 2 高密度连续培养中雪藻比生长速率、生物产量和硝酸氮日输入量

Fig. 2 The relationships between specific growth rate, biomass production and daily input of nitrate of high density culture system of *P. incisa*

1. 生物产量; 2. 硝酸氮输入量

依据太阳辐射性质和光合作用反应特性和量子效率来推算, 理论上植物进行光合作用最高利用太阳辐射的效率大致为 10%。植物在自然环境中进行光合作用时, 一般认为可达到的太阳辐射最高利用率约为 5% (或者说最低量子需要量为 20 左右)。而实际上, 植物受到各种逆境影响, 光合效率远远低于上面的理论太阳能转换效率, 通常为 1%, 而 2% 就已经相当高了(沈允钢, 2000)。人类开展农业耕作历史已经有几千年, 经过多次产业“革命”, 现在经济粮食作物已经达到“高产”阶段, 每亩年粮食产量 1000kg (500kg 小麦种子和 500kg 玉米种子), 也就是说, 就全部生长季节来算, 平均到每天的生产粮食产量也只有 $4.1g/m^2$ 光照面积。

本研究中利用相当于太阳辐射强度的高光强实验, 得到雪藻每天能在 $1m^2$ 光照面积内生产 35.3g AFDW, 该生物量相当于 46.4g 植物种子量, 是目前农业高产田经济产量的 11 倍。因此, 高密度培养微藻有惊人的开发潜力, 值得进一步深入研究和推广。

高密度培养微藻具有高产出的原因, 作者认为可以从以下几个方面分析。第一, 到达植物叶片的光线不能全部被吸收, 一部分光线通过反射、散射和漏透途径流失。而进入微藻高密度培养体系的光线(除体系边缘外)却极少流失, 部分单一细胞没有有效利用的光能, 常常又被其他细胞重新利用, 大大提高了光能利用率。第二, 在一般培养条件下, 即使光照强度不算太高, 也常常超过细胞光饱和点, 这样, 高光强抑制光合作用的现象就不可避免。在高密度微藻培养体系内, 尽管群体接受到的光线很强, 远远超过了每个细胞的光补偿点, 由于细胞之间的彼此遮盖作用, 每个细胞实际所得到的光照并不高, 通常还远远低于光饱和点, 因此也就不难理解提高光照强度可有效增加光合作用速率, 高光强下高密度微藻培养体系的高产出。第三, 作者观察到: 即使强光也只能穿透高密度藻液有限的区域, 大约靠近光源 3mm 左右厚度, 这些在光区中的细胞才能得到光照, 其他藻体完全处于暗中(暗区)。搅拌形成涡流, 使整个培养体系内部细胞处于动态之中, 每个雪藻细胞都在光区和暗区之间高速穿梭。雪藻细胞在光区接受瞬间光辐射, 光反应开始启动。随后细胞可能进入暗区, 但光合作用的其他过程的顺利进行并不因在暗区而受到影响。理论上, 整个光合作用过程循环一次, 细胞也可以在光区和暗区往复一周。随后又开始进入下一次光合作用和细胞运动周期, 非常经济有效地将光能转化到有机物中。第四, 高等植物叶子位置相对固定, 上层叶片总是暴露在光下, 时常获得强光照, 因此光合作用受到抑制。底层叶子时常处于阴暗处, 通常获得的光照不足, 光合速率大大被限制了。而微藻高密度

培养体系内各细胞, 从概率理论上具备获得光线的同等机会。另外有效控制高密度培养体系的温度、pH、解析氧气和补充 CO_2 气体等也是微藻高产的重要因素。

雪藻 SGR 和培养液细胞密度及总脂肪酸产量的关系见图 3。结果表明, 高密度培养体系达到稳态后, 培养液细胞密度和 SGR 呈负相关性, 即 SGR 越快培养液细胞密度就越低。因为细胞密度较低时, 每个细胞实际接受到的光辐射量增加, 由此导致 SGR 高, 该结果也预示着在高密度培养体系内光照相对不足仍然是一个生长限制因子。至于 SGR 从 0.07d^{-1} 升高到 0.1d^{-1} 时, 培养液细胞密度增加的原因估计受到另外营养亏缺因素(如氮亏缺)的影响, 因为以 0.07d^{-1} SGR 生长的雪藻培养体系氮补给最少(图 2)。图 3 数据还表明 TFA 产量与 SGR 也有密切的关系, 其中以 0.135d^{-1} 速率生长的雪藻培养体系产 TFA 最高, 达 $7\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 的高产量。

至于 SGR 对 AA 在 TFA 中的含量变化影响(图 4), 基本类似于对培养液细胞密度的

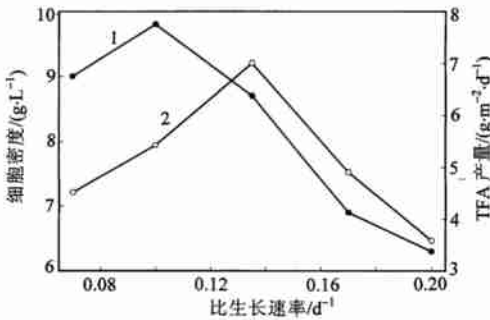


图 3 雪藻比生长速率与 TFA 产量和细胞密度的关系

Fig. 3 The relationships between specific growth rate, TFA production and cell density of *P. incisa*

1. 细胞密度; 2. TFA 产量

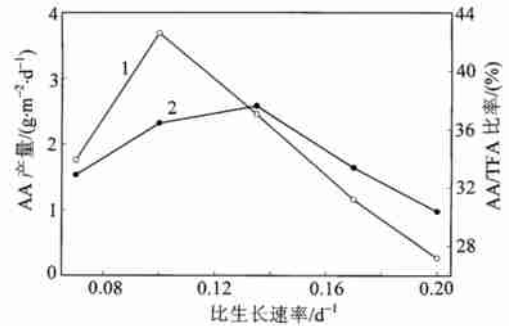


图 4 雪藻比生长速率对 AA/TFA 比率和 AA 产量的影响

Fig. 4 Influence of specific growth rate on AA/TFA and AA in high density culture of *P. incisa*

1. AA/TFA 比率; 2. AA 产量

影响。 SGR 越快 AA/TFA 比率一般越低。因为本实验中雪藻 SGR 快时, 培养液中的营养也较丰富, 同时细胞密度较低, 每个细胞实际接受到的光辐射量也增加了, 因此该结果也预示着强光照或营养亏缺可能有利于 AA 的累积(将在下面两部分分别加以阐述)。图 4 结果还表明, 单位面积 AA 日产率也与 SGR 也有密切的关系, 其中以 0.135d^{-1} 速率生长的雪藻培养体系产 AA 最高, 达每平方米光照面积日产出 2.6g 。而雪藻维持在该 SGR 时, 高密度培养体系 AA 日产率最高的原因, 主要是此时生物产量和 AA/TFA 都比较高的综合结果。

2.3 光径对生物产量和 AA 产率的影响

以光径分别为 1.4cm 和 2.8cm 的平板光生物反应器进行对比实验, 研究光径对相关培养参数的影响, 结果如表 1 所示。窄光径 (1.4cm) 的平板光生物反应器, 单位光照面积的 AFDW 和 TFA 的最大日产率各下降了 37.3% 和 10% , 分别减低到 22.1 和 $6.3\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。但是 AA 的最大日产率没有变化, 也是 $2.6\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。

窄光径 (1.4cm) 平板光生物反应器较宽光径 (2.8cm) 的反应器在单位光照面积内, 体

积减少了一半(即由 28L 下降到 14L), 而单位体积的生物量(或浓度)并没有提高 1 倍, 只是提高了 68%。由于研究实验照射在 2 个平板光生物反应器外部的光照强度是相同的 [$2400\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], 因此窄光径(1.4cm)平板光生物反应器内雪藻细胞接受的实际光辐射量提高了 19% 左右。研究结果说明高光强有利于 AA 在雪藻细胞中的累积, 也进一步印证上面的作出的光对 AA 影响的同样推测(参见 2.2)。结合窄光径平板光生物反应器在材料、水电和肥料消耗等方面的比较低, 大大降低生产成本, 因此建议实际操作中, 应适当采用窄光径的平板光生物反应器高密度培养雪藻生产 AA。

表 1 两种光径的光生物反应器连续培养雪藻的主要生产参数

Tab. 1 Some main productivity profiles of *P. inása* cultured in 2 light-path photobioreactors

光径 (cm)	1.4	2.8
最大 AFDW 日产率 [$\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$]	22.1	35.25
最大 TFA 日产率 [$\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$]	6.3	7.00
最大 AA 日产率 [$\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$]	2.6	2.6
最大 AFDW 浓度 (g/L)	16.5	9.8

在强光照条件下, 许多单细胞藻类大量积累次生代谢产物, 特别是对蓝光、紫外光具有很高吸收能力的类胡萝卜素, 抵御光胁迫伤害。例如: 雨生红球藻在细胞内产生虾青素, 盐藻通过积累 β -胡萝卜素(并储存于类囊体片层间的中性脂质小体中), 都能有效滤过过多的光线, 达到保护光合作用中心和其他细胞内部重要生命活动机构的目的(刘建国等, 1995, 2000)。在自然生态(特别是冬季雪地低温)条件下, 雪藻时常受到高光辐射的影响。在该条件下雪藻大量累积以 AA 为主的脂肪酸, 这究竟是胁变, 还是一种主动适应目前尚不太清楚。推测雪藻累积脂肪酸除与保障膜结构功能有关外, 即使不能直接吸收滤过掉某些光线, 也对光有一定遮挡作用, 另外也可能与猝灭化学活性很高的自由基有关系。

从图 3 可以看出, 在连续培养达到恒态时, 2.8cm 光生物反应器中藻液密度 AFDW 均在 6g/L 以上, 最高近 10g/L, 藻液完全呈“牛奶”状; 1.4cm 光生物反应器中, 藻液最高密度 AFDW 甚至高达 16g/L(表 1), 表现为“冰激淋”状。上述密度远远高于微藻室外培养水平[一般在 0.02%—0.06% (W/V) 之间], 也大大高于室内微藻培养的细胞密度(1.0g/L 左右)。在以往光自养培养条件下通常不可想象, 只有通过连续离心、过滤藻液等技术才能实现。作者不仅能够达到, 而且维持如此高的细胞密度进行连续培养, 因此称之为高密度培养。该技术除具有高产特点外, 还大大减低微藻收获困难造成的高成本问题。

2.4 营养亏缺对雪藻生长和 AA 的影响

作者离心获得雪藻, 并将藻泥分别重新接种到无氮(或无磷)的培养液中, 利用 2.8cm 光径的平板光生物反应器和高光强条件, 高密度通气培养, 连续跟踪观察了 6 天内雪藻生长和脂肪酸变化。结果十分明显, 尽管培养液中没有氮源, 雪藻在 6 天内生物量仍能呈线形生长。但同样在无磷源条件下, 雪藻生物量在 3 天内仍能维持一定的增长, 然后下降(表 2)。说明离心后的藻体仍吸附一定氮和磷, 在氮或磷亏缺条件下这些营养逐步提供给细胞代谢和维持雪藻生长。

表 2 雪藻在氮、磷亏缺条件下的生物量变化

Tab.2 The dynamic changes in biomass of *P. incisa* cultured in nitrate or phosphate free medium

处理时间(d)	生物量(g/L)	
	缺氮处理	缺磷处理
0.0	7.23	7.23
0.5	7.95	8.35
1.5	8.75	10.05
2.5	9.80	10.55
3.5	10.20	10.71
4.5	10.70	9.50
5.5	11.05	8.85

在氮饥饿条件下 AA/TFA 比率比刚收获时有大幅度的上升, 平均上升了 25%, 其中短期(1 天左右) 氮饥饿处理效果最明显, 为起始时的 30% 左右(表 3)。至于在氮亏缺条件下雪藻的 TFA 含量, 在第一天内 TFA/AFDW 就从 35% 上升到 38% (结果未列出)。同时, 1 天氮亏缺处理后, AA/AFDW 也从 11% 迅速上升到了 16%, AA 浓度也大幅度上升(表 4)。本结果说明雪藻对氮亏缺的第一应答反应是大量累积脂肪酸及其 AA。

表 3 氮或磷饥饿对雪藻 AA/TFA 的影响

Tab.3 Influence of nitrate or phosphate starvation on AA/TFA profile in *P. incisa*

处理时间(d)	缺氮		缺磷	
	AA/TFA	增加效果(%)	AA/TFA	增加效果(%)
0.0	0.308	100.0	0.308	100.0
0.5	0.416	135.1	0.329	106.8
1.5	0.399	129.5	0.362	117.5
2.5	0.384	124.7	0.453	147.1
3.5	0.411	133.4	0.447	145.1
4.5	0.349	113.3	0.450	146.1
5.5	0.353	114.6	0.457	148.4
平均		125		135

同样, 培养液缺磷也有利于 AA 的增加, 尽管开始时增幅没有缺氮时明显, 但 2 天以后磷饥饿效果非常明显(达 47% 左右), 因此 AA/TFA 比率上升幅度比缺氮时还要高, 平均上升了 35% (表 3)。同时, 在磷亏缺条件下雪藻的 AA/AFDW 在开始 2 天从 11% 迅速上升到 13%, AA 浓度也大幅度上升(表 4)。

表 4 氮或磷饥饿对雪藻 AA/AFDW 和 AA 浓度的影响

Tab.4 Effects of nitrate or phosphate starvation on AA/AFDW ratio and AA concentration in *P. incisa* culture

处理时间(d)	缺氮		缺磷	
	AA/AFDW(%)	AA 浓度(g/L)	AA/AFDW(%)	AA 浓度(g/L)
0	11.0	0.80	11.0	0.80
0.5	16.0	1.27	10.9	0.86
1.5	13.0	1.13	13.0	1.29
2.5	9.33	0.91	12.4	1.31
3.5	10.3	1.03	10.9	1.17
4.5	9.78	0.98	11.0	1.05
5.5	9.14	1.01	11.1	0.98

上述结果不仅印证了前面关于营养亏缺有利于AA累积的推测(参见2.2),而且提示生产上,在收获雪藻藻泥后再进行1—2天的氮(或磷)亏缺处理,能够获得更多的目的产物。鉴于雪藻比其他微藻容易收获的多,也不至于因此而大量增加收获时间和成本。

通常认为在营养亏缺条件下,微藻的代谢途径和形态结构都发生明显变化,以适应不良环境。目前对雪藻在营养亏缺条件下大量累积AA的具体原因和代谢调节机理也不十分明确。关于雪藻这方面生理和生化代谢研究目前还未见有关报道,但至少可以推测:在一定时间范围内,雪藻细胞内从亚油酸(18:2),合成AA的生化代谢途径加强了,与之相关的催化链延长和脱氢系列反应的关键酶类活性更大了。脂肪酸的链加长和去饱和途径一般认为与种类有密切关系。从亚油酸合成AA可能有3条渠道:

- (1) $18:2\omega_6 \rightarrow 18:3\omega_6 \rightarrow 20:3\omega_6 \rightarrow 20:4\omega_6$;
- (2) $18:2\omega_6 \rightarrow 20:2\omega_6 \rightarrow 20:3\omega_6 \rightarrow 20:4\omega_6$;
- (3) $18:2\omega_6 \rightarrow 18:3\omega_6 \rightarrow 18:4\omega_6 \rightarrow 20:4\omega_6$ 。

雪藻脂肪酸中含有少量的18:3 ω_6 、20:2 ω_6 和20:3 ω_6 ,没有发现18:4 ω_6 (图1)。因此推测雪藻不是通过第三种渠道合成AA。而其中18:3 ω_6 、20:2 ω_6 和20:3 ω_6 含量有很低,表明在可能的途径1和2中,从第2步以后的化学反应速度都比较快,不是限速步骤。18:2含量总是比较高(参见2.1),意味着第一步反应就是限速瓶颈。但目前尚不能进一步推断AA合成主要是通过渠道1还是渠道2。

2.5 灰分对干重的影响

以前对藻类生长状况研究,通常是以光合作用和呼吸作用速率、叶绿素和蛋白质含量、细胞数量、组织与器官的鲜重或干重等指标来表示。一般认为,生长速率同上述指标呈很好的正相关性,其中藻类的干重(特别是去灰分干重)是最直接、比较可信的指标。

淡水藻类的灰分含量较低,海水藻类的灰分含量高些。每种藻类的灰分变化不太大,干重和去灰分干重通常呈紧密的正相关性,因此为简化实验操作过程,常常以干重简单地代替了去灰分干重。然而,在藻类的高密度连续培养过程中,仅仅以藻类的干重来表示就很不可靠。作者注意到在普通浓度培养时,雪藻灰分通常在4%左右波动。然而在高密度连续培养中,雪藻的灰分虽然开始时也在4%左右,但是1个月后含量大幅度上升,并维持在AFDW的20%以上,有时高达25%左右,灰分的存在严重影响实际的生物量。因此直接用干重简单地代替去灰分干重就不能正确表示雪藻的生长状况。为此,本研究采用AFDW来表示雪藻的生长状况。同时估计此类现象在其他微藻高密度培养过程也存在,建议以AFDW作为高密度培养研究中细胞生长的适宜指标。

3 结论

在通气、无菌和高光照强度条件下,两种光径的平板光生物反应器的高密度连续培养体系都有非常高的产出率,其中雪藻生物产量、总脂肪酸和花生四烯酸的日最大产率分别达到35.3、7.0和2.6g/(m²·d)的高产量。本实验结果意味着:高密度培养技术可为更有效地开发微藻资源带来新的希望,因此有必要继续进行深入探索。

参 考 文 献

- 刘建国, 张京浦, 2000. 雨生红球藻光合作用和呼吸速率研究. 海洋与湖沼, 31(5): 490—495
- 沈允钢, 2000. 地球上最重要的化学反应——光合作用. 见: 路甬祥著. 院士科普书系, 第 21 册. 北京: 清华大学出版社, 69—93
- Adlerstein D, Bigogno C, Khozin I *et al*, 1997. The effect of growth temperature and culture density on molecular species composition of galactolipids in the red microalga *Porphyridium cruentum*. J Phycology, 33(6): 975—979
- Agostoni C, Trojan S, Belli R *et al*, 1997. Development quotient at 24 months and fatty acid composition of diet in early infancy: A follow up study. Archives Disease in Childhood, 76(5): 421—424
- Akimoto M, Shimai A, Ohtaguchi K *et al*, 1998. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. Appl Biochem Biotechnology, 73(2—3): 269—278
- Bougle D, Denise P, Vimard F *et al*, 1999. Early neurological and neurophysiological development of the preterm infant and polyunsaturated fatty acids supply. Clinical Neurophysiology, 110(8): 1363—1370
- Cohen Z, 1990. The production potential of eicosapentaenoic and arachidonic acids by the red alga *Porphyridium cruentum*. J American Oil Chemists Society, 67(12): 916—920
- Crawford M A, Costeloe K, Gebremeskel K *et al*, 1997. Are deficits of arachidonic acid and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? American J Clinical Nutrition, 66(4, Suppl.): 1032S—1041S
- Dubacq J P, Pham Q K, 1993. Biotechnology of Spirulina lipids: A source of gamma-linolenic acid. Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco) O (Special Issue), 12: 59—64
- Fabregas J, Garcia D, Morales E *et al*, 1998. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modified phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. J Fermentation Bioengineering, 86(5): 477—481
- Floreto E A T, Hirata H, Yamasaki S *et al*, 1994. Influence of light intensity on the fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). Botanica Marina, 37(2): 143—149
- Hayashi M, Toda K, Ishiko H *et al*, 1994. Effects of shifting pH in the stationary phase of growth on the chemical composition of *Euglena gracilis*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 58(11): 1964—1967
- Hu Q, Hu Z Y, Cohen Z *et al*, 1997. Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and gamma-linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor culture of *Monodus subterranus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). European J Phycology, 32(1): 81—86
- Kim M K, Dubacq J P, Thomas J C *et al*, 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. Phytochemistry, 43(1): 49—55
- Liu J G, Cohen Z, Richmond A, 2002a. Fatty acids profile in a high cell density culture of arachidonic acid-rich *Parietochloris incisa* exposed to high PFD. Chin J Ocean Limnol, 20(2): 149—156
- Liu J G, Zhang C W, Cohen Z *et al*, 2002b. Physiological inhibitory effects of OCS in arachidonic acid-rich *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Chin J Ocean Limnol, 20(3): 248—255
- Napolitano G E, Ackman R G, Ratnayake W M N, 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species used as food for bivalve larvae. J World Aquaculture Society, 21(2): 122—130
- Pascaud M, 1993. The essential polyunsaturated fatty acids of Spirulina and our immune response. In: Doumenge F, Hubert D C, Toulemon A ed. Spirulina, Algae of Life. Monaco, 49—57
- Petkov G D, Furnadzieva S T, Andreeva R D, 1994. Fatty acid and sterol composition on *Nannochloris* sp. Archiv Fuer Hydrobiologie Suppl, 102: 133—135
- Rorrer G L, Modrell J, Zhi C *et al*, 1995. Biodiesel seaweed cell culture for production of bioactive oxylipins. J Appl Phycology, 7(2): 187—198
- Rubin-Bernard R, 1999. Specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. J Amer Osteopathic Assoc, 99(6): 322—325
- Sajiki J, 1997. Effect of acetic acid treatment on the concentration of arachidonic acid and prostaglandin E₂ in the red algae, *Gracilaria asiatica* and *G. rhodocaudata*. Fisheries Science, 63(1): 128—131
- Watanabe S, Hirabayashi S, Boussiba S *et al*, 1996. *Parietochloris incisa* comb. Nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Phycological Res, 44(2): 107—108

- Wibert G J, Burns R A, Diersen-S D A *et al.*, 1997. Evaluation of single cell sources of docosahexanoic acid and arachidonic acid: A 4-week oral safety study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(10—11): 967—974
- Wu X C, Lu B R, Tseng C K, 1995. Comparative fatty acid composition of four *Sargassum* species (Fucales, Phaeophyta). *Chin J Oceanol Limnol*, 13(4): 370—373
- Xiang M, Lei S, Li T *et al.*, 1999. Composition of long chain polyunsaturated fatty acids in human milk and growth of young infants in rural areas of northern China. *Acta Paediatrica*, 88(2): 126—131

THE HIGH PRODUCTIVITY OF BIOMASS AND ARACHIDONIC ACID IN CONTINUOUS HIGH DENSITY CULTURE OF *PARIETOCHLORIS INCISA*

LIU Jian-Guo, LIU Wei

(*R&D Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Zvi Cohen, Amos Richmond

(*Microalgal Biotechnology, The Jacob Blaustein Institute for Desert Research Ben-Gurion University of the Negev, Sede Boker Campus 84993, Israel*)

Abstract *Parietochloris incisa* is a species of cryophilic green microalgae, which is economically valuable and has a unique ability to accumulate large amount of arachidonic acid. Some physiological profiles like specific growth rate (*SGR*), ash free dry weigh (*AFDW*), total fatty acids (*TFA*) and arachidonic acid (*AA*) in axenic high density culture of this alga were closely studied by using 1.4cm and 2.8cm light-path flat-photobioreactors. The culture was vigorously aerated and exposed to strong photon flux density [ca. 2400 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]. Culture was partly harvested daily and the same volume of fresh medium was added into the culture system.

Data showed that very high productions of biomass, *TFA* and *AA* were observed from the flat-photobioreactor systems, although the main profiles (*AA/TFA*, *TFA/AFD* and *AA/AFDW*) decreased in varied content with a similar pattern concomitant with the increase of *SGR*. Maximal biomass production [*AFDW*, 35.3g/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$)] and *TFA* production [7.0g/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$)] were obtained in 2.8cm light-path photobioreactor when the *SGR* were at 0.2d⁻¹ and 0.135d⁻¹. The highest ratio of *AA/AFDW* was observed when the *SGR* was at 0.1d⁻¹, while the *AA* production [2.6g/($\text{m}^2 \cdot \text{d}$)] reached to its maximum when the *SGR* of the culture was at 0.135d⁻¹. The maximal *TFA* production and biomass production in the narrow light-path photobioreactor (1.4cm) were 10% and 37.3% less than that of the thick one (2.8cm), though the culture volume was only half. The maximal *AA* production of two photobioreactors was the same mainly because of the increase of biomass density in narrow light-path photobioreactor and partly due to the increase in *AA/AFDW* profile.

The studies also indicated that nitrate- or phosphate-deficiency accelerated the *AA* accumulation in the cells, and strong light intensity favored the *AA* accumulation.

Key words *Parietochloris incisa*, High density culture, Flat-photobioreactor, Arachidonic acid, Productivity, Specific growth rate