

利用微藻规模化生产 EPA 的最佳条件探讨

王慧岭, 罗建涛, 白雪梅*, 滕杰, 张晋阳, 刘敏胜*

(新奥科技发展有限公司, 煤基低碳能源国家重点实验室, 河北廊坊 065001)

摘要 [目的]探讨微藻规模化生产二十碳五烯酸(EPA)的最佳条件。[方法]研究了温度对 ENN1001A 生长及 EPA 产量的影响, 分析了液位对温度的影响, 阐述了 EPA 的规模化生产工艺。[结果]5 月和 9 月 EPA 产量最高, 分别达到 738 和 786 mg/(m²·d), 全年平均产量为 666 mg/(m²·d), 远高于文献报道的 516 g/(m²·d)。全养殖季 EPA 与藻液平均温度变化相一致, 整体上呈先下降后上升的变化趋势。[结论]研究结果可为 EPA 的规模化生产奠定基础。

关键词 微藻; 温度; EPA; 养殖; 跑道池

中图分类号 S986.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)10-0010-04

Discussion on the Optimum Conditions for Large-scale Cultivation of EPA by Using Microalgae

WANG Hui-ling, LUO Jian-tao, BAI Xue-mei et al (State Key Laboratory of Coal-based Low Carbon Energy, ENN Science & Technology Development Co., Ltd., Langfang, Hebei 065001)

Abstract [Objective] To discuss the optimum conditions for large-scale cultivation of eicosapentaenoic acid(EPA) by using microalgae. [Method] The effects of temperature on ENN1001A growth and EPA yield were studied. The effects of liquid level on the temperature were analyzed. The large-scale production of EPA was expounded. [Result] EPA yield in May and September were 738 and 786 mg/(m²·d) respectively. And the average annual production was 666 mg/(m²·d), which was far higher than the reported data [516 mg/(m²·d)]. The content of EPA and the average temperature of algae medium had consistent changes and showed the changing trend of first decrease and then increase in total culture period. [Conclusion] The research results could lay the foundation for the large-scale cultivation of EPA.

Key words Microalgae; Temperature; EPA; Breeding; Raceway pond

二十碳五烯酸(EPA)在预防和治疗人类多种疾病(如心血管疾病、癌症和炎症性疾病)方面有显著作用, 而且还能起到延缓衰老的生理作用^[1]。目前 EPA 的唯一商业来源是深海鱼油, 但存在味道、气味和稳定性等问题。此外, 鱼油中大量的其他多不饱和脂肪酸使得 EPA 的提纯更为复杂, 导致纯品的价格很高^[2]。

许多海洋微藻都有较高的 EPA 含量, 其中很多微藻是重要的海产经济微藻, *Nannochloropsis oceanica* 易培养, 是海产苗种生产中广泛应用的一种饵料微藻^[3]。在澳大利亚和以色列等国家, 微绿球藻被规模化培养用于生产高纯度的 EPA^[4]。规模化培养微藻生产 EPA 受到许多因素的影响, 如光照、温度、盐度、酸碱度、营养方式等。笔者探讨了微藻规模化生产 EPA 的最佳条件, 旨在为 EPA 的规模化生产奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 藻种与培养基 试验所用藻种 ENN1001A, 由新奥科技发展有限公司藻种库提供。实验室内保种和培养均采用消毒水配制的 f/2 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 温度对 ENN1001A EPA 含量的影响。将试验藻株先活化 3 d, 接入内径 5 cm、高 50 cm 的玻璃管式反应器中, 养殖体积 800 mL, 初始浓度为 OD₇₅₀ = 2.0, 光照强度 (100 ± 10) μmol/(m²·s), 光暗比 16:8; 通入空气与 CO₂ 的混合气体, CO₂ 含量为 2%, 通气量为 0.1 L/min; 设置 10、15、20、23、27、30、33、37、40 °C 共 9 个温度梯度, 分别用冷暖水机控制温度恒定在设定温度, 每个温度梯度 3 个重复, 每天 08:30 停

气, 补水至原体积, 充分混合 30 min 后, 取样, 测定干重。培养 2 d 后, 于 15、20、30、40 °C 离心、洗涤收集藻泥后冷冻干燥, 藻粉用于脂肪酸分析, 试验重复 3 次, 结果取 3 次试验的平均值。由于养殖体系为实验室管式反应器, 所以遵循业内室内产量计算方式, 以 g/(L·d) 计。

1.2.2 液位对温度的影响。试验藻株来自户外规模化藻种扩培室, 接入养殖面积为 180 m² 开放式跑道池, 养殖深度设为 15、20、25 cm, 搅拌速度以液体流速来控制, 藻液平均流速控制在 0.4 m/s。自然条件下培养(内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗 10 月), 通入 CO₂ 气体, 控制 pH 在 7.0~8.0, 每个液位养殖 1 个跑道池, 养殖浓度为 100 g/m², 使用在线系统 24 h 监测记录各液位下藻液温度及空气温度, 连续监测 30 d, 温度差异以 30 d 各养殖池平均温度计。

1.2.3 EPA 的规模化生产。试验藻株来自户外规模化养殖藻种, 接入养殖面积为 1 200 m² 开放式跑道池, 养殖深度随季节的变化适时调整, 调整原则为不增加外部能耗和不降低生物质产量的前提下, 尽可能控制藻液温度在 15~25 °C, 养殖浓度控制在 1.0~1.5 g/L, 搅拌速度以液体流速来控制, 藻液平均流速控制在 0.4 m/s。自然条件下培养(内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗 4—10 月), 通入 CO₂ 气体, 控制 pH 在 7.0~8.0, 温度记录使用在线系统 24 h 监测记录。每天 16:30 补水测量干重, 根据生物量增长情况采收, 并补充等量营养盐, 采收藻粉喷雾干燥, 每月生产藻粉混合均匀后, 取样进行脂肪酸检测, EPA 产量由单位面积养殖藻粉量乘以该月藻粉 EPA 含量计算获得。

2 结果与分析

2.1 温度对 ENN1001A 生长及 EPA 产量的影响

2.1.1 温度对 ENN1001A 生长的影响。在室内恒定光照强

作者简介 王慧岭(1983—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 助理实验师, 从事新能源研究。* 通讯作者: 白雪梅, 博士, 从事微藻生物能源研究; 刘敏胜, 副研究员, 博士, 从事新能源研究。

收稿日期 2017-12-07

度 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下, 5 cm 管式反应器通气培养测得温度对 ENN1001A 生长的影响(图 1)。恒定温度下, 连续养殖 2 d, $10 \sim 27 \text{ }^\circ\text{C}$ 内, 随着温度的上升, ENN1001A 平均产量增加, $23 \sim 27 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 ENN1001A 产量基本相当。当温度超过 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 其生长明显受到抑制。当温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, ENN1001A 几乎不生长, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 时细胞死亡。

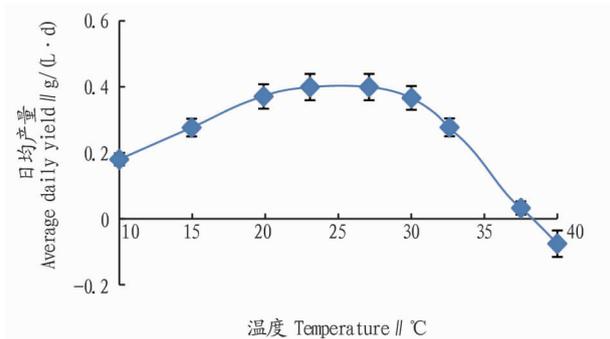


图 1 温度对 ENN1001A 生长的影响

Fig. 1 Effects of temperature on the growth of ENN1001A

2.1.2 温度对 ENN1001A EPA 含量的影响。从图 2 可以看出, 随着培养温度的升高, EPA 含量逐渐降低。当温度为 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 含量最高(3.7%), 当温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 含量略有降低, 为 3.4%; 当温度为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 含量略有降低, 为 3.3%; 当温度为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 含量降至 1.6%。

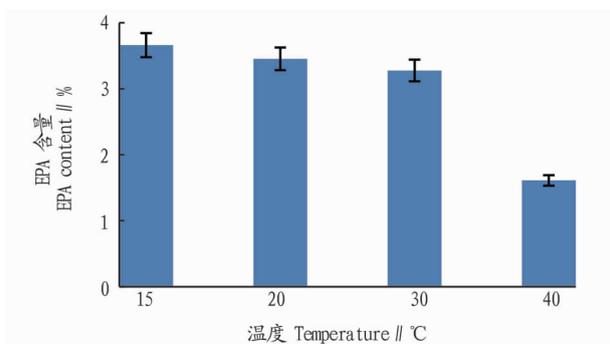


图 2 温度对 ENN1001A EPA 含量的影响

Fig. 2 Effects of temperature on EPA content in ENN1001A

从图 3 可以看出, 当温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 总产量最高, 当温度为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 时 EPA 产量也高于温度 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 当温度为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 时由于不能正常生长, 所以 EPA 产量为负值。

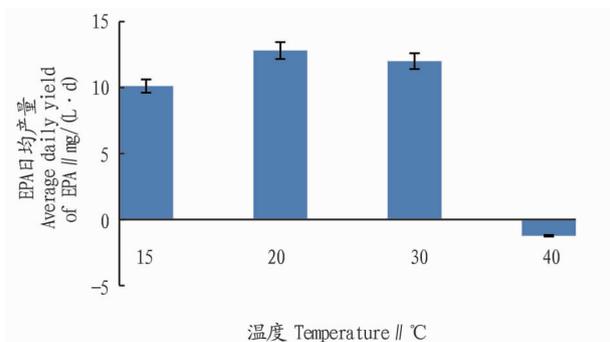


图 3 不同温度条件下 ENN1001A EPA 产量

Fig. 3 EPA yield of ENN1001A under different temperature conditions

2.2 液位对温度的影响 对 2013 年 10 月份内蒙古达拉特

旗养殖藻液各时间段测得的温度进行计算, 养殖液位对藻液温度的影响见图 4。从图 4 可以看出, $20:00$ —次日 $10:00$, 随着养殖液位的增加, 藻液温度随之增加; 在 $20:00$ 和次日 $10:00$ 3 个液位梯度的温度一致, 而 $10:00$ — $20:00$, 随着养殖液位的增加, 藻液温度降低, 当液位为 15 与 25 cm 时最高温度相差 $3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

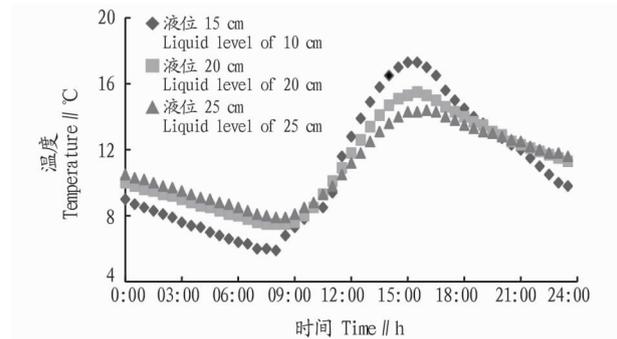


图 4 养殖液位对藻液温度的影响

Fig. 4 Effects of aquaculture liquid level on the temperature of algae fluid

2.3 EPA 的规模化生产 对 2016 年内蒙古达拉特旗全年养殖季藻液各月 24 h 温度进行检测, 结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, 7 月藻液最高温度为 $32.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 最低温度为 $17.3 \text{ }^\circ\text{C}$, 平均藻液温度为 $25.2 \text{ }^\circ\text{C}$, 为全年温度最高月份; 6 和 8 月温度差别不大, 最高温度分别为 29.1 和 $30.6 \text{ }^\circ\text{C}$, 最低温度分别为 14.2 和 $15.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 平均温度则分别为 22.2 和 $23.6 \text{ }^\circ\text{C}$; 5 和 9 月藻液温度相对较低, 最高温度分别为 24.6 和 $23.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 最低温度分别仅为 12.5 和 $8.8 \text{ }^\circ\text{C}$, 平均温度分别为 19.2 和 $18.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

全养殖季各月平均总辐射量如图 6 所示。从图 6 可以看出, 5—7 月平均总辐射量为 $22 \text{ MJ}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 8 月份平均总辐射量为 $19 \text{ MJ}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 9 月份平均总辐射量为 $17 \text{ MJ}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$; 全年光照情况较好。

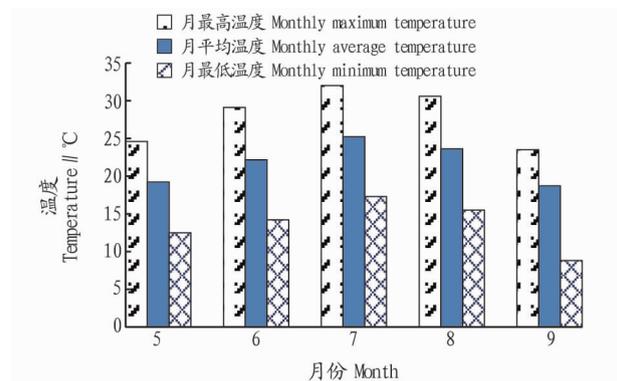


图 5 全年养殖中藻液温度

Fig. 5 Temperature of algae solution in whole year of culture

对内蒙古达拉特旗规模化养殖全年光照、平均藻液温度及产量关系进行分析, 结果如图 7 所示。从图 7 可以看出, 当温度在 $17 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下时, 产量不会因为光照总能量的增加而提高, 生长受温度的影响较大, 整体产量较低。当温度为 $17 \sim 27 \text{ }^\circ\text{C}$, 产量主要受光照的控制, 光照越强, 产量越高。

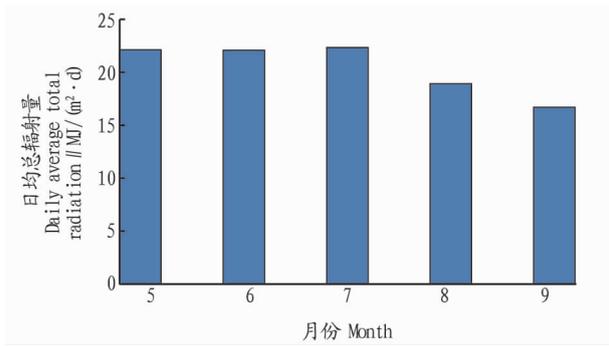


图6 全年各月总辐射量

Fig. 6 Monthly total radiation in the whole year

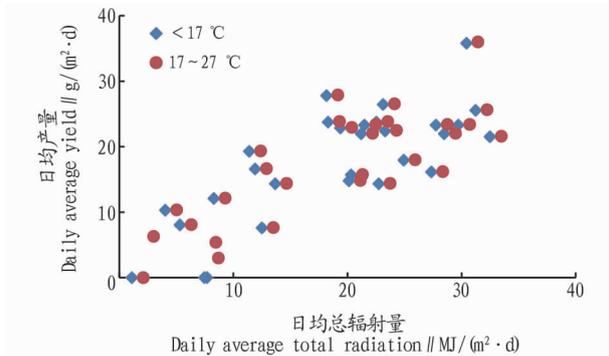


图7 微藻规模化养殖过程中温度、光照与产量的关系

Fig. 7 Relationship between temperature, light and yield in large scale production of microalgae

规模化生产各月 ENN1001A EPA 含量见图8。从图8可以看出,在5和9月时EPA含量分别为4.2%和4.6%,6和8月EPA含量均为3.9%,7月EPA含量降至最低(3.2%),全养殖季EPA变化和藻液温度变化一致,整体呈先下降后上升的变化趋势。

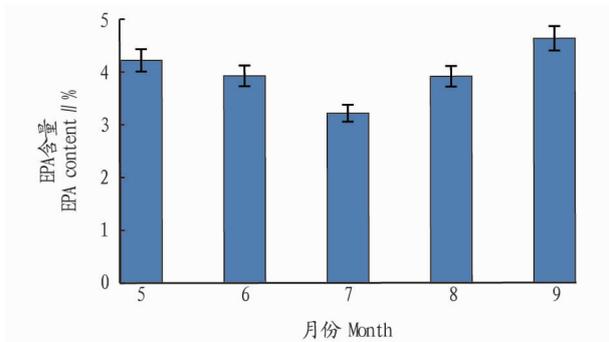


图8 不同月份 ENN1001A EPA 含量的变化

Fig. 8 Content of EPA in ENN1001A algae in different months

藻粉中EPA含量和养殖季平均温度关系见图9。从图9可以看出,在整个养殖季中EPA含量与藻液平均温度密切相关,随着藻液温度的升高,EPA含量呈线性下降。

从图10可以看出,随着培养温度的升高,EPA产量逐渐降低。EPA产量在5和9月分别为738和786 mg/(m²·d),6和8月EPA产量分别为663和646 mg/(m²·d),7月份EPA产量最低[495 mg/(m²·d)],全年平均产量为666 mg/(m²·d),全养殖季EPA变化和藻液温度变化一致,整体上呈先下降后上升的变化趋势。

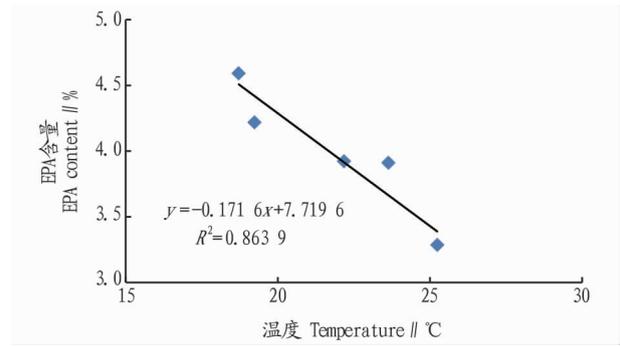


图9 温度与EPA含量的关系

Fig. 9 The relationship between temperature and EPA content

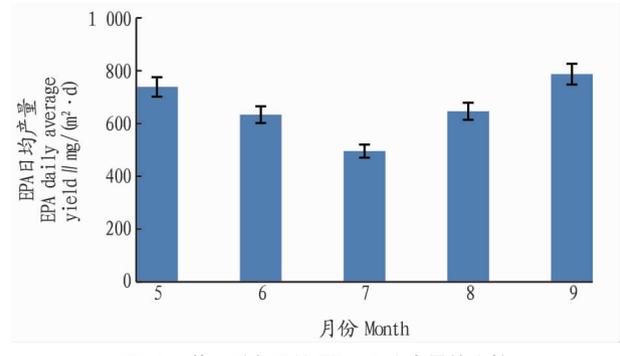


图10 养殖季各月份EPA日均产量的比较

Fig. 10 The comparison of EPA average daily yield in different months in the breeding season

3 讨论与结论

3.1 温度对EPA生产的影响 温度是决定植物代谢过程速率的主要环境因子之一^[5]。微藻能够适应的温度范围较宽,但不同温度对微藻生长和脂肪酸含量的影响较大。微藻细胞中多不饱和脂肪酸的积累与温度呈负相关,并受光照的诱导,这2个因素在诱导特异的脂肪酸去饱和酶的表达和脂肪酸组成的改变方面具有协同性。这是由于低温激活了细胞中 $\Delta 12$ 去饱和酶和 $\Omega-3$ 去饱和酶的转录与翻译,增加了细胞内的酶量,使膜脂的去饱和作用得以加强,以维持细胞完成正常生理功能所需的生物膜的流动性^[6-9]。杨官品等^[10]推测长链脂肪酸有可能提高微藻适应高温环境的能力。研究表明,EPA的含量随着温度的升高而降低,但生物量的生产受光照、温度的综合影响较大,在整个EPA的生产过程中生物质产量对EPA产量的影响较大。因此,在保证产量的同时,尽可能提高EPA含量,在光照时间段使藻液温度处于适宜生长的环境积累生物量,在弱光低温的早晨和傍晚积累EPA。

3.2 微藻养殖过程中的温度控制 微藻养殖大多数采用冷凝管、加热管、喷淋、棚膜等方式进行温度控制^[11],上述方法建设和运行成本较高,不利于规模化应用,且操作繁琐,影响混合和/或透光效果。该研究主要利用气候干燥地区蒸发量和昼夜温差大的自然条件,通过液位控制来实现规模化低成本开放式养殖系统的温度控制。

水体的热量主要来自辐射热、辐射热量及其对水体温度,根据公式 $Q_{\text{吸收}} = Q_{\text{辐射}} - Q_{\text{蒸发}} - Q_{\text{藻转化}} - Q_{\text{反射}}$ 计算吸收热量。在吸收同样多的热量的情况下,如果初始藻液温度相同

的条件下,藻液温度的变化与养殖水体的质量成反比;对单位面积水体而言,藻液温度与养殖深度成反比,养殖深度越深,同样条件下藻液温度越低。因此,在确定当地蒸发量、光照、微藻生长情况下,可对温度和液位进行理论计算,获得适宜的养殖深度,对实际养殖进行指导。

3.3 规模化生产 EPA 原料 室外培养时,温度随昼夜的更替和季节的变化产生较大的波动,这与室内培养的温度条件有较大的差异。该研究发现,在规模化养殖过程中,EPA 含量比实验室同等温度下较高,这可能是由规模化养殖过程中昼夜温差影响造成的。在养殖过程中,各月藻液最低温度均低于 20 ℃,有利于 EPA 的累积。大量研究表明,不同季节微藻细胞内 EPA 的含量不同^[12-13]。Sukenik 等^[14]研究了室外大规模培养微绿藻时,温度的季节性波动对脂肪酸种类的影响很大。冬季水温在 8 ~ 16 ℃ 时生物量产率较低,但 EPA 含量最高(占干重的 3.8%);在夏季,当生物量产率最高时,EPA 的含量降到不足冬季的 50%。Zitelli 等^[15]报道春季和初秋 EPA 含量最高。这与该研究长期养殖结果相一致。

目前规模化生产 EPA 的很少,基本上都是基于研究室的探索性养殖,且以反应器为主。Dunstan 等^[16]采用不同光径的露天平板式反应器培养拟微球藻,冬季和夏季 EPA 的最高产率分别为 278.2 和 515.70 g/(m²·d)。

参考文献

[1] TAPIERO H, BA G N, COUVREUR P, et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies[J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2002, 56(5): 215 - 222.

[2] BARCLAY W R, MEAGER K M, ABRIL J R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms[J]. *Journal of applied phycology*, 1994, 6(2): 123 - 129.

[3] 黄旭雄,周洪琪,朱建忠,等. 不同生长阶段微绿球藻的营养价值[J].

水产学报, 2004, 28(4): 477 - 480.

[4] 魏东,张学成,隋正红,等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. *海洋科学*, 2000, 24(7): 46 - 51.

[5] BERRY J, BJORKMAN O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants[J]. *Annual review of plant physiology*, 1980, 31(1): 491 - 543.

[6] 魏东,张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展[J]. *海洋科学*, 2000, 24(8): 42 - 46.

[7] SAKAMOTO T, LOS D A, HIGASHI S, et al. Cloning of ω3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation[J]. *Plant molecular biology*, 1994, 26(1): 249 - 263.

[8] KODAMA H, AKAGI H, KUSUMI K, et al. Structure, chromosomal location and expression of a rice gene encoding the microsomal ω-3 fatty acid desaturase[J]. *Plant molecular biology*, 1997, 33(3): 493 - 502.

[9] 魏东,张学成. 富含 EPA 的海洋微藻眼点拟微球藻的大规模培养[J]. *中国海洋药物*, 2003, 22(1): 5 - 10.

[10] 杨官品,张继民,魏东,等. 温度逆境处理提高拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) EPA 含量的研究[J]. *海洋学报*, 2002, 24(4): 132 - 135.

[11] ZOU N, RICHMOND A. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1/2/3): 351 - 356.

[12] SAKAMOTO T, HIGASHI S, WADA H, et al. Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152(2): 313 - 320.

[13] SAKAMOTO T, SHEN G Z, HIGASHI S, et al. Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation[J]. *Archives of microbiology*, 1997, 169(1): 20 - 28.

[14] SUKENIK A, ZMORA O, CARMELI Y. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. [J]. *Aquaculture*, 1993, 117(3/4): 313 - 326.

[15] ZITTELLI G C, LAVISTA F, BASTIANINI A, et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors[J]. *Journal of biotechnology*, 1999, 70(1): 299 - 312.

[16] DUNSTAN G A, VOLKAMN J K, BARRETT S M, et al. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture[J]. *J Appl Phycol*, 1993, 5(1): 71 - 83.

(上接第 9 页)

[2] 鄯玖琪,朱道林,汤怀志. 中国土地整治战略重塑与创新[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(4): 1 - 8.

[3] 李冰清,王占岐,金贵. 新农村建设背景下的土地整治项目绩效评价[J]. *中国土地科学*, 2015, 29(3): 68 - 74, 96.

[4] 冯应斌,杨庆媛. 转型期中国农村土地综合整治重点领域与基本方向[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(1): 175 - 182.

[5] 王军,钟莉娜. 土地整治工作中生态建设问题及发展建议[J]. *农业工程学报*, 2017, 33(5): 308 - 314.

[6] 吴林,张鸿辉,王慎敏,等. 基于栅格数据空间分析的土地整理生态评价:以江西省南康市凤岗镇为例[J]. *中国土地科学*, 2005, 19(3): 24 - 28.

[7] 孙兴志. 农村土地整治生态风险管理探究[J]. *南方农业*, 2017, 11(1): 110, 115.

[8] LANDIS W G, WIEGERS J A. Design considerations a suggested approach for regional and comparative ecological risk assessment[J]. *Human and ecological risk assessment*, 1997, 3(3): 287 - 297.

[9] LANDIS W G, WIEGERS J K. Ten years of the relative risk model and regional scale ecological risk assessment[J]. *Human and ecological risk assessment*; An international journal, 2007, 13(1): 25 - 38.

[10] 王常颖,张杰,辛红梅,等. 基于景观格局的海岛开发潜在生态风险评价[J]. *生态学报*, 2008, 28(6): 2811 - 2817.

[11] WANG X L, ZHANG J. A nonlinear model for assessing multiple probabi-

listic risks: A case study in South five-island of Changdao National Nature Reserve in China[J]. *Journal of environmental management*, 2006, 85(4): 1101 - 1108.

[12] 付光辉,陈慧. 土地整理生态风险的暴露和危害分析[J]. *科技信息*, 2011(29): 35 - 36.

[13] 张伟. 基于 RRM 模型的神木县土地整治规划生态风险评价[D]. 西安: 长安大学, 2014.

[14] 贡璐,鞠强,潘晓玲. 博斯腾湖区域景观生态风险评价研究[J]. *干旱区资源与环境*, 2007, 21(1): 27 - 31.

[15] 丁晖,徐海根,吴翼,等. 生物多样性风险评估方法和案例研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2014, 30(1): 90 - 95.

[16] 颜磊,许学工. 区域生态风险评价研究进展[J]. *地域研究与开发*, 2010, 29(1): 113 - 118.

[17] 马禄义,许学工. 基于气象灾害的青岛市域生态风险评价[J]. *城市环境与城市生态*, 2010, 23(4): 1 - 5.

[18] 王小龙. 海岛生态系统风险评价方法及应用研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.

[19] 刘晓,苏维词,王铮,等. 基于 RRM 模型的三峡库区重庆开县消落区土地利用生态风险评价[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(1): 248 - 256.

[20] 姚忠,辛在军,吴永明,等. 日本里山环境管理模式及对我国新农村建设的启示[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(9): 769 - 774.

[21] 鞠昌华,朱琳,朱洪标,等. 我国农村环境监管问题探析[J]. *生态与农村环境学报*, 2016, 32(5): 857 - 862.