

基于发酵动力学模型的小球藻高密度发酵培养

周有彩¹, 何勇锦^{1,2}, 李林声³, 王明兹^{1,2}, 陈必链^{1,2*}, 郑行³

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350117; 2. 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 福建 福州 350117;
3. 福清市新大泽螺旋藻有限公司, 福建 福清 350300)

摘要: 构建了 50 L 发酵罐小球藻分批培养动力学模型, 采用补料策略高密度发酵培养小球藻, 考察了补料发酵过程中碳源的利用情况, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析了蛋白质合成关键酶二氨基庚二酸异构酶(dapF)、柠檬酸合成酶(CS)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的基因表达情况。结果表明, 小球藻经补料培养 120 h, 细胞生物量达 106.65 g/L, 平均生长速率为 0.89 g/(L·h), 葡萄糖的细胞得率为 0.56 g/g, 发酵过程中葡萄糖和尿素浓度对小球藻的 dapF, CS 和 G6PDH 基因表达量有重要影响。
关键词: 小球藻; 发酵动力学; 补料培养; 高密度; 基因表达

中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2018)03-0624-08

High Cell Density Fermentation of *Chlorella* Based on Kinetics Model

Youcai ZHOU¹, Yongjin HE^{1,2}, Linsheng LI³, Mingzi WANG^{1,2}, Bilian CHEN^{1,2*}, Xing ZHENG³

(1. School of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China;
2. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350117, China;
3. Fuqing King Dnarmsa Sprulina Co., Ltd., Fuqing, Fujian 350300, China)

Abstract: The kinetic model of batch fermentation of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 in a 50 L fermenter was built, fed-batch strategy for high cell density cultivation was established. The application of carbon source was investigated. Furthermore, real-time quantitative PCR was used to determine the gene expression levels of key metabolic enzymes such as diaminopimelate isomerase (dapF), citrate synthase (CS) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in fed-batch fermentation. The results showed that the cell dry weight of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 was 106.65 g/L, the average growth rate was 0.89 g/(L·h) and the yield of cell dry weight on glucose was 0.56 g/g, respectively, after fed-batch culture for 120 h. The gene expression levels of dapF, G6DPH and CS of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 were strongly related with the concentrations of glucose and urea during the fermentation.

Key words: *Chlorella* sp. MBFJNU-17; fermentation kinetics; fed-batch culture; high cell density; gene expression

1 前言

小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)可通过光自养方式培养^[1], 但生物量低、培养周期长、占地面积大、采收成本高^[2,3], 影响其规模化培养及应用。传统的微生物发酵技术用于小球藻培养可不依赖光照、减少占地面积、降低微藻采收的能耗^[4,5]。关于异养发酵培养小球藻的报道^[6]主要研究优化补料策略、提高产物合成、分析基质代谢等。Palabhanvi 等^[7]在 7.5 L 反应器中通过补料分批发酵培养小球藻, 最高生物量达 90.15 g/L, 生长速率为

19.75 g/(L·d)。Zheng 等^[8]利用 5 L 发酵罐培养耐温性小球藻 *Chlorella sorokiniana*, 采用补料策略, 最高细胞密度可达 103.8 g/L。Singhasuwan 等^[9]研究了 C/N 摩尔比对小球藻异养生长的影响, 结果表明, 在 C/N 比为 29:1 的条件下, 经 4 d 发酵, 最大生长速率为 0.68 g/(L·d), 指数生长阶段葡萄糖得率为 0.62 g/g。

发酵动力学可模拟发酵过程的动态特征, 为工业化生产、培养控制提供理论基础^[10]。Sachdeva 等^[11]通过 Droop 细胞配额模型预测原壳小球藻细胞生物质的生长, 在碳源过量的条件下模拟细胞利用率的变化和预测

收稿日期: 2017-09-20, 修回日期: 2017-10-24

基金项目: “十三五”海洋经济创新发展示范项目子课题(编号: FZJH04)

作者简介: 周有彩(1992-), 男, 福建省三明市人, 硕士研究生, 微生物学专业; 陈必链, 通讯联系人, E-mail: chenbil@fjnu.edu.cn.

引用格式: 周有彩, 何勇锦, 李林声, 等. 基于发酵动力学模型的小球藻高密度发酵培养. 过程工程学报, 2018, 18(3): 624-631.
Zhou Y C, He Y J, Li L S, et al. High Cell Density Fermentation of *Chlorella* Based on Kinetics Model (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2018, 18(3): 624-631, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.217318.

脂质积累率,发现添加 0.1 g/L NaNO_3 可促进微藻细胞合成油脂,最高油脂产率达 1.26 mg/mL. Wu 等^[12]利用 Aiba 模型描述小球藻细胞生长动力学,基于 Luedeking-Piret 模型研究叶黄素合成动力学,预测培养体系控制 5~24 g/L 葡萄糖和 0.7~12 g/L KNO_3 最有利于小球藻合成叶黄素.近年来,国内外有关小球藻发酵动力学的研究主要集中在油脂^[11]、叶黄素合成^[12]、高密度培养^[7]等方面,研究小球藻细胞生长规律、蛋白质合成、基质消耗动力学并用于高密度发酵补料培养的极少.

碳代谢作为细胞正常生命活动的重要生化反应,受机体糖酵解途径、三羧酸循环、磷酸戊糖途径等代谢活动的关键酶调节和控制,直接或间接影响细胞机体的能量代谢和产物生成^[13].葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)是戊糖磷酸途径的限速酶,是细胞生命活动所需 NADPH 的重要来源之一,对细胞生长和产物合成具有重要调节作用^[14].柠檬酸合成酶(CS)催化乙酰辅酶 A 和草酰乙酸生成柠檬酸,是三羧酸循环和乙醛酸循环的关键酶,也是细胞体内氨基酸、糖和脂类代谢重要的调控酶^[15].二氨基庚二酸异构酶(dapF)是多数微生物和植物赖氨酸合成中的限速酶,提高该途径代谢流可显著提高必需氨基酸的产率,提高蛋白质含量^[16].

本研究用 50 L 发酵罐分批培养小球藻,构建发酵过程中底物消耗、细胞生长和蛋白质合成的动力学模型.在此基础上,建立合理的高密度培养补料工艺,测定补料发酵过程中 G6PDH, dapF 和 CS 的基因表达量,分析基质对小球藻细胞代谢的影响,阐述异养发酵过程中底物如碳源和氮源浓度变化与 3 种关键酶表达量的关系,为中试放大提供理论基础.

2 实验

2.1 材料与试剂

小球藻 *Chlorella* sp. MBFJNU-17 由本实验室提供.

培养基配方(g/L)^[17]: 葡萄糖 41.53, 尿素 4.14, KH_2PO_4 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84, CaCl_2 母液 5 mL, Fe-EDTA 母液 15 mL, 微量元素母液 1.84 mL.

血尿素氮试剂盒(南京建成生物工程研究所), 总 RNA 提取试剂盒 Fungal RNA Kit(美国 Omega 公司), 第一链 cDNA 合成试剂盒(北京全式金生物有限公司), 三氯甲烷、水饱和酚、无水乙醇等试剂均为分析纯.

2.2 实验设备

50 L 发酵罐(上海国强生化工程装备有限公司), 海能 K9840 全自动凯氏定氮仪(济南海能仪器股份有限公司), BS224S 电子秤(北京赛多利斯系统仪器有限公司),

SBA-40E 生物传感分析仪(山东省科学研究院), ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司), T100™ PCR 仪(美国 Thermal Cycler 公司), DS-11 超微量紫外分光光度计(美国 Spectrophotometer DeNovix 公司), DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂), 培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司).

2.3 实验方法

2.3.1 种子制备

将藻种从试管斜面接种至装液量 600 mL 的 1 L 三角瓶中, 28℃ 下 150 r/min 摇床黑暗培养 72 h.

2.3.2 发酵培养

将液体种子按 10vol% 接种量接种至装液量 30 L 的 50 L 发酵罐中, 28℃、通气量 45 L/min 条件下培养 120 h, 搅拌转速 150~300 r/min.

2.3.3 生物量测定

取发酵藻液 8 mL 于 10 mL 离心管中, 以 8000 r/min 速率离心 10 min, 弃上清, 用蒸馏水混匀藻泥, 离心弃上清, 重复 3 次. 将藻泥用少量蒸馏水洗入预先称重的玻璃平板, 置于 80℃ 烘箱中烘至恒重, 称重.

2.3.4 残糖量和蛋白含量测定

残糖采用 SBA-40E 生物传感分析仪测定^[18], 蛋白含量采用凯氏定氮法^[19]测定.

2.3.5 葡萄糖得率和平均生长速率计算方法

$$\text{葡萄糖得率(g/g)} = \text{葡萄糖用量} / \text{藻细胞干重}, \quad (1)$$

$$\text{平均生长速率[g/(L·h)]} = \text{藻细胞干重} / \text{培养时间}. \quad (2)$$

2.3.6 尿素含量测定

根据血尿素氮试剂盒说明书^[20]以吸光度 OD_{520} 为横坐标、尿素含量为纵坐标, 绘制尿素含量标准曲线, 结果见图 1, 可见吸光度与尿素含量之间存在良好的线性关系. 实验中尿素含量通过测定吸光度根据图 1 确定.

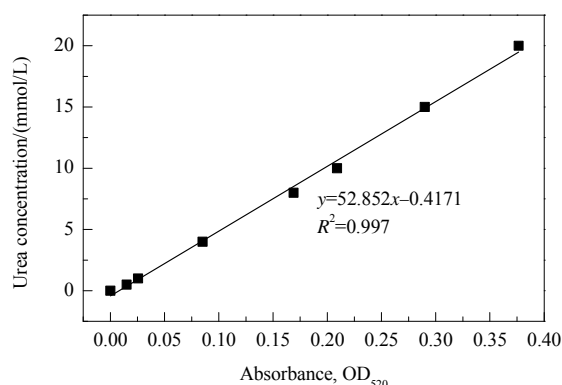


图1 尿素浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of urea concentration

2.3.7 补料培养及相关基因表达取样

根据补料策略进行 50 L 发酵罐培养, 测定细胞干重、残糖和相关酶的基因表达. 相关酶的基因表达测定分别在 24 h 小球藻刚进入指数生长阶段时取样, 为对照(样品 1), 发酵 32 h 葡萄糖、尿素浓度第 1 次处于较低水平时取样(样品 2), 36 h 时(第一次补料后 2 h)取样(样品 3), 90 h 时葡萄糖、尿素消耗速率开始降低时取样(样品 4), 120 h 放罐时取样(样品 5).

2.3.8 引物设计

从 KEGGpathway 中查找 dapF, CS, G6PDF 及内参基因 ACTIN 的序列, 采用 Primer primer 5 软件根据引物设计原则设计荧光定量 PCR 分析特异性引物, 见表 1, 由生物工程(上海)股份有限公司合成.

表 1 实时荧光定量 PCR 分析引物
Table 1 Primer pairs used in real-time qPCR analysis

Gene	Primer sequence
G6PDF F'	TGC TGG TGG ACC CCG TAG ATG
G6PDF R'	GCC AGAG CTC CAT GTC TTC ATC CT
CS F'	GCG GAC CCA GAC ACC AAG AT
CS R'	CGC TGA CAC GGC GAA CAT A
dapF F'	GCG GTC AAG TTT GCC AAG TAT C
dapF R'	GAC AGA GCC ATC CGA CTT CAA
Actin F'	TGC TTT GCG GGC GAT GAT
Actin R'	CAA TGG GAT ACT TGA GGG TGA GG

2.3.9 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 分析

按总 RNA 提取试剂盒说明提取小球藻样品的 RNA, 用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度. 将 cDNA 作为荧光定量 PCR 分析的模板, 优化模板浓度、退火温度等条件, 每个样品设 3 个复孔, 配制反应体系时先配制总反应液, 再分装, 三步扩增反应实时 qPCR 分析体系见表 2.

表 2 实时荧光定量 PCR 分析 20 μ L 反应体系

Reagent	Volume/ μ L
Template	2.0
Upstream primer	0.4
Green qPCR SuperMix	10.0
Passive Reference Dye	0.4
ddH ₂ O	7.8

实时 qPCR 反应条件(三步法): 94 $^{\circ}$ C 下预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 下变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 下退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 34 s, 40 个循环. 反应结束后, 以 ACTIN 为内参基因, 得每个样品的荧光信号达设定阈值时的循环数 C_t 值, 计算基因相对表达量^[21]并分析各样品的基因表达差异.

2.4 数据处理

用 Origin 8.5 软件对生物量、基质消耗和蛋白合成动力学进行拟合, 用 Excel 2010 进行数据方差分析.

3 结果与讨论

3.1 小球藻发酵过程代谢变化特征

分批发酵过程中, 小球藻的代谢变化见图 2. 从图可知, 0~8 h 为小球藻生长的延滞期, 藻细胞生长缓慢, 培养体系中葡萄糖消耗较少[图 2(a)]; 12~36 h 为微藻细胞指数生长阶段, 体系中葡萄糖和尿素浓度快速下降, 蛋白质合成几乎与细胞生长同步[图 2(b)]; 36~120 h 时微藻细胞进入平稳期, 生物量不变, 最大值为 22.8 g/L; 40 h 后, 体系中葡萄糖浓度趋于 0. 经 96 h 培养, 小球藻才能将尿素全部消耗[图 2(b)]. 值得注意的是, 在整个培养过程中, 蛋白质合成与微藻生长变化趋势一致, 表明小球藻细胞生长与其蛋白质合成的关系可能属于生长相关型或生长部分相关型发酵模式^[22].

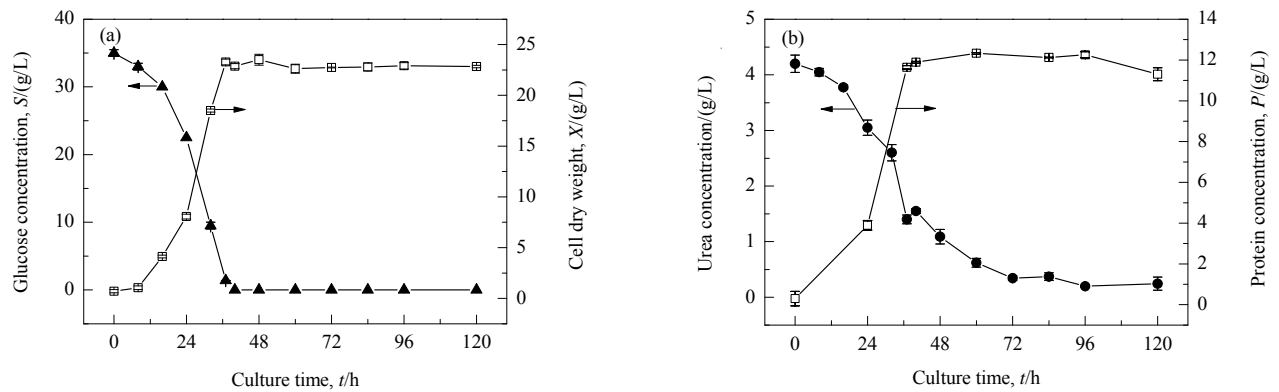


图 2 小球藻发酵过程曲线
Fig.2 The fermentation curves of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 cultivated in a 50 L fermenter

3.2 细胞生长模型

细胞生长动力学可用 Logistic 方程^[23]描述:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X (1 - X/X_m), \quad (3)$$

式中, X 为藻生物量(g/L), t 为发酵时间(h), dX/dt 为藻细胞生长速度[g/(L·h)], μ_m 为最大比生长速率(h^{-1}), X_m 为最大生物量(g/L).

对 Logistic 方程积分, 得:

$$X = X_0 X_m e^{\mu_m t} / (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}), \quad (4)$$

其中, $X_0=0.7015$ g/L 为初始藻生物量, $X_m=23.578$ g/L, $\mu_m=0.143$ h⁻¹.

用 Logistic 方程对实验值进行非线性拟合, 结果见图 3, 由图可知, 计算值与实验数据吻合较好, 相关系数 $R^2=0.968$, 小球藻生物量与发酵时间函数为

$$X = 16.53e^{0.143t} / (22.87 + 0.7015e^{0.143t}). \quad (5)$$

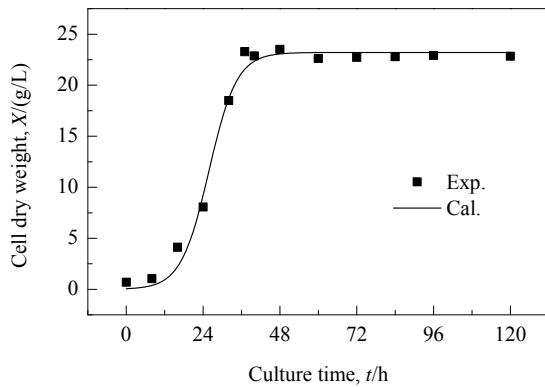


图3 小球藻细胞干重实验值与模型拟合结果的比较
Fig.3 Comparison of the experimental cell dry weight of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 with calculated values

3.3 蛋白质合成动力学模型

微生物生长与产物生成的关系可分为生长相关型(生长关联系数 $\alpha \neq 0$, 非生长关联系数 $\beta = 0$)、生长部分相关型($\alpha \neq 0$, $\beta \neq 0$)和非生长相关型($\alpha = 0$, $\beta \neq 0$). 蛋白质是小球藻细胞的重要组成成分, 细胞在生长过程中, 基质浓度会调控细胞内代谢活动, 影响糖类、油脂、色素、蛋白质等物质的合成代谢流. 根据 Ludeking-Piret^[24]方程可将蛋白质合成动力学描述为

$$dP/dt = \alpha dX/dt + \beta X, \quad (6)$$

式中, P 为蛋白质浓度(g/L).

从图 2 可知, 蛋白质的合成与细胞生长密切相关, 当细胞进入对数生长期, 体系中蛋白质浓度也迅速提高; 当微藻细胞进入平稳生长期, 蛋白质浓度已趋于较稳定(11~12 g/L). 为研究微藻细胞生长与其蛋白质合成的关系, 利用式(3), (4)和(6)建立蛋白质合成的数学模型, 经数学换算可得如下公式:

$$P = P_0 + \alpha [X_0 X_m e^{\mu_m t} / (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}) - X_0] + \beta (X_m / \mu_m) \ln[(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}) / X_m], \quad (7)$$

式中, P_0 为初始蛋白质浓度(g/L).

将 X_0 , X_m , μ_m 代入式(7), 可得:

$$P = P_0 + \alpha [16.53e^{0.143t} / (22.87 + 0.7015e^{0.143t}) - 0.7015] + 164.89 \beta \ln[(22.87 + 0.7015e^{0.143t}) / 23.578]. \quad (8)$$

用式(6)对小球藻蛋白质合成实验值进行非线性拟合, 结果见图 4, 可得 $P_0=0.298$ g/L, $\alpha=0.5086$, $\beta=0.0001$, $R^2=0.976$. β 值过小, 表明小球藻蛋白质合成与细胞生长的关系为生长相关型, 因此小球藻细胞合成蛋白质的动力学方程可表示为

$$P = 0.298 + [8.41e^{0.143t} / (22.87 + 0.7015e^{0.143t})]. \quad (9)$$

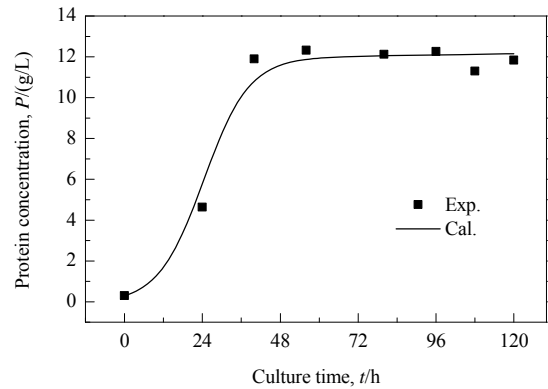


图4 小球藻蛋白质浓度实验值与模型拟合结果的比较
Fig.4 Comparison of the experimental protein concentration of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 with calculated values

3.4 基质消耗动力学模型

小球藻发酵过程中, 葡萄糖作为唯一碳源主要用于产物合成、细胞生长和维持能量代谢. 葡萄糖的消耗可用 Logistic 方程和 Ludeking-Piret 方程描述:

$$-dS/dt = (dX/dt) / Y_{X/S} + (dP/dt) / Y_{P/S} + mX. \quad (10)$$

将式(3), (6), (7)和(10)进行换算并积分, 可得:

$$S = S_0 - (Y_{X/S}^{-1} + \alpha / Y_{P/S} - 0.298) [X_0 X_m e^{\mu_m t} / (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t})] - (X_m / \mu_m) (\beta / Y_{P/S} + m - 0.298) \ln[(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}) / X_m], \quad (11)$$

其中, S 为葡萄糖浓度(g/L), S_0 为葡萄糖初始浓度(g/L), $Y_{X/S}$ 为葡萄糖的细胞得率(g/g), $Y_{P/S}$ 为葡萄糖的蛋白质得率(g/g), m 为维持常数.

将所得 X_0 , X_m , μ_m , α , β , P_0 值代入式(11), 得:

$$S = S_0 - (Y_{X/S}^{-1} + 0.5086 / Y_{P/S} - 0.298) [8.41e^{0.143t} / (22.87 + 0.7015e^{0.143t})] - (164.89m - 49.13) \ln[(22.87 + 0.7015e^{0.143t}) / 23.578]. \quad (12)$$

将发酵过程中葡萄糖浓度用式(12)进行非线性拟合, 结果见图 5, 方程为

$$S = 35 - [26.54e^{0.143t} / (22.87 + 0.7015e^{0.143t})] + 6.25 \ln[(22.87 + 0.7015e^{0.143t}) / 23.578], \quad (13)$$

其中, $S_0=35$ g/L, $Y_{X/S}=0.588$ g/g, $Y_{P/S}=0.29$ g/g, $m=0.26$,

计算值与实验结果拟合较好。

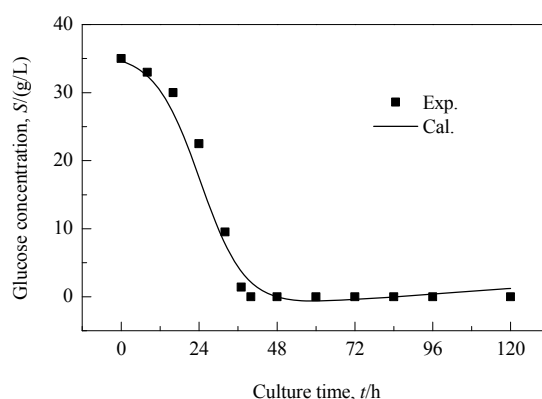


图 5 葡萄糖浓度实验值与模型拟合结果的比较

Fig.5 Comparison of the experimental glucose concentration of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 with calculated values

3.5 补料工艺

Wu 等^[12]研究小球藻异养培养产叶黄素时, 根据 Ludeking-Piret 方程构建了葡萄糖消耗模型, 在初始葡萄糖浓度 36.08 g/L 的条件下, 经 107 h 培养, 微藻生物量和叶黄素量分别为 15.7 g/L 和 41.9 mg/L, $m=0.001$, 表明葡萄糖主要用于小球藻细胞生长及产物合成, 较少用于维持代谢需求。而本实验中, 葡萄糖消耗用于维持自身代谢的量较高($m=0.26$), 这可能是因为藻种和发酵条件不同(如葡萄糖、尿素等基质浓度)。分析葡萄糖的

细胞得率可知, 葡萄糖主要用于形成新微藻细胞。由此推断, 小球藻细胞进入平稳期前期时, 可适当补充消耗的基质, 维持微藻细胞自身的正常代谢和形成新细胞, 实现高密度培养。

基于分批发酵结果, 单一补充碳源, 研究小球藻生长与尿素、葡萄糖消耗和蛋白质合成的关系, 结果见图 6。从图可看出, 当细胞培养处于平稳生长期(36 h)时, 向体系中第 1 次补充碳源, 使其浓度由 0.6 g/L 增至 16.5 g/L, 经 5 h 培养(41 h 时), 葡萄糖浓度由 16.5 g/L 增至 8.5 g/L[图 6(a)], 尿素浓度显著下降, 由 1.2 g/L 降至 0.27 g/L, 蛋白质浓度逐渐上升到 18.2 g/L[图 6(b)]。向发酵体系中再次补充碳源, 使其浓度由 8.5 g/L 增至 30.5 g/L, 随葡萄糖消耗, 微藻细胞的生长基本保持不变[图 6(a)], 但蛋白质浓度呈下降趋势[图 6(b)]。2 次补充碳源后, 总糖消耗为 76 g, 葡萄糖的细胞得率为 0.54 g/g, 接近式 (13)预测的 $Y_{X/S}=0.588$ g/g; 发酵 120 h 后, 微藻生物量仅为 40.75 g/L, 蛋白质含量为 14.78 g/L, 葡萄糖的蛋白质得率为 0.194 g/g, 显著低于模型预测的 $Y_{P/S}=0.29$ 。这可能是因为培养 48 h 后尿素耗尽[图 6(b)], 阻碍了细胞生长及蛋白质等大分子合成^[25,26]。Palabhanvi 等^[7]在小球藻发酵 60 h 后向发酵罐中补充氮源 KNO_3 , 细胞持续增长, 平均生长速率为 19.75 g/(L·d)。可见, 在小球藻异养发酵中, 需要补充足量的碳源和氮源, 才能有效形成新细胞和提高产物生成^[8], 满足高密度培养的条件。

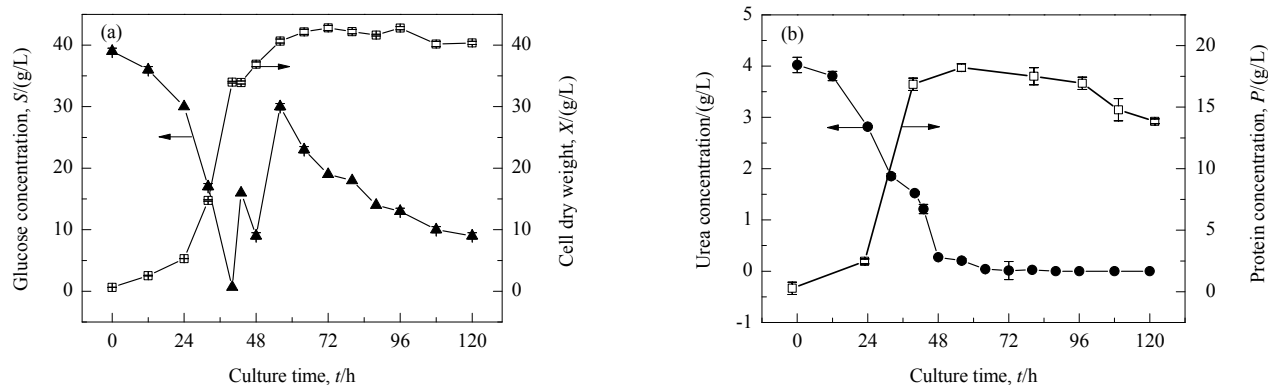


图 6 补充葡萄糖的小球藻发酵曲线

Fig.6 The fermentation curves of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 with feeding glucose in a 50 L fermenter

基于图 6 的结果, 采取如下补料策略: 葡萄糖低于 10 g/L 时补充葡萄糖, 尿素浓度低于 1 g/L 时补加尿素。由图 7 可知, 经约 36 h 的培养(2 次补糖 1 次补氮), 体系中碳源充足(约 28 g/L)而氮源即将耗尽(低于 1 g/L), 小球藻生物量呈上升趋势[图 7(a)]。可推断向发酵体系中多次补充碳源和氮源可促使细胞维持较高的生长速率, 实现其高密度发酵。发酵 36 h 后再经 4 次补糖和 4

次补氮, 培养至 96 h 时, 微藻生物量达 105 g/L。由于细胞密度较高造成供氧困难(实测溶氧仅为 1.7%)和发酵液中可能存在有害的代谢物, 影响小球藻对碳源和氮源的利用, 导致细胞生长速率减慢, 培养至 120 h 时, 细胞生物量达 105.01 g/L, 蛋白质浓度为 26.07 g/L, 葡萄糖浓度几乎为 0, 尿素浓度为 0.32 g/L[图 7(a)]。在整个培养过程中, 总糖消耗 187 g, 总尿素消耗 14.5 g, 葡

葡萄糖的细胞得率为0.56 g/g, 葡萄糖的蛋白质得率为0.14 g/g.

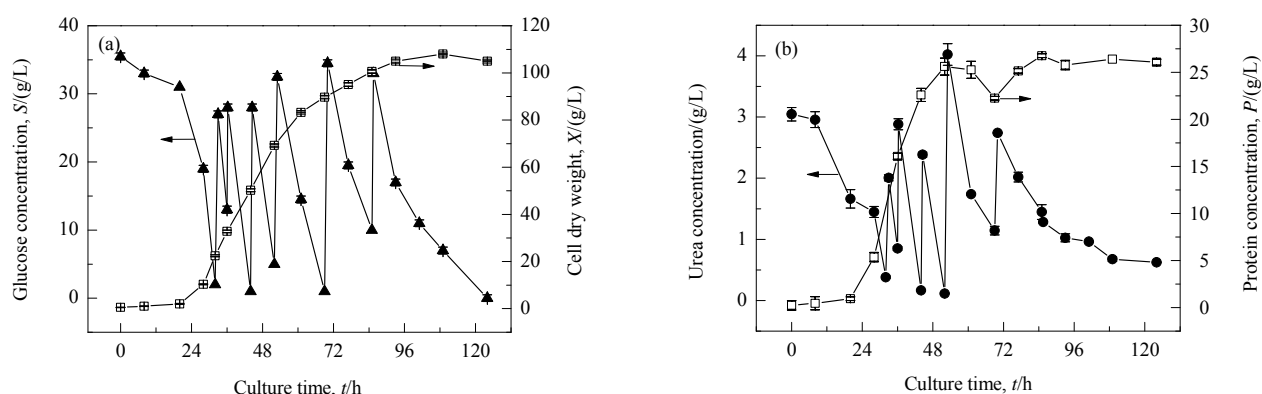


图7 补充葡萄糖和尿素的小球藻发酵曲线

Fig.7 The fermentation curves of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 with feeding glucose and urea in a 50 L fermenter

通过 50 L 发酵罐异养培养验证此补料方案, 结果见图 8. 培养 120 h 后, 细胞密度可达 106.65 g/L, 平均细胞生长速率为 0.89 g/(L·h), 葡萄糖的细胞得率为 0.56 g/g. Palabhanvi 等^[7]根据模型引导培养基进料, 用底物(硝酸)控制 pH, 培养 108 h 后加入乙酸钠促进合成脂质, 生物量可达 90.15 g/L, 生长速率为 19.75 g/(L·d). Zheng 等^[8]为提高小球藻生物量及产油率, 采用两阶段发酵培养策略: (1) 在发酵的前 48 h, 向发酵液中补充葡萄糖和 KNO₃, 提供充足的碳和氮源; (2) 48 h 后只补充葡萄糖, 不补充氮源, 继续培养至 228 h, 细胞生物量达 103.8 g/L, 油脂含量为 40.2 g/L. 本实验所得小球藻细胞干重与上述报道相似. 异养培养小球藻细胞的生长与培养基中碳源和氮源浓度密切相关, 培养基中缺少碳源和氮源会严重抑制生物量合成. 为获得高生物量, 发酵过程中应及时补充碳源和氮源.

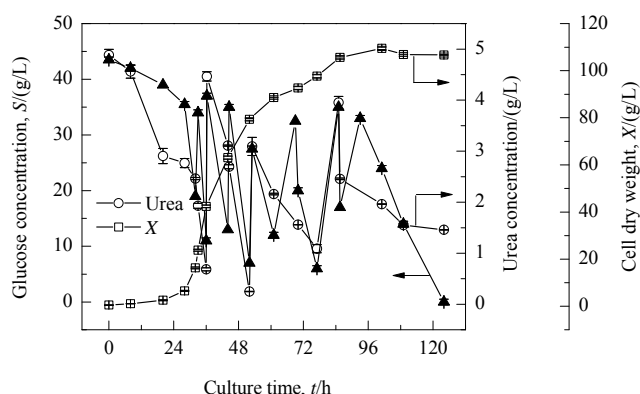


图8 50 L 发酵罐培养小球藻的细胞生长曲线

Fig.8 The cell growth curves of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 in a 50 L fermenter

3.6 相关基因表达水平

利用荧光定量 PCR 技术分析二氨基庚二酸异构酶(dapF)、柠檬酸合成酶(CS)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的基因表达情况, 结果见图 9. 由图可知, 对照样品 1 小球藻进入指数生长阶段时, 糖酵解的 G6PDH、三羧酸循环的 CS 和氨基酸代谢途径中的 dapF 三个基因表达量都较高; 而样品 2 葡萄糖、尿素消耗至较低水平时, 3 个基因表达量均下降明显, dapF、G6PDH 和 CS 的基因表达量分别是对照组的 0.48、0.58 和 0.46 倍, 表明较低的葡萄糖、尿素浓度会限制基因表达. 样品 3 补料后 2 h, 三个基因的表达量迅速升高, 表明在指数生长阶段, 培养基中存在适宜浓度的葡萄糖和尿素, 有利于 3 种基因的表达. 丁小云等^[27]在培养假丝酵母过程中补充葡萄糖, 补料后 G6PDH 酶活力明显下降, 更多的碳流量向 EMP 途径转移. 孙启星等^[28]在补料阶段流加有机氮源(酵母粉), 能有效提高 G6PDH 和 CS 酶活性, 促进了细胞的二次生长, 提高了 ε-聚赖氨酸产量. 本实验在该阶段补充葡萄糖和尿素, 使微藻细胞的 dapF、G6PDH 和 CS 的基因表达量均有提高, 目前还未见报道, 原因有待通过蛋白质组学、转录组学、代谢组学等技术进一步研究. 样品 4 和 5 发酵末期直到发酵放罐, 虽然葡萄糖和尿素浓度仍处于较高水平, 但 dapF、G6PDH 和 CS 的基因表达量均下降, 仅为对照组的 0.30、0.313 和 0.22 倍. 原因可能是, 一方面, 发酵末期细胞密度较大, 发酵液溶氧偏低及发酵过程中积累的很多细胞分泌物产生了毒性, 抑制了小球藻细胞生长; 另一方面, 藻细胞生长进入了衰亡期, 细胞老化, 大部分糖代谢基因表达逐渐减少, 相关酶活降低^[29].

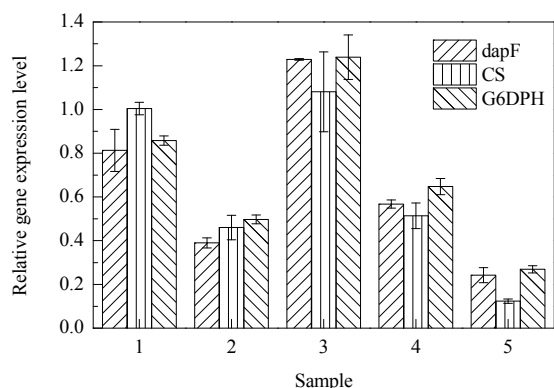


图9 小球藻发酵不同时间段所取样品的 dapF, G6DPH 和 CS 的基因表达量

Fig.9 The relative gene express levels of dapF, G6DPH and CS in different periods of *Chlorella* sp. MBFJNU-17 cultivation

4 结论

建立了细胞生长、蛋白质合成和葡萄糖消耗动力学模型,采用补料策略高密度发酵培养小球藻,测定了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)、二氨基庚二酸异构酶(dapF)和柠檬酸合成酶(CS)的基因表达量,分析了基质对小球藻细胞代谢的影响,得到以下结论:

(1) Logic 和 Ludeking-Piret 动力学模型能较好地拟合实验数据,可用于描述小球藻分批培养细胞生长和蛋白质合成过程。根据 Logic 和 Ludeking-Piret 动力学模型构建的基质消耗动力学模型也能很好地拟合分批发酵过程中葡萄糖的消耗。

(2) 发酵 30 h 时向体系中补碳源 6 次共 151.5 g、补氮源 5 次共 10.5 g,培养至 120 h 时,细胞密度达 105.01 g/L,小球藻平均细胞生长速率为 0.89 g/(L·h),葡萄糖的细胞得率为 0.56 g/g。

(3) 补料发酵过程中,小球藻细胞的 dapF, G6PDF 和 CS 基因的表达与细胞所处的生长周期和体系中葡萄糖和尿素浓度存在相关性。

参考文献:

- [1] Krienitz L, Huss V A, Bock C. *Chlorella*: 125 Years of the Green Survivalist [J]. Trends Plant Sci., 2015, 20(2): 67-69.
- [2] Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez O A, Martínez A. Heterotrophic Cultivation of Microalgae: Production of Metabolites of Commercial Interest [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2017, 92(5): 925-936.
- [3] 李雄, 王伟良, 黄建科. 微藻规模化培养技术研究进展及产业化概况 [J]. 生物产业技术, 2016, (3): 7-13.
Li X, Wang W L, Huang J K. Research Progress of the Microalgae Scale—Cultivation and the Industrialization [J]. Biotechnology & Business, 2016, (3): 7-13.
- [4] Ogbonna J C, Moheimani N R. Potentials of Exploiting Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae [J]. Biomass and Biofuels from Microalgae, 2015, 2(9): 45-61.
- [5] Wang J, Yang H, Wang F. Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 172(7): 3307-3329.
- [6] Ogbonna J C, McHenry M P. Culture Systems Incorporating Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae [J]. Biomass and Biofuels from Microalgae, 2015, 2(9): 63-74.
- [7] Palabhanvi B, Muthuraj M, Mukherjee M, et al. Process Engineering Strategy for High Cell Density-Lipid Rich Cultivation of *Chlorella* sp. FC2 IITG via Model Guided Feeding Recipe and Substrate Driven pH Control [J]. Algal Research, 2016, 16: 317-329.
- [8] Zheng Y, Li T, Yu X, et al. High-density Fed-batch Culture of a Thermotolerant Microalga *Chlorella sorokiniana* for Biofuel Production [J]. Appl. Energy, 2013, 108(8): 281-287.
- [9] Singhasuwan S, Choorit W, Sirisansaneeaykul S, et al. Carbon-to-nitrogen Ratio Affects the Biomass Composition and the Fatty Acid Profile of Heterotrophically Grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for Biodiesel Production [J]. J. Biotechnol., 2015, 216(23): 169-177.
- [10] 何勇锦, 柯汉伟, 陈兰孙, 等. 粘红酵母 RG 发酵产油脂动力学模型的构建 [J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2014, 30(3): 93-99.
He Y J, Ke H W, Chen L S, et al. Studies on the Fermentation Kinetics Models for the Lipid Production by *Rhodotorula glutinis* RG [J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2014, 30(3): 93-99.
- [11] Sachdeva N, Kumar G D, Gupta R P, et al. Kinetic Modeling of Growth and Lipid Body Induction in *Chlorella pyrenoidosa* under Heterotrophic Conditions [J]. Bioresour. Technol., 2016, 218: 934-943.
- [12] Wu Z Y, Shi C L, Shi X M. Modeling of Lutein Production by Heterotrophic *Chlorella* in Batch and Fed-batch Cultures [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2007, 23(9): 1233-1238.
- [13] 周德庆. 微生物学教程, 第 2 版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 101-121.
Zhou D Q. A Tutorial in Microbiology, 2nd Ed. [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 101-121.
- [14] 陶永新, 张磊, 郭丽, 等. 草菇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因及其可变剪接体的克隆与表达量分析 [J]. 菌物学报, 2015, 34(4): 724-733.
Tao Y X, Zhang L, Guo L, et al. Cloning and Expression Analysis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene and Alternative Splicing Variant in *Volvariella Volvacea* [J]. Mycosystema, 2015, 34(4): 724-733.
- [15] 叶思诚, 姚小华, 王开良, 等. 油茶柠檬酸合成酶(CS)基因的克隆和表达分析 [J]. 植物研究, 2016, 36(4): 556-564.
Ye S C, Yao X H, Wang K L, et al. Cloning and Expression Analysis of Citrate Synthase (CS) Gene in *Camellia Oleifera* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2016, 36(4): 556-564.
- [16] Ning H, Zhang Y, Ling H, et al. Cloning and Expression Analysis of a Diaminopimelate Epimerase Gene in Sugarcane [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(11): 2200-2208.
- [17] 李兴武, 李元广, 沈国敏, 等. 普通小球藻异养-光自养串联培养的培养基 [J]. 过程工程学报, 2006, 6(2): 277-280.
Li X W, Li Y G, Shen G M, et al. Medium for Culturing *Chlorella*

- vulgaris* with Sequential Heterotrophic–Autotrophic Model [J]. Chin. J. Process Eng., 2006, 6(2): 277–280.
- [18] 任婷月, 周万里, 张利群, 等. 一种检测葡萄糖氧化酶活力的新方法 [J]. 食品与发酵工业. 2015, 41(1): 212–215.
Ren T Y, Zhou W L, Zhang L Q, et al. The New Technology for Detecting Glucose Oxidase Activity [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(1): 212–215.
- [19] 中华人民共和国卫生部. 国家食品安全标准: 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5-2010 [S].
The Minister of Health of the People's Republic of China. National Food Safety Standard: Determination of Protein in Foods: GB 5009.5-2010 [S].
- [20] Liang S, Zhu M, Meng H, et al. Heterotrophic Mass Cultures of *Chlorella vulgaris* with Glucose Feeding in Fermenters [J]. Journal of South China University of Technology, 2000, 28(12): 66–70.
- [21] Fan J, Cui Y, Wan M, et al. Lipid Accumulation and Biosynthesis Genes Response of the Oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under Three Nutrition Stressors [J]. Biotechnol. Biofuels, 2014, 7(1): 17–21.
- [22] 王岁楼, 李志. 微生物动力学模式及其在工业发酵中的应用 [J]. 工业微生物, 1995, (1): 30–32.
Wang S L, Li Z. Microbial Kinetics Model and Application in Industrial Fermentation [J]. Industrial Microbiology, 1995, (1): 30–32.
- [23] Keating K A, Cherry S. Use and Interpretation of Logistic Regression in Habitat-selection Studies [J]. J. Wildl. Manage., 2004, 68(4): 774–789.
- [24] Luedeking R, Piret E L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation [J]. Journal of Biochemical & Microbiological Technology & Engineering, 2000, 1(4): 393–412.
- [25] Xie T, Xia Y, Zeng Y, et al. Nitrate Concentration-shift Cultivation to Enhance Protein Content of Heterotrophic Microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation Strategy [J]. Bioresour. Technol., 2017, 233: 247–255.
- [26] Chia M A, Lombardi A T, Da G G M M, et al. Combined Nitrogen Limitation and Cadmium Stress Stimulate Total Carbohydrates, Lipids, Protein and Amino Acid Accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) [J]. Aquat. Toxicol., 2015, 160: 87–95.
- [27] 丁小云, 诸葛斌, 方慧英, 等. 产甘油假丝酵母补料发酵中的甘油合成衰减 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 791–796.
Ding X Y, Zhuge B, Fang H Y, et al. Glycerol Synthesis Attenuation of *Candida glycerinogenes* in Fed-batch Fermentation [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5): 791–796.
- [28] 孙启星, 陈旭升, 任喜东, 等. 基于 pH 调节和有机氮源流加调控补料分批发酵过程提高 ϵ -聚赖氨酸产量 [J]. 生物工程学报, 2015, 31(5): 752–756.
Sun Q X, Chen X S, Ren X D, et al. Enhanced ϵ -Poly-L-lysine Production through pH Regulation and Organic Nitrogen Addition in Fed-batch Fermentation [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(5): 752–756.
- [29] Ren X, Chen J, Deschênes J S, et al. Glucose Feeding Recalibrates Carbon Flux Distribution and Favours Lipid Accumulation in *Chlorella protothecoides* through Cell Energetic Management [J]. Algal Research, 2016, 14: 83–91.