

螺旋藻细胞培养与光能利用的关系

曾文炉, 李浩然, 蔡昭铃, 欧阳藩

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 对钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis* Geitler) 细胞培养体系的光衰减以及连续培养条件下藻细胞生长对光能的利用特性进行了分析, 结果表明: 改进的 Lambert-Beer 定律 $I = I_0 \exp(-\alpha d)$ 可较好地描述细胞浓度及光程对光衰减的综合影响; 引入平均光强和细胞平均比消光量概念, 借鉴 Monod 方程形式, 较好地描述了它们与比生长速率之间的关系, 并求得最大比生长速率 μ_m 、光强半饱和参数 k_1 、光能维持系数 m 和得率系数 Y_G 分别为 $\mu_m = 1.75 / d$, $k_1 = 1.453 \times 10^3 \text{ lx}$, $m = 4.188 \times 10^{-2} \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{OD}_{560} \cdot \text{h})$, $Y_G = 3.637 \times 10^{-3} (\text{OD}_{560} \cdot \text{cm}^2)/\text{mW}$ 。

关键词: 光衰减; 螺旋藻; 平均光强; 光能维持系数; 光能得率系数; Lambert-Beer 定律

中图分类号: S968.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)03-0007-04

The relationship between *Spirulina platensis* Geitler growth and its light utilization ZENG Wen-lu, LI Hao-ran, CAI Zhao-ling, OUYANG Fan (State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(3): 7-10

Abstract: The characteristics of light attenuation and light utilization by *Spirulina platensis* Geitler cells were investigated under continuous culture conditions. It was found that the adapted Lambert-Beer law could well simulate synthetic influences of cell concentration and optical length on light attenuation. Two useful concepts, average irradiance and specific light energy utilization rate, were introduced to describe the relationship between cells growth and light utilization by means of the Monod type equation. Based on the experimental data, four parameters, the maximum specific growth rate μ_m , the half light-saturation constant k_1 , the light maintenance coefficient m , and light yield coefficient Y_G are gained respectively $\mu_m = 1.75 / d$, $k_1 = 1.453 \times 10^3 \text{ lx}$, $m = 4.188 \times 10^{-2} \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{OD}_{560} \cdot \text{h})$, $Y_G = 3.637 \times 10^{-3} (\text{OD}_{560} \cdot \text{cm}^2)/\text{mW}$.

Key words: light attenuation; *Spirulina platensis* Geitler; average light intensity; light maintenance coefficient; light yield coefficient; Lambert-Beer law

螺旋藻 (*Spirulina* sp.) 是一种螺旋状、不分枝的丝状微藻。含有丰富的蛋白质、维生素、多种不饱和脂肪酸以及多种酶类和微量元素等生理活性物质^[1], 具有极高的营养价值和医疗保健功效, 因而日益受到世界各国的广泛重视, 成为研究和开发的热点。据统计, 目前国际上共有 100 多家螺旋藻生产企业, 年产量为 2 000 t 左右^[2]; 其中我国有螺旋藻生产企业 80 多家, 培养面积超过 100 hm², 年产 800 t 左右, 约占世界总产量的 2/5。

经过多年实践, 人们虽然已在螺旋藻引种驯化、代谢调控和规模培养等方面积累了相对丰富的经验^[3-5], 但工业生产上还普遍存在着培养效率低下、产品成本偏高等诸多问题。原因之一是培养过程中细胞对光能的利用效率偏低。

作为光合作用的主要基质之一, 光能的供应及

其被藻细胞利用的状况与微藻工业化培养效率密切相关: 一方面, 光强过高或细胞浓度过低, 将产生光抑制现象, 导致光能不能被充分利用; 另一方面, 光强过弱或细胞浓度过高, 将造成光限制现象, 此时细胞生长所需的光能将不能得到适时的满足。这两种情况都制约着培养效率的提高和细胞增长潜能的发挥。

本文主要研究了螺旋藻培养液的光能衰减特性及细胞对光能的吸收与利用行为, 以期对光生物反应器的设计和提高光能利用率提供相关实验依据。

收稿日期: 2001-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29776044)

作者简介: 曾文炉(1969-), 男, 江西玉山人, 在读博士研究生, 主要从事生化工程研究。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis* Geitler), 由烟台大学生生化工程研究所提供。所用试剂均为市售国产分析纯或化学纯。培养基为 Zarrouk 培养基^[6]。

1.2 测试仪器

环地牌 FGH-1 型光合有效辐射计(北京师范大学光电仪器厂); JC-302 型数字式 pH 计(北京创业仪器厂); DU-Series 7000 型分光光度计(美国 Beckman 公司); 501 型超级恒温器(上海县实验仪器厂)。

1.3 培养装置

15 L 内循环气升式光反应器主要由罐体、气体提升管、热交换装置、气体分布器、内外光源和循环装置等构件组成。工作体积 13 L。罐体直径 182 mm, 高 1 000 mm, 内导流筒直径 131 mm, 高 600 mm。以压缩空气为动力使培养液循环。

1.4 连续培养及实验条件

在 15 L 内循环气升式光反应器中进行。实验条件为: 藻液体积 12 L, 反应器表面光强 2.755 mW/cm², 温度 (30 ± 1) °C, 通气量 230 L/h。先进行批式培养, 当细胞浓度达到一定值时, 启动连续培养。每隔 12 h 取样一次, 测定细胞浓度。当连续 36 h 测得的 OD₅₆₀ 值波动范围在 ±5% 内, 即认为已达到稳态。

1.5 检测与分析方法

1.5.1 细胞生物量浓度测定 以 Zarrouk 培养液为对照, 在分光光度计上测定藻液在 560 nm 处的光吸收值(OD₅₆₀), 依此反映藻细胞生物量浓度。

1.5.2 光强及其衰减测定 光强由光合有效辐射计测定(入射光强为 2.75 mW/cm²)。光能衰减量测定: 在一可变换光程的矩形玻璃容器中, 以日光灯为光源, 测定光强在通过不同光程、不同浓度螺旋藻液后的变化情况, 依此计算光衰减量。

2 结果与讨论

2.1 光强在空白培养液中的“增益”现象

一般认为, 绝大多数透过性介质都会因其对光能的吸收而产生光衰减现象。然而, 在本实验中, 当入射光透过 Zarrouk 培养液后, 随着光程的增大, 测

得透过光强反倒比入射光($I_0 = 2\ 625$ lx)强度大(图 1)。这种空白培养液产生的光强“增益”现象, 可能是由于水和培养液所含的金属离子以及玻璃镜片本身对光的反射、散射和衍射引起的。根据能量守恒原理, 由于溶液分子对光能的吸收, 透过光强虽然表面上有所增加, 但其总能量必定有所损耗, 当溶液中含有有色组分(如藻细胞)时, 更应如此。

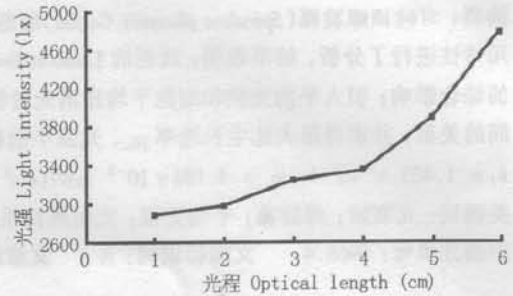


图 1 空白培养液对光强的“增益”现象

Fig. 1 The synergism of blank zarrouk culture medium to light intensity

2.2 光强在螺旋藻液中的衰减

光能作为光合作用的能量底物, 直接影响着微藻细胞的生长。为考察细胞生长与光强的关系, 首先研究了不同光程和不同细胞浓度螺旋藻液的光强衰减情况, 结果如图 2、图 3 所示。从中可以看出, 它们对光强衰减的影响具有相似的趋势, 随着光程或细胞浓度的增大, 透过藻液后的光强急剧减小。

为综合反映细胞浓度和光程对光强衰减的影响, 取上述任一图形中的所有实验数据, 以改进的 Lambert-Beer 定律^[7], 即 $I = I_0 \exp^{-(\alpha x)}$ 对其进行拟合(I 和 I_0 分别表示透过光强和入射光强; α 和 L 分别表示比消光系数和光程; x 表示藻液浓度, 以 OD₅₆₀ 表示, 下同), 结果见图 4。从中可以看出, 模型拟合值与实测数据点吻合较好, 说明改进的 Lambert-Beer 衰减模型可较好地描述光程和细胞浓度对光能衰减的协同影响作用。

2.3 螺旋藻细胞生长与光强的关系

2.3.1 螺旋藻液的平均光强 I_{av} 由前可知, 由于光能在藻液中具有指数衰减特征, 其在光反应器中的“浓度”不象一般的营养性基质, 是非均一化的。因此, 藻液的总体受光状况不能以简单的算术平均值来求算, 而需先经均化处理。

Fernandez^[7] 和 Rabe^[8] 定义平均光强(I_{av})为

$$I_{av} = \frac{1}{V} \int I dv$$

取反应器中一立方体微元,设受光面积为 A ,沿光路方向距离为 L ,则

$$dv = AdL$$

因而

$$I_{av} = \frac{1}{V} \int Idv = \frac{1}{V} \int IAdL = \frac{A}{V} \int IdL$$

将改进的 Lambert-Beer 公式代入,得

$$I_{av} = \frac{A}{V} \int IdL = \frac{AI_0[1 - \exp(-\alpha x)]}{\alpha x}$$

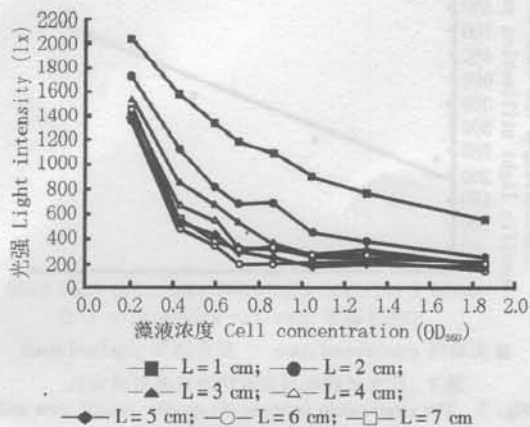


图 2 不同光程相同细胞浓度的藻液对光强的衰减
Fig. 2 Light attenuation as a function of optical length under same cell concentration

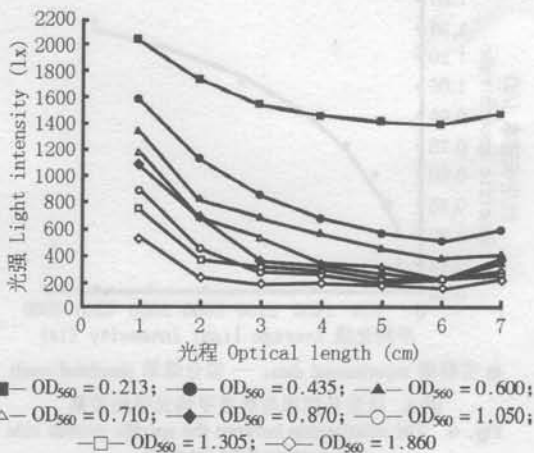


图 3 相同光程不同细胞浓度的藻液对光强的衰减
Fig. 3 Light attenuation as a function of cell concentration under same optical length

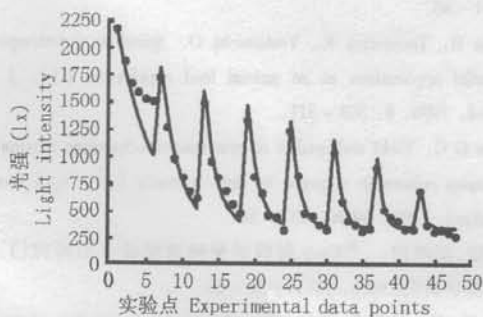


图 4 光强衰减实验值与拟合值的比较
Fig. 4 Comparison and verification of experimental data and simulated results

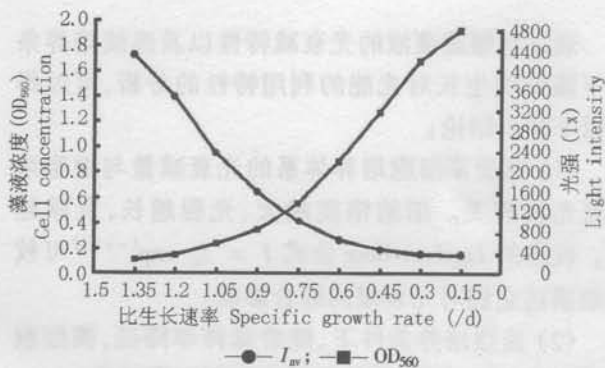


图 5 比生长速率与细胞浓度及藻液平均光强的关系
Fig. 5 Relationship among specific growth rate, cell concentration and average light intensity

为阐明螺旋藻细胞生长对光能的需求特性,根据比生长速率与平均光强之间的曲线形状,借鉴 Monod 方程,即 $\mu = \frac{\mu_m I_{av}}{k_1 + I_{av}}$, 对它们进行关联。从拟合情况来看(图 6),上述模型能够很好地反映比生长速率与平均光强之间的关系。相应的实验参数分别为 $\mu_m = 1.75 /d$ 和 $k_1 = 1.453 \times 10^3 \text{ lx}$, 即最大比生长

速率为 $1.75/d$; 而细胞生长的光能半饱和常数为 $1.453 \times 10^3 \text{ lx}$, 它表示当光强为 $1.453 \times 10^3 \text{ lx}$ (约为 0.463 mW/cm^2) 时细胞的比生长速率达到最大比生长速率的一半。

将前述平均光强定义式进行变换,得

$$\frac{A}{V} = \frac{I_0[1 - \exp(-\alpha x)]}{x} = I_{av} \alpha$$

由此可计算得到反应器中藻液的平均光强。

2.3.2 细胞生长的光能半饱和和常数 k_1 、维持系数 m 及得率系数 Y_c 螺旋藻细胞在光反应器中的恒化培养结果如图 5 所示。可以看出,在一定的范围内,随着稀释率降低,藻细胞浓度逐渐上升,而由上述公式计算得到的平均光强则逐渐减弱。

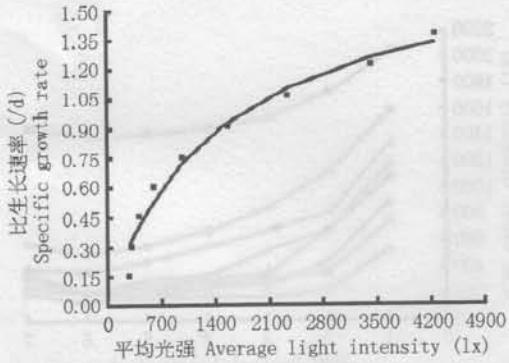
上式的物理意义为藻液的平均比消光量,即细胞生长对光能的平均比消耗速率,它表示单位质量(以 OD_{500} 表示)的细胞所消耗(衰减)的入射光能量。

参照基质比消耗速率概念,细胞比生长速率与平均比消光量之间在一定的范围内将存在下列线性关系,即 $I_{av} \alpha = \frac{\mu}{Y_G} + m$, 采用最小二乘法拟合有关

实验数据(结果见图7),可得螺旋藻细胞生长的光能维持系数 m 以及得率系数 Y_G 分别为:

$$m = 1.209 \times 10^2 \text{ lx}/(\text{OD}_{500} \cdot \text{h}) \approx 4.188 \times 10^{-2} \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{OD}_{500} \cdot \text{h})$$

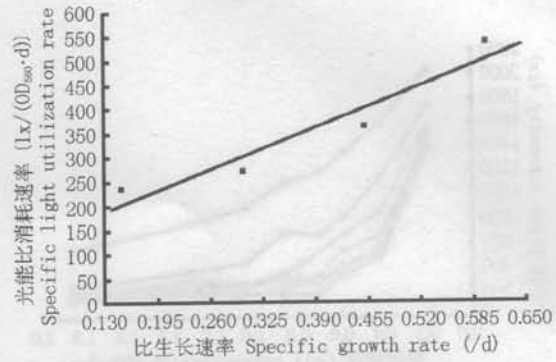
$$Y_G = 1.489 \times 10^{-3} \text{ OD}_{500}/\text{lx} \approx 3.637 \times 10^{-3} (\text{OD}_{500} \cdot \text{cm}^2)/\text{mW}$$



■ 实验值 experimental data; — 拟合结果 simulated result

图6 比生长速率与藻液平均光强的关系

Fig. 6 The relationship between the specific growth rate and average light intensity



■ 实验值 experimental data; — 拟合结果 simulated result

图7 比生长速率与光能比消耗速率的关系

Fig. 7 The relationship between the specific growth rate and the specific light utilization rate

3 结论

通过对螺旋藻液的光衰减特性以及连续培养条件下藻细胞生长对光能的利用特性的分析,可以得到以下初步结论:

(1) 螺旋藻细胞培养体系的光衰减量与细胞浓度及光程有关。细胞浓度越大、光程越长,衰减越甚。改进的 Lambert-Beer 公式 $I = I_0 \exp(-\alpha \times L)$ 可较好地描述它们对光衰减的综合影响。

(2) 连续培养条件下,随着稀释率降低,藻细胞浓度逐渐上升,而藻液的平均光强则逐渐减弱。

(3) 为准确反映螺旋藻细胞培养体系的总体受光情况,考虑到光衰减的非线性,引入了平均光强和藻体细胞平均比消光量概念以探讨比生长速率与它们之间的关系。求得螺旋藻细胞的最大比生长速率 μ_m 、光强半饱和参数 k_1 、光能维持系数 m 和得率系数 Y_G 分别为 $\mu_m = 1.75 / \text{d}$, $k_1 = 1.453 \times 10^3 \text{ lx}$, $m = 4.188 \times 10^{-2} \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{OD}_{500} \cdot \text{h})$, $Y_G = 3.637 \times 10^{-3} (\text{OD}_{500} \cdot \text{cm}^2)/\text{mW}$ 。

参考文献:

- [1] Birkhauser V. Mass production of *Spirulina* [J]. *Experientia*, 1982, 38: 41-46.
- [2] Amha B, Toshimitsu K, Yoshimichi O. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential applications as an animal feed supplement [J]. *J Appl Phycol*, 1996, 8: 303-311.
- [3] Tadros G G. Yield and quality of cyanobacteria-*Spirulina* maximum in continuous culture in response to light intensity [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1993, 39/40: 337-347.
- [4] 龚小敏, 胡鸿钧. $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线诱变钝顶螺旋藻的研究 [J]. *武汉植物学研究*, 1996, 14(1): 58-66.
- [5] Singh Y, Kumar H D. Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in cobalt and iodine-enriched media [J]. *J Appl Bacteriol*, 1994, 76(2): 149-154.
- [6] Becker E W. *Micro-algal Biotechnology* [M]. London: Cambridge University Press, 1994. 9-41.
- [7] Fernandez F G A, Gamacho F G, Pérez J A S, et al. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the micro-algal mass culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55(5): 701-714.
- [8] Rabe A E. Mean light intensity — a useful concept in correlating growth rates of dense cultures of microalgae [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1962, 4: 377-390.

(责任编辑:惠红)