

# 聚球藻 7002 在光生物反应器中的光自养培养

康瑞娟 周文齐 蔡昭铃

(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)

施定基

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

**摘要** 通过对聚球藻 7002 在光生物反应器中的培养,研究了光强在聚球藻 7002 培养液中的衰减规律,得到了培养过程光强随藻细胞浓度和光程距离变化的关系式,即  $I = I_0 \exp[-(-0.0239 + 0.0777 OD_{750}) \cdot L]$  并对培养过程特性及培养温度、外加 CO<sub>2</sub> 浓度和光照强度对藻细胞生长的影响进行了较为详细的研究,得到了反应器中较为适宜的聚球藻 7002 的培养条件,藻细胞培养密度达到 3.4g/L(干重),体积产率达到 0.57g/(L·d)的较高水平。

**关键词** 聚球藻 7002,光生物反应器,光自养培养,光衰减

中图分类号 Q949 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0618-05

聚球藻 7002 系单细胞海洋蓝藻<sup>[1]</sup>。由于海洋微藻中含有许多特殊的生物活性物质,尤其是转基因蓝藻的构建成功,使得海洋微藻的培养成为了研究热点。作为主要的转基因微藻的宿主,聚球藻 7002 的培养具有现实意义和应用前景。本研究在内外光源相结合的内环流气升式光生物反应器中,进行了聚球藻 7002 的光自养培养实验,考察了培养过程中环境条件变化及对藻细胞生长的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

聚球藻 7002(*Synechococcus sp.* PCC7002)由中科院植物所提供。

### 1.2 设备及仪器

**1.2.1** SZX-B 型水浴恒温摇床(哈尔滨东方电控开关厂),日光灯提供光照。

**1.2.2** 种子罐:配置外光源的 5L 的磁力搅拌通气培养罐。

**1.2.3** 气升式光生物反应器:由罐体、气体提升管、内光源密封管、热交换装置、气体分布器、内外光源等部分组成。罐体、气体提升管和内光源密封管由耐热玻璃制作,可进行蒸汽灭菌。内外光源以日光灯管提供。罐体直径 182mm,高 1000mm,提升管直径 131mm,高 600mm。内光源管直径 45mm。反应器的照光面积与体积的比值为 50m<sup>-1</sup>。总体积为

15L 工作体积 13L。可通过光源管位置及光源管数量调节光强。提升管底部设有可替换的不锈钢烧结板制成的圆形气体分布器。实验装置如图 1 所示。

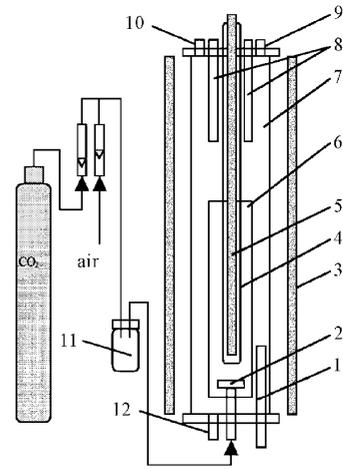


图 1 光生物反应器结构图

Fig.1 Diagram of the airlift photobioreactor

1. Heater or cooler 2. Air distributor 3. External light source ; 4. Internal light source envelop ; 5. Internal light source 6. Air-lift column ; 7. Photobioreactor ; 8. pH, DO probes ; 9. Feeding and inoculation port ; 10. Air exhaust ; 11. Air-CO<sub>2</sub> mixing chamber ; 12. Sample or harvest

**1.2.4** YQ-W-Ⅱ 溶氧测控仪器:天津轻工业学院仪器厂 ; 721 分光光度计:国营东方仪器厂 ; FGH-1 型光合有效辐射计:北京师范大学光电仪器厂 ; 302

Digital pH 计 北京创业仪器厂。

### 1.3 方法

**1.3.1 摇床培养** 配制 Medium A 培养基<sup>[2]</sup>, 分装在 250mL 的三角瓶中, 每瓶装 150mL, 消毒后静置至少 8h 方可使用, 否则藻细胞会由于缺乏 CO<sub>2</sub> 而死亡。接种前加入 Vitamin B12(将 0.5mg/mL 的 Vitamin B12 注射液以无菌去离子水稀释 10 倍后, 保存在暗处, 需要时按每升 1mL 比例加入培养液中)。从平板上挑取单藻落接入 50mL 培养液中, 培养约 2 周后, 按每瓶 10mL 的接种量接入摇瓶中, 30 ± 1℃ 光照下摇床培养, 转速为 120r/min。

**1.3.2 反应器培养** 将处于对数生长期的摇瓶培养液接入种子罐中, 30℃ 光照通气培养 1 周。

在 15L 气升式反应器中加入培养基灭菌后体积为 12L, 接入 1~2L 的种液, 使接种后的 OD<sub>750</sub> 保持在 0.1 左右。同时加入一支 V<sub>B12</sub> 注射液(1mL), 通气量和补加 CO<sub>2</sub> 的量通过气体流量计控制, 光强通过反应器四周日光灯的数目来控制。温度由恒温水浴进行控制。

**1.3.3 分析检测** 培养过程中 pH, 温度, 溶氧的变化由相应的测控装置在线检测。

藻细胞的生长则通过定时取样后测定其在 678nm, 720nm, 750nm 波长下的光吸收值定量, 其中 OD<sub>750</sub> 反映藻细胞生物量的增加, 叶绿素的变化则由下列公式计算得到<sup>[3]</sup>:

$$\text{叶绿素}(\mu\text{g/mL}) = 14.96(OD_{678} - OD_{750}) - 0.61(OD_{720} - OD_{750})$$

**藻细胞干重的测定** 准确量取 10mL 藻液, 放入预先干燥恒重的小离心管中, 4000r/min 离心 15min, 弃去上清液, 以去离子水将藻细胞重新悬浮, 再次离心。去掉上清液后, 将离心管连同藻细胞一同放入烘箱内, 烘干至恒重。用分析天平称重。以上操作取 3 个平行样品。

**光衰减的测量** 在一个直径为 58mm 的杯状玻璃容器中, 以日光灯作为光源, 用光合辐射计测量光通过不同浓度的藻液、不同光程距离时的衰减情况, 藻液的深度分别为 1、2、3、4cm。入射光的初始光强为 1.80mW/cm<sup>2</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光强在光自培养体系中的衰减规律

在蓝藻光自培养过程中, 随着藻细胞浓度的增加, 反应器中光强沿光程距离的衰减加剧, 将导致光沿反应器径向距离的分布发生巨大变化, 因此, 了

解光强随藻细胞浓度和光程距离的衰减规律, 对于反应器的设计、放大及培养工艺的优化有重要的意义。实验测定了在一定的初始入射光强下, 培养体系中光强随细胞浓度及光程距离的变化, 结果如图 2 所示。

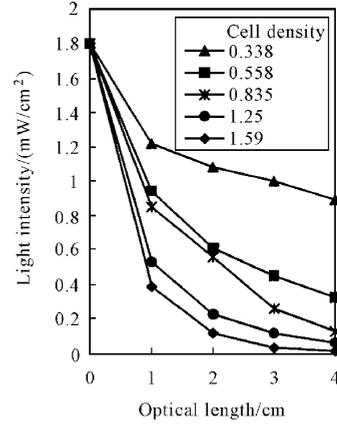


图 2 光强随聚球藻细胞密度和光程距离的衰减

Fig. 2 The change of light intensity with cell density and optical length in *Synechococcus sp.* PCC7002 culture

由图 2 可见, 在藻细胞浓度较低时, 光强随光程的衰减幅度较小, 随着藻液浓度的增加, 藻细胞对光的吸收和遮挡均增加, 光衰减幅度逐渐增大。

对上述结果作回归分析得到光自培养体系中光强随细胞浓度和光程衰减的关系式为:

$$I = I_0 \exp[-(-0.0239 + 0.0777 OD_{750}) \cdot L]$$

式中  $I$  为一定光程距离处的光强(mW/cm<sup>2</sup>),  $I_0$  为初始入射光强(mW/cm<sup>2</sup>),  $OD_{750}$  是以光密度表示的藻细胞密度,  $L$  为光程距离(cm)。实测值与上式计算值的比较见图 3。

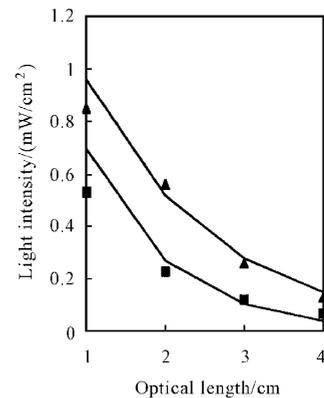


图 3 光强在聚球藻 7002 培养液中衰减的实测值与计算值的比较

Fig. 3 Comparison of calculated values with measured values of light intensity in *Synechococcus sp.* PCC7002 culture

Line Calculated values Symbol Measured values

从图中可以看出,计算值与实测值基本能够较好地吻合,误差在 10% 以内,说明所获得的关系式能够较好地描述光强在聚球藻 7002 培养液中的变化情况。

## 2.2 反应器中光自养培养过程的特性

在初始入射光强为  $4\text{mW}/\text{cm}^2$ , 培养温度为  $31^\circ\text{C}$ , 通气量为  $0.12\text{m}^3/\text{h}$ ,  $\text{CO}_2$  浓度为 1% 的条件下, 进行聚球藻 7002 的光自养培养实验, 一组典型的实验结果如图 4 所示。

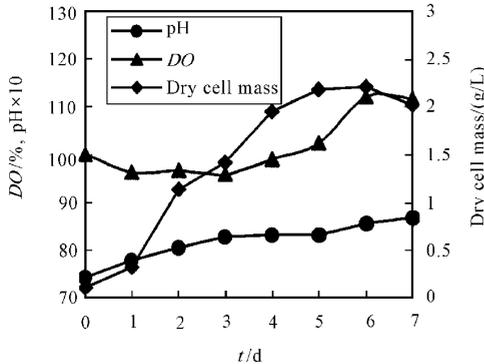


图 4 聚球藻 7002 光自养培养过程中 pH、溶氧及细胞密度随时间的变化

Fig. 4 The variations of pH, dissolved oxygen and cell mass with cultivation time in the cultures of *Synechococcus sp.* PCC 7002

由图中可以看出,聚球藻 7002 在光生物反应器中生长时,具有一般生物培养特征,均经过迟滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期。在较适宜的培养条件下,迟滞期相对很短甚至没有而直接进入对数生长期,4~7 d 可以完成一个培养周期。藻细胞的比生长速率在  $0.4\sim 0.6\text{d}^{-1}$  之间,细胞倍增时间最短仅为 6 h。在整个培养过程中,溶氧略有增加,但均维持在一个较稳定的水平,说明藻细胞光合作用产生的氧能够被有效地驱除,避免了氧积累而造成的对细胞的伤害。培养体系的 pH 值呈上升趋势,但由于通入的空气中配有适宜比例的  $\text{CO}_2$ , 这种上升趋势极为缓慢,因此不需要另加调节。

本实验所用的光生物反应器中,内外光源管之间的距离为 6 cm。由所得到的数学关系式,分别估算反应器中距外光源 1~5 cm 处内外光强的衰减比率随培养时间的变化,结果列于表 1 中。

从表 1 可以看出,虽然内光源的绝对值较小,但在距离外光源较远的区域内,尤其是细胞密度较大时,内光源的贡献在此处总光强值中占有相当大的比例。因此,在整个培养过程中,内外光源结合可以保证反应器内大部分区域处于光照区,辅之以良好的混合,可以满足藻细胞光合作用的高效进行。

表 1 反应器中距外光源不同距离处内外光源光强衰减比率 ( $I/I_0$ )

Table 1 The ratio of light intensity attenuation in different radial distance in the photobioreactor under different cell densities during the photoautotrophic cultivation process

	Radial distance/cm	Light source	1d/%	2d/%	3d/%	4d/%	5d/%
Ratio of light intensity attenuation ( $I/I_0$ )	1	External	98.5	90.96	85.64	80.90	76.8
		Internal	92.72	62.27	46.07	34.82	26.72
	2	External	97.05	82.73	73.34	65.57	58.98
		Internal	94.19	68.44	53.78	42.99	34.78
	3	External	95.57	75.26	62.81	53.1	45.3
		Internal	95.57	75.26	62.81	53.1	45.3
	4	External	94.19	68.44	53.78	42.99	34.78
		Internal	97.05	82.73	73.34	65.57	58.98
	5	External	92.72	62.27	46.07	34.82	26.73
		Internal	98.5	90.96	85.64	80.98	76.8

## 2.3 光强对藻细胞生长的影响

通过改变光源的配置来改变光强,初始入射光强分别为 (A)  $2\text{mW}/\text{cm}^2$ 、(B)  $4\text{mW}/\text{cm}^2$  和 (C)  $7.6\text{mW}/\text{cm}^2$ , 进行了平行实验。培养温度为  $35^\circ\text{C}$ , 通气量为  $0.12\text{m}^3/\text{h}$ ,  $\text{CO}_2$  浓度为 3%。结果如图 5 所示。

从图 5 中可以看到,当入射光强从  $2\text{mW}/\text{cm}^2$

增加至  $4\text{mW}/\text{cm}^2$  时,藻细胞的生长速率大幅度提高,藻细胞密度也增加将近 1 倍。而当光强继续增加至  $7.6\text{mW}/\text{cm}^2$  时,培养结果并未显示明显的优越性,相反的,在培养初期,其生长速度还低于  $4\text{mW}/\text{cm}^2$  时的结果。从图 5b 中的不同光强下叶绿素随时间的变化曲线可以看出,当光强为  $7.6\text{mW}/\text{cm}^2$  时,培养前期,叶绿素的含量比其他条件下少,

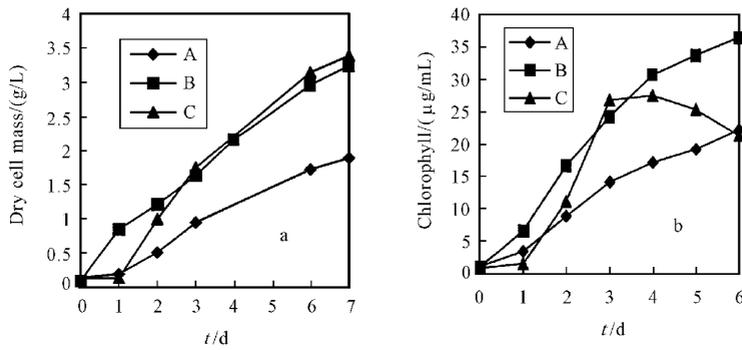


图5 光强对藻细胞生长的影响,分别是(a)细胞密度(b)叶绿素随时间的变化

Fig.5 The effects of variable light intensity on the growth of *Synechococcus sp.* PCC 7002 (a) Dry cell mass (b) Chlorophyll

在培养进行了4 d后,叶绿素含量开始下降,表明此条件下的光强超过了藻细胞培养的最适值,表现为光抑制现象。本实验条件下,入射光强为 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 较为适宜。

#### 2.4 温度对藻细胞生长的影响

在入射光强为 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ ,通气量为 $0.12\text{m}^3/\text{h}$ , $\text{CO}_2$ 浓度为1%的条件下,分别于 $27^\circ\text{C}$ 、 $31^\circ\text{C}$ 、 $35^\circ\text{C}$ 和 $39^\circ\text{C}$ 四个温度下进行培养,结果如图6所示。由实验结果可得,随着温度从 $27^\circ\text{C}$ 增加到 $35^\circ\text{C}$ ,藻细胞培养的终密度随之增加,说明温度的升高使光合作用中催化二氧化碳固定过程的酶的活性增加,导致藻细胞的光合作用效率不断增加。当温度继续增加至 $39^\circ\text{C}$ 时,藻细胞培养密度反而有所下降,说明此时已经超过了藻细胞生长的最适温度。因此,在本实验条件下 $35^\circ\text{C}$ 是较佳的培养温度。

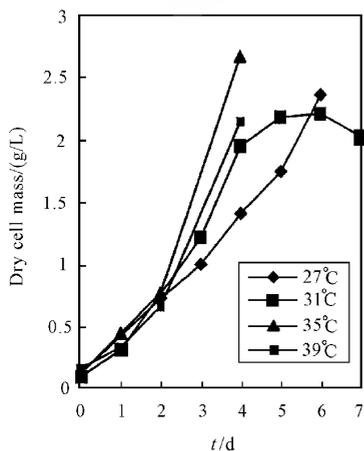


图6 不同温度对聚球藻 7002 生长的影响

Fig.6 Effects of different temperature on the growth of *Synechococcus sp.* PCC 7002

#### 2.5 $\text{CO}_2$ 浓度对生长的影响

本实验利用气体混合装置将 $\text{CO}_2$ 与空气定量混合后通入反应器中,考察不同的碳源浓度对细胞

生长的影响。本实验采用的通气量为 $0.12\text{m}^3/\text{h}$ , $\text{CO}_2$ 的含量分别是0%、1%、3%、5%、7%,在 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 的初始入射光强,培养温度为 $35^\circ\text{C}$ 条件下,进行对比培养,结果见图7。

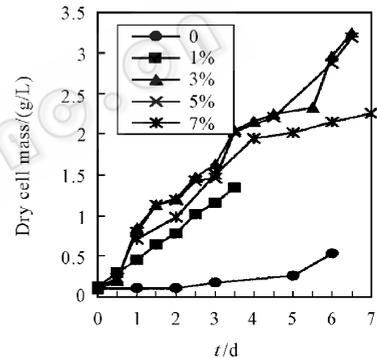


图7  $\text{CO}_2$  浓度对聚球藻 7002 藻细胞生长的影响

Fig.7 The effects of variable  $\text{CO}_2$  concentrations on the growth of *Synechococcus sp.* PCC 7002

由图中可以看到,不加 $\text{CO}_2$ 时,藻细胞生长速率低,迟滞期很长,最终藻细胞密度很小。通入1% $\text{CO}_2$ 后,细胞生长状况显著改善。生长速率成倍增加。当通入的 $\text{CO}_2$ 增加到3%时,细胞生物量有较大幅度的增加,藻细胞密度达到 $3.4\text{g}/\text{L}$ ,体积产率达到了 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。当 $\text{CO}_2$ 的浓度继续增加至5%和7%时,藻细胞生长的各种指标未见明显的增加,而且,在7%时还有显著的下降。这是由于通入 $\text{CO}_2$ 后增加了光合作用底物的浓度,从而增加了反应速率。当 $\text{CO}_2$ 含量达到最适值后,光合作用速度也达到最大值。此时再继续增大 $\text{CO}_2$ 含量,光合作用反应速率不再继续增加,反而对藻细胞的代谢起抑制作用。这种抑制作用可能是由于过量的 $\text{CO}_2$ 引起的培养液pH下降所致。当 $\text{CO}_2$ 浓度在5%以下时,培养过程中pH维持在 $7.6\sim 8.2$ 的最适范围之内,而当 $\text{CO}_2$ 浓度为7%时,pH则在 $6.3\sim 7.2$ 之

间。从细胞增殖指标可以看出,3% CO<sub>2</sub> 时,细胞终密度值为最大。由此可见,通入空气中 CO<sub>2</sub> 浓度为3%时,对于细胞的生长是较为合适的。

### 3 结论

本实验采用内外光源相结合的气升式反应器,对聚球藻 7002 的光自养培养条件进行了优化,确立

了较为适宜的培养条件,达到了较高的培养密度。通过对培养体系中光强衰减规律的研究,得到了一数学表达式,能够较好地描述培养过程中光强的变化。并依此比较了内外光源对反应器内各区域总光强的贡献。证明内光源的加入,可以有效地补偿外光源的不足,提高藻细胞的光合作用效率。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Fott B,藻类学,罗迪安译,上海:上海科学技术出版社,1980
- [ 2 ] Stevens SE Jr, Patterson COP, Myers J. *J Phycol* 1973 **9** 427~430
- [ 3 ] Williams J G K, Construction of Specific Mutations in photo System II Photosynthetic Reaction Center by Genetic Engineering Methods in *Synechococcus* 6803, In: *Methods in Enzymology*, Academic press, 1988, Vol. 167, pp 766~788

## Photoautotrophic Cultivation of *Synechococcus* sp. PCC7002 in Photobioreactor

KANG Rui-Juan ZHOU Wen-Qi CAI Zhao-Ling

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

SHI Ding-Ji

(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

**Abstract** The Photoautotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. PCC 7002 in a 15L-airlift photobioreactor was carried out. The changes of light intensity with cell density and optical length in the cultivation system were investigated. Based on experimental results, the light attenuation could be described by  $I = I_0 \exp[-(-0.0239 + 0.0777 OD_{750}) \cdot L]$ . The effects of the variations of light intensity, CO<sub>2</sub> concentration in gas inlet and culture temperature on the growth of cells during the cultivation process have also been studied. The optimized condition was determined and a high dry cell density of 3.4g/L was obtained. The volumetric productivity reached 0.57g/(L·d) under the optimized condition.

**Key words** *Synechococcus* sp. PCC7002 photobioreactor photoautotrophic cultivation light intensity attenuation