

钝顶螺旋藻在 LED 光电板式光生物反应器中的培养研究 *

徐明芳 李贻玲

(暨南大学生物工程系 广州 510632)

提要 分析研究了 LED 集成光电板光辐射强度对螺旋藻生物量浓度、螺旋藻比生长速率、藻光合放氧量及藻光合色素等螺旋藻生长特性的影响,并分析了 LED 集成光电板辐射红光及红、蓝组合双波长光质与冷白荧光灯光质对藻类各有效组成部分的影响。结果表明,在光辐射强度尚未达到饱和光辐射强度之前,光辐射强度决定螺旋藻的比生长速率;超过饱和光辐射强度,光合作用产氧量趋向恒定,说明螺旋藻光合器官具有光合稳定性;与冷白荧光日光灯组相比,LED 集成光电板辐射红光及红、蓝组合双波长光质非常适合螺旋藻的生长并促进细胞干重、叶绿素、藻胆蛋白的增加,在相同的光辐射强度 $[275.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$ 下,采用 LED 集成光辐射板辐射单色红光与冷白荧光日光灯光组相比,藻胆蛋白、藻细胞干重及叶绿素 a 分别增加 43.39%,98.40%,51.563%。

关键词 LED 光电板式光生物反应器,螺旋藻,螺旋藻生长特性

成功的植物细胞培养,不仅能解决天然资源匮乏,活性成分不稳定等问题,而且更重要的是为人类提供开发生物新药、食品香料色素调味品及农业杀虫剂和生物农药的有效途径,如从珍稀植物红豆杉(*Taxus*)和硬紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)细胞培

养中生产昂贵高效抗癌新药紫杉醇(Paclitaxel)及具有药用价值的天然色素紫草宁(Shikonin),从螺旋藻

* 广东省自然科学基金资助项目 980022 号。

收稿日期:2000-02-31;修回日期:2000-07-26

(*Spirulina*)、盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 及血球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 培养中获取高附加值的藻蓝蛋白、 β -胡萝卜素和虾青素 (Astaxanthin) 等。但植物细胞与微生物不论从形态结构上, 还是生理生化上都存在着一定的差别, 尤其是植物细胞独特的光合作用功能, 使得植物细胞内的多种酶需要光照的刺激和诱导, 才能合成或表现较高的生理活性^[1]。目前世界许多国家和地区都在进行光生物反应器的研制^[2], 然而大规模培养光合自养微藻及其他植物细胞, 涉及到利用最有效的光源促进生长的养殖方式问题, 而有效光源的选择和利用则是多种光生物反应器研制成功的关键所在, 因此光生物反应器的设计研究与传统发酵反应器有本质的区别而具有独特性^[3]。

1 材料与方法

1.1 实验装置

LED (Light emitting diodes) 光电板式光生物反应器是用 5 mm 厚透明有机玻璃板卷封连接成长方形结构, 多块厚度为 3.0 cm 光辐射复合套板交叉固定于反应器内侧, 作为反应器内部光源发射中心。同时采用光辐射板交替排列形成的折板环流, 则有利于强化气流传质、强化光合作用, 排除因溶氧蓄积而产生的有氧光呼吸, 克服高密度培养过程中藻细胞间相互遮光效应及克服可能存在于藻体周围的营养物的浓度梯度。反应器总体积 8 L, 有效装液量 6 L, 最大光照表面积与体积之比为 40 m^{-1} 。光生物反应器培养体系主要包括: 光生物反应器主体、循环装置、光源系统、培养液调节装置、培养参数调控装置等 5 个部分。其中光源系统 LED 集成光辐射板是将优选的红光 LED 发射光谱为 660 ~ 680 nm 制成光源, 通过电压调节, 使光辐射强度在 $165.5 \sim 496.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 范围可控。

1.2 实验材料

1.2.1 藻种 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 由深圳农科中心螺旋藻养殖基地提供。

1.2.2 合成培养基 本研究对 Zarrouk 培养液配方进行适当调整, 用 NaHCO_3 、 Na_2CO_3 缓冲液取代唯一碳源 NaHCO_3 , 通过调整 Na_2CO_3 的量, 可将溶液的 pH 值控制在 9.0 ~ 9.5 之间, 以适合钝顶螺旋藻最适生长的需要。

1.2.3 螺旋藻接种物的一级培养 取 3 L 容量的玻璃瓶若干个, 按 1% (W/V) 的接种量接种在 2 L 修正 Zarrouk 培养液中, pH 值维持为 9.0 ~ 9.4, 温度 28°C , 光辐射强度 $165.5 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 空气以 $1.5 \text{ dm}^3/\text{min}$ 流速连续通过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔过滤器, 无菌通

气 (2% CO_2) 鼓泡搅拌排除溶氧蓄积, 光照培养 1 周后, 制成浓藻液以便在不同光辐射强度及其他同等条件下进行光生物反应器扩大培养。

1.3 测试分析与计算方法

1.3.1 光辐射强度的测定 用 IB188B 光量子仪。

1.3.2 溶解氧的测定 采用 SJG203 型溶氧仪测定。

1.3.3 光合放氧活性测定 光合放氧率是采用 YSI58 型测氧仪按 Zhang A. Q 1989 年的方法测定, 在测量中, 保持温度 25°C 恒定。

1.3.4 螺旋藻叶绿素 a 和光合色素含量的测定 螺旋藻叶绿素采用 Hansmann E. 1973 年的方法测定; 类胡萝卜素采用 Whyte J. N. 1987 年的方法测定。

1.3.5 藻胆蛋白质含量测定 根据 Glazer A. N. 1975 年的方法, 用岛津 160A 型紫外-可见分光光度计, 在波长 620 nm, 580 nm 下测定光密度值并计算藻胆蛋白的含量。

1.3.6 螺旋藻生物量测定 根据 Leduy A. 1979 年的改进法, 在 560 nm 处采用光谱吸收法, 测定螺旋藻悬浮液经 15 kHz 超声均质后均质液的光密度值, 并换算成藻细胞生物量 X。

1.3.7 藻的比生长速率 μ 测定 在 560 nm 下测定藻悬浮均质液的光密度值, 由光密度值与藻生物量的换算关系, 按 Vonsha K. A. 1982 年的方法, 计算藻的比生长速率 μ 。

2 结果与讨论

2.1 LED 集成光电板光辐射强度 (红光) 对螺旋藻生长的影响

在光生物反应器中, 当营养底物和环境温度不是螺旋藻生长限制因子时, 光辐射强度对螺旋藻生长及对螺旋藻比生长速率的影响如图 1 及图 2 所示。

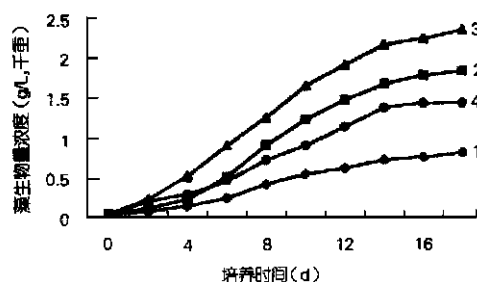


图 1 光辐射强度对螺旋藻生长的影响

Fig.1 Effect of light intensity on growth of *Spirulina*
1, 2, 3, 4 的光辐射强度分别为 110, 220, 276, 441 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

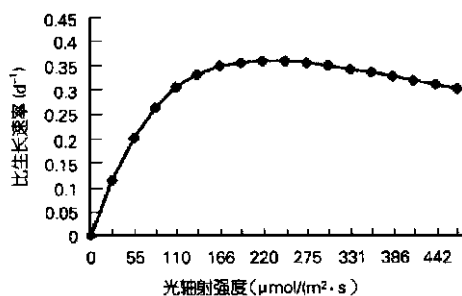


图2 光辐射强度对螺旋藻比生长速率的影响

Fig.2 Effect of light intensity on special growth rate of *Spirulina*

在实验条件下,由图1,2中看到,藻的生物量浓度(X)及比生长速率(μ)在一定光强度范围内,随着光辐射强度的增加而增加。当光辐射强度从 $55.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 增加到 $275.8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,经过 18 d 的培养,藻的生物量浓度从最初的 0.8 g/L (干重)增加到 2.3 g/L (干重),藻的比生长速率从 0.18 d^{-1} 增加到 0.35 d^{-1} (当藻的初始生物量 X_0 为 0.1 g/L (干重)时),这表明在光辐射强度尚未达到饱和光辐射强度(光合作用强度达到最高时的光辐射强度)之前,光辐射强度决定螺旋藻的生长速率;而当光辐射强度超过一定值时,如图2所示,光辐射强度为 $441.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,藻的最终生物量浓度下降为 1.41 g/L (干重),藻的比生长速率为 0.30 d^{-1} ,藻的最终生物量浓度和藻的比生长速率这两者都在高光辐射强度条件下,呈下降趋势,表明此时藻的生长受到光抑制现象的影响和控制。

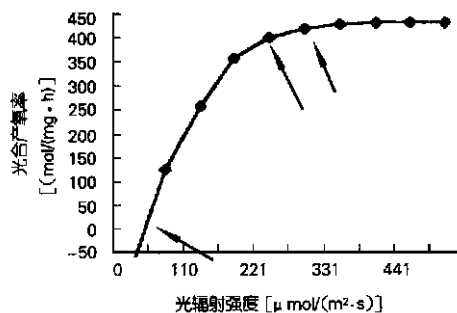
植物的饱和光辐射强度是指植物光合作用强度达到最大值时的光辐射强度,不同的藻种和不同的接种浓度,各有其不同的饱和光辐射强度。在相同的光辐射实验条件下,当螺旋藻的初始生物量 X_0 为 0.1 g/L (干重)时,由图2中光辐射强度对螺旋藻比生长速率的影响可知,当光辐射强度超过光饱和点以前, $\mu-I$ 曲线呈陡峭上升趋势,螺旋藻的比生长速率(μ)随着 I 的增大,显著增加,表明螺旋藻生长对光辐射强度十分敏感,当营养底物和环境温度不是螺旋藻生长限制因子时,螺旋藻的生长主要受光辐射强度的控制。如图2所示,在本实验装置中,螺旋藻生长的饱和光辐射强度在 $165.5 \sim 275.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 出现,此时,螺旋藻的比生长速率趋于恒定值;当光辐射强度超过光饱和点以后,螺旋藻生长则受到光辐射强度抑制,最终生物量浓度(X)及 $\mu-I$ 曲线都呈现下降趋势,随着光辐射强度的进一步增加,下降的幅度逐渐增大,即存在高光强的光抑制现象。Gibbs 1979 年对光

合器官的碳代谢和氧代谢的研究表明,藻类在饱和光辐射强度以上的光抑制现象的本质是光氧化。魏锦城、吴鼎福等 1991 年及高煜珠 1982 年的实验表明,这种现象的产生可能是高光辐射强度影响光合色素系统中反应中心,出现反应中心 PS II 中的 D1 蛋白质的降解,使光系统 II 的活性丧失,同时也抑制核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶的活性,使其在高光下发生光适应性调节,从催化光合碳还原(PCR即卡尔文循环)偏向催化光呼吸碳氧化(PCO即光呼吸)过程,使藻细胞所固定碳素的一部分(大约在 25%~50%)被光呼吸消耗,导致藻的生物量和比生长速率下降。

2.2 光辐射强度(红光)对螺旋藻光合产物形成的影响

光辐射强度对螺旋藻光生长过程中光合产物的形成有显著的影响,图3,4说明了在一定光辐射强度范围内,钝顶螺旋藻光合放氧及光合色素与光辐射强度(I)的相互依赖关系。

图3说明了在实验条件下,从 $55.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 到 $496.8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光辐射强度(红光)范围内螺旋藻光合放氧与光辐射强度的关系,从图中可知,曲线下端箭头所指的是光补偿点为 $24.84 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,在这样的光辐射强度下,光合作用产生的氧量与呼吸作用产生的氧量恰好相等,细胞只能维持基础代谢而不能生长,藻类适光的范围必须高于光补偿点,否则藻类不能生长;曲线上端箭头所指的是饱和光辐射强度为 $193.2 \sim 275.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,此时光合作用产氧量已趋向最大值,因此,饱和光辐射强度是藻类生长繁殖的最适光辐射强度,不同藻类在不同的培养条件下,各有其不同的饱和光辐射强度。超过饱和光辐射强度,光合作用产氧量趋向稳定,在曲线上出现高原平稳区,这表明螺旋藻光合器官具有的光合稳定性,也说明了要使螺旋藻光合强度达到一定强

图3 光辐射强度(I)对螺旋藻光合放氧的影响Fig.3 Effect of light intensity on oxygen production rate of *Spirulina*

度,必须依赖一定量的叶绿素。光辐射强度(I)对螺旋藻光合色素的影响如图4所示。

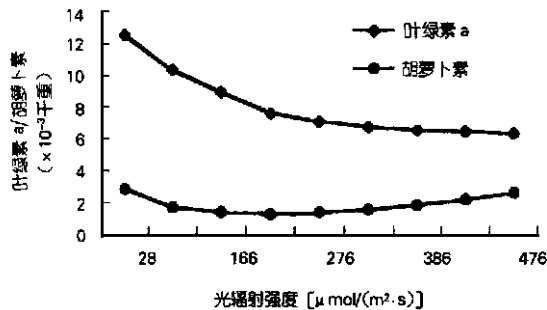


图4 光辐射强度(I)对螺旋藻光合色素的影响
Fig.4 Effect of light intensity on *Spirulina* pigment

叶绿素a和胡萝卜素的含量从光辐射强度 $110.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (红光)时的 10.35×10^{-3} (干重)、 1.69×10^{-3} (干重)下降到光辐射强度 $275.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (红光)时的 7.12×10^{-3} (干重)、 1.35×10^{-3} (干重)(如图4所示),表明螺旋藻中的光合色素遵循蓝藻光适应机制。在饱和光辐射以前,随着光辐射强

度的增加,叶绿素a和胡萝卜素的含量出现不同程度的下降;当超过饱和光辐射强度以后,叶绿素的含量随光辐射强度增加,下降幅度变缓,胡萝卜素的含量则反而有所增加,此时胡萝卜素发挥了在强光下保护叶绿素a及感光酶的作用及具有抗光氧化的作用,其作用机制是胡萝卜素可从三线态的叶绿素a吸收能量,破坏叶绿素a与氧反应或与单线激发态氧的作用,有效防止叶绿素a受光氧化作用,因此在超过饱和光辐射强度过大时,叶绿素含量减少而胡萝卜素含量增加,这样可以依靠胡萝卜素吸收化学作用强烈的光线保护叶绿素,使其不分解,以维持螺旋藻光合放氧强度。

2.3 LED集成光电板辐射光质对螺旋藻生长及光合色素的影响

生物体的新陈代谢和生长发育主要受遗传信息及环境信息的控制,遗传信息规定了个体发育的潜在模式,但它的实现在很大程度上受控于环境信息。光作为主要的环境因子,不仅提供光合作用所需的能量,而且触发植物形态变化,质体分化,新陈代谢等重要反应^[4]。

表1 LED光电板辐射光对螺旋藻光合色素的影响

Tab.1 The effect of LED radiation on the photosynthetic pigments of *Spirulina platensis*

光源	叶绿素 a		藻胆蛋白		β-胡萝卜素		藻细胞干重	
	(× 10 ⁻³ 干重)		(× 10 ⁻³ 干重)		(× 10 ⁻³ 干重)		(g/ L)	
	在不同光辐射强度下(μmol/(m ² •s))							
	137.80	275.90	137.80	275.90	137.80	275.90	137.80	275.90
红光 LED集成光辐射板	11.82	7.76	186.56	236.82	1.98	1.75	1.56	2.48
白色日光灯组	9.56	5.12	136.24	165.16	1.28	1.16	0.95	1.25
红蓝光 LED集成光辐射板	15.34	13.16	265.87	294.89	2.41	1.92	1.89	2.89

LED光辐射强度及光质对光合色素的影响如表1所示。采用单色红光LED集成光辐射板与白色日光灯组相比,在相同的光辐射强度下($275.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),藻胆蛋白、藻细胞干重及叶绿素a分别增加43.39%,98.40%,51.563%,而采用红、蓝光LED集成光辐射板,各项光合色素含量显著增加。

从图及表中的实验结果可知,在一定的光辐射强度范围内,当光辐射强度增加到某种光饱和程度前,螺旋藻对光能的利用达到最大限度(从图4中可知),随着光辐射强度的增强,藻细胞生物量干重及藻蛋白和胡萝卜素含量显著提高,但叶绿素a略有下降,因此,这在螺旋藻的培养过程中,适当提高光饱和度,可使藻吸收到更多的光能,增加光合作用产物,从而能促进藻的快速生长,藻的这种光饱和现象,与细胞的

生理机制及色素体系有关。由表1可知,与白色日光灯组相比,LED集成光电板辐射红光及红、蓝组合双波长光非常适合藻的生长并促进细胞干重、叶绿素、藻胆蛋白的增加,实验结果说明,红光是植物进行光合作用最有效的光,因此在红光下生长的螺旋藻光合效率高,能产出更多的光合产物,细胞生长快,干物质积累多,尤其是加强蓝光作用,由于蓝光是叶绿素和胡萝卜素的另一主要光能吸收区,更有利于促进藻的光合作用及光合效率。

参考文献

- 邢建民,查丽杭,李佐虎等.生物工程进展,1997,17(5): 49~53
- 徐明芳,郭宝江.水产学报,1998,22(1):56~62
- 徐明芳,郭宝江.食品与发酵工业,1998,24(2):72~79

4 顾雪松,陈章量,朱玉贤,光敏色素与光调控,植物学报, 1997,39(7):675~681

THE STUDIED ON CULTURE *Spirulina platensis* IN THE PHOTOBIOREACTOR WITH LED ILLUMINANT PANEL

XU Mngfang LI Yr-ling

(Department of Bioengineering , Jinan University , Guangzhou 510632)

Received : Feb., 31 ,2000

Key Words : Photobioreactor with illuminated LEDpanel , *Spirulina platensis* , Special characteristic of growth

Abstract

This paper analyze : (1) the effect of light intensity illuminated from LEDpanels on the properties of biomass(X) , specific growth rate , oxygen production rate and photosynthetic pigments of *Spirulina platensis* , and (2) the effect of light quality of red or red+blue illuminated from LEDpanels on the active components of *S. platensis* . The results show that *S. platensis*'s specific growth rate is determined by the light intensity illuminated from LEDpanels before saturated light intensity; the oxygen production rate of *S. platensis* with a stabilization of photosynthetic organ trends to equilibrate once above the saturation of light intensity; the light quality of red or red+blue illuminated from LEDpanels is suitable for the growth of *S. platensis* , increasing the contents of its phycobiliprotein , chlorophyll and dry cells weight by 43.39 % , 51.563 % and 98.40 % respectively as compared with white cool fluorescent light at the same light intensity of $275.9 \mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$.

(本文编辑 :张培新)