

螺旋藻批式与连续培养及其生长动力学

曾文炉* 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 在内循环气升式光生物反应器中,分别研究了螺旋藻细胞在批式和连续培养条件下的生长特性,结果表明:Richards 模型和指数衰减模型可较好地描述批式培养时细胞和碳源底物浓度与培养时间的关系,批式培养时最大细胞生长速率为 0.371g/d/L,细胞对碳的得率系数为 3.439g/gC,连续培养时随着稀释率的增大,细胞和底物浓度分别呈下降和上升趋势,连续培养时最大细胞产率为 0.362g/L/d,最佳稀释率为 0.45/d,细胞对碳的得率系数为 2.050g/gC,所提出的连续培养动力学模型可较好地拟合实验数据。

关键词 螺旋藻,微藻,连续培养,批式培养,动力学模型,得率系数,光生物反应器

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0414-06

螺旋藻是一类螺旋状、不分枝的丝状微藻。它含有丰富的蛋白质、维生素、多不饱和脂肪酸以及多种酶类和微量元素等生理活性物质,具有较高的营养价值和医疗保健功效^[1]。其潜在的巨大开发利用价值已引起人们日益广泛的关注。

迄今为止,人们虽然已在螺旋藻的引种驯化、代谢调控和规模培养等方面开展了一定的工作^[2~4],但培养效率低下、产品成本偏高依然是大规模工业化培养所面临的主要问题。

本文通过光生物反应器中螺旋藻的批式和连续培养实验,考察了两种条件下细胞生长及其对碳源底物的消耗与利用特性,并建立了相应的动力学模型,以期为提高工业化生产的效率提供参考。

1 理论分析

1.1 批式培养生长动力学

1.1.1 细胞生长模型 根据生物的新陈代谢规律,细胞或生物体的生物量(Biomass)变化速率应是其同化与异化速率之差。设同化速率正比于生物量的 m 次方,而异化速率则反比于生物量本身,系数分别为 α 和 β 。以数学形式表示为:

$$\frac{dX}{dt} = \alpha x^m - \beta x$$

此方程的解为

$$x = A[1 - \exp^{-k(t-t_0)}]^{-\frac{1}{1-m}}$$

其中,

$$A = \left(\frac{\alpha}{\beta}\right)^{\frac{1}{1-m}} \quad k = (1-m)\beta$$

令

$$B = \exp^{kt_0}$$

由此得到细胞生长的 Richards 模型^[8]。

$$x = A(1 - B \exp^{-kt})^{-\frac{1}{1-m}}$$

上述诸式中的符号及其因次见文后说明(下同)。

1.1.2 培养基碳源消耗模型 碳源消耗量与细胞浓度密切相关。在培养初期,由于细胞浓度低,培养基中碳源的消耗量也不多。随着细胞的旺盛生长,碳源消耗量将急剧增加,由此导致其浓度快速下降。可假设培养液中的剩余碳源浓度与细胞生物量浓度呈二阶负指数相关关系,即

$$C_{total} = c_1 + c_2 \exp^{-\frac{x}{c_3}} + c_4 \exp^{-\frac{x}{c_5}}$$

此即螺旋藻细胞批式培养时培养基中碳源消耗模型。

1.2 连续培养动力学

1.2.1 细胞产率 为简化起见,将螺旋藻细胞连续培养体系看作是一个单级恒化器(CSTR)。忽略细胞培养过程中产物的形成以及维持代谢的底物消耗,则参照稳态条件下单级 CSTR 的物料衡算,可得如下关系式^[5]:

$$x = Y_{x/S}(S_0 - S)$$

在连续培养过程中,可以预见,随着稀释率的增大,自反应器中流出也即反应器中的底物浓度也将上升。当稀释率达到一定值时,底物浓度将接近极限值即等于流入反应器的培养液中的浓度。由此可假设反应器中底物浓度与稀释率的关系为 Monod 类型的方程式,即

$$S = S_1 + \frac{S_2 D}{S_3 + D}$$

将其代入前式,有

$$x = Y_{x/S}\left(S_0 - S_1 - \frac{S_2 D}{S_3 + D}\right)$$

连续培养时细胞产率 P 等于稀释率与细胞浓度之积,即

$$P = Dx = DY_{x/S}\left(S_0 - S_1 - \frac{S_2 D}{S_3 + D}\right)$$

此为连续培养时的细胞产率模型。

1.2.2 底物消耗:根据细胞得率系数的概念,可将底物消耗速率表示为

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/S}} \frac{dx}{dt}$$

联系细胞产率方程式,得

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/S}} \frac{dx}{dt} = D\left(S_0 - S_1 - \frac{S_2 D}{S_3 + D}\right)$$

此为螺旋藻细胞连续培养时的底物消耗模型。

2 材料、方法与设备

2.1 材料

藻种:钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),由烟台大学生化工程研究所提供。

试剂:市售国产分析纯或化学纯商品。

培养基:Zarrouk 培养基^[6]。

2.2 实验条件与培养方法

细胞培养在自制的内循环气升式光生物反应器中进行。实验条件为:藻液体积 10 L,反应器表面光强 2.755mW/cm²,温度 30℃±1℃,通气量 230L/h。

批式培养方法:将培养液和处于指数生长期的藻种细胞一次性地引入反应器中进行培养。每 12 h 取样测定 1 次藻液细胞浓度,直至其生长达到稳定期。

连续培养方法:当批式培养开始进入指数生长阶段时,启动连续培养。每 12 h 取样 1 次,测定细胞浓度。当连续 3 次测得的细胞浓度其波动在±5%内,即认为已达到稳态。

2.3 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(上海市上海县实验仪器厂)。

2.4 培养装置

15L 内循环气升式光反应器(图 1)主要由罐体、气体提升管、热交换装置、气体分布器和内外光源等部件构成。工作体积 13L。罐体直径 182 mm,高 1000 mm,内导流筒直径 131 mm,高 600 mm。

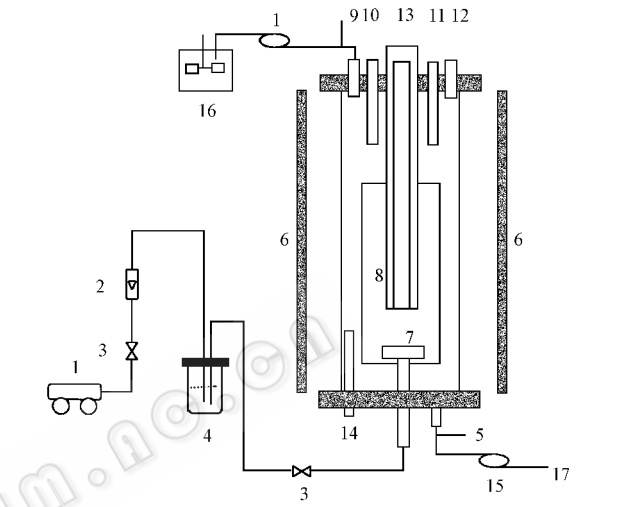


图 1 内循环气升式光生物反应器装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of internalloop airlift photobioreactor

1. Air compressor; 2. Air flowmeter; 3. Valve; 4. Air mixing-tank; 5. Sampling port; 6. External light; 7. Air distributor; 8. Airlift column; 9. Feeding port; 10. Thermometer; 11. pH probe; 12. Air exhausting port; 13. Internal light; 14. Heat exchanger; 15. Peristaltic pump; 16. Medium tank; 17. Draining port

2.5 检测与分析方法

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

藻细胞质量(干重)浓度(g/L),根据细胞干重浓度与藻液 OD_{560} 之间的标准曲线,由下式计算得到($R^2 = 0.9984$):

$$g \text{ dry biomass/L} = 0.6449 \times OD_{560}$$

2.5.2 碳浓度测定

采用“碱度-酸滴定法”^[7]。由下式计算藻液中碳源各组分及总碳浓度。

$$C_{total} = C_{CO_2} + C_{HCO_3^-} + C_{CO_3^{2-}}$$

3 结果与讨论

3.1 批式培养细胞生长动力学

首先考察了螺旋藻细胞在光生物反应器中的批

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

式生长特性。结果见图 2。从中可以看出,在培养的初始阶段,由于接种密度较小,过强的光照使细胞生长处于迟滞阶段,48h 后才进入指数生长期。此后细胞相继经过减速生长和稳定生长阶段。光密度值最高为 2.465,细胞干重浓度约为 1.59g/L。

随着培养过程的进行和细胞浓度的增大,藻液的 pH 值上升较快,并一度达到 12.7(见图 2)。由于螺旋藻细胞生长的最适 pH 为 8.5~9.5,因此在培养后期这种碱性环境已成为细胞进一步生长的限制因素,加之细胞之间产生的相互遮荫现象以及其它营养元素的缺乏,可能是使得细胞生长处于停滞状态的原因。

将前述批式培养的细胞生长模型对实验数据进行拟合,得方程

$$x = 2.583(1 - 0.0745\exp^{-0.026t})^{\frac{1}{1-0.992}}$$

从图 2 可以看出,模型方程较为能够准确地描述螺旋藻细胞浓度随培养时间的变化($R^2 = 0.9996$)。

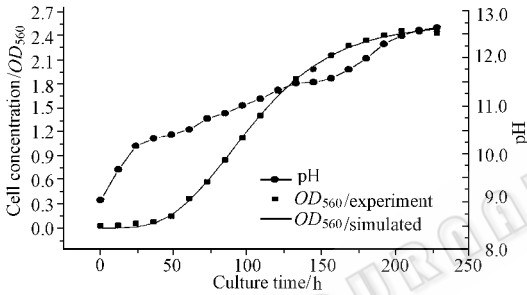


图 2 批式条件下细胞生长和 pH 值的变化曲线

Fig.2 Cell growth and pH as a function of culture time

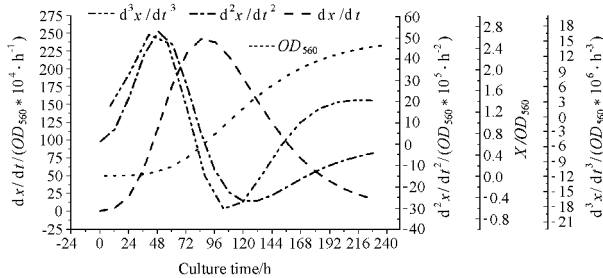


图 3 细胞浓度与生长速率及生长加速度随时间的变化曲线

Fig.3 Cell concentration, growth rate and growth acceleration rate as a function of culture time

将模型方程对时间求一、二和三阶导数,得

$$\frac{dx}{dt} = 0.608\exp^{-0.026t}(1 - 0.075\exp^{-0.026t})^{22.824}$$

$$\frac{d^2x}{dt^2} = 0.142\exp^{-0.051t}(1 - 0.075\exp^{-0.025t})^{21.824} - 0.016\exp^{-0.025t}(1 - 0.075\exp^{-0.025t})^{22.824}$$

$$\begin{aligned} \frac{d^3x}{dt^3} = & 0.033\exp^{-0.076t}(1 - 0.075\exp^{-0.025t})^{20.824} \\ & - 0.011\exp^{-0.051t}(1 - 0.075\exp^{-0.025t})^{21.824} \\ & + 3.955 \times 10^{-4}\exp^{-0.025t}(1 - 0.075\exp^{-0.025t})^{22.824} \end{aligned}$$

对上述 4 个方程进行综合分析,可知螺旋藻细胞的批式培养过程具有以下几个特点(见图 3):

①令二阶导数等于零,可求得细胞生长曲线的一个拐点。其坐标为

$$t = 87.172h \quad x = 0.947(OD_{560})$$

此时细胞生长速率取得极大值

$$\left(\frac{dx}{dt}\right)_{\max} = 0.024 \frac{OD_{560}}{h} = 0.371 \frac{g}{dL}$$

②令三阶导数等于零,可求得细胞生长速率曲线的两个拐点。其坐标分别为

$$t_1 = 49.570h \quad x_1 = 0.025(OD_{560})$$

$$t_2 = 124.77h \quad x_2 = 1.76(OD_{560})$$

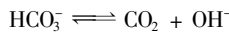
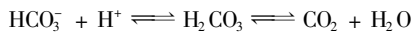
其中 $t = 49.570h$ 是细胞由迟滞期进入指数生长期的分界点,而 $t = 124.77h$ 则是细胞由指数生长期进入稳定生长期的分界点。它们分别对应于细胞生长加速度的两个极值点,即

$$\left(\frac{d^2x}{dt^2}\right)_{\max} = 5.267 \times 10^{-4} \frac{OD_{560}}{h^2} = 0.196 \frac{g}{d^2L}$$

$$\left(\frac{d^2x}{dt^2}\right)_{\min} = -2.722 \times 10^{-4} \frac{OD_{560}}{h^2} = -0.101 \frac{g}{d^2L}$$

3.2 批式培养底物消耗动力学

批式培养过程藻液中的碳源总量及其各种成分的变化情况如图 4 所示。从中可以看出,随着培养过程的进行,碳源总量和碳酸氢根形式的碳量呈下降趋势,而碳酸根形式的碳量却呈上升趋势。这是由于一般藻类细胞不能直接利用 CO_3^{2-} ,少数大型海藻细胞虽然能吸收 HCO_3^- ,但需通过胞内碳酸酐酶(CA)转化为 CO_2 后才可供 Rubisco 同化固定,而绝大多数微藻细胞则只能直接吸收利用二氧化碳形式的碳源^[9]。因此,在实验所处的 pH 环境和碳源条件下,螺旋藻细胞将主要通过以下两种途径获得光合作用所需的 CO_2 ,由此导致碳源总量和碳酸氢根形式的碳量急剧减少,而培养液的 pH 值和碳酸根形式的碳浓度则不断升高。



将前述总碳浓度与藻细胞浓度之间的指数衰减模型拟合上述实验数据,得

$$C_{total} = 1338.84 + 1985.08\exp^{-\frac{OD_{560}}{0.02}} + 511.70\exp^{-\frac{OD_{560}}{1.36}}$$

从图 5 可以看出,模型方程能够较好地拟合实验数据。

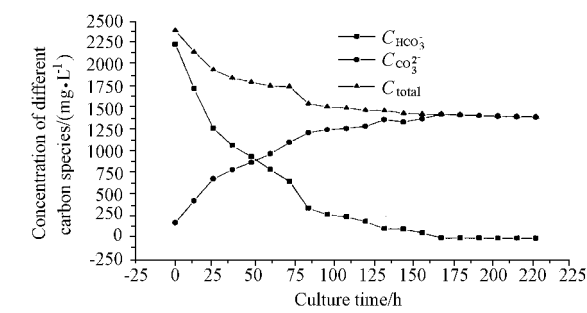


图 4 碳源组分浓度随培养时间的变化

Fig.4 Concentration of different carbon species as a function of culture time

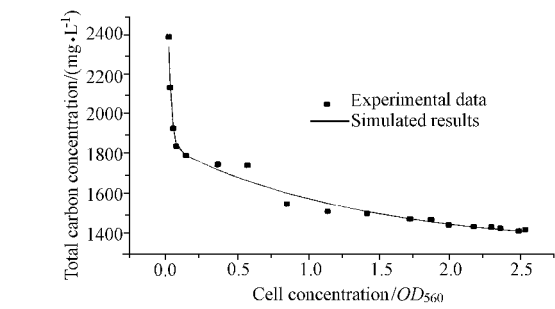


图 5 碳源组分浓度与细胞浓度的关系

Fig.5 The relationship between the concentration of carbon and that of cells

对上式就细胞浓度求导数 ,并经适当转换 ,得细胞生长的碳源得率系数方程式为

$$\frac{d OD_{560}}{d C_{total}} = \frac{1}{99254.00 \exp^{-\frac{OD_{560}}{0.02}} + 376.25 \exp^{-\frac{OD_{560}}{1.36}}}$$

可见在批式培养过程中 ,藻细胞对碳的得率系

数随细胞浓度的不同存在差异。当细胞生长速率最大时($OD_{560} = 0.947$) ,得率系数为 $5.333 \times 10^{-3} OD_{560}$ L/mgC 相当于 3.439g/gC。

3.3 连续培养动力学

在连续培养过程中 ,不同稀释率条件下稳态时的细胞浓度和细胞产率示于图 6。可见 ,细胞浓度和碳浓度随着稀释率的增大分别呈下降和上升趋势。根据连续培养条件下 S 和 x 与 D 关系的模型方程 ,对实验数据进行拟合(模型参数见表 1) ,可得如下两个关系式

$$S = 979.694 + \frac{1490.058 D}{0.372 + D}$$

$$x = 3.311 \times 10^{-3} \left(1174.176 - \frac{1490.058 D}{0.372 + D} \right)$$

比较图 6 中的模型拟合曲线与实验数据 ,可以发现模型方程能较好地描述稀释率与碳源和细胞浓度的关系。

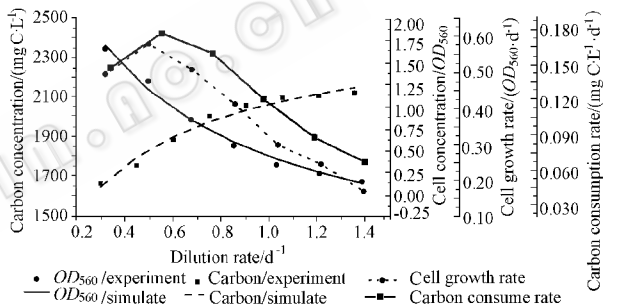


图 6 细胞浓度和细胞产率等与稀释率的关系

Fig.6 Cell concentration and cell growth rate etc. as a function of dilution rate

表 1 模型参数

Parameter	S_0	S_1	S_2	S_3	$Y_{x/S}$	
Value	2153.870	979.694	1490.058	0.372	3.311×10^{-3}	2.135
Unit	(mg C/L)			h^{-1}	$OD_{560} \text{ (mg C/L)}$	g dry biomass(g C)

此外 ,由图 6 还可看出 ,细胞产率与稀释率的关系存在峰值现象。即在一定的范围内 ,细胞产率随着稀释率的上升而增大 ,并逐渐达到极大值。此后 ,随着稀释率进一步增加 ,细胞产率渐趋下降。可把细胞产率最大时的稀释率称为最佳稀释率。

根据连续培养的细胞产率理论方程 ,将其对稀

释率求一阶导数 ,并令其等于零 ,可求得细胞产率最大时的最佳稀释率为

$$D_{opt} = \frac{-S_0 S_3 + S_1 S_3 + S_2 S_3 - \sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2}}{S_0 - S_1 - S_2}$$

将 D_{opt} 代入细胞产率方程式 ,得最大细胞产率为

$$P_m = (Dx)_m = -Y_{x/S} \frac{(-S_2 S_3 + \sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2}) (S_0 S_3 - S_1 S_3 - S_2 S_3 + \sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2})}{\sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2}}$$

此时反应器中的细胞浓度为

$$x = Y_{x/S} \frac{(-S_0 + S_1 + S_2) (-S_2 S_3 + \sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2})}{\sqrt{S_2 (-S_0 + S_1 + S_2) S_3^2}}$$

细胞产率最大时的底物消耗速率为

$$\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \left(\frac{dx}{dt} \right)_m = \frac{1}{Y_{x/s}} P_m$$
$$= - \frac{(-S_2 S_3 + \sqrt{S_2(-S_0 + S_1 + S_2)S_3^2}) \wedge S_0 S_3 - S_1 S_3 - S_2 S_3 + \sqrt{S_2(-S_0 + S_1 + S_2)S_3^2}}{\sqrt{S_2(-S_0 + S_1 + S_2)S_3^2}}$$

将有关参数代入,可求得最佳稀释率为 0.436/d,最大细胞产率(干重)为 0.534g/L/d,最大碳消耗速率为 0.161g C/L/d,细胞浓度为 $OD_{560} = 1.226$,得率系数为 $Y_{x/s} = 0.0033111 OD_{560} \text{ L/mg C} = 2.135\text{g/g C}$ 。

而由图 6 读出的最佳稀释率为 0.45/d,此时细胞浓度为 $OD_{560} = 1.282$,最大细胞产率(干重)为 0.362g/L/d,最大碳消耗速率为 0.177g C/L/d,由此算出细胞对碳的得率系数为 2.050g/g C。这再次反映了模型方程的准确性和可行性。

3.4 批式培养与连续培养产率比较

根据上述批式与连续培养有关模型方程,可计算得到两种操作条件下细胞产率与细胞浓度的关系(见图 7)。从中可以看出,无论是批式还是连续培养过程,细胞产率与细胞浓度的关系都存在峰值现象,且最适细胞浓度比较接近。但当细胞浓度较低时,批式培养产率要大于连续操作,而细胞浓度较高时则正好相反。这可能主要与批式培养后期碳源底物和微量元素缺乏、细胞浓度过高引起的体系光通量供应不足以及 pH 环境不适宜等因素有关。为了克服这种不足,可在批式培养后期往反应器中通入富含适量 CO₂ 的空气,这样既能减缓 pH 的上升,又可补充碳源,因而可使高产率保持更长的时间。此外,还可在培养后期启动连续培养或补料分批培养。应当指出的是,虽然细胞浓度较高时连续培养的细胞产率大于批式培养,但这种培养方式存在着诸如底物利用效率不高、营养盐浪费等缺陷。因此,在实际生产过程中,可根据培养目的的不同,灵活选用不同的培养方式。

4 结 论

本文主要考察了螺旋藻细胞在光生物反应器中的批式与连续培养的生长行为及其对碳源底物的利用特性,得到以下初步结论:

- ①在批式培养条件下,细胞和底物浓度与培养时间的关系可分别用 Richards 模型和指数衰减模型加以描述。 $t = 87.172\text{h}$ 是细胞生长曲线的拐点,此时 $OD_{560} = 0.947$,细胞生长速率达到最大值 0.371g/d/L,而 $t = 49.570\text{h}$ 和 124.77h 则分别是细胞由迟滞期进入指数生长期和由指数生长期进入稳定生长期的分界点。它们既是细胞生长加速度的两个极值点,也是细胞生长速率曲线的两个拐点。批式培养细胞产率最大时细胞对碳的得率系数为 3.439g/g C。
- ②在连续培养条件下,随着稀释率的增大,细胞和底物浓度分别呈下降和上升趋势,而细胞产率与稀释率的关系存在峰值现象。最大细胞产率为 0.362g/L/d,最佳稀释率为 0.45/d,最大碳消耗速率为 0.177gC/L/d,最适细胞浓度为 $OD_{560} = 1.282$ 。连续培养细胞产率最大时细胞对碳的得率系数为 2.050g/gC。
- ③当细胞浓度较低时,批式培养的细胞产率大于连续操作,而当细胞浓度较高时,连续培养的细胞产率大于批式培养。
- ④所提出的批式和连续培养动力学模型可较好地拟合实验数据,具有一定的参考价值。

符号说明

A	生长上限参数(OD_{560});
B	细胞初始生长参数;
c_1, c_2, c_4	模型参数(mg C/L);
c_3, c_5	模型参数(OD_{560});
$C_{total}, C_{HCO_3^-}, C_{CO_3^{2-}}$	总碳,碳酸氢根碳和碳酸根碳浓度(mg C/L);
D, D_{opt}	稀释率和最佳稀释率(d^{-1});
k	同化或生长速率常数(h^{-1});
m	异化或降解速率参数;
P	细胞产率(g/L/d);
S, S_0	反应器和进料中的碳浓度(mg C/L);

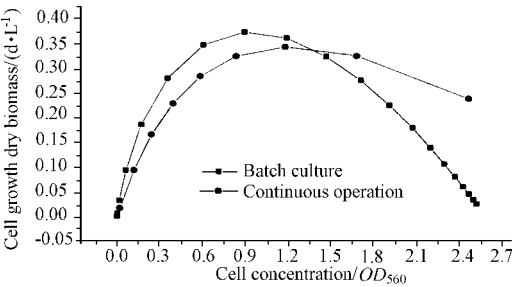


图 7 批式与连续培养细胞产率比较

Fig.7 Comparison of cell growth rate between batch and continuous operation mode

S_1, S_2	模型参数(mg C/L)
S_3	模型参数(d^{-1});
t, t_0	培养时间(h);
x	细胞生物量(OD_{560})
$Y_{x/s}$	得率系数 ($OD_{560}/mg\ C/L$ or g/gC);
α, β	模型参数

REFERENCES(参考文献)

[1] Birkhauser Verlag ,Mass production of *Spirulina* . *Experimentia* ,1982 ,
38 :41 ~ 46

[2] Tadros G G. Yield and quality of cyanobacteria-*Spirulina Maximum* in
continuous culture in response to light intensity . *Applied Biochemistry
and Biotechnology* ,1993 ,39/40 :337 ~ 347

[3] GONG X M(龚小敏). Studies of mutageize of *Spirulina platensis* by

$^{60}Co-\gamma$ irradiation . *Journal of Wuhan Botanical Research* ,1996 ,14
(1) :58 ~ 66

[4] Singh Y. Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in co-
balt-and -iodine-enriched media . *Journal of Applied Bacteriology* ,
1994 ,76(2) :149 ~ 154

[5] YU J T(俞俊棠)et al . *Biotechnology* . Shanghai :East China Univer-
sity of Science and Technology Press(华东理工大学出版社) ,1992

[6] Becker E W. *Micro-algal Biotechnology* ,London :Cambridge Univer-
sity Press ,1994 .pp.9 ~ 41

[7] Fresenius W ,Quentin K E. *Water Analysis* ,Springer-Verlag Berlin
Heidelberg ,1988

[8] Richards F J. A flexible growth function for empirical use . *Journal of
Experimental Botany* ,1959 ,10(2) :290 ~ 300

[9] Bjork M. Inducible mechanisms for HCO_3^- utilization & repression of
photo-respiration in protoplasts & thalli of three species of ULVA
(chlorophyta) . *Journal of phycology* ,1993 ,29 :166 ~ 173

Studies on the Growth Characteristics of *Spirulina* Cells
Under Batch and Continuous Conditions

ZENG Wen-Lu* CAI Zhao-Ling OUYANG Fan

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

Abstract The research paper focused mainly on the growth characteristics of *Spirulina* cells under batch and continuous condi-
tions. It was found that the Richards and Exponential decay model could well express the relationships between the concentration
of the cell ,carbon in the medium and culture time respectively. The maximum cell growth rate and the cell yield coefficient
against carbon under batch culture was 0.371g/d/L and 3.439g/gC respectively. The concentration of cell and that of carbon in
the reactor increased and decreased with the dilution rate respectively under the continuous culture condition. The maximum cell
growth rate and the optimum dilution rate was 0.362g/d/L and 0.45/d respectivel. The cell yield against carbon under continuous
culture condition was 2.050g/gC. The cell growth rate of batch culture was larger than that of continuous one when the cell con-
centration was relatively low ,but it will be smaller than that of continuous culture when the cell concentration became high.

Key words *Spirulina* , micro-algae , batch culture , continuous culture , growth kinetics , cell yield coefficient , photo-bio-reactor

Received : January 5 2001

This work was supported by grant from the National Natural Sciences Foundation of China(29776044)

* Corresponding author. Tel 86-10-62574372 ; Fax 86-10-62561822 ; E-mail :zengwenlu@hotmail.com