

分批异养培养小球藻光密度值与干重的关系^{*}

刘学铭 余若黔 梁世中

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

摘要: 在小球藻的分批异养培养过程中,培养液的细胞浊度(*OD*)与细胞干重(*DW*)的关系受培养条件和培养过程的影响很大,在实验中,干重与光密度值的比值在 $0.53 \sim 0.28 \text{g}/\text{OD} \cdot \text{L}$ 间变化。因此在小球藻分批异养培养过程中,培养液藻生物量检测采用单一的 *DW* 与 *OD* 换算常数用 *OD* 来推算细胞的干重则会产生较大的误差。

关键词: 小球藻,光密度,干重,分批异养培养

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0339-03

THE RELATIONSHIP BETWEEN OPTICAL DENSITY AND DRY WEIGHT OF *CHLORELLA VULGARIS* IN BATCH HETEROTROPHIC CULTURE

LIU Xueming, YU Ruoqian, LIANG Shizhong

(The College of Food Bioengineering and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract: In the batch heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*, the ratio of dry weight (*DW*) of cell and optical density (*OD*) of medium is significantly influenced by culture condition and time course. In the present experiments, it changed between $0.28 \sim 0.53 (\text{g} / \text{OD} \cdot \text{L})$. The results show that the *DW* of cells cannot be simply calculated from *OD* of medium using single conversion constant in the batch heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*.

Key words: *Chlorella vulgaris*, Optical density, Dry weight, Batch heterotrophic culture

许多微藻具有全面而均衡的营养价值,广泛用于饲料添加剂、食品添加剂、精细化工品和医药制剂原料^[1]。为了获得大量的微藻生物量,国内外科研工作者开发出各种微藻的培养系统,主要有室外开放池式光自养培养系统、各种半密闭和密闭光合反应器、基于异养的无光照的发酵罐培养系统等。

监测藻类生产系统的效率的基本指标就是测定藻所产生的生物量。检测藻生长的常用方法有浊度法、干重法、细胞压积法、叶绿素含量法、蛋白质测定法和镜检计数法等^[2]。

异养培养微藻的叶绿素和蛋白质含量变化

受培养基的影响很大,不能作为监测藻生物量的常用方法;细胞压积法和镜检计数法误差也很大,一般只用于定性或粗定量监测。藻干重测定法是测定生物量最直接的方法之一,但在操作过程中需要经过离心、洗涤、干燥等步骤,比较繁琐而且耗时较长,而浊度法具有快速、无损伤性的特点,因此成为测定培养系统藻浓度最常用的方法。在很多情况下藻培养液浊度与藻细胞干重之间存在的良好的正相关关系,可作

^{*} 广东省科研基金资助项目

收稿日期:1998-09-07, 修回日期:1998-12-07

出不同浓度干重与光吸收关系的标准曲线图或建立回归方程,继而通过测定光吸收的简单方式推算样品中生物量的多少。在许多关于单细胞藻类培养的研究报道中正是使用这种方法来计算藻细胞的干重^[1~4]。但我们在进行小球藻异养培养的研究中发现,在分批培养中培养液的细胞浊度与细胞干重之间的关系变化较大,因此对两者的关系进行了专门研究,以检验此测定方法的准确性和可靠性。

1 材料与方法

1.1 藻种

小球藻(*Chlorella vulgaris*)由香港大学陈峰博士惠赠,用基础培养基制成的琼脂斜面保存。用基础培养基经二级放大用于实验研究。

1.2 培养基组成及培养条件

基础培养基为小球藻光自养培养基^[7]添加葡萄糖 10g/L 而成,调 pH6.5。实验培养基根据需要对培养基成分作相应调整。

250mL 三角瓶装培养基 100mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。超净工作台接种和取样,接种量为 1:11(每 100mL 培养基接种藻液 10mL), 30℃ 150r/min 旋转摇床暗培养。

1.3 测定方法

1.3.1 藻生物量测定:藻生物量测定采用浊度法和干重法^[2]。浊度法用 721 分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度(OD_{540} , 下面简称 OD), 测定时确保 OD 在 0.4~0.6 间。同时取 20mL 培养液离心洗涤,藻体沉淀在 85℃ 恒温干燥至恒重来测定藻体干重(DW)。

1.3.2 NO_3^- 的测定:采用浓硫酸-水杨酸法^[8]。

1.3.3 葡萄糖的测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

2 结果

2.1 培养过程中 DW/OD 的变化

27 个三角瓶装入相同的基础培养基,在接种时尽量保证每个三角瓶的接种量一致,全部置于相同条件下培养,每隔 8h 取出 3 瓶,测定培养液的 OD 值和藻体 DW,同时测定培养基中的

葡萄糖浓度和 NO_3^- 浓度。

结果表明,在整个培养过程中藻生物量的 DW/OD 呈现出先升后降的趋势。刚接种时的细胞 DW/OD 代表了对数生长期藻种的 DW/OD, 为 0.36(g/OD · L); DW/OD 在培养的前 24h 逐渐上升,在第 24h 达到最大,为 0.503(g/OD · L);然后迅速下降,第 40h 为 0.28(g/OD · L),此后基本保持稳定。

2.2 DW/OD 与培养基 C/N 的关系

调节培养基中硝酸钾浓度(g/L)分别为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 0.25, 每组 3 瓶,培养 48h 后测定培养液 OD 值和藻体 DW,同时测定培养液中的葡萄糖和硝酸钾浓度。结果发现,起始葡萄糖浓度为 10g/L 时,培养 48h 后,硝酸钾小于 0.5g/L 的葡萄糖不能耗完,而硝酸钾浓度大于 1.75g/L,则硝酸钾有相应剩余。在一定范围内,随着 C/N 的下降, DW/OD 逐渐下降。可能是 C/N 比较合适时细胞的营养摄取与细胞分裂增殖同步进行;在碳源过剩时细胞吸收过量的葡萄糖以脂质的形式储存起来,细胞分裂由于氮源的不足而减慢;在氮源过剩时,细胞利用自身的储存能过度吸收氮源以蛋白质和叶绿素的形式保存起来。

3 讨论

大多数情况下,微藻生产系统的主要目的是获得全生物量,因此在进行微藻培养的研究和生产中经常要测定藻生物量。对于封闭式微藻培养系统生物量的检测的常用方法有浊度法和干重法,而且在很多情况下两者存在良好的正相关关系,可以用分光光度计简单地测定培养液的细胞浊度来估算细胞的干重。但我们的实验研究表明,在进行分批异养培养小球藻时,不管是从培养过程中 DW/OD 关系还是从 C/N 与 DW/OD 的关系都可看出, DW/OD 与培养基中葡萄糖浓度有较大关系,在葡萄糖含量充足时 DW/OD 较大,反之则较小。这可能是在葡萄糖含量充足时,细胞摄取葡萄糖的速度快于细胞分裂,细胞将摄取的葡萄糖转化为脂质储存起来,使得每个细胞相对较重,而在葡萄糖浓度

相对低时,细胞利用自身储存的脂质进行分裂,细胞变得相对较轻,从而使 DW/OD 发生较大变化。因此在进行分批异养培养小球藻时应从 OD 和 DW 两方面监测藻生物量。

参 考 文 献

- [1] Yamaguchi K. J Appl Phycol, 1997, 8: 487~502.
- [2] Becker E W. Microalgae Biotechnology & Microbiology. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 56~62.
- [3] Lee Y K, Low C S. Biotechnol Bioeng, 1992, 40(9): 1119~1122.
- [4] Chen F, Johns M R. Process Biochem, 1996, 31(6): 601~604.
- [5] J de la Noue, Eidhin D N. Biotechnol Bioeng, 1988, 31: 397~406.
- [6] Molina E, Martinez E, Sanchez S, et al. Process Biochem, 1991, 26: 183~187.
- [7] Borowitzka M A, Borowitzka L J. Microalgal Biotechnology. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1988, 1~36.
- [8] Hecht U, Mohr H. Physiol Plant, 1990, 78: 379~387.
- [9] 黄伟坤,唐英章,黄焕昌等.二硝基水杨酸法测定还原糖.食品检验与分析,北京:中国轻工业出版社,1989, 583~584.