

集胞藻 6803 的混合培养 ——光照强度和葡萄糖的影响

王永红^{1*} 李元广¹ 施定基² 沈国敏¹ 茹炳根³ 袁 航¹ 张嗣良¹

¹(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

²(中国科学院植物研究所光合作用研究中心 北京 100093)

³(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要 利用摇瓶研究了混合营养条件下单细胞蓝藻集胞藻 6803(*Synechocystis sp.* PCC6803)的生长特性,以及葡萄糖和光照强度对集胞藻 6803 生长的影响。实验结果表明,在葡萄糖消耗完之前,集胞藻 6803 的混合营养型生长处于对数生长期,且葡萄糖浓度及光照强度都对集胞藻 6803 的混合营养型生长有显著影响:在初始葡萄糖浓度 0.97~4.80g/L 范围内,同一光照强度培养下藻细胞的比生长速率随葡萄糖浓度的增大而降低;而在光照强度 15~55 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 范围内,初始葡萄糖浓度相同条件下藻细胞的比生长速率及对葡萄糖的藻体得率都随光照强度的增强而增大,但当光照强度在 55~96 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,集胞藻 6803 混合培养的比生长速率基本不变,出现了光饱和现象。

关键词 集胞藻 6803, 混合培养, 葡萄糖, 光照强度

中图分类号 Q813.1⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0193-05

随着藻类基因工程的发展,转基因蓝藻已有可能被大规模应用于植物疫苗生产、环保及高附加值产品生产等。转基因蓝藻大规模应用中必然涉及的蓝藻的高密度培养技术研究日益引起人们关注。单细胞蓝藻集胞藻(*Synechocystis sp.*)PCC6803 是藻类基因工程中常用的宿主系统,外源基因已被转入集胞藻 6803 并获得成功表达^[1]。但有关集胞藻 6803 高密度培养的研究尚未见报道。

蓝藻是具有光合作用能力的原核微生物。蓝藻除能进行光能自养型生长外,约有一半的蓝藻能在光照条件下利用外源有机物进行混合营养型生长,少数蓝藻还能在完全无光条件下利用外源有机物进行化能异养型生长。混合培养和部分兼性异养微藻的化能异养培养的生长速度及最终藻液浓度均大大高于光能自养培养。混合/异养培养已成为一种快速、大量培养微藻的有效方法^[2~7]。

由于在完全黑暗条件下,集胞藻 6803 不能利用外源有机物进行生长^[8],本文着重研究了集胞藻

6803 在混合营养条件下的生长特性及光照强度和葡萄糖浓度对集胞藻 6803 生长的影响,以期对转基因集胞藻 6803 的大规模高密度培养提供有益的信息。

1 材料和方法

1.1 藻种和培养条件

集胞藻 6803 由中国科学院植物研究所惠赠。在有光照和葡萄糖存在条件下进行的混合培养在装有 130mL BG-11 培养基的 250mL 摇瓶中进行。培养温度 30℃,摇床转速 130r/min。光照强度为 15~96 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照由 5 支 18W 日光型荧光灯提供。葡萄糖浓度为 0.97~4.80g/L。

1.2 分析方法

葡萄糖浓度用上海生物制品所葡萄糖试剂盒测定。藻液的光密度值(OD)用 721 型分光光度计在 750nm 处测定。以干重表示的藻细胞浓度(Biomass, g/L)相当于 OD_{750} 0.288,干燥条件为

收稿日期:1999-02-12,修回日期:1999-11-03。

基金项目:本研究得到生物反应器工程国家重点实验室 1996,1997 年度开放课题、国家自然科学基金(No.29876010)、国家“九五”科技攻关项目(96-C02-04-05)及海洋生物技术 863 项目(819-Q-01)的支持。

* E. mail:linwyh93@online.sh.cn Tel:(021)64253205

80℃, 4h。

2 结 果

2.1 集胞藻 6803 混合营养型生长与光能自养型生长的比较

在光照强度为 $15 \sim 96 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内, 当初始葡萄糖浓度低于(或等于) 2.90g/L 时, 葡萄糖对集胞藻 6803 的生长有强烈的促进作用。如图 1 所示, 当初始葡萄糖浓度为 2.90g/L 、光照强度为 $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 培养 5d 后混合培养的平均生长速率为 $OD_{750} 1.13/\text{d}$, 而其对照光自养培养同期的生长速率仅为 $0.13 OD_{750}/\text{d}$, 前者是后者的 8.7 倍。

2.2 光照和葡萄糖存在条件下集胞藻 6803 的生长特性

从图 2 不同光照及初始葡萄糖浓度条件下集

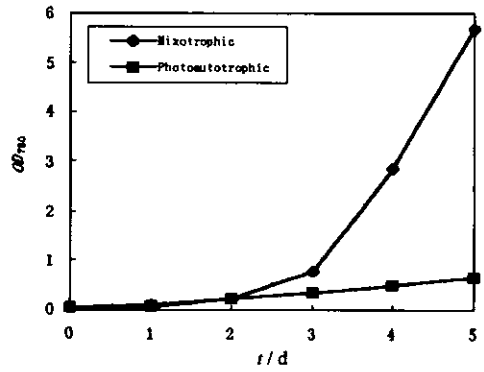


图 1 集胞藻 6803 混合营养型生长与光能自养型生长的生长曲线

Fig.1 The growth curves of mixotrophic and photoautotrophic cultivation of *Synechocystis sp.* PCC 6803 At $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The initial glucose concentration of mixotrophic growth is 2.90g/L .

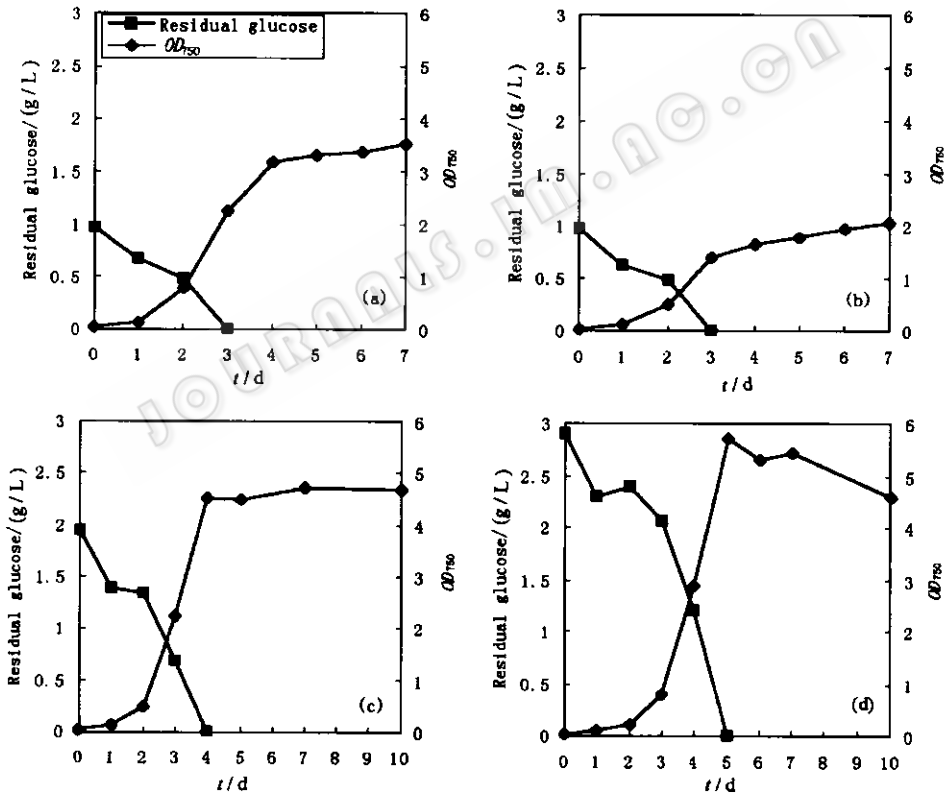


图 2 不同光照及初始葡萄糖浓度条件下集胞藻 6803 生长及残糖曲线

Fig.2 Variation of OD_{750} and residual glucose with culture time

Experiment (a) 0.97g/L , $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, (b) 0.97g/L , $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;

(c) 1.94g/L , $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; (d) 2.90g/L , $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

胞藻 6803 的光密度值随时间的变化可以看出, 在葡萄糖耗尽之前, 藻细胞生长处于对数生长期。而葡萄糖消耗完之后, 藻细胞的生长却与初始葡萄糖浓

度有关; 初始葡萄糖浓度低的培养物, 如 (a), (b) 呈缓慢生长; 初始葡萄糖浓度较高的培养物, 如 (c) 其光密度值基本保持不变; 而初始葡萄糖浓度最高的

(d)其光密度值呈缓慢下降趋势。

2.3 对数生长阶段的比生长速率

在对数生长阶段,藻细胞的比生长速率保持不变,此时光密度值 $OD = OD_0 \text{EXP}^{\mu t}$,其中 OD_0 为接种时的光密度值, μ 为比生长速率, t 为培养时间。根据对数生长阶段光密度值及其对应的培养时间进行拟合,可得各种培养条件下微藻细胞的比生长速率。

如图 3 所示,在同样光照强度条件下,集胞藻 6803 的比生长速率随初始葡萄糖浓度的增加而明显下降。另外,在初始葡萄糖浓度相同但不同光照强度培养条件下,藻细胞比生长速率随着光照强度的增大而增加,但高于 $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照对藻细胞生长不再有促进作用。这表明在集胞藻 6803 的混合营养型生长中也存在着光饱和现象。

2.4 葡萄糖利用完时的藻细胞浓度

初始葡萄糖浓度为 0.97、1.94、2.90g/L 的摇瓶,其葡萄糖浓度降为零的培养时间大约分别为 3、4、5d。图 4 显示了培养 3、4、5d 后,初始葡萄糖浓度为 0.97~4.80g/L、光照强度为 $15 \sim 96 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的培养物的光密度值 OD_{750} 。从图中可见随着培养

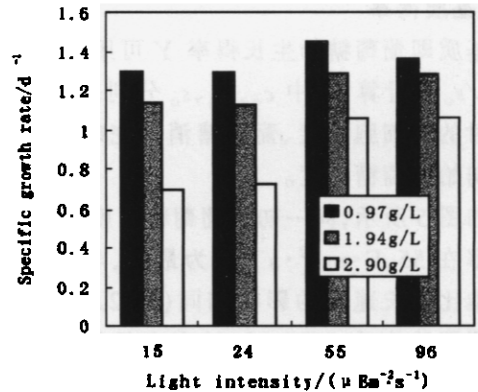


图 3 光照及初始葡萄糖浓度对集胞藻 6803 比生长速率的影响

Fig.3 Effects of light intensity and initial glucose concentration on the specific growth rate of *Synechocystis sp.* PCC6803

的进行,最大光密度值区域(用 H 表示)由 1~2g 葡萄糖/L、 $55 \sim 96 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 移至葡萄糖 2.9g/L、 $55 \sim 96 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。这表明光照强度及初始葡萄糖浓度都能影响最终藻细胞浓度。

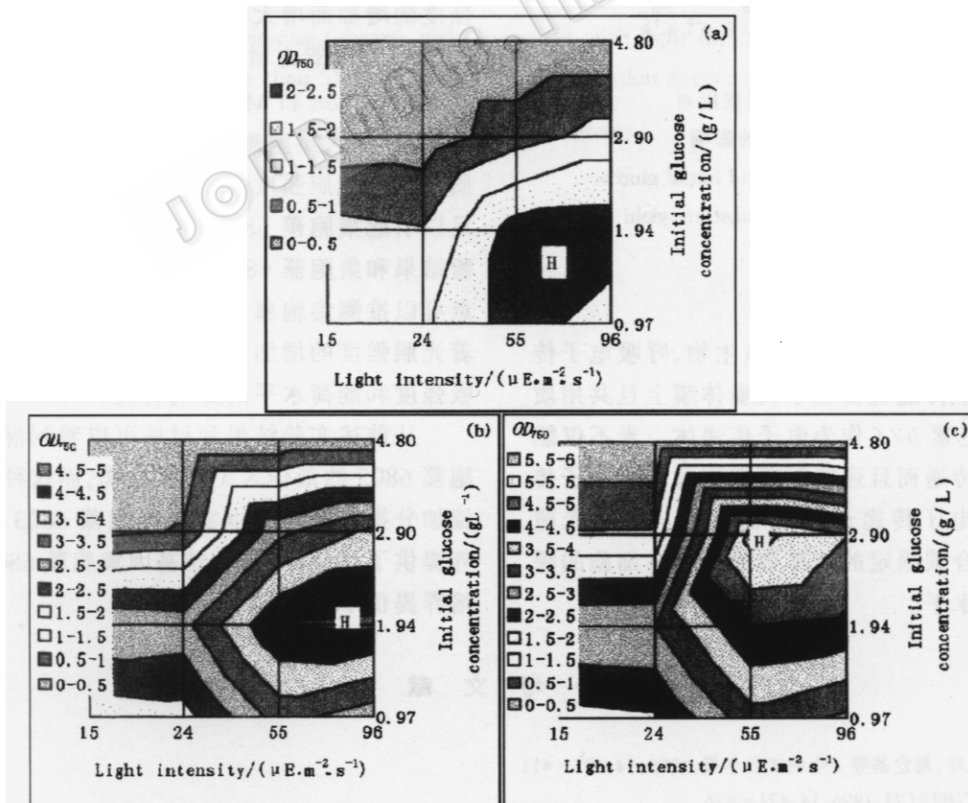


图 4 初始葡萄糖浓度及光照强度对藻细胞光密度(OD_{750})的影响

Fig.4 Effects of initial glucose concentration and light intensity on the optical density (OD_{750})

(a)three; (b)four; (c)five days cultivation

2.5 基质得率

基质即葡萄糖的生长得率 Y 可用公式 $Y = (c_m - c_0) / s_0$ 来计算, 其中 c_0 、 c_m 、 s_0 分别表示混合培养开始时的藻细胞浓度、葡萄糖消耗完时的藻细胞浓度和初始葡萄糖浓度。

如图 5 所示, 同一初始葡萄糖浓度培养物, 其基质得率在 $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 处为最大, 与光照强度对藻细胞比生长速率的影响相同(见 2.3), 而尤以初始葡萄糖浓度为 0.97g/L 时表现得最为明显。另外, 总的说来低葡萄糖浓度下藻细胞的基质得率大于高葡萄糖浓度下的基质得率。这可能是由于高葡萄糖浓度下藻细胞的内源呼吸更旺盛所致^[9]。

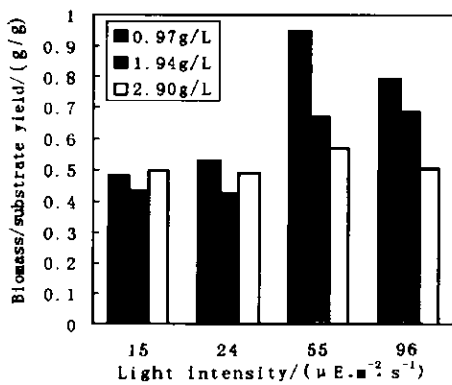


图 5 光照及初始葡萄糖浓度对集胞藻 6803 基质得率的影响

Fig. 5 Effects of light intensity and initial glucose concentration on the biomass/substrate yield

3 讨 论

集胞藻 6803 是一种光合原核生物, 呼吸电子传递链与光合电子传递链都位于类囊体膜上且共用质醌 PQ 和细胞色素 b/f 作为电子传递体。光不仅能调节光合电子传递而且还能对藻细胞的呼吸电子传递和循环光合电子传递进行调节^[10,11]。因此光照不仅能影响光合碳固定的速率也能影响藻细胞的呼吸强度和能荷水平。

实验结果表明, 集胞藻 6803 的混合营养型生长受光照强度和初始葡萄糖浓度的共同影响, 尤为引人注意的是在光照强度 $15 \sim 55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内, 混合培养的比生长速率和基质得率都随光照强度的增强而增大, 但当光照强度大于 $55 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 比生长速率和基质得率不再随光照强度增大, 出现了光饱和现象, 究其原因, 这种现象与上述集胞藻 6803 的呼吸链和光合链的特点有关。

Endo 等人认为, *Chlorella regularis* 等兼性异养微藻在光照及有机物存在条件下的比生长速率, 可以用相同光照条件下的光自养比生长速率与化能异养时的比生长速率之和来表示, 且此时微藻中 CO_2 的吸收、固定和有机物的同化在同时且相互独立的进行^[9,12~14]。根据这一结果, 藻细胞比生长速率和基质得率随着光强度的增大而增加的现象可解释为随着光照强度的增加, 藻细胞光合作用能力增强, 固定 CO_2 的能力增强, 从而引起比生长速率和以葡萄糖消耗量计算的基质得率的增加。由于集胞藻 6803 的混合营养型生长中也存在着光饱和现象, 因此集胞藻 6803 比生长速率和基质得率随着光照强度的增加而增大的原因之一, 可能是由于藻细胞固定 CO_2 的能力增强。

Anderson 和 McIntosh^[8] 发现, 在每日给与 5min 光照条件下, 集胞藻 6803 即可利用葡萄糖生长且基质得率随光照强度的增加而增大, 而此光照条件不足以引起集胞藻 6803 的光能自养生长。由这一实验结果和集胞藻 6803 光合作用系统和呼吸系统特点可以推测集胞藻 6803 比生长速率及基质得率随着光照强度的增加而增大的现象还可能与光照对呼吸强度和能荷水平的影响有关。

从前述实验结果和讨论可以看到混合培养是集胞藻 6803 的最佳人工培养模式, 而这种模式为利用流加分批培养方法以实现集胞藻 6803 的高密度培养提供了可能性, 也为转基因集胞藻 6803 的高密度培养提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 郭祥学, 赵 晖, 施定基等. 生物工程学报, 1998, 14: 405~411
- [2] Chen Feng. TIBTECH, 1996, 14: 421~426
- [3] Day J D, Edwards A P, Rodgers G A. Bioresource Technology, 1991, 38: 245~249
- [4] Chen Feng, Chen Hui, Gong Xiandi. Bioresource Technology, 1997, 62: 19~24
- [5] Marquez F J, Nisho N, Nagi S. J Chem Tech Biotechnol, 1995, 62: 159~164
- [6] Barclay W R, Meager K M, Abril J R. Journal of Applied Phycology, 1994, 6: 123~129
- [7] Lee Y K, Ding S Y, Hoe C H et al. Journal of Applied Phycology, 1996, 8: 163~169

- [8] Anderson S L, Mcintosh L. *J Bacteriol*, 1991, **173**(9):2761~2767
- [9] Martinez F, Orus M I. *Plant Physiol*, 1991, **95**:1150~1155
- [10] Siegfried S. *TIBS*, 1990, **15**:458~462
- [11] Mi H, Endo T, Schreiber U *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1994, **35**(2):163~173
- [12] Endo H, Sansawa H, Nakajima K. *Plant Cell Physiol*, 1997, **18**:199~205
- [13] Marquez F J, Sasaki K, Kakizono T. *J Ferment Bioeng*, 1993, **76**(5):408~410
- [14] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**(1):17~20

Mixotrophic Cultivation of *Synechocystis sp.* 6803: Influences of Light Intensity and Glucose *

WANG Yong-Hong¹ LI Yuan-Guang¹ SHI Ding-Ji²

SHEN Guo-Min¹ RU Bing-Gen³ YUAN Hang¹ ZHANG Si-Liang¹

¹(State Key Lab of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

²(Research Center of Photosynthesis, Institute of Botany, The Chinese Academy of Science, Beijing 100093)

³(College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The growth characteristics and the effects of glucose and light on the growth of *Synechocystis sp.* PCC6803 under mixotrophic conditions have been investigated. An exponential growth phase had been observed before glucose was consumed. The results showed that both of light intensity and glucose concentration had obvious effects on the mixotrophic growth of *Synechocystis sp.* PCC6803: the specific growth rate decreased with the increase of glucose concentration at light; the specific growth rate and biomass/glucose yield increased with light intensity, ranging from 15~55 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; when light intensity was higher than 55 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, light saturation appeared.

Key words *Synechocystis sp.* 6803, mixotrophic, glucose, light intensity