

螺旋藻培养液 pH 值变化的机理和碳源利用率的研究

李夜光 胡鸿钧 龚小敏

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

摘要 螺旋藻从培养液中吸收 CO_2 是培养液 pH 值升高的主要原因。应用化学平衡移动原理和培养液中 3 种碳源形态(CO_2 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-})相互转变化学反应平衡常数阐明了培养液 pH 值变化的机理,定量描述了 pH 值变化与碳源转化利用率之间的关系。利用 NaHCO_3 为碳源培养螺旋藻,碳源利用率与培养液 pH 值相对应;利用 CO_2 为碳源培养螺旋藻,碳源利用率在任何稳定的 pH 值下都是 100%。理论计算结果初步得到实验室内培养试验和 10000m^2 培养面积工业化生产螺旋藻统计数据的验证。研究结果揭示了螺旋藻培养系统的一个重要特点:监测 pH 值的同时实现了对碳源的监测;添加 NaHCO_3 或 CO_2 ,同时实现了对碳源和 pH 值的调控。为连续培养过程中 pH 值和碳源的调控提供了科学依据。

关键词 pH 值变化机理,碳源利用率,螺旋藻

pH 值大幅度上升是螺旋藻培养过程中培养液的最显著变化,pH 值升高主要是螺旋藻光合作用从培养液中吸收 CO_2 所致^[1]。一方面,对碱性环境的需求是螺旋藻的生理特性,同时,较强的碱性可以创造一个选择性的环境,有利于防止其它微生物的污染;另一方面,pH 值的不断升高又会对螺旋藻的生长繁殖产生不利影响,甚至导致培养的失败。控制培养液的 pH 值,是连续培养螺旋藻,特别是工厂化生产螺旋藻的一个关键^[2-4]。

由于螺旋藻培养过程中生理、生化及无机化学反应的高度复杂性,pH 值变化机理、pH 值变化与碳源转化利用之间的关系一直没有得到深入的研究和定量的描述。目前,国内已投产的螺旋藻工厂有十余家,绝大多数受到培养液 pH 值变化的困扰而频繁更换培养基,代价是生产成本大幅度上升。阐明 pH 值变化的机理、定量描述 pH 值变化与碳源转化利用率之间的关系将为螺旋藻培养过程中经济、有效、精确地调控 pH 值和碳源提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 藻种:钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),品系代号:(Sp)NS-90029。

1.1.2 培养基:除 NaHCO_3 浓度根据实验设计有所变化外,培养基其它成份及浓度与 Zarrouk 培养基相同。

1.1.3 培养条件:实验室内培养,光照强度 8000lX ,光暗时间比为 14:10h,温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。室外大面积培养采用自然光照,温度 $30 \sim 38^\circ\text{C}$ 。

1.1.4 培养液光密度(OD 值)测定:使用 721 型分光光度计,光波长 560nm 。

1.1.5 pH 值测定:使用 PM-10 型数字显示 pH 计测定。

本文于 1995 年 5 月 18 日收到。

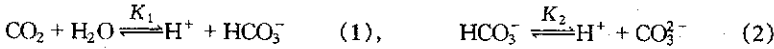
1.1.6 CO₂ 供给:钢瓶装商品 CO₂, 纯度 99.8% 以上;利用自制微孔塑料管向培养液中补充 CO₂。

1.1.7 培养液 OD 值与生物量的换算关系:OD_{560nm} = 1.0 时,每升藻液中含螺旋藻(干重)0.54g。

1.1.8 培养液中 3 种碳源形式(CO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻)数量增减,相互转化的理论和计算方法:

(a)螺旋藻培养液中 3 种碳源形式相互转化的动态平衡

螺旋藻培养液中 CO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻ 的相互转化可以表示为。



K₁、K₂ 是化学反应平衡常数,当反应处于平衡状态时,CO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻ 3 者的浓度(分别以[CO₂],[HCO₃⁻],[CO₃²⁻]表示)满足下列数量关系:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} = K_1 \quad (3), \quad \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} = K_2 \quad (4)$$

当浓度采用 mol/L 时, K₁ = 4.3 × 10⁻⁷, K₂ = 5.6 × 10⁻¹¹[5~7]。

(b)判断化学平衡移动方向的原理:根据化学平衡移动原理,平衡体系的任何条件发生变化后,平衡就向削弱或消除这些改变的方向移动。对于化学反应 A + B ⇌ C + D,其中一种或几种成分的浓度发生变化后,平衡状态被打破,化学反应将向生成 C 和 D(正方向)或向生成 A 和 B(负方向)的方向进行,直到建立起新的平衡为止。如果([C][D])/([A][B]) > K,反应向生成 A 和 B 的方向进行;反之,反应向生成 C 和 D 的方向进行^[7]。

(c)利用化学平衡常数 K 进行计算的方法:

设光合作用消耗 CO₂, 使 CO₂ 浓度减小 X mol/L, 导致化学平衡移动, 培养液中 Y mol/L HCO₃⁻ 与 H⁺ 结合生成 CO₂ 和 H₂O, Z mol/L HCO₃⁻ 解离为 H⁺ 和 CO₃²⁻, 达到新的平衡后, H⁺ 浓度由 [H⁺]₁ 变为 [H⁺]₂, 各变量满足下列关系:

$$\frac{[\text{H}^+]_2([\text{HCO}_3^-] - Y - Z)}{[\text{CO}_2] - X + Y} = K_1 \quad (5)$$

$$\frac{[\text{H}^+]_2([\text{CO}_3^{2-}] + Z)}{[\text{HCO}_3^-] - Y - Z} = K_2 \quad (6)$$

$$[\text{H}^+]_1 - Y + Z = [\text{H}^+]_2 \quad (7)$$

$$\text{pH}_2 = -\lg[\text{H}^+]_2 \quad (8)$$

只要确定了新的平衡状态下培养液的 pH 值(pH₂), X、Y、Z 3 个未知数即可由解方程组得到。以上计算方法也适用于人工添加 NaHCO₃ 或 CO₂ 导致的化学平衡移动。

2 结 果

2.1 培养过程中培养液 pH 值上升的机理

根据判断化学平衡移动方向的原理,可以判明,随着螺旋藻吸收利用 CO₂, 化学反应方程式(1)和(2)表示的反应都向正方向进行(推导过程省略),在新的平衡状态下,各种变量的关系由方程式(5)、(6)表达。

比较方程式(4)和(6),可见 [H⁺]₂ < [H⁺]₁, 即在新的平衡状态下, H⁺ 浓度小于初始

平衡的 H^+ 浓度, pH 值上升了。pH 值上升的机理可以概括为:

光合作用消耗 $CO_2 \rightarrow$ 培养液中 CO_2 浓度减小 $\rightarrow CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-}$ 平衡发生移动 $\rightarrow H^+$ 浓度减小, pH 值上升。

2.2 向培养液中添加 CO_2 或 $NaHCO_3$, pH 值下降的机理

向培养液中添加 CO_2 , 导致的化学平衡移动正好与 CO_2 被吸收利用时相反, 在新的平衡状态下, $[H^+]_2 > [H^+]_1$ (推导过程省略), 即 H^+ 浓度大于初始平衡状态时的 H^+ 浓度, pH 值下降。

向培养液中添加 $NaHCO_3$, 导致化学反应方程式(1)表示的反应向负方向进行, 式(2)表示的反应向正方向进行。在新的平衡状态下, $[H^+]_2 > [H^+]_1$ (推导过程省略), 即 H^+ 浓度大于初始平衡状态时的 H^+ 浓度, pH 值下降。

2.3 利用 $NaHCO_3$ 为碳源培养螺旋藻的碳源利用率

2.3.1 初始培养基中 $NaHCO_3$ 的利用率: Zarrouk 培养基中 $NaHCO_3$ 的浓度是 0.2 mol/L (16.8 g/L), 未接种的新鲜培养基 pH 值在 8.0 左右。当 $\text{pH} = 8.0$, CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-} 的浓度满足下列三元一次方程组:

$$\frac{10^{-8}[HCO_3^-]}{[CO_2]} = 4.3 \times 10^{-7}$$

$$\frac{10^{-8}[CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} = 5.6 \times 10^{-11}$$

$$[CO_2] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] = 0.2$$

$$\text{解方程组得 } [CO_2] = 0.004521 (\text{mol/L})$$

$$[HCO_3^-] = 0.1944 (\text{mol/L})$$

$$[CO_3^{2-}] = 0.001089 (\text{mol/L})$$

接种后, 伴随着细胞生长繁殖, 培养液 pH 值升高。设光合作用吸收利用了 $X \text{ mol/L}$ CO_2 , 同时 $Y \text{ mol/L}$ HCO_3^- 与 H^+ 结合生成 CO_2 和 H_2O , $Z \text{ mol/L}$ HCO_3^- 解离成 H^+ 和 CO_3^{2-} , pH 值由 8 上升到 9, 上述各变量的关系满足下列方程组:

$$\frac{10^{-9}(0.1944 - Y - Z)}{0.004521 - X + Y} = 4.3 \times 10^{-7}$$

$$\frac{10^{-9}(0.001089 + Z)}{0.1944 - Y - Z} = 5.6 \times 10^{-11}$$

$$10^{-8} - Y + Z = 10^{-9}$$

$$\text{解方程组得: } X = 0.01299, Y = 0.008811, Z = 0.008811$$

$$\text{碳源利用率} = \frac{0.01299}{0.2} \times 100\% = 6.46\%$$

用同样的方法计算出 pH 值由 8.0 分别上升到 9.5, 10.0, 10.3, 10.5, 11.0, 12.0 时, 对应的碳源利用率分别是 14.50%, 24.30%, 35.70%, 40.00%, 46.80%, 50.40%。

当初始培养基中 $NaHCO_3$ 的浓度分别是 0.05 mol/L (4.2 g/L) 和 0.1 mol/L (8.4 g/L), 计算得到的结果与 $NaHCO_3$ 的浓度是 0.2 mol/L 时一样。碳源利用率与培养液 pH 值的关系见图 1, 培养过程中培养液中 CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-} 浓度的变化见图 2。

2.3.2 向培养液中补加 $NaHCO_3$, 碳元素的利用率: 以 Zarrouk 培养基为例计算 pH 值在 10.0 与 10.5 之间波动时碳源的利用率。

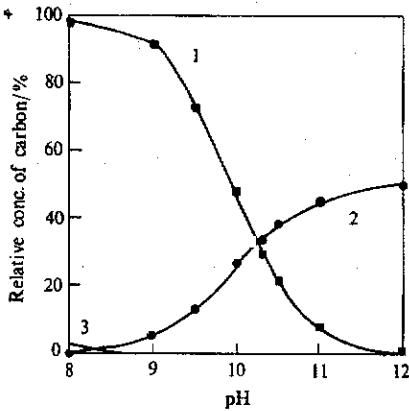


图 1 碳源利用率与 pH 值的关系曲线
Fig.1 Relation between carbon conversion ratio and pH

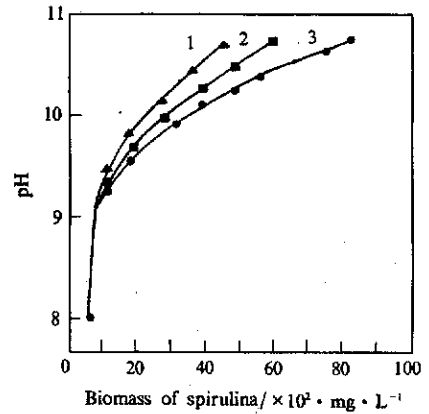


图 2 螺旋藻培养过程中, 培养液中 CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} 浓度变化曲线
Fig.2 Change of concentration of CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , in the process of *Spirulina* cultivation
1, Conc. of HCO_3^- ; 2, Conc. of CO_3^{2-} ; 3, conc. of CO_2

当 Zarrouk 培养基的 pH 值为 10.5 时, 向培养基中添加 $0.0936\text{mol/LNaHCO}_3$, pH 值降到 10.0(计算过程省略)。

随着光合作用吸收 CO_2 , pH 值再度升高到 10.5, 培养液中有 0.03652mol/LCO_2 被利用(计算过程省略)。

$$\text{碳源利用率} = \frac{0.03652}{0.0936} \times 100\% = 39\%$$

用同样的方法计算出, 再次使 pH 值降到 10.0, 需要向培养液中添加 $0.1381\text{mol/LNaHCO}_3$; 在 pH 值又升高到 10.5 的过程中, 光合作用利用了 0.05386mol/LCO_2 , 碳源利用率是 39%, 与第一次相同。第三次需要添加 $0.2039\text{mol/LNaHCO}_3$, 光合作用利用了 0.07953mol/LCO_2 , 碳源利用率仍然是 39%。

用同样的方法计算得到, 添加 NaHCO_3 控制 pH 值在 10.0 与 10.3 之间, 碳源利用率是 34.58%。

2.4 利用 CO_2 为碳源培养螺旋藻的碳源利用率

很显然, 当培养液吸收 CO_2 的量与光合作用消耗 CO_2 的量相等时, 不会导致化学平衡的移动, 培养液 pH 值保持不变。

向培养液中添加 CO_2 , 使 pH 值降低, 然后光合作用吸收 CO_2 , 使 pH 值恢复, 在这一过程中, 光合作用吸收利用的 CO_2 的量与添加的 CO_2 (被培养液吸收)的量相同(数学推导过程省略)。

所以, 当维持 pH 值不变, 反复添加 CO_2 的碳源利用率是 100%。

2.5 实际培养过程中 pH 值的变化和碳源利用率

2.5.1 pH 值随生物量累积而上升: 生物量累积代表了光合作用吸收利用 CO_2 的数量。在实验室培养螺旋藻, pH 值变化与生物量累积的关系见图 3。培养基碳源浓度越低, pH 值上升越快。

2.5.2 初始培养基中碳源(NaHCO_3)的利用率:根据图 3 提供的数据,计算生物量累积和碳源利用率,结果如表 1 所示。

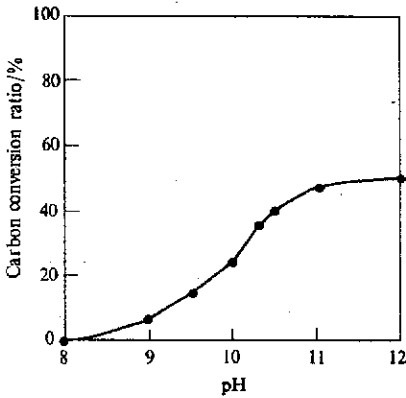


图 3 螺旋藻培养液 pH 值随生物量累积上升曲线

Fig.3 Increase of pH value with increase of biomass of *Spirulina*.

NaHCO_3 concn./mg. L^{-1} : 1, 300; 2, 500; 3, 800

表 1 实验测得的 pH10.75 时的碳源利用率
Table 1 Experimental carbon conversion ratio corresponding to pH10.75

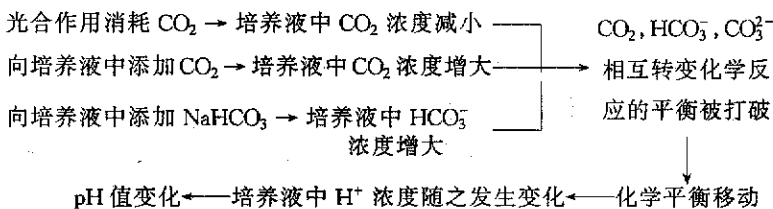
Conc. of $\text{NaHCO}_3/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3	5	8
Achieved pH value	10.75	10.75	10.75
Biomass/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.351	0.502	0.767
Used $\text{NaHCO}_3/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.154	1.652	2.523
Carbon conversion ration/%	38	33	32

2.5.3 以 NaHCO_3 补充碳源连续培养螺旋藻的碳源利用率:10000 m^2 培养面积工业化生产螺旋藻,以添加 NaHCO_3 补充碳源,维持培养液 pH 值在 10.3 左右。生产 2.915t 螺旋藻(含水量 3%),消耗 NaHCO_3 26.55t。按螺旋藻含碳 47% 计算,连续培养过程中碳源利用率是 35%。

4 讨 论

螺旋藻培养过程发生的生理、生化及无机化学反应是极其复杂的。在本项研究中,为了定量地描述培养液中 pH 值变化的机理及碳源转化利用率,采用了将问题简化的方法:只考虑碳源变化对培养液 H^+ 浓度的影响,不考虑培养基中其它营养成分变化及化学平衡移动对 H^+ 浓度的影响,将“主要的”原因作为“唯一的”原因来进行分析,对于培养液 pH 值变化机理的描述是正确的,但计算的结果会有所偏差。本文的主旨在于揭示一种原理,一种本质的联系,加深对螺旋藻培养系统中发生的重要过程的理解,从而提供新的思路和方法。计算的意义更主要地在于将研究方法从定性的层次上升到定量的层次。

培养液 pH 值变化的机理可以概括为:



分析初始培养基中碳元素利用率的计算结果,可以得出两点结论:

1. 碳源利用率与初始碳源(NaHCO_3)浓度无关,加大或减小培养基配方中 NaHCO_3 的浓度不影响碳源利用率;2. 一般情况下培养液碱性不超过 pH11,所以,碳源的利用率不超过 45%。

向培养液中补加 NaHCO_3 ,碳源利用率的计算结果反映出:1. 通过反复添加 NaHCO_3 维持培养液 pH 值在某两个值之间波动,需要添加的 NaHCO_3 一次比一次多,但每次所添加的碳源的利用率都是相同的;2. 培养液 pH 值波动范围不同,所添加的碳源的利用率不同,碳源利用率由 pH 值波动的上限决定;3. 某一 pH 值波动上限所对应的碳源利用率与相同 pH 值时初始培养基中碳源的利用率相同,即一次性加入 NaHCO_3 与分批添加 NaHCO_3 ,碳源的利用率是相同的。

对于利用 CO_2 为碳源,碳元素利用率的分析表明,碳源利用率不与 pH 值对应,无论 pH 值是多少,只要保持稳定,碳源的利用率都是 100%。需要说明,“所添加的 CO_2 ”指已被培养液吸收的 CO_2 ,而不是所提供的气体 CO_2 。所提供的 CO_2 有多少能被培养液吸收,由培养液的特性和添加 CO_2 的工艺技术决定。

在实验室中利用不同 NaHCO_3 浓度的培养液培养螺旋藻,得到 pH10.75 时的碳源利用率分别是 38%,33%,32%(表 1),pH10.75 时碳源利用率的理论值在 40%与 46.8%之间(图 3),实验结果与理论计算之间的差别主要由两方面原因引起:1. 理论计算采用的简化方法与实际培养过程中的复杂情况之间的差距;2. pH9 以下培养液碳源的损失。由螺旋藻培养液的特性所决定,搅拌或摇动情况下,培养液的 pH 值上升很快,几个小时内由 pH8 上升到 pH9 以上,这一阶段内 pH 值的上升,主要是由于培养液中的 CO_2 向空气中释放^[9],而不是光合作用吸收 CO_2 所致。这部分碳源的减少没有引起生物量的积累(如图 1 所示),由 pH8 到 pH9 对应的碳源利用率的理论值是 6.46%,所以应该在实验测定的基础上增加 6.46% 来进行校正,这样,实验结果应该分别为 44.46%,39.46%,38.46%,与理论计算的数据就比较接近了。

10000 m^2 培养面积工业化生产螺旋藻,添加的 NaHCO_3 中碳元素的利用率为 35%,与理论计算结果 35.7% 非常接近,因为添加 NaHCO_3 是在 pH 值 10.3 左右的情况下进行的,没有碳源损失的问题。

简化培养基配方一直被作为降低螺旋藻生产成本的重要方法,主要是减小 NaHCO_3 的浓度^[8]。其实, NaHCO_3 浓度小,pH 值上升快(图 3),很快就需要添加 NaHCO_3 来控制 pH 值,而理论上添加 NaHCO_3 和一次性加入 NaHCO_3 的碳源利用率是相同的。实际培养过程中,后添加的 NaHCO_3 与初始加入的 NaHCO_3 相比,减少 6.46% 的碳源损失实际碳源利用率相应地提高了 6.46%。由此可见,为了减少 NaHCO_3 用量而采用减小初始培养基中的 NaHCO_3 的浓度的方法有一定的效果,但不显著。

pH 值变化机理、pH 值变化与碳源转化利用率之间的关系揭示了螺旋藻培养系统的一个重要特点:监测 pH 值的同时实现了对碳源的监测;添加 NaHCO_3 或 CO_2 ,同时实现了碳源和 pH 的调控。这一特点其实就是一种同时调控碳源和 pH 值的原理:根据 pH 值变化添加 NaHCO_3 或 CO_2 ,控制稳定的 pH 值就是提供稳定的碳源。具体方法就是:添加 NaHCO_3 或 CO_2 将 pH 值控制在一个确定的范围内。这一方法的特点是①简便:只需要一个技术参数 - pH 值;②精确:它不是仅仅补充了减少的碳源,而是提供了所需要的碳

源,因为它已经根据碳源利用率考虑了不能被利用的那部分碳源;③经济、高效:同时实现了对碳源和 pH 值的调控,所提供的正是系统所需要的,既没有多余的东西,也没有负效应。这一方法经本文作者应用生产实践,上述特点得到了充分证明。

NaHCO_3 的碳源利用率不超过 45%,而 CO_2 的碳源利用率可以达到 100%,从有效利用资源的角度看,以 CO_2 为碳源的优势是非常显著的。维持培养液 pH 值在两个值之间波动,需要添加的 NaHCO_3 一次比一次多,而需要添加的 CO_2 每次都一样的,从有效调控 pH 值的角度看, CO_2 也优于 NaHCO_3 。

本文的研究方法在微藻生物技术研究领域是一次尝试,理论计算的结果初步得到了实验数据的验证,说明所采用的理论分析和计算的原理、方法,对于定量描述螺旋藻培养系统中复杂的变化过程是有效的,具有指导生产的应用价值。

参 考 文 献

- [1]Kaplan D, Richmond A, Dubinsky A *et al.* In: Richmond, A eds, Handbook of Microalgal Mass Culture, CRC Press, Florida, 1986, PP. 147~198.
- [2]Richmond A. In: Borowitzka A Borowitzka, J eds. Microalgal Biotechnology, Cambridge University Press, Cambridge, 1988, 85~121.
- [3]Richmond A. In: Round and Chapmand eds, Progress in Phycological Research(Vol. 7), Biopress, London, 1990, 1~62.
- [4]Vonshak A, Richmond, A. In: Biomass, Elsevier Applied Sciences Publishers, England, 1988, pp. 233~247.
- [5]汪小兰主编. 有机化学,北京:人民教育出版社,1981, pp. 92~109.
- [6]陈荣三,黄孟健,钱可萍主编. 无机及分析化学,北京:人民教育出版社,1979, pp. 86~137.
- [7]Mahan, B H 主编(复旦大学无机化学教研室译). 大学化学:上海科学技术出版社,1982, 168~245.
- [8]曾明涛,胡鸿钧. 武汉植物学研究,1992, 10:73~82
- [9]Vasquez V H P. In: Becker W, Tubingen eds, Advance in Limnology, Germany, E. Schweizerbart' Sche Verlags Buchhandlung, 1985, Vol. 20, pp. 95~113.

Studies on the Mechanism of pH Value Change and Carbon Conversion Ratio of *Spirulina Media*

Li Yequang Hu Hongjun Gong Xiaomin

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

Abstract The rise of pH value is mainly caused by the absorption of CO_2 by *Spirulina* from the media. The mechanism of pH value change and the relationship between pH value change and carbon conversion ratio have been demonstrated by using the principle of the movement of chemical equilibrium and the constant of chemical equilibrium of the chemical reaction by which the three forms of inorganic carbon(CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) being changed to each other. When NaHCO_3 is used as carbon source, the carbon conversion ration is corresponding to the pH values. When CO_2 is used as carbon source, carbon conversion ratio is always 100% as long as the pH value keep steady. The results of theoretic calculation have been proved by experiments carried out in laboratory and mass culture in 10000m² ponds. One important characteristic of *Spirulina* culture system has been revealed: while the pH value is monitored, the carbon source is also monitored; when NaHCO_3 or CO_2 is supplied, both carbon and pH value have been regulated. This provides scientific basis for pH value and carbon regulation in *Spirulina* continuous culture.

Key words pH value change mechanism, carbon conversion ratio, *Spirulina*