

# 有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响

喻国策<sup>1</sup> 丛 威<sup>1</sup> 蔡昭铃<sup>1</sup> 施定基<sup>2</sup> 欧阳藩<sup>1</sup>

(1 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; 2 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要:**在培养基中添加多种有机碳化合物对鱼腥藻 7120 进行培养。结果表明,葡萄糖的存在能明显地促进细胞的生长,但细胞仅能有限地利用葡萄糖;细胞混合营养生长的饱和光强约为  $80\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。乙酸、蔗糖、乙醇和甘油对细胞生长的影响不很显著,乳酸、柠檬酸、谷氨酸和甘氨酸表现出明显的抑制作用。鱼腥藻 7120 不能利用葡萄糖进行化能异养生长和光激活的化能异养生长,但有轻微的光异养现象。

**关键词:**鱼腥藻 7120; 有机碳化合物; 葡萄糖; 混合营养生长; 化能异养生长

**中图分类号:**Q949.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2003)03-0238-05

许多蓝藻(蓝细菌)及其他一些微藻能够利用有机碳化合物进行生长<sup>[1-3]</sup>,混合营养培养和异养培养已成为微藻大规模培养的有前途的可能的的方式<sup>[4]</sup>。微藻细胞对于利用何种有机碳化合物以及利用的程度具有偏爱性,合适的有机碳底物的选择是混合营养培养中首要的一个环节。固氮蓝藻鱼腥藻 7120 是藻类分子生物学研究的模式藻种,是转基因获得成功的少数藻种之一<sup>[5,6]</sup>,鱼腥藻 7120 的培养具有潜在的应用意义。为探索鱼腥藻 7120 混合营养培养的可能性,本文考察葡萄糖等有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 藻种和培养基** 鱼腥藻 *Anabaena* sp. 7120 由中国科学院植物研究所光合作用研究中心提供。实验采用无氮 BG-11 培养基,在需要时加入不同浓度的有机碳化合物。

**1.2 培养过程** 在旋转式摇床上,在光强为  $160\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、转速为 130r/min 和 30℃条件下进行种液培养,培养至对数期后,取 20mL 种液接入含 130mL 培养基的 250mL 锥形瓶中,培养基中含不同浓度的有机碳化合物。培养条件除光强在指明处有所变化外与种液培养时相同,光照由 5 只日光灯(PHILIPS TLD 18W/54)提供。对于所要考察的每一种情况同时进行两组平行实验。

**1.3 分析方法** 藻细胞浓度通过用分光光度计(泰州东方仪器厂,721 型)检测藻液在 750nm 的吸收值

得到,在  $\text{OD}_{750}0.0-0.6$  范围内干重与  $\text{OD}_{750}$  呈线性关系。细胞叶绿素(Chl)浓度通过下面公式<sup>[7]</sup>计算得到:  $\text{Chl}(\text{mg/L}) = 14.96(\text{OD}_{678} - \text{OD}_{750}) - 0.616(\text{OD}_{720} - \text{OD}_{750})$ ,  $\text{OD}_{678}$  和  $\text{OD}_{720}$  以及  $\text{OD}_{750}$  同时测得。葡萄糖浓度采用 Fehling 方法<sup>[8]</sup>或葡萄糖测定试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)测定。光强用光合有效辐射计(北京师范大学光电仪器厂,FGH-1 型)测定。光合放氧和呼吸吸氧采用 Clark 型氧电极(HANSATECH, GREAT BRITAIN)在光下和在暗中测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 葡萄糖对鱼腥藻 7120 生长的影响

在预备实验中,葡萄糖浓度在 0—5g/L 和 0—15g/L 范围内变化时,细胞生长均受到明显的促进,于是考察葡萄糖浓度在 0—30g/L 内变化对细胞生长的影响。葡萄糖浓度在 0—18g/L 范围内提高可以显著地促进细胞的生长,在 18—30g/L 范围内变化对细胞生长不再有更大的影响,混合营养培养的最大细胞密度是光自养培养时的 2.5—3.4 倍,混合营养生长对数期比光自养生长时有不同程度的缩短。细胞叶绿素浓度与细胞密度在整个培养过程大致存在相同的变化趋势,细胞叶绿素含量在培养过程没有大的波动。混合营养培养过程细胞对葡萄糖的利用则非常有限(采用 Fehling 方法测定)。

葡萄糖在蓝藻细胞中主要是通过磷酸戊糖途径

被分解利用的<sup>[9-11]</sup>, 细胞中三羧酸循环是不完全的<sup>[12]</sup>。葡萄糖的存在可能弥补了 CO<sub>2</sub> 供碳的不充分, 并可能使细胞在碳源利用中所消耗的 ATP 和 NADPH 有所节省。葡萄糖对细胞生长的促进作用已经在许多微藻的培养中表现出来, Martinez 和 Orus<sup>[13]</sup> 认为即使在光饱和条件下也需要用葡萄糖来达到最大生长速率。实验中鱼腥藻 7120 可以在较高的底物渗透压条件下保持良好的生长, 这与同为原核生物的细菌相似, 可能与它们具有相似的细胞壁结构有关<sup>[14,15]</sup>。Droop<sup>[1]</sup> 认为葡萄糖进入蓝藻细胞不是一个容易的过程, 较高的外源有机底物浓度可能也有助于有机底物被细胞利用。

2.2 光强对鱼腥藻 7120 以葡萄糖为有机底物的混合营养生长的影响

图 1 表示初始葡萄糖浓度为 3g/L 时光强对鱼腥藻 7120 混合营养生长的影响。从中可以看出, 最大细胞密度、细胞比生长速率和最大叶绿素浓度在光强小于 80μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 时, 随着光强的增大, 产生明显增大的变化; 在光强大于 80μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 时, 随着光强的增大, 不再增大或变化较小。从这些变化判断, 鱼腥藻 7120 以葡萄糖为有机底物的混合营养生长的饱和光强可能在 80μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 左右。

一般地微藻只在较低光强下利用有机底物生长<sup>[16-18]</sup>, 这时有有机底物的利用弥补了光合作用的不足。但佛氏绿胶藻 (*Chlorogloea fritschii*)<sup>[19]</sup>, 尤其是满江红鱼腥藻 (*Anabaena azollae*)<sup>[20]</sup> 和鱼腥藻 HB 1017 (*Anabaena* sp. HB 1017)<sup>[21]</sup>, 也可以在较高光强下同化有机物。从上述结果可见, 鱼腥藻 7120 是又一株有类似表现的鱼腥藻。这很可能是因为在这类蓝藻细胞中有机物的氧化机制不够完善, 有机物进入细胞后主要是作为碳源而不是能源被细胞代谢, 细胞各种生理活动的进行包括有机底物的主动运输所需要的能量主要是由光能来提供, 在一定范围内光强的提高不会抑制而是有利于细胞对外源有机底物的利用, 细胞的混合营养生长因而可以得到更大的促进。

2.3 乙酸对鱼腥藻 7120 生长的影响

乙酸作为最简单的脂肪酸分子, 虽然可以被某些具有异养能力的微藻细胞所利用<sup>[1,3]</sup>, 但鱼腥藻 7120 的生长并没有被乙酸所促进, 相反乙酸的存在可能造成了细胞生长环境的不利变化而在某种程度上阻碍了细胞的生长(表 1)。乙酸一般是通过乙醛酸循环被细胞利用的, 鱼腥藻 7120 不能利用乙酸说明鱼腥藻 7120 细胞的乙醛酸循环可能不活跃。

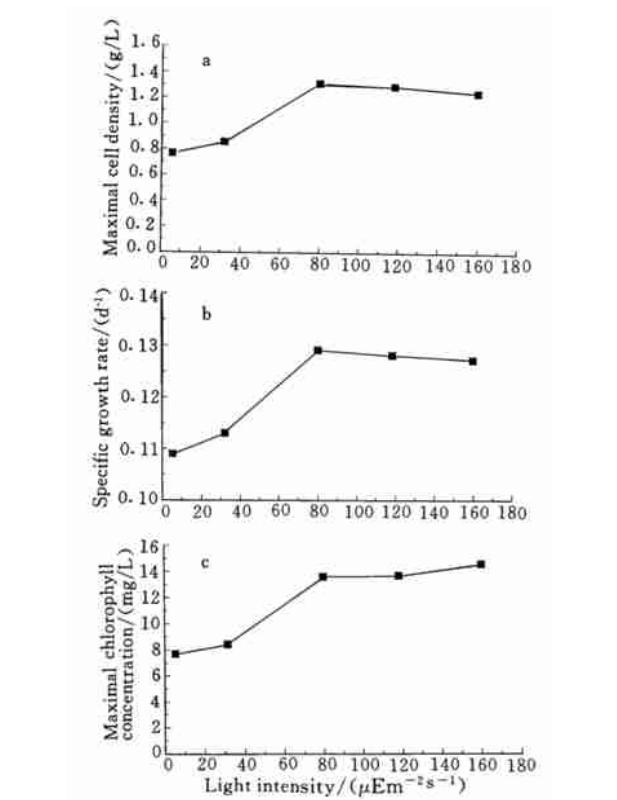


图 1 光强对鱼腥藻 7120 以葡萄糖为有机底物的混合营养生长的影响 a 最大细胞密度变化; b 细胞比生长速率变化; c 最大叶绿素浓度变化

Fig 1 Effect of light intensity on the glucose mixotrophic growth of *Anabaena* sp. 7120 (a) change of maximal cell density; (b) change of specific growth rate; (c) change of maximal chlorophyll concentration

表 1 乙酸对鱼腥藻 7120 生长的影响

Tab. 1 Growth of *Anabaena* sp. 7120 in BG-11 medium containing different concentrations of acetate.

| 乙酸浓度<br>Acetate conc.<br>(g/L) | 最大细胞密度<br>Maximal cell<br>density(g/L) | 比生长速率<br>Specific growth<br>rate( day <sup>-1</sup> ) | 最大叶绿素浓度<br>Maximal Chl. conc.<br>(mg/L) |
|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                              | 0.81                                   | 0.159                                                 | 7.07                                    |
| 0.5                            | 0.675                                  | 0.153                                                 | 5.17                                    |
| 1.0                            | 0.653                                  | 0.151                                                 | 4.79                                    |
| 1.5                            | 0.518                                  | 0.138                                                 | 4.37                                    |

2.4 其他有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响

考察几种较为典型的有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响(数据未列出)发现, 乳酸、柠檬酸、谷氨酸和甘氨酸这四种有机底物的存在对细胞生长有抑制作用, 在培养的前 6 d, 培养液渐趋无色。蔗糖、乙醇和甘油对鱼腥藻 7120 的生长影响不大, 其中蔗糖稍有利于细胞的生长。不同有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响说明, 鱼腥藻 7120 细胞虽然具有一定的异养能力,

但能够被它所吸收利用的有机碳底物可能并不多。

2.5 有机碳化合物对鱼腥藻 7120 光合和呼吸的影响

从几种有机碳化合物对细胞光合放氧和呼吸吸氧的影响(表2)来看,葡萄糖、乙酸、蔗糖、甘油和乙醇没有引起细胞光合作用和呼吸作用太大的变化,而乳酸、柠檬酸和谷氨酸则对细胞的生理活动造成了破坏性的影响。大体与这些有机底物对细胞生长影响的宏观效果一致。

表 2 有机碳化合物对鱼腥藻 7120 光合和呼吸的影响  
Tab. 2 The effect of Some organic compounds on photosynthesis and respiration of *Anabaena* sp. 7120 cells on some organic compounds. Exponentially growing photoautotrophic cells were collected and suspended in BG-11 medium containing 1 g/L of each organic carbon source. Photosynthetic rates and respiratory rates were measured by a Clark-type oxygen electrode.

| 有机碳化合物            | 放氧率                                             | 耗氧率                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Organic compounds | O <sub>2</sub> evolution rate                   | O <sub>2</sub> consumption rate                 |
|                   | ( $\mu\text{mol mg dry wt}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{mol mg dry wt}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) |
| —                 | 0.822                                           | 0.336                                           |
| Glucose           | 0.611                                           | 0.233                                           |
| Acetate           | 0.875                                           | 0.417                                           |
| Sucrose           | 0.708                                           | 0.280                                           |
| Glycerol          | 0.612                                           | 0.236                                           |
| Ethanol           | 0.701                                           | 0.317                                           |
| Lactate           | -0.022                                          | 0.030                                           |
| Citrate           | -0.022                                          | 0.044                                           |
| Glutamate         | -0.081                                          | 0.074                                           |

2.6 鱼腥藻 7120 的异养生长能力

2.6.1 鱼腥藻 7120 的化能异养生长能力 在完全黑暗的条件下,在培养基中加入葡萄糖等有机底物进行化能异养培养,12d 后,细胞均没有生长现象,即使葡萄糖浓度提高到 9g/L,细胞也未见生长(数据未列出)。这基本排除了鱼腥藻 7120 利用葡萄糖等有机底物进行化能异养生长的可能。虽然少数微藻能够在黑暗条件下利用有机底物进行化能异养生长<sup>[1,3]</sup>,但多数微藻却做不到这样。实验结果表明,没有光的参与,鱼腥藻 7120 细胞可能不能利用外源有机物质或利用的程度极其有限,细胞完全依赖有机底物的化能异养生长将无法实现。

2.6.2 鱼腥藻 7120 的光异养生长能力 光异养是指细胞利用光作为能源、利用有机碳化合物作为碳源的营养方式<sup>[3]</sup>。某些蓝细菌已经证明具有光异养生长现象<sup>[2]</sup>。光异养生长条件可以通过在含有有机碳源的培养基中加入合适浓度的二氯苯基二甲脲

(DCMU)来实现<sup>[22]</sup>。此时细胞光系统 II 的活性被抑制,非环式电子传递被阻止,NADPH 不再产生,CO<sub>2</sub> 不再被还原同化,但光系统 I 仍在起作用,细胞仍可通过环式磷酸化进行 ATP 的合成。

从图 2 推测,鱼腥藻 7120 应能够利用葡萄糖进行光异养作用,只是这种营养作用十分微弱,不足以支持细胞的持久生长。即使在不加 DCMU 的混合营养培养中,鱼腥藻 7120 对葡萄糖的利用能力也是有限的,因此这种微弱的光异养作用是可以理解的。并且,由此判断,鱼腥藻 7120 对葡萄糖的利用没有光系统 II 的参与也能够进行,不过很可能会受到一些影响。

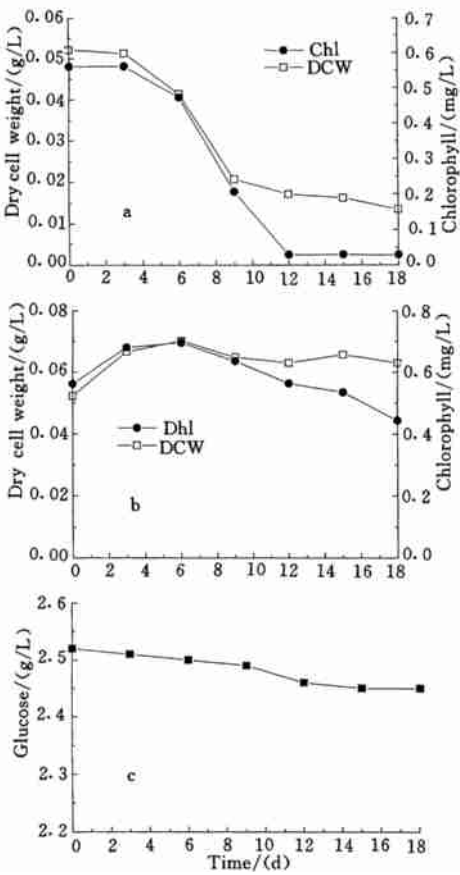


图 2 鱼腥藻 7120 的光异养现象 a 光自养生长被  $10^{-5}\text{mol/L}$  DCMU 所抑制;b 光异养现象;c 光异养培养过程葡萄糖消耗  
Fig. 2 Photoheterotrophic growth of *Anabaena* sp. 7120 (a) inhibition of photoautotrophic growth of *Anabaena* sp. 7120 by  $10^{-5}\text{mol/L}$  DCMU; (b) photoheterotrophic growth of *Anabaena* sp. 7120; (c) glucose consumption in photoheterotrophic culture of *Anabaena* sp. 7120

2.6.3 鱼腥藻 7120 的光激活的化能异养生长能力 Anderson和 McIntosh<sup>[23]</sup>指出蓝细菌 *Synechocystis* sp. 6803 具有一种光激活的异养生长的能力,即对在完全黑暗条件下不能利用葡萄糖进行生长的 *Synechocystis*

sp. 6803 每天施以脉冲式的短暂光照 (5min, 404μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), *Synechocystis* sp 6803 即能够依靠葡萄糖生长, 而这样的光照条件是不足以支持藻细胞的光自养生长的。在这里, 光起着一种调节异养代谢、细胞分化或者其他形态发生过程的环境信号的作用。考

虑到这种光激活的异养生长能力对于微藻大规模异养培养的潜在意义, 表 3 以相同的方式对鱼腥藻 7120 是否可进行光激活的化能异养生长进行了考察, 从中推断, 鱼腥藻 7120 可能不存在光激活的化能异养生长的可能性。

表 3 鱼腥藻 7120 光激活的化能异养生长能力

Tab. 3 Examination of light activated heterotrophic growth of *Anabaena* sp. 7120. Heterotrophic cultures of *Anabaena* sp. 7120 were carried out in BG 11 medium containing different glucose concentrations with a daily pulse of light of 5 min of 160 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

| Glucose conc.<br>(g/L) | DCW <sup>a</sup> (g/L)<br>(0 day) | Chl <sup>a</sup> (mg/L)<br>(0 day) | DCW <sup>a</sup> (g/L)<br>(4 day) | Chl <sup>a</sup> (mg/L)<br>(4 day) | DCW <sup>a</sup> (g/L)<br>(8 day) | Chl <sup>a</sup> (mg/L)<br>(8 day) | DCW <sup>a</sup> (g/L)<br>(12 day) | Chl <sup>a</sup> (mg/L)<br>(12 day) |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 0                      | 0.043                             | 0.471                              | 0.034                             | 0.441                              | 0.030                             | 0.426                              | 0.023                              | 0.383                               |
| 3                      | 0.043                             | 0.471                              | 0.027                             | 0.441                              | 0.029                             | 0.398                              | 0.039                              | 0.398                               |
| 9                      | 0.043                             | 0.471                              | 0.037                             | 0.471                              | 0.033                             | 0.471                              | 0.028                              | 0.426                               |

<sup>a</sup> DCW and Chl mean dry cell weight and chlorophyll, respectively.

参考文献:

[ 1 ] Droop M R. Heterotrophy of carbon [ M]. California: University of California Press, 1974, 530—559

[ 2 ] Smith A J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism [ M]. London: Blackwell Scientific Publications. 1982, 47—85

[ 3 ] Tuchman N C. The role of heterotrophy in algae [ M]. San Diego: Academic Press. 1996, 299—319

[ 4 ] Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth [ J]. *Tibtech*, 1996, **14**: 421—426

[ 5 ] Ren L, Shi D J, Dai J X, *et al.* Expression of the mouse metallothionein I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium [ J]. *FEMS Microbiol. Letts.*, 1998, **158**: 127—132

[ 6 ] Liu F L, Zhang H B, Shi D J, *et al.* Construction of shuttle, expression vector of human tumor necrosis factor alpha(hTNFα)gene and its expression in a cyanobacterium, *Anabaena* sp. 7120 [ J]. *Science in China (Series C)*, 1999, **42**: 25—33

[ 7 ] Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [ M]. San Diego: Academic Press, 1988, 766—778

[ 8 ] Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Methods and Techniques in Biochemical Experiments [ M]. Beijing: Higher Education Press. 1981, 6—9. [ 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981, 6—9]

[ 9 ] Cheung W Y, Gibbs M. Dark and photometabolism of sugars by a blue green alga: *Tolypothrix tenuis* [ J]. *Plant Physiol.*, 1966, **41**: 731—737

[ 10 ] Pearce J, Carr N G. The incorporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis* [ J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1969, **54**: 451—462

[ 11 ] Pelroy R A, Rippka R, Stanier R Y. Metabolism of glucose by unicellular blue green algae [ J]. *Arch. Mikrobiol.*, 1972, **87**: 303—322

[ 12 ] Pearce J, Leach C K, Carr N G. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue green alga *Anabaena variabilis* [ J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1969, **55**: 371—378

[ 13 ] Martinez F, Onus M I. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101 [ J]. *Plant Physiol.*, 1991, **95**: 1150—1155

[ 14 ] Drews G. Fine structure and chemical composition of the cell envelopes [ M]. London: Blackwell Scientific Publication. 1973, 99—116

[ 15 ] Drews G, Weckesser J. Function, structure and composition of cell walls and external layers [ M]. London: Blackwell Scientific Publications. 1982, 333—357

[ 16 ] Kiyohara T, Fujima Y, Hattori A *et al.* Effect of light on glucose assimilation in *Tolypothrix tenuis* [ J]. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1962, **8**: 165—168

[ 17 ] Hoare D S, Hoare S L, Moore R B. The photoassimilation of organic compounds by autotrophic blue green algae [ J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1967, **49**: 351—370

[ 18 ] Van Baalen C, Hoare D S, Brandt E. Heterotrophic growth of blue green algae in dim light [ J]. *J. Bact.*, 1971, **105**: 685—689

[ 19 ] Fay P. Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii* Mitra [ J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1965, **39**: 11—20

[ 20 ] JIN C Y. Physiology of heterotrophic growth of blue green alga *Anabaena azollae* [ J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1984, **8**(4): 443—448. [ 金传荫. 满江红鱼腥藻的异养生长. 水生生物学集刊, 1984, **8**(4): 443—448]

[ 21 ] JIN C Y, SONG L R, LI S H. The mixotrophic growth of *Anabaena* sp. HB1017 [ J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, **20**(2): 134—137. [ 金传荫, 宋立荣, 黎尚豪. 鱼腥藻 1017 株的混合营养型生长. 水生生物学报 1996, **20**(2): 134—137]

[ 22 ] Rippka R. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue green algae [ J]. *Arch. Mikrobiol.*, 1972, **87**: 93—98

[ 23 ] Anderson A L, McIntosh L. Light activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue light requiring process [ J]. *J. Bacteriol.*, 1991, **173**: 2761—2767

EFFECTS OF ORGANIC COMPOUNDS ON THE GROWTH OF ANABAENA sp. 7120

YU Guo Ce<sup>1</sup>, CONG Wei<sup>1</sup>, CAI Zhao Ling<sup>1</sup>, SHI Ding Ji<sup>2</sup> and OUYANG Fan<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;

2. Research Center of Photosynthesis, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

**Abstract:** Cultures of *Anabaena* sp. 7120 were carried out in nitrogen-free BG-11 medium in an orbital shaker at 130 r/min and 30 °C at a light intensity of 160 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> unless otherwise specified. Various concentrations of organic carbon compounds were contained in the medium to examine their effects on the growth of *Anabaena* sp. 7120 cells as indicated by the cell density and the chlorophyll concentration. Glucose was shown to be able to improve cell growth markedly. With the glucose concentration varying within a range from 0 to 30 g/L, the maximal cell density in mixotrophic growth was able to reach 3.4 folds of that in photoautotrophic growth. Glucose was utilized to a limited extent in mixotrophic cultures. Cell growth at various light intensities indicated that the saturation light intensity for mixotrophic growth with a glucose concentration of 3 g/L was around 80 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Acetate was found to impede cell growth to some extent when examined within a concentration range from 0 to 1.5 g/L. Sucrose, ethanol and glycerol exerted slight influence on cell growth, whereas lactate, citrate, glutamate and glycine inhibited cell growth seriously. Glucose, acetate, sucrose, glycerol and ethanol did not cause significant changes in photosynthetic oxygen evolution and dark respiratory oxygen consumption while lactate, citrate and glutamate destroyed these activities. *Anabaena* sp. 7120 did not exhibit heterotrophic growth on glucose in complete darkness or light-activated heterotrophic growth on glucose with a daily pulse of light of 5 min of 160 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. However, comparison of cell growth in the presence of 10<sup>-5</sup> M DCMU with and without glucose in light suggested that slight photoheterotrophy may exist.

**Key words:** *Anabaena* sp. 7120; Organic compounds; Glucose; Mixotrophic growth; Heterotrophic growth