

doi: 10.7541/2019.024

## 一株新型自絮凝凯式拟小球藻的两步培养产油技术

赵艳 汪成 王超霞 王天圻

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310018)

**摘要:** 以分离获得的一株新型自絮凝凯式拟小球藻(*Parachlorella kessleri*) F01为材料, 自养单步培养法为对照, 设计两步培养法, 研究阶段 I 添加葡萄糖兼养和阶段 II 营养元素限制处理对藻细胞油脂积累及絮凝性能的影响。分别采用血球板计数法、干重法、脂染色法测定藻细胞浓度、生物量和总脂含量, 三维荧光光谱分析藻细胞胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)组分和含量。结果表明: (1)两步培养法阶段 I 兼养培养最适葡萄糖浓度为10 g/L, 10d收获时藻细胞油脂产率204.25 mg/(L·d), 是对照组的16.20倍; 静置12h的藻细胞自絮凝率96.1%, 与对照组差异不显著。(2)在阶段 I 基础上, 阶段 II 进行不同元素限制处理培养1d, 低糖组和低糖低氮协同处理组的藻细胞油脂产率分别为242.64和227.61 mg/(L·d), 分别比阶段 I 增加18.8%和11.4%; 培养4d, 低糖、无糖、低氮和低糖低氮协同4种处理组油脂产量显著高于对照组和阶段 I, 其中低糖低氮协同处理组最高, 达到3.08 g/L, 是对照组的23.69倍, 比阶段 I 增加了51.0%, 而且阶段 II 中4种处理组藻细胞的自絮凝率基本在85.0%以上, 能满足收获要求。(3) F01藻细胞EPS中蛋白类色氨酸物质含量高低与藻细胞自絮凝率大小密切相关, 不同培养处理通过改变藻细胞EPS中蛋白类色氨酸物质的含量而影响其絮凝性能。自絮凝凯式拟小球藻F01是生物柴油生产的优良潜力藻种, 两步培养法能大幅提升其产油效益。产油微藻的自絮凝优势与两步培养法结合, 有望成为解决微藻生物柴油生产技术瓶颈的关键突破口。

**关键词:** 凯式拟小球藻; 两步培养法; 自絮凝性能; 油脂产率

**中图分类号:** S917.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)01-0196-09

以小球藻为代表的微藻是一类能进行光合自养生长的单细胞绿藻, 具有光合作用效率高、生长速度快、适合工业化养殖等优点, 微藻油脂含量比大豆、棕榈树、油菜等传统油料作物更高, 可达到50%—70%细胞干重, 是生产生物柴油的优异可再生资源<sup>[1]</sup>。随着化石能源逐渐耗竭, 微藻被认为是唯一可完全替代化石能源的生物柴油新原料<sup>[2]</sup>。获取优良藻株和建立高效的人工培养技术体系是当前微藻生物柴油研发的重点, 其中藻细胞生物量、油脂含量和油脂产率是微藻培养中的3个关键参数<sup>[3]</sup>。理想的培养技术体系应保障藻细胞生物量和油脂含量同时达到峰值, 但实际上两个指标通常难以同步, 因为生物量的提高通常依赖于营养物质的充足供应, 而脂质积累大多发生在营养元素限制的应激条件下<sup>[4]</sup>。为了解决上述矛盾, 研究者设计了

两步培养法<sup>[5, 6]</sup>, 即阶段 I 藻细胞在富营养培养基中快速生长达到较高生物量, 阶段 II 转移至营养元素限制培养基以刺激藻细胞的油脂合成。Mujtaba等<sup>[7]</sup>通过补充CO<sub>2</sub>和低氮胁迫两步培养法使普通小球藻的油脂产率提高到传统单步培养法的2.45倍。李小妹等<sup>[8]</sup>报道两步培养法使栅藻生物量和油脂含量分别比单步培养法提高了35.74%和近1倍。两步培养法优势明显, 但尚处于探索阶段。阶段 I 提高藻细胞生物量的方法包括添加有机碳源、通CO<sub>2</sub>气体、补充激素、提高光照强度等<sup>[9, 10]</sup>, 其中添加葡萄糖能使微藻处于自养和异养共存的兼养模式, 既能提高藻细胞生物量, 又能显著增加油脂含量, 从而大幅提高微藻油脂产率<sup>[11, 12]</sup>。阶段 II 提高藻细胞油脂含量的理论基础在于营养元素限制改变微藻的代谢模式并影响油脂合成, 具体方法包括氮、

收稿日期: 2018-01-30; 修订日期: 2018-06-17

基金项目: 浙江省一流学科建设经费(食品科学与工程1110JYN6517001G); 国家自然科学基金(31772100)资助 [Supported by the First-class Discipline Construction Project in Zhejiang Province 2017 (Food Science and Engineering 1110JYN6517001G); National Natural Science Foundation of China (31772100)]

通信作者: 赵艳(1970—), 女, 河北临漳人; 博士, 教授; 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: yanzhao9918@163.com

硫、磷等单种元素限制或稀释培养基进行全营养元素限制等<sup>[4, 13]</sup>。但藻种不同提高油脂产率所需的培养条件也不同,如小球藻NJ-18在氮、磷限制时油脂产率较高<sup>[14]</sup>,普通小球藻CCALA256在全营养元素限制时油脂产率较高<sup>[15]</sup>。因此针对特定藻种进行两步培养法的技术优化,实现生物量与油脂含量的协同增效是构建微藻油脂生产体系的关键。此外,由于微藻细胞体积小、收获困难,传统的机械过滤和离心等物理收集方法的成本高达微藻油脂生产总成本的20%—30%,化学絮凝收集法中絮凝剂的使用又会造成环境污染和生物毒害<sup>[16]</sup>,这无疑增加了两步培养法的生产经济成本,限制了其应用。优良的自絮凝微藻在不添加任何絮凝剂的条件下即可自发絮凝,易于收获且无需增加额外经济成本<sup>[17]</sup>,与两步培养法结合,有望成为解决微藻生物柴油生产技术瓶颈的新突破口。

本课题组筛选获得一株凯式拟小球藻(*Parachlorella kessleri*)优良藻株F01,自养条件下油脂含量达到30%左右,且具有很强的自絮凝能力,在微藻油脂生产方面应用潜力较大。本文针对两步培养法的阶段 I 葡萄糖兼养培养和阶段 II 的元素限制处理条件进行技术优化,为新型自絮凝凯式拟小球藻 F01 应用于生物柴油开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

凯式拟小球藻藻种F01由本实验室从水生植物根际土壤分离鉴定并保存。

### 1.2 实验设计

**凯式拟小球藻F01的两步培养法方案** 阶段 I 培养:以BG11基础培养基<sup>[18]</sup>为自养培养基作为单步培养对照,BG11中添加4种不同初始浓度(1、5、10和20 g/L)的葡萄糖作为两步培养法的兼养培养基,分装到250 mL三角瓶中,装液量为100 mL。挑取单藻落纯化后自养扩培至对数生长期的F01作为种子细胞,藻细胞接种后初始浓度均为 $2 \times 10^6$  cell/mL,置于人工气候箱内。培养条件为:25℃,光强 $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光周期中光暗比L:D为12h:12h,每天早晚各摇动一次。每组设置3个平行,培养周期为10d。

阶段 II 元素限制培养:将阶段 I 兼养培养10d至稳定期的F01藻细胞按初始浓度 $1 \times 10^7$  cell/mL转接至元素限制培养基进行阶段 II 培养,培养条件同阶段 I。元素限制培养基以阶段 I 兼养培养基为基础,设置不同浓度起始碳源、氮源和营养

元素及其相关组合,具体包括:(1)糖限制组:1/10 G 低糖组,即将阶段 I 兼养培养基中的葡萄糖浓度由10降低至1 g/L;0 G 无糖组,即BG11基础培养基。(2)低糖低氮组:BG11基础培养基中添加1 g/L的葡萄糖并将氮素硝酸钠由1.5减少至0.5 g/L (1/10G+1/3N)。(3)无糖氮限制组:1/3N低氮组,即BG11基础培养基中的硝酸钠减为0.5 g/L;0N无氮组,BG11基础培养基中去除硝酸钠。(4)全元素限制组:BG11基础培养基稀释为原来的1/3。

**藻细胞计数和生物量测定** 阶段 I 和阶段 II 培养中分别每2d或1d取样一次,取样时间均为光照10h后,藻细胞浓度的测定采用血球计数法,为了避免自絮凝特性对计数效果的影响,取样计数前将培养液震荡摇匀保证计数准确性。离心收集适量藻细胞并烘干至恒重,计算干重生物量和干重产率。

$$\text{干重产率}[\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})] = \frac{\text{收获藻细胞干重}(\text{g/L})}{\text{培养天数}(\text{d})}$$

**藻细胞油脂提取和含量的测定** 采用溶剂提取法和脂染色法对凯式拟小球藻油脂含量进行测定,并建立凯式拟小球藻油脂含量与脂染色后吸光度在 $A_{645 \text{ nm}}$ 的线性回归方程,采用脂染色法测定培养过程中的油脂。溶剂提取法具体操作参考Zhao等<sup>[19]</sup>的方法,脂染色法具体操作参照任洁等<sup>[20]</sup>的方法。

油脂产率按照如下公式计算:

$$\text{藻细胞油脂产率}[\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{d})] = \frac{\text{收获藻细胞干重}(\text{mg/L}) \times \text{油脂含量}(\%)}{\text{培养天数}(\text{d})}$$

**F01藻细胞絮凝率测定** 参照Alam等<sup>[21]</sup>的方法并稍作修改。测定时摇动培养液以使藻细胞分散均匀,然后将10 mL细胞悬浮液转移到试管中摇匀并测定藻细胞总浓度A (cell/mL),将培养液分别静置0.5、1、2、3、6和12h后,在距离液面顶部4 cm处取细胞悬液试样,测量试样藻细胞浓度B (cell/mL)。絮凝率按照如下公式计算:

$$\text{絮凝率}(\text{Flocculating ability}) = (A - B)/A \times 100\%$$

**藻EPS的提取与三维荧光光谱分析** 小球藻胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)的提取与分析参照Yang等<sup>[22]</sup>的方法。在培养周期结束后,取藻细胞干重相当于0.1 g的微藻悬浮液,8000 r/min离心10min,弃上清,用5 mL去离子水洗涤沉淀,8000 r/min离心5min,收集的微藻沉淀用5 mL去离子水悬浮并加热至80℃,水浴30min。随后,将混合物以8000 r/min离心10min,将上清液用

0.45  $\mu\text{m}$ 醋酸纤维素膜过滤,滤液即EPS组分。

三维荧光光谱(3D-EEM)的测定条件参照Lv等<sup>[23]</sup>的方法。使用150 W氙弧灯为激发光源,光电倍增管(PMT)电压为700 V;设定激发狭缝宽度为10 nm,发射狭缝宽度为1 nm。光谱仪扫描范围为激发波长/发射波长(EX/EM)=200—450 nm/250—550 nm,扫描速度为1200 nm/min。得到每个EX/EM所对应的荧光强度(Intensity, 单位: arbitrary units, a.u.), 对所有数据点采用Origin9.0软件进行处理,形成等高线荧光光谱图。

**数据处理与统计分析** 每个实验处理设3次重复,各指标测定结果以 $\bar{x} \pm s$  (平均数 $\pm$ 标准误)表示,应用SPSS22.0软件对对照和各处理组数据进行方差分析,  $P < 0.05$ 为差异显著,  $P < 0.01$ 为差异极显著。采集数据利用Origin9.0软件进行分析作图。

## 2 结果

### 2.1 阶段 I 兼养培养对凯式拟小球藻F01生长和油脂含量的影响

与自养对照组相比,兼养组中葡萄糖浓度在1—20 g/L内对F01促生长效应明显(图1A)。培养8—10d,添加5—20 g/L葡萄糖培养组藻细胞生长开始进入稳定期,对照组仍处于对数期;至10d培养期结束时,所有兼养组藻细胞浓度均显著( $P < 0.05$ )高于对照组,其中10和20 g/L葡萄糖兼养组藻细胞浓度较大,分别为对照组的3.59倍和3.50倍,二者差异不显著。

第10天收获藻细胞,测定藻细胞的干重和油脂的含量,结果如图1B,兼养组藻细胞干重均显著( $P < 0.05$ )高于对照组,其中10 g/L葡萄糖兼养组藻细胞干重达到3.54 g/L,是对照组的6.94倍,对比藻细胞浓度增幅(3.59倍)可知,兼养培养促进藻细胞干

物质积累效应更显著。10 g/L葡萄糖兼养组藻细胞油脂含量57.7%,同比是对照组的2.35倍,说明兼养培养有利于藻细胞的生物量提高和油脂积累。综合藻细胞生物量与油脂含量两个指标,选择10 g/L葡萄糖作为阶段 I 兼养培养的优化碳源。由于第10天兼养组藻细胞生长到达稳定期,故阶段 I 培养周期选择为10d。

### 2.2 阶段 II 不同元素限制处理对凯式拟小球藻F01油脂产率的影响

阶段 I 兼养培养10d后的藻细胞转接至元素限制培养基进行阶段 II 培养,比较了葡萄糖限制、氮素限制和全元素限制等三类元素限制处理对F01藻细胞浓度(图2A)、干重(图2B)和油脂含量(图2C)的影响。结果表明,三类营养元素限制处理对藻细胞的生物量和油脂含量影响较大,显著( $P < 0.05$ )改变了藻细胞的油脂产率。转接后的前2d,所有处理组的藻细胞均快速生长,但藻细胞油脂含量与转接前起始含量(油脂含量57.7%)相比均出现明显下降,第1天尤其明显。这说明藻细胞从阶段 I 兼养富营养培养基中转入阶段 II 的营养元素限制培养基后,短期内物质代谢发生了适应性调节变化。

**葡萄糖限制** 在阶段 II 5d培养过程中,低糖组(1/10 G)和无糖组(0 G)的藻细胞浓度(图2A)和干重(图2B)持续增长,第4天均到达稳定期,此时低糖组和无糖组的藻细胞浓度分别为初始转接浓度的1.99和1.88倍,二者差异不显著,但低糖组藻细胞干重(2.01 g/L)极显著( $P < 0.01$ )高于无糖组(1.48 g/L)。低糖组和无糖组的藻细胞油脂含量持续下降,4d时低糖组油脂含量显著( $P < 0.05$ )高于无糖组。可见低糖限制处理比较利于藻细胞干重积累和油脂含量维持。

**氮素限制** 氮素限制处理(1/3N和0N)对

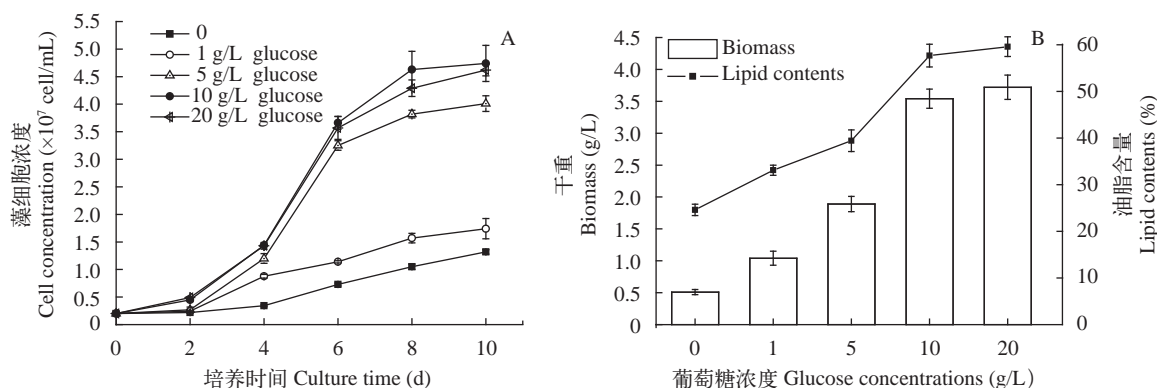


图1 阶段 I 兼养培养对凯式拟小球藻F01生物量和油脂含量的影响

Fig. 1 The effect of mixotrophic conditions at stage I on cell concentration, biomass and lipid contents of *Parachlorella kessleri* F01

A. 藻细胞浓度; B. 藻细胞干重和油脂含量

A. cell concentration; B. biomass and lipid contents

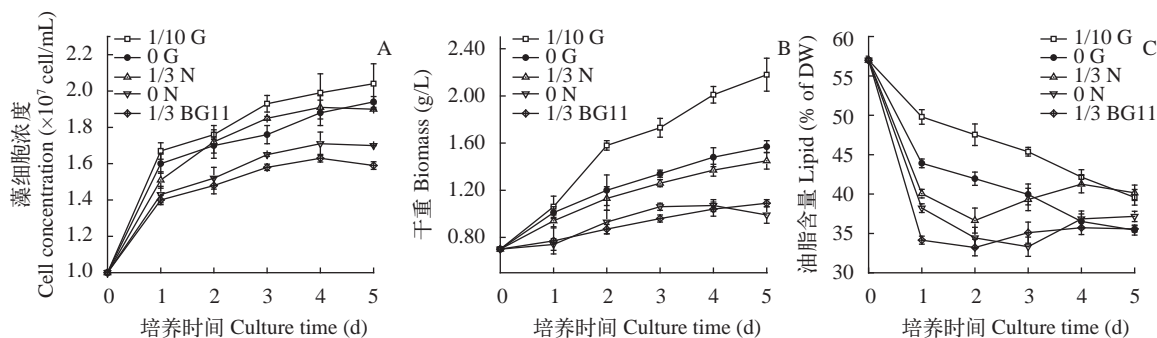


图2 阶段II培养对凯式拟小球藻F01细胞浓度(A)、干重(B)和油脂含量(C)的影响

Fig. 2 Effect of stage II culture conditions on cell concentration (A), biomass (B) and lipid contents (C) of *Parachlorella kessleri* F01

F01细胞浓度和干重的影响与低糖处理组类似(图2A和2B), 总体上介于葡萄糖限制处理和全元素限制处理之间, 且低氮组均显著( $P<0.05$ )高于无氮组, 4d稳定期时低氮组细胞干重为无氮组的1.28倍。转接后前2d, 氮限制处理组藻细胞油脂含量下降幅度比葡萄糖限制组更大, 但分别于第2和第3天达到最低值, 之后开始回升。4d时低氮组油脂含量回升至41.3%, 超过无糖组, 同比与低糖组(40.2%)类似, 相当于转接前起始含量的71.5%; 无氮组油脂含量也回升至与无糖组相当的水平。藻细胞油脂含量出现回升拐点是氮素限制处理的显著特征。

**全元素限制** 采用1/3 BG11培养基进行全元素限制处理时, 藻细胞浓度和干重增长最为缓慢, 4d时到达 $1.63 \times 10^7$  cell/mL和1.04 g/L (图2A和2B), 比初始转接时分别增加了63.0%和48.6%, 达到显著差异( $P<0.05$ )水平。藻细胞油脂含量变化趋势与低氮组相似(图2C), 回升拐点出现在第2天, 4d时藻细胞油脂含量与无糖组、无氮组相近, 无显著性差异。

**低糖低氮协同处理** 基于上述低糖处理提高藻细胞干重生物量和低氮处理后藻细胞油脂含量出现回升拐点的实验结果, 设计考察了低糖与低氮协同处理(1/3N+1/10G)对藻细胞生物量、油脂含量的影响, 结果(图3)发现在协同处理后, 藻细胞干重和油脂含量变化趋势与低氮组类似, 但同比介于低糖组与无糖组之间, 效果低于低糖处理组。

### 2.3 两步培养法提高凯式拟小球藻F01油脂产率的效果评价

收获期藻细胞干重和油脂含量决定了其最终的油脂产量, 而与培养时间关联的油脂产率反映了平均每日的油脂收益。由于阶段II处理后藻细胞生物量逐渐增加并于4d达到稳定期, 而油脂含量有所下降, 综合考虑, 将单步培养法和两步培养法阶段II处理1d和4d后收获的藻细胞油脂产量及油脂产率总结于表1。可知单步法自养对照组的油脂产率仅为12.61 mg/(L·d), 两步培养法经阶段I兼养后

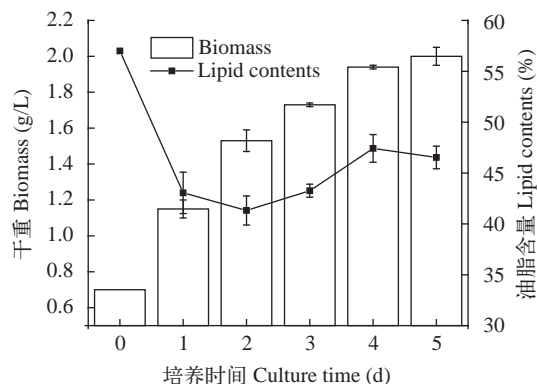


图3 低糖与低氮协同处理对凯式拟小球藻F01干重与油脂含量的影响

Fig. 3 Effect of low glucose and low nitrogen co-treatment on biomass and lipid contents of *Parachlorella kessleri* F01

藻细胞油脂产量(2.04 g/L)和油脂产率[204.25 mg/(L·d)], 分别是对照组的15.69倍和16.20倍, 增效十分显著。经阶段II的6种元素限制处理后, F01油脂产量和油脂产率出现较大变化, 虽然与单步法相比所有处理组藻细胞的油脂产量和产率均极显著( $P<0.01$ )增加, 但与阶段I相比出现了增效与减产两种技术结果。其中无氮组 and 全元素限制组油脂产量和油脂产率均显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )低于阶段I, 说明这两种处理效果不佳。而低糖、无糖、低糖低氮组在处理1d时都显著提高了F01的油脂产量, 并且4d时增效更显著。其中低糖低氮协同处理4d后的油脂产量最高, 达到3.08 g/L, 同比是低氮组的1.39倍, 比单独阶段I油脂产量增加了51.0%, 比单步法对照组增加了22.69倍。从油脂产率看, 阶段II低糖组处理1d的效果最佳, 达到242.64 mg/(L·d), 比阶段I提高了18.8%, 达到了单步法的19.24倍, 其次是低糖低氮协同处理组, 处理1d和4d的油脂产率均显著高于阶段I, 增加幅度分别为11.4%和15.4%, 其他不添加葡萄糖的处理组油脂产率均显著( $P<0.05$ )低于阶段I, 说明葡萄糖兼养是影响F01的油脂产率的主要因素。

综上, 两步培养法对凯式拟小球藻F01的油脂生产促进效果明显, 阶段 I 兼养培养大幅提高了藻细胞的油脂产量和产率, 阶段 II 低糖处理和低糖低氮协同处理对进一步提高油脂产量和产率效果最佳。

## 2.4 两步培养法对凯氏拟小球藻F01自絮凝性能的影响

**收获期F01自絮凝率分析** 在培养过程中, 凯式拟小球藻自絮凝能力很强, 藻细胞沉淀在培养瓶底部, 需人工振荡才能悬浮起来。对照组培养10d的培养液静置12h, 絮凝率为90.34%, 说明F01具有良好的自絮凝性能。

两步培养法阶段 I 培养结束时藻细胞自絮凝率为96.11%, 与对照组差异不显著。阶段 II 中6种方式处理1d和4d后的藻细胞絮凝率结果如表 2。可见阶段 II 处理后藻细胞的自絮凝率有所下降, 且4d时藻细胞的絮凝率同比1d时下降幅度较大, 但所有处理组藻细胞絮凝率均在80.0%以上。各处理组絮凝能力由大到小分别为: 低糖组>低糖低氮组>无糖组>低氮组>无氮组>全元素限制组, 特别是对油脂产量和油脂产率具有显著增效作用的低糖、无糖、低氮、低糖低氮处理组的藻细胞絮凝率基本在85.0%以上, 虽然与对照组或阶段 I 的差异达到显著( $P<0.05$ )水平, 但仍能满足自絮凝收获的要求, 收获后上清液中剩余的藻细胞还可以作为下批次

培养的种子细胞进行循环利用, 无需额外增加经济成本。

**收获期F01藻细胞EPS的组分分析** 藻细胞絮凝性能主要与EPS的组分和含量有关, 图 4显示单步法对照组、两步培养法阶段 I 和阶段 II 全元素限制处理4d后藻细胞EPS的三维荧光图谱, 可知所有组藻细胞的EPS扫描均在区域T存在一个主峰(Ex/Em: 280/355 nm), 特征荧光峰的范围基本相同。Chen等<sup>[24]</sup>对废水中微生物胞外可溶性产物的三维荧光光谱特征进行了详细研究, 建立了三维荧光图谱区域与不同类型有机物的对应关系, 本文在相同试验条件下主要参照文献的信息采用积分区域方法对试验藻细胞EPS的三维荧光光谱图进行解析, 可推测谱图T区域溶解性藻细胞产物主要为蛋白样类色氨酸物质, 由于色氨酸含有疏水性基团, EPS中蛋白样类色氨酸物质含量高可能是凯式拟小球藻F01具有良好絮凝性能的原因。图 4峰T强度大小排列顺序为B>A>C, 对应表 2藻细胞的自絮凝率大小排序为96.11%>90.34%>82.07%。统计F01对照组、阶段 I 和 II 处理不同天数后藻细胞EPS的峰T强度列于表 2, 进一步说明EPS中蛋白类色氨酸物质含量高低与藻细胞絮凝率大小之间确实存在正相关。两步培养法的不同培养基组成通过改变藻细胞EPS蛋白类色氨酸物质的含量而影响了其絮凝性能。

表 1 两步培养法对凯式拟小球藻F01油脂产量和产率的影响

Tab. 1 Effect of two-step culture on lipid production and lipid productivity of *Parachlorella kessleri* F01

方法Method		时间Time (d)	油脂产量 Lipid production (g/L)	油脂产率 Lipid productivity [mg/(L·d)]
单步法One-step method	对照Control group	10	0.13±0.03	12.61±0.09
两步法Two-step method	I	10	2.04±0.04 <sup>aa</sup>	204.25±0.04 <sup>aa</sup>
	I + II (1/10 G)	10+1	2.67±0.14 <sup>aa**</sup>	242.64±4.23 <sup>aa**</sup>
		10+4	2.95±0.32 <sup>aa**</sup>	210.99±2.06 <sup>aa</sup>
	I + II (0 G)	10+1	2.24±0.17 <sup>aa *</sup>	203.84±6.61 <sup>aa</sup>
		10+4	2.27±0.06 <sup>aa *</sup>	162.15±2.44 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/3 N)	10+1	1.90±0.07 <sup>aa *</sup>	173.08±2.76 <sup>aa *</sup>
		10+4	2.21±0.30 <sup>aa *</sup>	158.04±4.12 <sup>aa**</sup>
	I + II (0 N)	10+1	1.51±0.32 <sup>aa**</sup>	136.86±4.80 <sup>aa**</sup>
		10+4	1.60±0.81 <sup>aa**</sup>	114.23±3.76 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/3 BG11)	10+1	1.40±0.20 <sup>aa**</sup>	126.98±4.16 <sup>aa**</sup>
		10+4	1.51±0.46 <sup>aa**</sup>	107.69±1.14 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/10G+1/3N)	10+1	2.50±0.18 <sup>aa**</sup>	227.61±4.05 <sup>aa *</sup>
		10+4	3.08±0.31 <sup>aa**</sup>	219.66±2.95 <sup>aa *</sup>

注: 单步法与两步法对比, <sup>a</sup>差异显著 ( $P<0.05$ ), <sup>aa</sup>差异极显著 ( $P<0.01$ ); 阶段 II 与阶段 I 对比, <sup>\*</sup>差异显著 ( $P<0.05$ ), <sup>\*\*</sup>差异极显著 ( $P<0.01$ ); 下同

Note: Comparison between the one-step culture and two-step culture method, <sup>a</sup> Significant difference ( $P<0.05$ ), <sup>aa</sup> Extremely significant difference ( $P<0.01$ ). Comparison between stage II and stage I, <sup>\*</sup> Significant difference ( $P<0.05$ ), <sup>\*\*</sup> Extremely significant difference ( $P<0.01$ ); the same applies below



表 2 两步培养法对凯式拟小球藻F01絮凝性能的影响

Tab. 2 The effect of flocculating ability of *Parachlorella kessleri* F01 in culture under two-step culture

方法Method		时间Time (d)	絮凝率 Flocculation rates (%)	T峰强度 The intensity of Peak T (a.u./0.01 g)
单步法One-step method	对照组Control group	10	90.34±2.11	149.40±2.68
两步法Two-step method	I	10	96.11±0.80	192.90±3.66 <sup>a</sup>
	I + II (1/10 G)	10+1	93.21±2.08	98.16±1.84 <sup>aa**</sup>
		10+4	87.24±1.03	73.12±1.45 <sup>aa**</sup>
	I + II (0 G)	10+1	88.92±1.17	87.11±3.09 <sup>aa**</sup>
		10+4	85.37±2.35 <sup>*</sup>	64.16±0.86 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/3 N)	10+1	86.37±0.83 <sup>*</sup>	84.32±0.96 <sup>aa**</sup>
		10+4	84.97±1.77 <sup>*</sup>	57.32±0.71 <sup>aa**</sup>
	I + II (0 N)	10+1	85.19±1.33 <sup>*</sup>	80.62±1.36 <sup>aa**</sup>
		10+4	83.04±3.01 <sup>a*</sup>	49.63±1.15 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/3 BG11)	10+1	84.73±1.52 <sup>*</sup>	76.72±1.55 <sup>aa**</sup>
		10+4	82.07±1.35 <sup>a*</sup>	44.89±0.93 <sup>aa**</sup>
	I + II (1/10G+1/3N)	10+1	92.30±0.56	90.74±0.83 <sup>aa**</sup>
		10+4	86.93±1.27	64.49±2.04 <sup>aa**</sup>

### 3 讨论

本文采用的新型凯式拟小球藻F01具有光合自养与兼养生长的能力, 两步培养法阶段 I 添加葡萄糖兼养培养显著提升了藻细胞生物量与油脂含量, 10d收获时藻油脂含量为57.7% (图 1), 达到大多数传统产油微藻(如普通小球藻、斜生栅藻、富油新绿藻)在条件综合优化后的40%—60%的油脂含量<sup>[4]</sup>。黄冠华等<sup>[5, 25]</sup>报道蛋白核小球藻和普通小球藻两步培养法中阶段 I 的最适葡萄糖用量为20 g/L, 培养周期15d, 使油脂产率最大提高约2倍。Mujtabao等<sup>[7]</sup>和Ho等<sup>[26]</sup>报道产油微藻普通小球藻和斜生栅藻在两步法培养后的油脂产率介于70—80 mg/L/d之间。本文中凯式拟小球藻F01阶段 I 兼养的最适葡萄糖浓度为10 g/L, 两步培养法的阶段 II 低糖组处理1d的最大油脂产率最高达到242.64 mg/(L·d) (表 1), 是单步培养法对照组的19.24倍, 优势显著, 表明F01属于生物柴油生产的优良潜力藻种。

油脂产率指标综合反映生产期内每天的油脂收益, 受收获藻细胞干重、油脂含量和培养周期的影响, 通过分解这3个重要参数可考察其对油脂产率贡献的大小。本文发现阶段 II 的不同营养元素限制处理对F01油脂产率的影响机制存在差异, 其中1/10G低糖处理1 d油脂产率达到峰值(表 1)的原因在于藻细胞干重增长显著且油脂含量相对阶段 I 而言下降幅度较小, 说明该过程中藻细胞干重增加贡献最大。除了全元素限制处理组外, 阶段 II 所有处理组的藻细胞在转接后立即开始快速生长(图 2)。这与Ho等<sup>[26]</sup>在斜生栅藻两步培养中的研究

结论不同, 斜生栅藻在阶段 I 通入二氧化碳的培养中生长迅速, 进入阶段 II 营养元素限制处理后藻细胞生长缓慢, 但油脂含量明显提高, 最终油脂产率[78.73 mg/(L·d)]约为阶段 I 的2倍。原因可能是本文阶段 I 葡萄糖兼养后F01藻细胞本身的生化组分含量丰富, 能迅速适应新的培养环境。综合分析阶段 I 葡萄糖兼养对藻细胞干重和油脂含量大幅提升, 以及阶段 II 低糖组、低糖低氮组油脂产率或产量较高(表 1)的技术效果, 可知补充有机碳源葡萄糖对F01藻种的生长和油脂合成极为有利, 但直接添加葡萄糖的成本较高。营养素限制处理的成本较低, 其中氮素限制处理应用最为广泛, 但技术效益随藻种、环境条件和培养方式变化很大<sup>[13]</sup>。Li等<sup>[27]</sup>在自养条件下对凯式拟小球藻(CCALA255)进行低氮处理, 4d内藻细胞油脂含量逐渐上升。本文中低氮、无氮、低糖低氮协同处理5d内藻细胞油脂含量均出现先下降后回升的拐点现象(图2C), 而生物量随培养时间延长逐步增加至稳定期(图2A), 说明氮素限制处理条件下F01在生物量增长与油脂合成积累并不同步。可见针对特定藻种通过基础研究选择微藻生物量与油脂含量的最佳平衡点极为重要, 油脂产量和产率指标技术含义不同, 需要根据生产工艺和成本核算进行优化筛选。此外, Fu等<sup>[28]</sup>报道小球藻(*Chlorella regularis*)在葡萄糖异养培养和氮饥饿胁迫共同作用时, 充足的磷元素使藻细胞油脂含量和产率分别达到对照组的2倍和1.3倍, Fernandes等<sup>[29]</sup>报道采用CO<sub>2</sub>通气、元素限制培养处理和光照条件综合优化后的两步培养技术能使凯式拟小球藻(CCALA255)藻细胞油脂含量

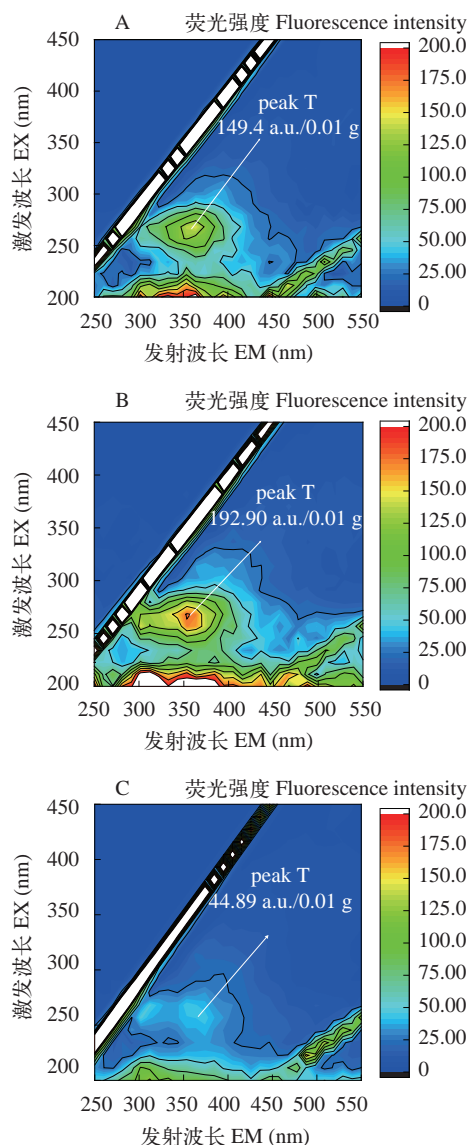


图4 凯式拟小球藻F01的EPS三维荧光光谱

Fig. 4 3D-EEM spectra of EPS of *Parachlorella kessleri* F01 (white slanting part of the spectrum was due to the scattering effect by water molecules)

光谱图白色斜线部分为水分子的散射效应造成,位置相对固定不影响实验分析。A. 单步法自养对照培养10d; B. 两步法阶段I培养10d; C. 阶段I+II全元素限制培养4d

The position was relatively fixed and didn't affect the experimental analysis. A. one-step culture under autotrophic on the 10th d, B. two-step culture under mixotrophic on the 10th d, C. full elemental restricted in culture under stage II on the 4th day)

提高4—5倍,油脂产率最高达340 mg/(L·d)。磷元素及其他条件的优化是否能进一步提升F01的产油效益值得进一步探究。

在微藻生物柴油生产技术中,传统的藻细胞收获方法如离心分离等巨大的能量和成本消耗是工程化应用的主要限制,尤其两步培养法设计方案中,多通过离心过滤等方式来分别收获两个阶段处理

后的藻细胞,会大幅度提高生产成本<sup>[7]</sup>。本文对照组F01藻细胞自絮凝率高达90%以上,其EPS组分中疏水性的蛋白样色氨酸含量高可能是其具有优良自絮凝性能的生化基础,两步培养法不同处理组虽然通过改变EPS中蛋白类色氨酸组分的含量而影响藻细胞的絮凝率(图4和表2),但对油脂增效显著的低糖、低氮等处理组的藻细胞自絮凝率基本在85.00%以上(表2),能满足自絮凝收获的要求,无需增加收获经济成本,这对两步培养法生产微藻油脂而言是极为重要。

自絮凝凯式拟小球藻F01是生物柴油生产的优良潜力藻种,两步培养法能大幅提升其产油效益。产油微藻的自絮凝优势与两步培养法结合,有望成为解决微藻生物柴油生产技术瓶颈的关键突破口。

#### 参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**(3): 294—306
- [2] Scott S A, Davey M P, Dennis J S, *et al.* Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, **21**(3): 277—286
- [3] Li Y T, Han D X, Hu G R, *et al.* Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, **107**(2): 258—268
- [4] Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, *et al.* Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae [J]. *Applied Phycology*, 2014, **26**(3): 1359—1377
- [5] Huang G H, Chen F, Ren Q G. Research on biodiesel production from *Chlorella vulgaris* [J]. *Acta Energetica Sinica*, 2010, **31**(9): 1085—1091 [黄冠华, 陈峰, 任庆功. 应用小球藻制备生物柴油. 太阳能学报, 2010, **31**(9): 1085—1091]
- [6] Xia L, Ge H M, Zhou X P, *et al.* Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15 [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **144**(3): 261—267
- [7] Mujtaba G, Wookjin C, Choul-Gyun L, *et al.* Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2012, **123**: 279—283
- [8] LI X M, Liao X H, Wang M Z, *et al.* Improvement of biomass and oil content of *Scenedesmus* sp. by two-step cultivation [J]. *China Oils and Fats*, 2014, **39**(5): 53—56 [李小妹, 廖兴辉, 王明兹, 等. 两步培养法提高栅藻的生物量及油脂含量. 中国油脂, 2014, **39**(5): 53—56]
- [9] Alicja P N, Andrzej B. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* [J]. *Plant*

- Growth Regulation*, 2014, **73**(1): 57—66
- [10] Vitova M, Bisova K, Kawano S, *et al.* Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, **33**: 1204—1218
- [11] Fernández S J M, Cerón G M C, Sánchez M A, *et al.* Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode [J]. *Biotechnology Progress*, 2004, **20**: 728—736
- [12] Liang Y, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. *Biotechnology Letters*, 2009, **31**(7): 1043—1049
- [13] Griffiths M J, van Hille R P, Harrison S T L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, **24**(5): 989—1001
- [14] Zhou X, Ge H, Xia L, *et al.* Evaluation of oil-producing algae as potential biodiesel feedstock [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **134**: 24—29
- [15] Přibyl P, Cepák V, Zachleder V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella* and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, **94**(2): 549—561
- [16] Uduman N, Qi Y, Danquah M K, *et al.* Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels [J]. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2010, **2**(1): 12—17
- [17] Suali E, Sarbatly R. Conversion of microalgae to biofuel [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, **16**(6): 4316—4342
- [18] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order chroococcales) [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1971, **35**: 171—205
- [19] Zhao P, Yu X Y, Li J J, *et al.* Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, **117**(1): 72—77
- [20] Ren J, Lang X Y, Liu Z Y. Rapidly determining relative lipid level of *Chlorella vulgaris* sp. by three dyeing methods [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, **23**(7): 967—972 [任洁, 郎筱宇, 刘志媛. 三种脂染色法快速检测小球藻油脂相对含量. 农业生物技术学报, 2015, **23**(7): 967—972]
- [21] Alam M A, Wan C, Guo S L, *et al.* Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, **118**(1): 29—33
- [22] Yang S F, Li X Y. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions [J]. *Process Biochemistry*, 2009, **44**: 91—96
- [23] Lv J P, Guo J Y, Feng J, *et al.* A comparative study on flocculating ability and growth potential of two microalgae in simulated secondary effluent [J]. *Bioresource Technology*, 2016, **205**: 111—117
- [24] Chen W, Westerhoff P, Leenheer J A, *et al.* Fluorescence excitation-Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter [J]. *Environmental Science Technology*, 2003, **37**(24): 5701—5710
- [25] Huang G H, Chen F, Wei D. Improvement of lipid content of *Chlorella pyrenoidosa* by two step cultivation [J]. *Journal of South China University of Technology* (Natural Science Edition), 2008, **36**(12): 97—101 [黄冠华, 陈峰, 魏东. 两步培养法提高蛋白核小球藻的油脂含量. 华南理工大学学报(自然科学版), 2008, **36**(12): 97—101]
- [26] Ho S H, Chen W M, Chang J S. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**: 8725—8730
- [27] Li X L, Přibyl P, Bisova K, *et al.* The microalga *Parachlorella kessleri*-a novel highly efficient lipid producer [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**(1): 97—107
- [28] Fu L, Cui X C, Li Y B, *et al.* Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, **330**: 566—572
- [29] Fernandes B, Teixeira J, Dragone G, *et al.* Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri* [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **144**: 268—274



## A NEW TWO-STEP METHOD ON CULTURING SPONTANEOUSLY FLOCCULATING MICROALGA *PARACHLORELLA KESSLERI*

ZHAO Yan, WANG Cheng, WANG Chao-Xia and WANG Tian-Qi

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** A newly isolated spontaneously flocculating microalgae *Parachlorella kessleri* F01 was used as the material, and the algae sample in autotrophic cultivation of one-step culture method was used as the control group. A two-step culture method was designed in which glucose was supplemented for mixotrophic cultivation at stage I, and nutritional limitation treatments were done at stage II, and we studied their effects on the lipid accumulation and flocculation performance of the algae. The algae cell number was determined by a hemocytometer. Biomass was measured via dry weight, and the total lipid was quantified with staining method. The extracellular polymeric substances (EPS) components of algae were analyzed by three-dimensional fluorescence spectroscopy. The results showed that: (1) The optimum glucose concentration was 10 g/L at stage I. The alga lipid productivity reached to 204.25 mg/L/d on the 10th harvesting day, which was 16.20 times of that in the control group, and the self-flocculation rate of alga cell was 96.1% after sitting for 12h, which has no significant difference with that in the control group. (2) On the basis of stage I, alga cells were cultured for 1 day in stage II with different elemental treatments. The alga lipid productivity were 242.64 mg/L/d and 227.61 mg/L/d in the low-glucose group and the low-glucose coupled with low-nitrogen group, respectively, increasing by 18.8% and 11.4% of those at stage I. After 4 days cultivation, the alga lipid productions of the four treatment groups including low-glucose, no-glucose, low-nitrogen and the low-glucose coupled with low-nitrogen significantly increased compared with those in the control group and stage I. The highest production reached to 3.08 g/L in the low-glucose and low-nitrogen co-treatment group, which was 23.69 times of that in the control group, and increased by 51.0% compared with that in stage I. The self-flocculation rates in four treatment groups at stage II were nearly above 85.0%, which could satisfy the harvesting requirements. (3) The content of protein tryptophan in alga EPS was positively related to the self-flocculation rate. Different culture treatments could change the protein tryptophan content in EPS of algae cells, and thus affect their flocculation performance. Self-flocculation *Parachlorella kessleri* F01 is an excellent potential alga for biodiesel production. The two-step culture method can greatly enhance its lipid production. The advantage of self-flocculation combined with two-step culture method is expected to be the key breakthrough to solve the bottleneck of biodiesel production technology of microalgae.

**Key words:** *Parachlorella kessleri*; Two-step culture method; Self-flocculation ability; Lipid productivity