

# 絮凝法收集异养小球藻

尹永磊<sup>1,2</sup>, 毕生雷<sup>2</sup>, 杨磊<sup>1</sup>, 张乃群<sup>1\*</sup>

1. 南阳师范学院生命科学与技术学院(南阳 473061);

2. 河南天冠企业集团有限公司车用生物燃料技术国家重点实验室(南阳 473000)

**摘要** 异养小球藻体积小、发酵液成分复杂,导致藻细胞收集困难、收集成本高,探索异养小球藻收集方法,以实现在生产实践中应用。比较不同种类的絮凝方法,并利用单因素试验、响应面分析对絮凝法收集异养小球藻进行工艺条件优化。获得二次回归模型,获得最优变量:絮凝剂添加量2.0 g/L、300 r/min、搅拌时间40 min。在该条件下絮凝率达到89.15%。无机絮凝剂、霉菌吸附均对异养小球藻絮凝效果不太理想,有机絮凝剂显示较好的絮凝效果。

**关键词** 絮凝;异养小球藻;条件优化;响应面分析

## The Collection of Heterotrophic Chlorella by Flocculation

YIN Yonglei<sup>1,2</sup>, BI Shenglei<sup>2</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, ZHANG Naiqun<sup>1\*</sup>

1. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University (Nanyang 473061);

2. State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology, Henan Tianguan Group Co., Ltd. (Nanyang 473000)

**Abstract** Heterotrophic chlorella cells had small size and its fermentation broth composition was complex which caused difficulty in collecting algae cells and high cost of collection. Explore the heterotrophic chlorella collection methods, in order to realize the application in the production practice. Different flocculation methods were compared, and the process conditions of collecting heterotrophic chlorella by single factor test and response surface analysis were optimized. The quadratic regression model was obtained, and the optimal variables were obtained as the addition amount of flocculant 2.0 g/L, 300 r/min, and the stirring time 40 min, under which the flocculation rate reached 89.15%. Inorganic flocculant, mold adsorption on heterotrophic chlorella flocculation effect was not ideal, organic flocculant showed good flocculation effect.

**Keywords** flocculation; heterotrophic chlorella; condition optimization; response surface analysis

藻类食品是既传统又新颖的食品,继螺旋藻之后,小球藻、雨生红球藻也越来越多地被用于保健品,微藻食品受到越来越多关注。异养小球藻生长速

度是自养藻的40倍、生物量是自养藻的60倍,而且含油量高、占地面积小、可利用工业发酵装置进行集约化生产,不仅可用于食品原料,同时也被认为是生产

选择,都可借鉴本试验的性价比相关公式,根据自身条件进行选择。

### 参考文献:

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量(2013版)[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- [2] 苏杭. 亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸的摄入比例对体内炎症因子及高度不饱和脂肪酸合成通路的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [3] 杨月欣. 中国食物成分表(标准版)[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2018.
- [4] 李丽萍, 韩涛. 富含 $\alpha$ -亚麻酸植物资源的开发与利用[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 614-618.
- [5] 吴俏瑾, 杜冰, 蔡尤林, 等.  $\alpha$ -亚麻酸的生理功能及开发研究进展[J]. 食品工业科技, 2016(10): 386-390.
- [6] 沈涛. 烹饪营养[M]. 成都: 四川大学出版社, 2006: 68-69.
- [7] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量速查手册(2013版)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 6.
- [8] 中国营养学会. 中国居民膳食指南2016[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 107.
- [9] 王亮, 谷盼盼, 王芳梅, 等. 黑果枸杞籽油的氧化稳定性研究[J]. 中国油脂, 2019(10): 42-45, 70.
- [10] 闫晓松.  $\alpha$ -亚麻酸乙酯的制备与纯化[D]. 郑州: 河南工业大学, 2015.
- [11] 焦惠丽, 刘玉兰, 张东东. 不同产地和不同制油工艺对杜仲籽仁油品质分析[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(9): 53-57.
- [12] 陆小鸿. “植物黄金”杜仲[J]. 广西林业, 2013(12): 28-30.
- [13] 沈涛, 詹珂, 刘思齐. 海洋生物中EPA、DHA含量及性价比分析[J]. 四川烹饪高等专科学校学报, 2011(4): 32-36.
- [14] 王芳. 坚果中脂肪含量及脂肪酸组成分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 4105-4111.

生物柴油的良好原料<sup>[1]</sup>。微藻收集成本较高,一般占藻粉总成本的1/3<sup>[2]</sup>。藻类收集方法研究较多的是大型藻类、自养微藻类,规模化收集微藻主要使用工艺和设备均较成熟的离心法,但该方法能耗大、成本高。絮凝法在收集细胞的同时,对细胞伤害极小,絮凝团内的细胞形态完好,游离细胞则可保持良好的活性<sup>[3]</sup>,对后序提取工艺没有不良影响,有研究表明絮凝法能够使自养微藻收集成本降低68.8%<sup>[4]</sup>。试验在前人研究基础上,探索絮凝法收集异养小球藻工艺,以期为规模化应用提供参考。

絮凝法大致可分为无机絮凝法、有机絮凝法、生物絮凝法。薛蓉等<sup>[5]</sup>研究表明,壳聚糖、琼脂等有机絮凝剂对自养小球藻没有任何絮凝作用,无机絮凝剂絮凝效果均比较理想。赵奎等<sup>[6]</sup>研究8种絮凝剂对自养小球藻的影响,结果表明氢氧化钙是最理想的絮凝剂,自养小球藻絮凝率可达97%。现有文献仅涉及异养小球藻的生物絮凝法<sup>[2]</sup>,其他絮凝法尚未报道。异养小球藻的藻细胞油脂含量达50%以上,但藻蛋白含量仅15%左右,与自养小球藻培养液相比,异养小球藻发酵液生物量较高、发酵液成分复杂,不仅含有培养基中残留的葡萄糖、酵母粉、营养盐等物质,还有大量的细胞碎片、胶体、代谢产物等物质,这些物质都是自养小球藻培养液不含有的。因此,直接借鉴以往经验可能无法获得理想结果,试验在综合比较不同絮凝方法的絮凝效果基础上,对絮凝率高的方法进行工艺优化,探索适合异养小球藻发酵液的絮凝方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及设备

异养小球藻(*Chlorella protothecoides*)藻种(清华大学生命科学院);异养小球藻发酵液(车用生物燃料技术国家重点实验室);异养小球藻发酵液由异养小球藻使用葡萄糖、酵母粉等原料发酵所得,发酵終了生物量为121 g/L、pH 6.3,发酵结束后经100℃灭菌、降温,备用;三氯化铁、氯化铝、壳聚糖、阳离子型高分子改性絮凝剂聚丙烯酰胺(简称聚丙烯酰胺)、醋酸(均为市售);黑曲霉(*Aspergillus niger* 3.3928,车用生物燃料技术国家重点实验室)。

ME1002E型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司);WH220-HT数字式加热磁力搅拌器(伊孚森生物技术(中国)有限公司);FE28-Bio型pH计(梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司);XSP-9CA型显微镜(上海光学仪器厂)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 不同絮凝方法的比较

无机絮凝法和有机絮凝法:取1 000 mL发酵液,

分别置于5个500 mL小烧杯中,并分别加入1.5 g/L三氯化铁、氯化铝、壳聚糖、聚丙烯酰胺,在磁力搅拌器上以150 r/min速率搅拌2 min后静置80 min(添加聚丙烯酰胺的同时需要同时添加醋酸,添加比例为1:100 g/mL),使用移液枪从烧杯中上部吸取适量液体测定细胞数,参照文献[6]计算絮凝率。

生物絮凝法:参照文献[2]在摇瓶发酵液中补充营养物质并接入黑曲霉继续培养,直到霉菌吸附球不再增加为止,使用移液枪从烧杯中上部吸取适量液体测定细胞数,参照文献[6]计算絮凝率。

#### 1.2.2 絮凝条件优化

絮凝剂添加量对絮凝率的影响:取1 000 mL发酵液,分别置于5个500 mL小烧杯中,并分别加入0.5, 1.0, 1.5, 2.0和2.5 g/L的聚丙烯酰胺(添加聚丙烯酰胺的同时需要同时添加醋酸,添加比例为1:100 g/mL),在磁力搅拌器上以150 r/min速率搅拌2 min后静置80 min,使用移液枪从烧杯中上部吸取适量液体测定细胞数,参照文献[6]计算絮凝率。

搅拌速率对絮凝率的影响:取1 000 mL发酵液,分别置于5个500 mL小烧杯中,并分别加入2.0 g/L的聚丙烯酰胺(添加聚丙烯酰胺的同时需要同时添加醋酸,添加比例1:100 g/mL),在磁力搅拌器上以0, 100, 200, 300和400 r/min速率搅拌2 min后静置80 min,使用移液枪从烧杯中上部吸取适量液体测定细胞数,参照文献[6]计算絮凝率。

搅拌时间对絮凝率的影响:取1 000 mL发酵液,分别置于5个500 mL小烧杯中,并分别加入2.0 g/L聚丙烯酰胺(添加聚丙烯酰胺的同时需要同时添加醋酸,添加比例1:100 g/mL),在磁力搅拌器上以300 r/min速率搅拌0, 10, 20, 40和80 min后静置80 min,使用移液枪从烧杯中上部吸取适量液体测定细胞数,参照文献[6]计算絮凝率。

#### 1.2.3 响应面分析

根据单因素试验确定的主要影响因素,利用Box-Behnken组合设计的方法对其进行试验,利用响应面分析方法对结果进行回归模拟,确定最优絮凝条件。

#### 1.2.4 絮凝率的计算

$$\text{絮凝率} = 100 - \frac{\text{絮凝液细胞数}}{\text{发酵液细胞数}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.2.5 数据分析方法

单因素试验使用Origin 75软件绘图并分析,响应面分析使用Design-Expert 8.0进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 絮凝方法选择

无机絮凝法可分为铁系、铝系,无机絮凝法主要通过释放离子到细胞表面,通过电中和作用消除细胞

表面的静电斥力,从而使细胞之间由原来的相互排斥变成相互吸引、凝聚成团。有机絮凝法可分为壳聚糖等天然型和聚丙烯酰胺等合成型,通过吸附等作用凝聚细胞。生物絮凝法一般使用真菌、霉菌等菌丝体较长的细胞,霉菌等细胞通过菌丝包裹其他细胞凝聚成团,从而实现细胞的絮凝,也有研究将生物法划归到有机絮凝法中。

图1是不同絮凝方法对异养小球藻的絮凝效果。从图1可知,霉菌吸附效果最差,仅43.18%,原因可能是异养小球藻发酵时间长、发酵液中成分复杂,霉菌生长状况不太理想,异养小球藻细胞较小,霉菌丝无法形成致密的菌丝团包裹细胞。三氯化铁、氯化铝的絮凝效果略高于霉菌吸附,原因可能是异养小球藻经过十几天的发酵,发酵液中不仅有大量的代谢产物,还存在胶体、细胞碎片等物质,干扰了无机离子的电中和作用。聚丙烯酰胺絮凝率最高,可能是人工合成的有机絮凝剂携带大量的带电官能团,能够强烈吸附胶体、细胞,并迅速凝聚成团沉积下来。试验所用絮凝方法与其他文献相比略低,可能是异养小球藻发酵液质量体积浓度达121 g/L,远高于文献所用自养小球藻的2 g/L,这导致溶液黏度过大、不利于高分子链的分散,导致絮凝效果较差<sup>[7-9]</sup>。

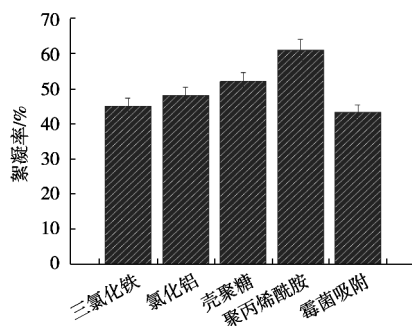


图1 不同絮凝方法的絮凝率

## 2.2 工艺参数对絮凝率的影响

影响絮凝的参数有絮凝剂添加量、搅拌速率、搅拌时间、沉降时间、pH等。对于沉降时间,陈晓燕等<sup>[10]</sup>研究表明,絮凝后沉降一般在10 min内即可完成,絮凝时间对絮凝率影响并不大,而调节pH将会使用额外的酸和碱,絮凝率较高的pH区间也往往处于中性范围<sup>[11]</sup>。因此着重考察絮凝剂添加量、搅拌速率、搅拌时间对絮凝率的影响。

### 2.2.1 絮凝剂添加量对絮凝率的影响

聚丙烯酰胺是人工合成的高分子有机絮凝剂,它的作用机理是絮凝剂能够释放带电官能团吸附胶体、细胞,从而使细胞桥架成大团并沉降,可见这种絮凝剂实现絮凝效果的前提是能够与细胞接触、细胞之间桥架成团。如果絮凝剂添加量较少,絮凝剂不足以吸

附全部胶体、细胞,不能聚集成团并沉积,而如果絮凝剂添加量过多,每个细胞都被数个絮凝剂基团吸附、包裹没有空间去桥架,而絮凝剂基团之间无法桥架,所以细胞之间可能无法实现桥架、无法絮凝成团并沉降<sup>[11]</sup>。因此合适的絮凝剂添加量不仅与絮凝剂成本有关,还影响着絮凝效果。

图2是絮凝剂添加量对絮凝率的影响。随着絮凝剂添加量提高,絮凝率不断提高,但絮凝剂添加量2 g/L时絮凝率达到68.03%,继续增加用量絮凝率反而快速下降。赵奎等<sup>[6]</sup>研究表明,壳聚糖、聚丙烯酰胺的用量越大越好,与试验结果存在差异,这可能是赵奎等研究所用研究对象是自养藻,培养液中成分简单,只有水、少量的可溶性无机盐和藻细胞,另外试验的絮凝率并没有达到最大值,从而得出絮凝剂用量越大越好的结论。因此,试验选择絮凝剂添加量2 g/L。

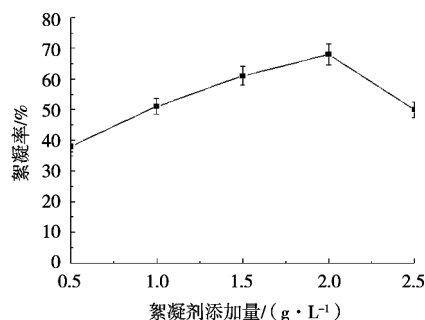


图2 絮凝剂添加量对絮凝率的影响

### 2.2.2 搅拌速率对絮凝率的影响

搅拌是生化反应中的常用操作,目的是为了使溶液中的各种成分能够混合均匀,以防局部反应物浓度过高,从而缩短反应时间,提高反应速率。絮凝剂、发酵液均是可溶性物质,但它们之间吸附、桥架作用并不剧烈。因此对搅拌速率需要进一步考察。

图3是搅拌速率对絮凝率的影响。随着搅拌速率提高,絮凝率快速提高,说明搅拌使絮凝剂、发酵液在容器中分布均匀、充分接触,从而在搅拌速率提高时絮凝率也得到相应提高。但搅拌速率超过300 r/min后,絮凝率反而有所下降,这可能是由于搅拌速率过高而产生的剪切力过大,这种作用力超过了絮凝剂与细胞之间的桥架、吸附作用力,从而将部分絮凝团打散、絮凝率下降,试验结果与陈晓燕等<sup>[10]</sup>的研究结果相同,因此试验选择搅拌速率300 r/min。

### 2.2.3 搅拌时间对絮凝率的影响

絮凝是一个缓慢的过程,没有酸碱中和之类的生化反应那样剧烈,因此絮凝过程需要一定时间。搅拌能让反应体系中各成分混合均匀、充分接触,如果搅拌时间过短,就会导致絮凝不完全,絮凝率不理想。



图4是搅拌时间对絮凝率的影响。随着搅拌时间增加,絮凝率快速提高,搅拌时间达到20 min后,絮凝率增加速度放慢,搅拌时间达到40 min时絮凝率达到88.93%,继续增加搅拌时间絮凝率反而有所降低。这说明在合适的剪切力范围内,随着絮凝的完成,絮凝团内部结构稳定。陈晓燕等<sup>[10]</sup>研究表明,使用阳离子淀粉絮凝剂收获自养斜生栅藻搅拌10 min即可达到最高絮凝率,继续搅拌将浪费能源,试验所用搅拌时间较长的原因是生物量高、发酵液成分极其复杂。因此,试验选择搅拌时间40 min。

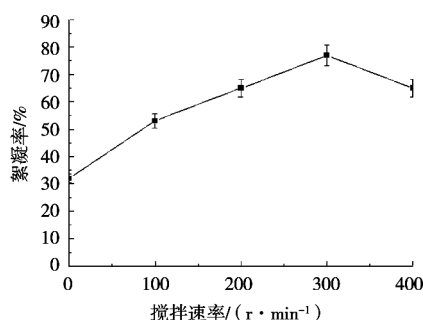


图3 搅拌速率对絮凝率的影响

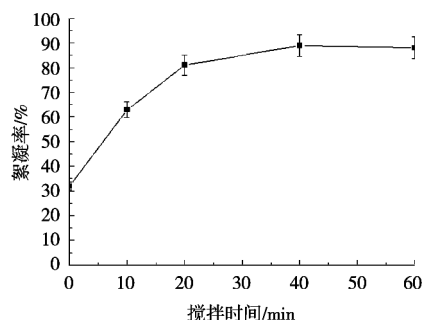


图4 搅拌时间对絮凝率的影响

### 2.3 响应面分析

根据单因素试验结果,使用Design-Expert 8.0软件对絮凝剂添加量、搅拌速率、搅拌时间3个变量进行Box-Behnken设计(见表1),以絮凝率为响应值进行响应面分析(见表2),利用软件进行建立回归模型,并选择最优变量。

通过软件分析,进行二次多项式拟合,获得回归方程:絮凝率=89-0.75A-1.00B+0.00C+1.00AB+0.00AC+0.50BC-8.50A<sup>2</sup>-15.00B<sup>2</sup>-6.50C<sup>2</sup>。回归方程的复相关系数的R<sup>2</sup>为98.72%,校正后的R<sup>2</sup>为97.09%,说明试验可靠度高,而变异系数C.V.值为2.29%,说明试验稳定性强,试验操作可信,该回归方程为絮凝法收集异养小球藻提供良好模型。

根据二次回归模型绘制响应面分析图,如图5所示。

表1 因素水平表

水平	因素		
	A絮凝剂添加量/ (g · L <sup>-1</sup> )	B搅拌速率/ (r · min <sup>-1</sup> )	C搅拌时间/min
-1	1.5	200	20
0	2.0	300	40
+1	2.5	400	60

表2 响应面分析结果

编号	A絮凝剂添加量	B搅拌速率	C搅拌时间	Y絮凝率/%
1	1	1	0	66
2	-1	0	1	75
3	-1	-1	0	67
4	0	0	0	89
5	0	-1	1	69
6	1	-1	0	66
7	0	0	0	89
8	1	0	1	71
9	0	0	0	89
10	0	1	1	68
11	0	0	0	89
12	-1	0	-1	77
13	0	-1	-1	68
14	0	1	-1	65
15	1	0	-1	73
16	-1	1	0	63
17	0	0	0	89

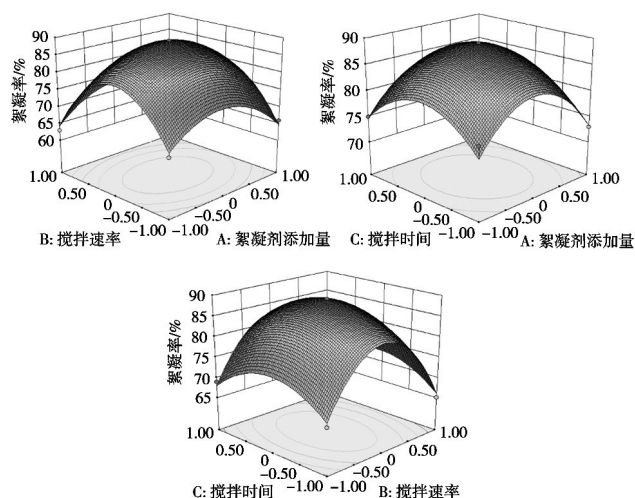


图5 响应面分析图

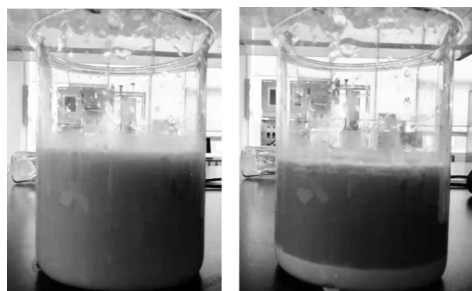


图6 絮凝前后对比

从表3可知,絮凝剂添加量、搅拌速率、搅拌时间对絮凝率影响均不太显著,絮凝剂添加量、搅拌速率、搅拌时间各变量之间的交互作用不太明显。二项式模型选择的最优变量为絮凝剂添加量2.0 g/L、300 r/min、搅拌时间40 min,此时理论絮凝率达到89%,根据最优变量进行验证,三次重复试验的平均结果为89.15%,与理论值仅相差0.17%,说明通过响应面分析获得的絮凝法收集工艺条件是可行的。从图6可以看出,使用最佳条件进行絮凝,在絮凝后异养小球藻在烧杯底部沉积明显,收集效果较好,绝大部分细胞沉积,能够满足藻细胞收集要求。结果显示发酵液中上部仍为不透明液体,原因在于培养基和流加补料均使用大量葡萄糖、酵母粉,灭菌以后培养基颜色为深褐色,高含油异养小球藻细胞为米黄色,因此在发酵中后期异养小球藻浓度较高时发酵液偏黄色,但藻细胞沉积后发酵液中上部仍残留个别细胞、色素等物质,不会像自养藻培养液絮凝后变得透明。

表3 方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F值	p值 (Prob>F)	显著性
模型	1 587.26	9	176.36	60.22	<0.000 1	显著
A絮凝剂添加量	4.5	1	4.5	1.54	0.255 1	不显著
B搅拌速率	8	1	8	2.73	0.142 4	不显著
C搅拌时间	0	1	0	0	1	不显著
AB	4	1	4	1.37	0.280 8	不显著
AC	0	1	0	0	1	不显著
BC	1	1	1	0.34	0.577 3	不显著
A <sup>2</sup>	304.21	1	304.21	103.88	<0.000 1	显著
B <sup>2</sup>	947.37	1	947.37	323.49	<0.000 1	显著
C <sup>2</sup>	177.89	1	177.89	60.74	0.000 1	显著
残差	20.5	7	2.93			
失拟项	20.5	3	6.83			
纯误差	0	4	0			
总和	1 607.76	16				

试验获得的最佳工艺条件下絮凝率仍然比传统离心法所得采收率低,这说明单一絮凝剂的絮凝效果比离心法差,这也是絮凝法在异养小球藻实际生产中应用相对较少的原因之一。彭超等<sup>[12]</sup>研究表明,复合絮凝剂选择合适将产生明显的协同作用,使絮凝率远高于单一絮凝剂,絮凝效果更好,将在后序试验中开展进一步研究。

聚丙烯酰胺低毒,但丙烯酰胺单体会对动物神经系统造成损伤,如果收集到的藻粉用于生产保健品、饵料等产品,将影响产品质量,因此,将在后序试验中进一步研究低毒、无害的收集方法。

### 3 结论

由于发酵液成分复杂、杂质过多,无机絮凝剂、

霉菌吸附均对异养小球藻絮凝效果不太理想,有机絮凝剂显示出较好的絮凝效果。通过单因素试验、响应面分析,获得最优变量:絮凝剂添加量2.0 g/L、300 r/min、搅拌时间40 min,在此条件下进行试验验证,絮凝率达到89.15%,回归分析和验证试验均表明响应面分析结果合理、可信。

复合絮凝剂絮凝效果更理想,有待于进一步研究,但在发酵液中添加絮凝剂将改变上清液、藻粉的物质构成,对上清液处理、藻粉制取工艺造成不利影响。新兴的磁性粒子絮凝、藻细胞自絮凝等絮凝工艺具有不改变发酵液物质构成、成本低廉等优点,有待于跟踪研究进展,进行相应技术储备,低成本、高效率絮凝法新工艺的不断涌现将推动絮凝法收集微藻细胞的广泛应用,进而推动微藻产业的进一步发展。

#### 参考文献:

- [1] CERÓN-GARCÍA M C, MACÍAS-SÁNCHEZ M D, SÁNCHEZ-MIRÓN A, et al. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source[J]. Applied Energy, 2013, 103: 341-349.
- [2] 毕生雷,王方方,张成明,等. 培养条件对霉菌收集异养小球藻细胞的影响[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(4): 34-38.
- [3] 赖素兰,高如承,胡艳艳,等. 几种常用絮凝剂对饵料微藻的絮凝效应[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2015, 31(2): 69-75.
- [4] 丁进锋,赵凤敏,曹有福,等. 聚合氯化铝絮凝小球藻的动力学研究[J]. 农业机械学报, 2015, 46(3): 203-207.
- [5] 薛蓉,陆向红,卢美贞,等. 絮凝法采收小球藻的研究[J]. 可再生能源, 2012, 30(9): 80-84.
- [6] 赵奎,王亚君,武振晋,等. 8种不同絮凝剂对埃氏小球藻絮凝效应的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2017, 37(1): 54-59.
- [7] 马志欣,尚春琼,胡小丽,等. 微藻絮凝采收的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(4): 942-948.
- [8] 王鹰燕. 小球藻絮凝采收工艺及其上清液循环利用的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [9] 韩乐,孙晓海,韩伟. 壳聚糖絮凝法精制合欢皮多糖水提液的工艺[J]. 生物加工过程, 2014, 12(2): 38-43.
- [10] 陈晓燕,林向阳,王静,等. CSF絮凝微藻技术研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(9): 151-156.
- [11] 李凡锋,周玉杰,刘德华. 1, 3-丙二醇发酵液的絮凝预处理研究[J]. 微生物学通报, 2004(3): 30-35.
- [12] 彭超,苏会波,熊强,等. 絮凝剂对雨生红球藻采收的影响[J]. 生物加工过程, 2017, 15(2): 1-6.