

# 以异养细胞作为种子的椭圆小球藻产油脂光自养培养优化

王军<sup>1</sup>, 李元广<sup>1</sup>, 王伟良<sup>1</sup>, 黄建科<sup>1</sup>, 沈国敏<sup>1</sup>, 李淑兰<sup>2</sup>, 潘荣华<sup>3</sup>

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 上海泽元海洋生物技术有限公司, 上海 200237

3 嘉兴泽元生物制品有限责任公司, 浙江 嘉兴 314000

王军, 李元广, 王伟良, 等. 以异养细胞作为种子的椭圆小球藻产油脂光自养培养优化. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1639-1643.

Wang J, Li YG, Wang WL, et al. Optimization of photoautotrophic lipid production of *Chlorella ellipsoidea* seeded with heterotrophic cells. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1639-1643.

**摘要:** 异养细胞种子/光自养培养方法是一种可异养培养的能源微藻培养的有效方法, 但已有文献尚未从工艺优化角度考察其发展潜力。为了获得较高细胞密度的用于光自养培养的种子和提高光自养培养的细胞密度与油脂产率, 对异养细胞种子/光自养培养的培养基和培养条件进行了优化。结果表明, 采用优化后的培养基, 椭圆小球藻在摇瓶中异养培养的最高藻细胞密度可达 11.04 g/L, 比在初始培养基条件下提高了 28.0%, 在 5 L 发酵罐中异养培养的藻细胞密度达到 73.89 g/L; 在 2 L 柱式光生物反应器中光自养培养的藻细胞密度、油脂含量和油脂产率分别达 1.62 g/L、36.34% 和 6.1 mg/(L·h), 油脂成分主要为含 C16-C18 碳链的脂肪酸, 是制备生物柴油的理想原料。经过优化, 异养细胞种子/光自养培养这一方法能够显著地提高椭圆小球藻产油脂的能力, 这进一步表明异养细胞种子/光自养培养方法有望成为可异养的能源微藻的高效培养方式。

**关键词:** 椭圆小球藻, 异养细胞种子/光自养培养, 细胞密度, 油脂产率

## Optimization of photoautotrophic lipid production of *Chlorella ellipsoidea* seeded with heterotrophic cells

Jun Wang<sup>1</sup>, Yuanguang Li<sup>1</sup>, Weiliang Wang<sup>1</sup>, Jianke Huang<sup>1</sup>, Guomin Shen<sup>1</sup>, Shulan Li<sup>2</sup>, and Ronghua Pan<sup>3</sup>

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Shanghai Zeyuan Marine Biotechnology Co., Ltd. Shanghai 200237, China

3 Jiaying Zeyuan Bioproducts Co., Ltd. Jiaying 314000, Zhejiang, China

**Abstract:** Photoautotrophic cultivation with heterotrophic cells as seeds (heterotrophic cells / photoautotrophic cultivation) is

**Received:** April 27, 2014; **Accepted:** July 21, 2014

**Supported by:** National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2011CB200904), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA050101, 2013AA065804)

**Corresponding author:** Yuanguang Li. Tel/Fax: +86-21-64250964; E-mail: ygli@ecust.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB200904), 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA050101, 2013AA065804) 资助。

网络出版时间: 2014-08-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140248.html>

an effective way for the development of microalgal biofuel, but its development potential from the point of process optimization has not been investigated in literatures. To evaluate this, the optimizations of medium and culture conditions for *Chlorella ellipsoidea* were studied. In the heterotrophic stage, the biomass concentration reached 11.04 g/L with the optimized medium in flask, which were 28.0% higher than that with the original medium, and the biomass concentration reached 73.89 g/L in 5-L fermenter. In the photoautotrophic stage, the culture medium and conditions were studied in a 2-L column photobioreactor. The maximum biomass concentration, lipid content and lipid productivity reached 1.62 g/L, 36.34% and 6.1 mg/(L·h) under the optimal photoautotrophic conditions. The lipids were mainly composed of C16-C18 fatty acids, which were raw material suitable for biodiesel. After optimization, heterotrophic cells / photoautotrophic cultivation can significantly improve the capacity of biofuel production by *Chlorella ellipsoidea*, this method is also expected to be an efficient way for the cultivation of other microalgae that can grow heterotrophically.

**Keywords:** *Chlorella ellipsoidea*, heterotrophic cells / photoautotrophic cultivation, biomass concentration, lipid productivity

小球藻生长速度快、胞内油脂含量高,并且油脂组分中主要是 C16-C18 碳链的脂肪酸甘油酯,是生产生物燃料的理想原料<sup>[1]</sup>。目前,如何高效地获得高含油脂的藻细胞是一个亟待解决的关键问题。

小球藻光自养培养种子扩培时间非常长<sup>[2]</sup>,扩培过程中易受杂藻和原生动物污染及天气的影响<sup>[3]</sup>。为了克服上述弊端,近年来有学者以异养培养的藻细胞作为光自养培养种子,即异养细胞种子/光自养培养小球藻。Han 等<sup>[4]</sup>用该方法对 3 种小球藻(蛋白核小球藻、普通小球藻和椭圆小球藻)进行研究,在种子阶段,异养培养的藻细胞密度是光自养培养的 14.33-16.15 倍;在光自养阶段,采用异养细胞作为种子进行光自养培养的藻细胞密度、油脂产率分别是采用光自养细胞作为种子的 1.49-1.81 倍和 1.42-1.66 倍。Zheng 等<sup>[5]</sup>同样采用该方法培养嗜热小球藻 *Chlorella sorokiniana*,结果表明采用异养细胞和光自养细胞作为种子进行光自养培养的藻细胞具有相似的藻细胞密度和油脂含量。上述结果表明,以异养培养的藻细胞作为光自养培养的种子来进行光自养培养的方法具有很好的发展潜力。

小球藻属中有很多可以产油脂的种,而关于椭圆小球藻产油脂的研究较少。Yang 等<sup>[6]</sup>利用市内二次处理的污水光自养培养椭圆小球藻,油脂含量达到 43%,但藻细胞密度只有 425 mg/L,油脂产率仅为 0.53 mg/(L·h),培养效率低。

为了进一步探索椭圆小球藻利用异养细胞种子/光自养培养模式产油脂的潜力,本文对椭圆小球藻异养培养及光自养培养工艺分别进行了优化研究。本文的研究结果可为以椭圆小球藻作为藻种的能源微藻高效培养技术的产业化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

椭圆小球藻 *Chlorella ellipsoidea* 购自中国科学院武汉水生生物研究所,笔者所在实验室自行纯化。

### 1.2 培养基及培养方法

#### 1.2.1 异养培养

椭圆小球藻在 500 mL 三角瓶中恒温振荡培养,培养温度 30 °C,转速 150 r/min。以 Endo 培养基<sup>[7]</sup>为初始培养基,采用单因子分析法对培养基进行优化。

#### 1.2.2 光自养培养

光自养培养在 2 L 柱式光生物反应器中进行,藻种为 500 mL 摇瓶异养藻细胞,离心去除上清液。初始藻细胞密度 0.2 g/L 左右,装液量 2 L,培养液先用次氯酸钠消毒,然后用硫代硫酸钠中和,通气量 1 L/min,CO<sub>2</sub> 占气体流量 2% (V/V),连续光照,光生物反应器外壁面光强为 10 000 lux,对培养基及培养条件进行优化。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 藻细胞密度的测定

藻细胞密度测定采用干重法,见文献[8]。

#### 1.3.2 油脂和脂肪酸含量的测定

油脂和脂肪酸含量的测定分别采用有机溶剂提取法和高效液相色谱液-质谱连用法,见文献[9]和文献[10]。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮源种类及浓度对椭圆小球藻异养培养的影响

#### 2.1.1 不同氮源种类对椭圆小球藻异养培养影响

在保持初始葡萄糖浓度及 C/N 比相同的条件下,

椭圆小球藻对不同氮源的利用差别较大。表 1 说明椭圆小球藻对  $\text{KNO}_3$  的利用效率最高,最高细胞密度可达 10.27 g/L,细胞生长速率可达 0.122 g/(L·h),且葡萄糖基本消耗完。椭圆小球藻对  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的利用效果非常差,最高藻细胞密度仅有 3.06 g/L,细胞生长速率只有 0.032 g/(L·h),且有大量的葡萄糖残留。

### 2.1.2 不同 C/N 比对椭圆小球藻异养培养的影响

在碳浓度保持不变的前提下,改变 C/N 比。随着 C/N 比的增加,椭圆小球藻的生长速率逐渐增大,其中 C/N 比为 10.84 和 15.84 时两者生长速率基本一致,当 C/N 比达到 20.84 的时候生长速率比初始培养基(C/N 比为 5.84)的生长速率提高 23.14%,且培养时间明显缩短(表 2)。

### 2.1.3 异养培养基优化前后的对比

采用优化后的培养基,椭圆小球藻的生长速率明显高于其在初始培养基中的生长速率,最高细胞密度可达 10.74 g/L,比初始培养基中提高了 28%(表 3)。

### 2.1.4 5 L 发酵罐中异养培养过程

在 5 L 发酵罐中应用上述优化后的异养培养基,采用补料分批培养工艺异养培养椭圆小球藻,最高细胞密度达 73.89 g/L,平均生长速率为 0.88 g/(L·h)(图 1),极大地提高了藻细胞密度,缩短了培养时间,可以为光自养培养及时提供充足的种子。

表 1 不同氮源种类对椭圆小球藻异养培养的影响  
Table 1 Effects of different nitrogen sources on heterotrophic growth of *C. ellipsoidea*

Different nitrogen sources	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	$\text{KNO}_3$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
<i>t</i> (h)	84	84	96
Maximum biomass concentration (g/L)	8.84±0.31	10.27±0.43	3.06±0.09
Productivity (g/(L·h))	0.105±0.0037	0.122±0.0053	0.032±0.00092
Residual glucose concentration (g/L)	6.95±0.28	0.86±0.03	16.87±0.84

表 2 不同 C/N 比对椭圆小球藻异养培养的影响  
Table 2 Effects of different C/N on heterotrophic growth of *C. ellipsoidea*

Different C/N	5.84	10.84	15.84	20.84
<i>t</i> (h)	84	84	84	72
Maximum biomass concentration (g/L)	10.18±0.44	10.65±0.36	10.51±0.30	10.74±0.41
Productivity (g/(L·h))	0.121±0.0052	0.127±0.0043	0.125±0.0041	0.149±0.0061

表 3 异养培养基优化前后椭圆小球藻生长特性比较  
Table 3 Comparison on growth characteristic of *C. ellipsoidea* cultivated with optimal and original medium

Medium	Maximum biomass concentration	Productivity
Original	(8.84±0.33)g/L	(0.095 8±0.003 9)g/(L·h)
Optimal	(10.74±0.46)g/L	0.149±0.006 4
Increased proportion	(21.48±0.67)%	(55.52±0.35)%

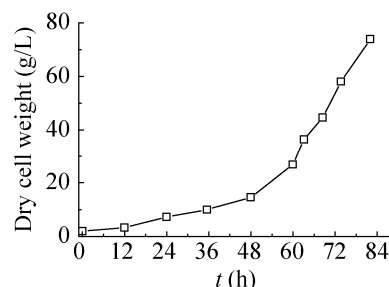


图 1 椭圆小球藻 5 L 发酵罐异养培养过程  
Fig. 1 The process of fed-batch cultivation of *C. ellipsoidea* in 5 L fermenter.

## 2.2 光自养培养基及培养条件优化

### 2.2.1 不同培养基对椭圆小球藻光自养培养影响

在相同培养条件下,3#<sup>[11]</sup>、F/2<sup>[12]</sup>、Pr<sup>[13]</sup>和 BG-11<sup>[14]</sup>培养基条件下藻细胞密度差别不大,分别为 1.20 g/L、1.18 g/L、1.17 g/L 和 1.11 g/L,但椭圆小球藻在 4 种培养基中的油脂含量和油脂产率差别较大。虽然在 BG-11 培养基条件下藻细胞密度最低,但其油脂含量和油脂产率却是最高,分别达到 30.39%和 4.03 mg/(L·h);在 3#培养基条件,虽然藻细胞密度最高,但其油脂含量和油脂产率却均低于 BG-11 培养基,分别为 22.09%和 2.73 mg/(L·h),而 F/2 和 Pr 培养基中藻细胞的油脂含量和油脂产率均低于 BG-11 培养基(图 2)。

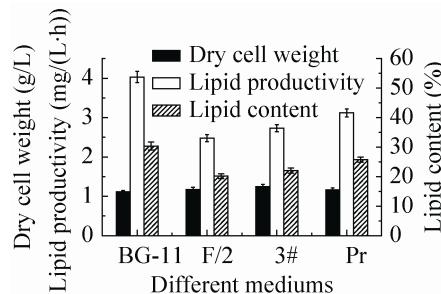


图 2 不同培养基对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响

Fig. 2 Effects of different mediums on photoautotrophic cultivation and lipid accumulation of *C. ellipsoidea*.

### 2.2.2 氮浓度对椭圆小球藻光自养培养的影响

不同氮浓度下小球藻光自养培养的藻细胞密度、油脂含量和油脂产率有较大的差异。当培养基中不添加氮源时,藻细胞根本无法生长,油脂含量和油脂产率基本为零。当培养基中氮含量为初始培养基中氮含量的 2/3 时,最高藻细胞密度、油脂含量和油脂产率比初始培养基分别提高 23.58%、12.03%和 56.61%;当培养基中氮含量为初始培养基中氮含量的 1/3 时,最高藻细胞密度比初始培养基提高 22.28%,但其油脂含量却下降 17.06%。

### 2.2.3 磷浓度对椭圆小球藻光自养培养的影响

如图 4 所示,当培养基中不添加磷源时,藻细胞依然可以生长,但其最高藻细胞密度、油脂含量和油脂产率比对照分别下降 29.25%、48.85%和 81.11%。此现象与培养基中不添加氮源的结果有较大差别,这可能是由于藻细胞对磷有吸附作用。虽然异养培养的藻细胞经过离心去除了上清液,但藻细胞可能吸附了一定量的磷,因此藻细胞依然可以在不添加磷的光自养培养基中生长。当培养基中磷含量为初始培养基中磷含量的 2/3 时,最高藻细胞密度、油脂含量和油脂产率比初始培养基条件下分别提高 4.08%、2.43%和 9.57%;当培养基中磷含量为初始培养基中磷含量 1/3 时,最高藻细胞密度比初始培养基条件下提高 8.16%,但其油脂含量却下降 8.04%。因此,优化后确定的最佳光自养培养基为 BG-11 培养基,其中氮源和磷源浓度均为原始浓度的 2/3。

### 2.2.4 初始细胞密度对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响

在相同培养条件下,不同的初始接种密度对光自养培养的结果有较大影响。当初始接种密度在 0.3 g/L 以下时,随着初始接种密度的提高,小

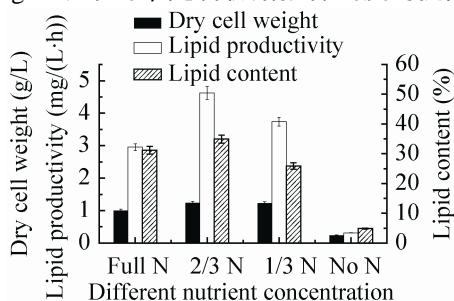


图 3 氮浓度对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响  
Fig. 3 Effects of nitrogen level of medium on the photoautotrophic cultivation and lipid accumulation of *C. ellipsoidea*.

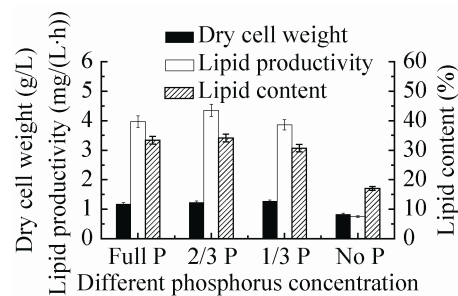


图 4 磷浓度对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响  
Fig. 4 Effects of phosphorus level of medium on the photoautotrophic cultivation and lipid accumulation of *Chlorella ellipsoidea*.

球藻光自养最高藻细胞密度也越大。初始接种密度为 0.2 g/L 和 0.3 g/L 时,两者油脂产率无明显差异,但初始藻细胞密度 0.3 g/L 时的油脂含量却比 0.2 g/L 时下降 21.94% (图 5)。

### 2.2.5 通气量对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响

在相同培养条件下,通气量越大,小球藻光自养培养的藻细胞密度、油脂含量和油脂产率也越大。通气量越大,光生物反应器中混合也越充分,藻细胞可以更好接受光照。在通气量为 2 L/min 条件下,光自养培养最高藻细胞密度、油脂含量和油脂产率可以分别达到 1.62 g/L、36.34%和 6.13 mg/(L·h) (图 6)。

### 2.3 异养细胞/光自养培养的椭圆小球藻胞内脂肪酸的组成

从表 4 可见,以异养细胞/光自养培养模式培养的椭圆小球藻中脂肪酸以 C16-C18 为主,占总脂肪酸的 98.88%,不饱和脂肪酸大约占总脂肪酸的 64.15%。根据相关文献<sup>[15]</sup>,上述组分的脂肪酸较适合制备生物柴油。

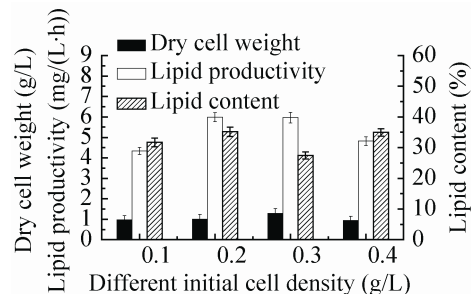


图 5 初始细胞密度对椭圆小球藻光自养生长及油脂积累的影响  
Fig. 5 Effects of initial cell density on photoautotrophic cultivation and lipid accumulation of *C. ellipsoidea*.

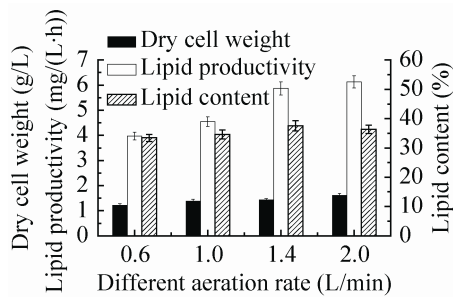


图6 通气量对椭圆小球藻光自生长及油脂积累的影响  
Fig. 6 Effects of aeration rate on the photoautotrophic cultivation and lipid accumulation of *C. ellipsoidea*.

表4 异养细胞种子/光自培养培养的椭圆小球藻细胞内油脂中脂肪酸的组成

Table 4 Fatty acid composition of *C. ellipsoidea* cultivated by heterotrophic cells/photoautotrophic cultivation model

Fatty acid	C	C	C	C	C	C
	13:00	14:00	14:01	16:00	16:02	16:03
Content (%)	0.16	0.67	0.29	33.59	9.89	9.07
Fatty acid	C	C	C	C	C	
	17:00	18:00	18:01	18:02	18:03	
Content (%)	0.25	1.18	1.56	26.65	16.69	

### 3 结论

异养细胞/光自培养方法的关键是获得高浓度的异养藻细胞以及提高光自培养产油脂的能力。通过优化,异养阶段最高藻细胞密度和光自培养阶段油脂产率分别达到 11.04 g/L 和 6.1 mg/(L·h),比 Zheng 等<sup>[5]</sup>报道的最高异养藻细胞密度 9.0 g/L 和油脂产率 5.2 mg/(L·h),分别提高了 22.67%和 17.12%。

通过本文的研究,使椭圆小球藻异养培养的藻细胞密度有了很大提高,且培养规模从摇瓶放大到 50 L 罐,最高细胞密度达到 73.89 g/L,可为光自培养提供充足及时的种子;同时也揭示了不同培养基成分及培养条件对光自培养过程油脂的积累具有较大影响。上述结论说明异养细胞种子/光自培养方法可以有效地提高椭圆小球藻产油脂的能力,这进一步表明异养细胞种子/光自培养方法有望成为可异养的能源微藻的高效培养方式。

### REFERENCES

- [1] Huang GH, Chen F, Ren QG. Research on biodiesel production from *Chlorella vulgaris*. Acta Energetica Sin, 2010, 31(9): 1085–1091 (in Chinese). 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.
- [2] Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K, et al. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 54(1): 112–117.
- [3] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A Look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. Washington: National Renewable Energy Laboratory, 1998.
- [4] Han FF, Huang JK, Li YG, et al. Enhancement of microalgal biomass and lipid productivities by a model of photoautotrophic culture with heterotrophic cells as seed. Bioresour Technol, 2012, 118: 431–437.
- [5] Zheng YB, Chi ZY, Lucker B, et al. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. Bioresour Technol, 2012, 103(1): 484–488.
- [6] Yang J, Li X, Hu HY, et al. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. Appl Energy, 2011, 10(88): 3295–3299.
- [7] Endo H, Nakajima K, Chino R, et al. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. Agricult Biol Chem, 1974, 38: 9–18.
- [8] Sim SJ, An JY, Kim BW. Two-phase extraction culture of *Botryococcus braunii* producing long-chain unsaturated hydrocarbons. Biotechnol Lett, 2001, 23: 201–205.
- [9] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Phys, 1959, 37(8): 911–917.
- [10] Jham GN, Teles FFF, Campos LG. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. J Am Oil Chem Soc, 1982, 59(3): 132–133.
- [11] Pan X, Li JH, Dai CC, et al. Study on heterotrophic culture of *Chlorella*. Food Sci, 2002, 23(4): 28–33 (in Chinese). 潘欣, 李建宏, 戴传超, 等. 小球藻异养培养的研究. 食品科学, 2002, 23(4): 28–33.
- [12] Valenzuela-Espinoza E, Millán-Núñez R, Núñez-Cabrero F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult Eng, 2002, 25(4): 207–216.
- [13] Liang YN, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnol Lett, 2009, 31(7): 1043–1049.
- [14] Yamaberi K, Takagi M, Yoshida T. Nitrogen depletion for intracellular triglyceride accumulation to enhance liquefaction yield of marine microalgal cells into a fuel oil. J Mar Biotechnol, 1998, 6(1): 44–48.
- [15] Luo W, Yuan ZH, Tan TW, et al. Study on the relationship between the fuel properties and component of biodiesel. Acta Energetica Sin, 2008, 29(7): 878–882. 罗文, 袁振宏, 谭天伟, 等. 生物柴油理化性质与组分关系的研究. 太阳能学报, 2008, 29(7): 878–882 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)