

论述与研究

可沉微藻转化油脂潜力及 PHB 合成试验研究

郝晓地, 靳景宜, 罗玉琪, 曹达启

(北京建筑大学北京未来城市设计高精尖创新中心 中-荷未来污水处理技术
研发中心, 北京 100044)

摘要: 可沉微藻在去除二级出水中氮、磷的同时,可以合成并积累多种具有高附加值的聚合物,如油脂、蛋白质、多糖、聚 β -羟基丁酸酯(PHB)等。前期试验在“冲淘”压力下筛选出了沉淀率高达97%的可沉微藻,并通过一系列环境变化(通入 CO_2 、实行光/暗循环等)刺激油脂聚积,最高可获得49.2%(细胞干质量,下同)的油脂含量。进一步强化试验显示,以增加光照强度与 CO_2 通入量达到进一步提高可沉微藻油脂含量的做法事与愿违,反而出现油脂含量下降的现象。而可沉蓝藻具有相当的合成、积累PHB的能力,只要存在少许特异性碳源(乙酸盐)刺激,可沉蓝藻在不通入 CO_2 的情况下即可轻松合成并积累含量高达30%左右的PHB。这种主要以无机碳源合成PHB的方法比以有机碳源合成PHB的活性污泥法更具吸引力。

关键词: 可沉微藻; 二级出水; 聚合物; 油脂; 聚 β -羟基丁酸酯(PHB); 蓝藻
中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)07-0001-06

Lipids Conversion Potential and PHB Synthesis of Settleable Microalgae

HAO Xiao-di, JIN Jing-yi, LUO Yu-qi, CAO Da-qi

(Sino-Dutch R & D Centre for Future Wastewater Treatment Technologies, Beijing Advanced
Innovation Center of Future Urban Design, Beijing University of Civil Engineering and
Architecture, Beijing 100044, China)

Abstract: Beyond removing nitrogen and phosphorous from secondary effluent, the settleable microalgae can also synthesize and accumulate such high value-added polymers as lipids, proteins, polysaccharides, poly- β -hydroxybutyrate (PHB), etc. The previous experiments efficiently enriched settleable microalgae with the settleable rate of more than 97% by applying “washout” pressure, and accumulated the highest lipids content of 49.2% (dry cell weight) by changing environmental factors like CO_2 , light/dark shift, etc. According to the following experiment results, increasing the light intensity and CO_2 intake would not further increase the lipids content of the settleable microalgae. Instead, the lipids content decreased. However, settleable cyanobacteria had a good ability to synthesize and accumulate PHB. As long as there was a tiny specific carbon source (acetate) stimulation, cyanobacteria could easily synthesize and accumulate PHB with the content of up to 30% without CO_2 input. Clearly, synthesizing PHB mainly from inorganic carbon source was more attractive than that from

organic carbon source by activated sludge.

Key words: settleable microalgae; secondary effluent; polymer; lipids; poly- β -hydroxybutyrate (PHB); cyanobacteria

在实验室条件下,通过“冲淘”压力筛选出沉淀率高达97%的可沉微藻,为藻-水分离开辟了一条技术捷径。利用二级处理出水可培养可沉微藻,微藻吸收氮、磷的同时亦可合成/转化具有高附加值的有机聚合物,如油脂、蛋白质、多糖甚至聚 β -羟基丁酸酯(PHB)等,可谓一石二鸟。

优化可沉微藻的培养基质与环境条件(如辐照强度和营养水平),可以有效促进微藻生长、繁殖以及聚合物富积。前期试验显示,在可沉微藻系统中通入 CO_2 可以增加11.2%(细胞干质量,下同)的油脂含量,再加上其综合作用,油脂含量可以高达49.2%^[1-2]。为考察可沉微藻油脂含量是否能借助外界环境条件进一步增加,遂通过增加光照、高无机碳源(CO_2)供给、限制营养物水平等方式^[3]继续开展试验。与此同时,亦开展合成PHB的试验。增加光照在一定程度上可以促进营养物吸收,而增加 CO_2 供给有可能提高油脂含量。对可沉微藻而言,通常低光照强度只会诱导极性脂质以及碳水化合物的形成,而高光照强度则会降低极性脂质含量,刺激中性脂质(主要是甘油三酯)的累积^[4]。增加无机碳源(CO_2)供给可协同高光照强度帮助可沉微藻增加营养物吸收,在外部形成营养物限制条件,或许能进一步增加油脂储量。

PHB是一种生物聚合塑料,由 β -羟基丁酸通过酯单体连接组成,具有可生物降解性,能取代传统石油基塑料制品,从根本上消除白色污染^[5]。目前PHB的生物制取方式以有机碳源培养异养细菌发酵代谢制取为主,该方式消耗大量有机碳源^[6];而蓝藻是唯一可以合成、积累PHB的原核生物,同时可以利用无机碳源(CO_2),文献资料显示,蓝藻中的PHB含量最高可达50%(细胞干质量,下同);而蓝藻中PHB的合成和积累取决于藻株、碳源、营养状况以及培植条件等^[6-7]。

1 材料与试验方法

1.1 试验装置与方法

油脂潜力试验所用反应器为6个2L的烧杯,运行周期以天计,包括进水(5 min)、反应、沉降(5 min)和排水(10 min),每个周期结束后,系统保留

30%的混合液,剩余部分排出系统。通过不断“冲淘”筛选出符合沉降条件的微藻,优胜劣汰,从而得到沉降性能良好的藻种。试验条件除额外供给 CO_2 、光照强度外,其他条件与前期试验^[1,8]一致。

1~4号反应器为全天24h连续光照、周期起始进水,其中1、2号无 CO_2 供给,3、4号间歇通入 CO_2 (通3 min、停12 min,前期通入量为6 mL/min,自第120天起增至20 mL/min,下同);5、6号反应器则模拟实际昼/夜交替状态,光/暗反应时间比为10 h:14 h,在光阶段间歇通入 CO_2 ,但两反应器的进水时段不同,5号反应器为光阶段起始(即每日8时)进水,6号反应器为暗阶段起始(即每日18时)进水,目的是考察明、暗交替环境下营养注入时段对油脂积累的影响。另外,1、3、5、6号反应器在进水时额外投加20 mg/L的硅酸盐营养物。油脂潜力试验共持续245 d,在前期光照强度为400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,自第54天将光照提升1倍,即提升至800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;为应对油脂产量在高光照强度下持续下降的现象,自第120天提高 CO_2 的通入量,以帮助可沉微藻适应高光照环境。以1、2号反应器为试验对象测定微藻的PHB合成规律,在油脂潜力试验后期进行;在进水中添加8 mg/L的乙酸钠作为特异性碳源,用于刺激微藻中PHB的合成^[9]。试验光源为20 W射灯,前期为单侧光,54 d后为双侧光。

1.2 藻源

初始藻源取自北京某污水厂二沉池池壁,在前期“冲淘”试验压力下^[1,8]已培育出沉降效果较好(97%的沉降率)的藻种,并以此藻种作为本次试验对象。各反应器处于连续搅拌状态,使微藻处于悬浮状态并可以自由流动,以实现微藻的均匀培养。

1.3 试验水样

试验以采用传统活性污泥法工艺的北京某市政污水处理厂二级出水作为可沉微藻的培养水样,具体水质指标如下:COD为(71.23 \pm 4.5) mg/L, TN为(22.37 \pm 0.8) mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为(0.60 \pm 0.2) mg/L, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为(20.08 \pm 1.8) mg/L, TP为(1.29 \pm 0.3) mg/L, $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 为(1.26 \pm 0.1) mg/L, Mg^{2+} 为(26.89 \pm 2.3) mg/L, Ca^{2+} 为(81.26 \pm 3.0) mg/L,

无机碳为 (36.28 ± 6.3) mg/L, 硅酸盐为 (8.02 ± 1.0) mg/L, pH 值为 7.21 ± 0.3 。试验过程中, 实时监测并微调微藻培养水样, 维持水样中关键指标 (N、P、pH 值、硅酸盐等) 相对稳定, 保证微藻稳定生长。1、3、5、6 号反应器进水除额外投加硅酸盐营养物外, 其余指标与其他反应器保持一致。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 通用指标

取 50 mL 混合藻液, 在室温下静置 5 ~ 10 min 后取上清液检测各项指标。TN、氨氮、硝态氮、TP、磷酸盐、硅酸盐浓度等均按标准方法测定。微藻生物量以悬浮固体 (SS) 含量表征^[10]。微藻中叶绿素 a 含量的变化可以表征微藻的生长状况和光合作用情况, 叶绿素 a 含量采用二甲基亚砜 (DMSO) 提取、紫外分光光度法测定。

1.4.2 多糖、蛋白质、油脂

多糖含量: 苯酚 - 硫酸法测定; 蛋白质含量: 先对微藻进行碱 (NaOH) 热水解提取, 然后采用考马斯亮蓝法测定^[11]; 油脂含量: 先对微藻进行超声波破壁, 然后用氯仿/甲醇 (体积比为 2 : 1) 混合液提取, 采用质量计量法测定油脂含量^[8, 12-13], 同时可对微藻混合液采用尼罗红染色法在荧光显微镜下观测油脂的荧光生物相^[14]。

1.4.3 PHB

PHB 采用巴豆酸 - 紫外分光光度法检测^[15], 原理是 PHB 可与浓硫酸在 100 °C 下脱水生成巴豆酸, 利用巴豆酸在 235 nm 波长处存在最大吸收峰值, 根据 OD 值和标准曲线可计算出对应的 PHB 含量。微藻胞内其他脂类物质与浓硫酸反应产物的最大吸收峰值与 PHB 的区别很大, 可以排除其他脂类杂质对测量结果的干扰, 具有较高的准确性^[16]。

2 结果与分析

2.1 油脂积累潜力

生物油脂一直是藻类科学研究重点, 在当今能源危机状况下研究自养微藻积累油脂的特性具有一定战略意义。通过从藻类提取油脂并经转酯交换制取生物燃料是藻类生物能源技术开发的原动力^[16]。

利用荧光显微镜观测手段, 在暗视野下通过荧光染色反应可观测到微藻胞内贮存的油脂。试验后期 (54 d 后) 在高光照强度下培养 3 周后, 通过暗视野观测尼罗红染色后的微藻荧光生物相, 发现生物相中出现大量的金黄色荧光点 (如图 1 所示), 这便

是微藻胞内的油脂。

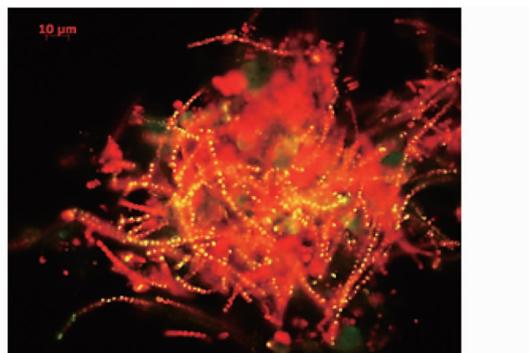


图 1 暗视野下微藻的荧光镜检图片

Fig. 1 Microalgae fluorescent image in dark field

由之前的试验结果^[1-2]可知, 在光/暗交替环境下, 光照起始阶段进水能显著提高微藻中的油脂含量, 将碳固定与氮摄入步骤分离, 油脂含量最高可达 49.2%^[2]。但在本次试验中, 增加光照强度后, 所有反应器中微藻的油脂含量呈现下降趋势, 1 ~ 4 号反应器中微藻的油脂含量长期低于 20%、甚至不足 10%, 只有 5、6 号反应器中微藻的油脂含量较高 (>20%), 如图 2 所示。

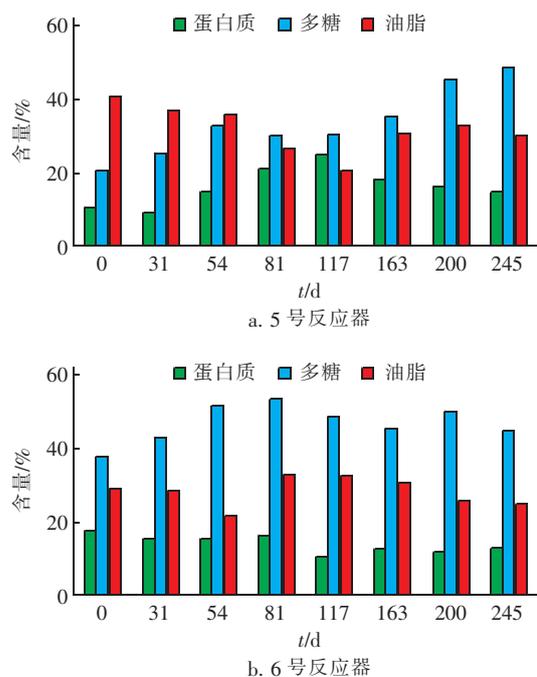


图 2 5 号和 6 号反应器内微藻蛋白质、多糖和油脂含量的变化

Fig. 2 Change of protein, polysaccharide and lipids contents of microalgae in reactors 5 and 6

由图 2(a) 可知, 5 号反应器内增加光照强度后油脂含量呈现持续下降趋势, 表现出对强光刺激的

不耐受性。在第 117 天时油脂含量降至最低值即 20.1%，后续虽略有上升，但并未达到预想值。同时可以发现，微藻的油脂含量随环境变化处于动态变化中，即具有非持续性；虽然增大光照强度可以刺激少数微藻的油脂积累，但对系统总体的油脂刺激效果不佳，即使在试验后期微藻适应了高光照强度环境后，也并未恢复到最初的高产水平。与 5 号反应器截然不同，6 号反应器中高光照强度对油脂的积累具有积极作用，如图 2(b) 所示，在高光照强度的刺激下，在 81 d 后便达到 33% 的峰值，后期虽略有下降，但也保持在 25% 左右。5 号和 6 号反应器出现差异性结果可能与进水方式的不同有关，从而导致了反应器中微藻代谢途径的改变。此外，图 2 中油脂和糖类物质的相对变化并无显著相关性，由此可认为微藻在合成糖类物质和油脂时并不存在底物竞争关系^[17]。结合图 3 中 5 号和 6 号反应器内微藻生物量及沉降率的变化可知，突然的高光照强度会导致系统内的微藻进入调整适应期，微藻的代谢及生理活动波动较大、系统生物量锐减、微藻沉降率降低，说明微藻对高光照强度的适应性较差。因此，在适应期微藻生长代谢受到严重干扰，阻碍了油脂含量进一步升高，甚至会消耗微藻自身的能量储备。

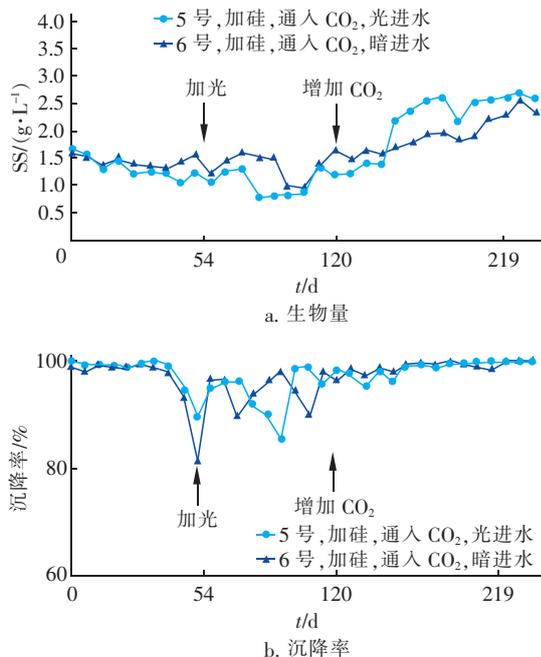


图3 5号和6号反应器内微藻生物量与沉降率的变化
Fig.3 Change of biomass and settling rate of microalgae in reactors 5 and 6

目前为增加微藻油脂积累而普遍采取的策略有：生长受限（营养饥饿）、增大光照强度（提供过剩能量）、增加无机碳源（CO₂）等^[18-19]。尽管在本试验中也采取了类似的措施，但由于可沉微藻对高光照强度的生长适应作用，导致微藻生物量的骤减和沉降性能的恶化，最终油脂含量不升反降。微藻胞内油脂的积累取决于自身生长速率和生物量中的脂类含量，若处于生长受限（N 或 P 饥饿）环境中，确实可以引导微藻向积累油脂代谢方向转变，但同时也限制了微藻的自身生长。所以，高脂和高产两者所需环境因素可能是相斥的，即不可兼得^[18]。两者之间存在一种权衡，高脂需要较低的养分含量，而高产则需要较高的养分含量，两者之间难以实现平衡。

此外，微藻颗粒在系统中的沉降特性近似符合斯托克斯沉降定律，即微藻自身属性影响其沉降性能，如生物密度、生物体积和其他环境因素（如水的黏度）等^[19]。微藻中脂类物质的增加意味着相对密度的降低，可提高自身浮力，导致沉降性能的恶化。高油脂产量的微藻因此可被“冲刷”系统所淘汰。可见，可沉微藻的油脂含量可能存在一个“天花板”，初始筛选条件是可沉微藻进一步提升油脂含量的根本限制。

2.2 PHB 合成试验

上述油脂潜力试验显示，利用微藻生产油脂可能存在一个上限，即所谓的“天花板”，目前油脂含量难以突破 50% 的限制，在此情况下，考察另外一种潜在聚合物——PHB 似乎显得非常有必要，以扩大微藻的资源化路径。

前期试验结果表明^[2]，1、2 号反应器在不通入 CO₂ 且高 pH 值环境下可富集可沉蓝藻。而蓝藻可以合成、积累 PHB^[5-6]。若可沉蓝藻聚积的 PHB 达到可观含量，提取 PHB 亦具有经济与环境效益。为此，后期启动可沉蓝藻合成 PHB 试验。在 1、2 号反应器内添加特异性碳源（8 mg/L 的乙酸钠）后，两反应器内 PHB 含量的变化如图 4 所示。初始阶段两反应器内的 PHB 含量均很低，分别为 3.4% 和 4.9%，至第 5 天均达到峰值，分别为 27.9% 和 30.2%，然后开始下降，这可能是微藻内源代谢消耗所致，PHB 被转变为其他含碳有机物。根据峰值 PHB 含量和生物量的变化结果，由 PHB 生产力计算公式（PHB 产量 = PHB 含量 × 生物量）得到可沉微藻在最优条件下的 PHB 产量为 14 mg/(L·d)。

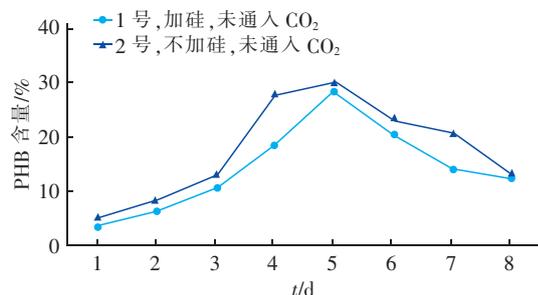


图4 1号和2号反应器中微藻 PHB 含量的变化

Fig. 4 Change of PHB content of microalgae in reactors 1 and 2

1、2号反应器内叶绿素 a 含量的变化见图 5。前 5 d 叶绿素 a 含量总体呈上升趋势,即微藻的光合作用随 PHB 含量的增加同样得到了增强,推测特异性碳源强化了微藻的某些代谢作用,同时积累 PHB 为代谢内聚物。微藻的生物量变化见图 6。可知,3 d 后生物量开始明显增加,至第 8 天分别达到 3.61 和 3.82 g/L。这与其他人的研究结果^[6,20]类似,微藻在吸收特异性碳源后导致 PHB 累积,可能是因为内部代谢过程中乙酰辅酶 A 和还原型辅酶 (NADPH) 可用性增强,提高了细胞固碳能力,促进了代谢反应向以 PHB 为内聚物的方向转变^[21]。

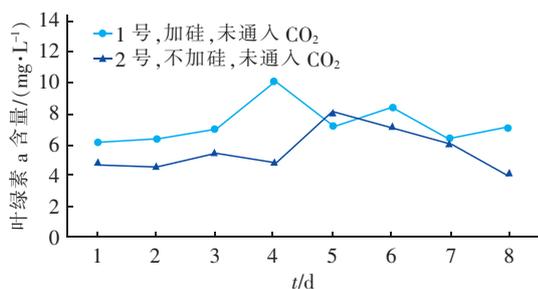


图5 1号和2号反应器中微藻叶绿素 a 含量的变化

Fig. 5 Change of Chl-a content of microalgae in reactors 1 and 2

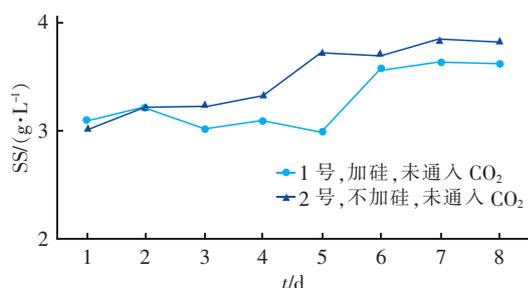


图6 1号和2号反应器中微藻生物量的变化

Fig. 6 Change of microalgae biomass in reactors 1 and 2

上述初步试验结果显示,当加入少量特异性碳源刺激后,系统中可沉蓝藻在一定时间内确实可以合成、富积相当含量的 PHB,最高可达到 30% 左右,远远高于正常情况下活性污泥富集 PHB 的峰值 (15%)^[22]。因此,后续有必要进一步开展对微藻合成 PHB 的试验研究。

3 结论

试图以增加光照强度与 CO₂ 通入量的方式进一步提高可沉微藻油脂含量的做法事与愿违,反而出现油脂含量下降的现象。这表明,可沉微藻油脂含量可能存在一个上限,即所谓的“天花板”,现有技术手段难以突破 50% 的油脂含量。而可沉蓝藻具有相当的合成、积累 PHB 的能力,在少许特异性碳源 (乙酸盐) 的刺激作用下,可沉蓝藻的 PHB 含量可达到 30% 左右,高于活性污泥代谢有机碳源时合成 PHB 的能力,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 郝晓地,吴宇涵,胡沅胜. CO₂ 对可沉微藻油脂含量的影响[J]. 中国给水排水,2018,34(11):1-5.
Hao Xiaodi, Wu Yuhuan, Hu Yuansheng. Effect of CO₂ addition on increasing lipid content contained in settleable microalgae[J]. China Water & Wastewater, 2018, 34(11):1-5 (in Chinese).
- [2] 吴宇涵. CO₂, 进水, 光促可沉藻产油脂实验研究[D]. 北京:北京建筑大学,2018.
Wu Yuhuan. Experimental Study on the Production of Oil by CO₂, Feeding Mode and Light Promoting Settleable Algae [D]. Beijing: Beijing University of Civil Engineering and Architecture, 2018 (in Chinese).
- [3] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. Plant Journal, 2008, 54(4):621-639.
- [4] He Q, Yang H, Wu L, et al. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae [J]. Bioresour Technol, 2015, 191(9):219-228.
- [5] Balaji S, Gopi K, Muthuvelan B. A review on production of poly-β-hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio-plastics[J]. Algal Res, 2013, 2(3):278-285.
- [6] Troschl C, Meixner K, Drosch B. Cyanobacterial PHA production—review of recent advances and a summary of

- three years' working experience running a pilot plant [J]. Bioengineering, 2017. DOI: 10. 3390/bioengineering4020026.
- [7] Miyake M, Erata M, Asada Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate [J]. J Ferment Bioeng, 1996, 82(5) : 512 - 514.
- [8] 郝晓地, 王欣, 罗玉琪, 等. 可沉微藻对室外光照强度的适应性试验研究 [J]. 中国给水排水, 2020, 36(5) : 20 - 25.
Hao Xiaodi, Wang Xin, Luo Yuqi, et al. Adaptation of settleable microalgae to outdoor natural light intensity [J]. China Water & Wastewater, 2020, 36(5) : 20 - 25 (in Chinese).
- [9] Panda B, Mallick N. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 44(2) : 194 - 198.
- [10] Craggs R J, Lundquist T, Benemann J. Wastewater Treatment Pond Algal Production for Biofuel [M]. Dordrecht: Springer, 2012.
- [11] Pruvost J, van Vooren G, Le Gouic B, et al. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application [J]. Bioresour Technol, 2011, 102(1) : 150 - 158.
- [12] Song M, Pei H, Hu W, et al. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production [J]. Bioresour Technol, 2013, 141(4) : 245 - 251.
- [13] 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]. Bioresour Technol, 2013, 144: 268 - 274.
- [14] Eltgroth M L, Watwood R L, Wolfe G V. Production and cellular localization of neutral long chain lipids in the haptophyte algae *isochrysis galbana* and *emiliania huxleyi* [J]. J Phycol, 2005, 41(5) : 1000 - 1009.
- [15] Rahman A, Putman R J, Inan K, et al. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae based media [J]. Algal Res, 2015, 8: 95 - 98.
- [16] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications; A review [J]. Renew Sust Energ Rev, 2010, 14(1) : 217 - 232.
- [17] Siaux M, Cuiné S, Cagnon C, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves [J]. BMC Biotechnol, 2011, 11: 7.
- [18] Li Y, Han D, Hu G, et al. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 107(2) : 258 - 268.
- [19] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
Chen Feng, Jiang Yue. Microalgae Biotechnology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese).
- [20] Tabandeh F, Vasheghani-Farahani E. Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate as a biodegradable polymer [J]. Iran Polym J, 2003, 12: 37 - 42.
- [21] Khetkorn W, Incharoensakdi A, Lindblad P, et al. Enhancement of poly- β -hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes [J]. Bioresour Technol, 2016, 214: 761 - 768.
- [22] Yuan Q, Sparling R, Oleszkiewicz J. Polyhydroxybutyrate production from municipal wastewater activated sludge with different carbon sources [J]. Air, Soil and Water Research, 2015, 8: 53 - 58.



作者简介: 郝晓地 (1960 -), 男, 山西柳林人, 教授, 从事市政与环境工程专业教学与科研工作, 主要研究方向为污水生物脱氮除磷技术、污水处理数学模拟技术、可持续环境生物技术。现为国际水协期刊《Water Research》区域主编 (Editor)。

E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

收稿日期: 2019 - 12 - 10