

藻-菌混合培养及添加 NaHCO_3 促进 栅藻生长和脂类合成

王雪晴^{1,2}, 邢向英^{1,2}, 董庆霖^{1,2}, 燕然^{1,2}, 李文娜^{1,2}

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300130; 2. 河北工业大学代谢工程实验室, 天津 300130)

摘要:研究了藻-菌混合培养(M)、添加 NaHCO_3 培养(C)以及二者的结合培养(MC)对栅藻生长和脂类合成的影响。将从栅藻培养液中分离的4种微生物与栅藻进行混合培养,筛选出对栅藻生长促进效果最佳的细菌 B_1 ,并确定栅藻与 B_1 的最佳接种比例;确定添加 NaHCO_3 培养的最佳 NaHCO_3 质量浓度;按照确定的最佳参数进行M、C和MC实验,测定每种培养方式的生长指标和脂质合成指标,并与栅藻单独培养进行对比分析。结果表明:与栅藻单独培养相比,M、C和MC的生物量分别提高了68.3%、98.8%、195.1%,脂类含量提高35.6%、41.6%、50.4%,脂肪酸组成中的C18:1总含量提高了17.0%、30.9%、47.4%。因此,MC比M和C更高效,是一种有潜在应用价值的生物柴油原料生产模式。

关键词:藻-菌混合培养;栅藻;生长;脂类合成;生物柴油

中图分类号:Q939.9;X52

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)08-0096-07

Acceleration of growth and lipid synthesis of *Scenedesmus obliquus* by algae - bacteria mixed culture and supplement of NaHCO_3

WANG Xueqing^{1,2}, XING Xiangying^{1,2}, DONG Qinglin^{1,2},
YAN Ran^{1,2}, LI Wenna^{1,2}

(1. College of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

2. Metabolic Engineering Laboratory, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: The effects of algae - bacteria mixed culture (M), supplement of NaHCO_3 culture (C), and the combination of both (MC) on the growth and lipid synthesis of *Scenedesmus obliquus* were studied. Four microorganisms separated from algae broth were mixed cultured with *S. obliquus*, then the best bacterial B_1 for promoting growth of *S. obliquus* was selected and the optimal inoculation ratio was determined; the optimal NaHCO_3 mass concentration in supplement of NaHCO_3 culture was determined; then the M, C and MC experiments were carried out, the growth indexes and lipid synthesis indexes of the culture methods were determined and compared with individual culture. The results showed that compared with the individual culture, the biomasses and lipid contents of *S. obliquus* by M, C and MC increased by 68.3%, 98.8%, 195.1% and 35.6%, 41.6%, 50.4%, respectively; and the C18:1 contents in the lipid increased by 17.0%, 30.9% and 47.4%, respectively. Therefore, MC was more efficient than M and C, and MC had potential application value as a biodiesel raw material production mode.

Key words: algae - bacteria mixed culture; *Scenedesmus obliquus*; growth; lipid synthesis; biodiesel

收稿日期:2019-12-16;修回日期:2020-01-10

基金项目:河北省自然科学基金项目(B2008000029)

作者简介:王雪晴(1993),女,在读硕士,研究方向为生物能源(E-mail) wangxueqing9735@163.com。

通信作者:董庆霖,教授,博士(E-mail) qldong@hebut.edu.cn。

微藻生长速率快^[1],易于培养,脂类含量高^[2],是生产生物柴油的主要原料^[3-5]。然而,与化石燃料相比,生物柴油的生产成本仍然较高,无法实现可

持续的商业化生产^[6-8]。因此,如何提高微藻产量和脂类含量是生物柴油原料生产的关键问题。

为解决上述问题,两种藻类光合自养培养技术成为目前研究的热点:一是藻-菌混合(共生)培养^[9-10],即将藻类与细菌/真菌在同一反应体系中进行培养,使二者产生类似自然界的藻-菌共生协同效应(如地衣),此体系中细菌^[11-13]/真菌^[14-15]吸收藻类光合作用过程中释放的氧气,解除氧对光合作用的抑制,并释放CO₂促进藻类的光合作用从而促进藻类的生长和脂类合成,并且部分微生物还能够分泌其他的胞外产物刺激藻类生长^[16-17];二是补充无机碳源,即通入CO₂或添加NaHCO₃,提高藻类培养液中的CO₂浓度,促进藻类的光合作用进而提高藻类的生物量和脂类含量^[18-19]。由于CO₂在培养液中的气-液传质效率低,大部分通入的CO₂不能被藻细胞吸收利用而导致浪费和生产成本上升^[20-21],因而通入CO₂的藻类培养技术无法在工业上应用。与CO₂相比,NaHCO₃在培养液中相对稳定,其解离产生的HCO₃⁻易于被藻细胞吸收而参与光合作用^[22],因此在藻类培养过程中添加NaHCO₃比通入CO₂的效率高,成本低。并且可以将用NaOH回收工业废气中CO₂产生的NaHCO₃/Na₂CO₃直接用于培养藻类^[23-25],进一步降低藻类的生产成本。

虽然上述两种藻类培养技术具有显著的优势,但仍然存在不足:①藻-菌混合培养过程中,微生物释放CO₂是以代谢藻类分泌的胞外产物为基础的,因此数量有限,不足以满足藻类光合作用的需求,限制了藻细胞生长速率的进一步提高;②添加NaHCO₃导致培养液pH大幅度上升,不利于藻类的生长和对HCO₃⁻的高效吸收。但将这两种培养技术结合实验,理论上可以克服其不足,从而进一步提高藻类的生长速率和脂类产量。因此,本实验分离筛选出促进栅藻生长的最佳微生物——细菌B₁,并确定了栅藻与细菌B₁的最佳接种比例和培养栅藻的最佳NaHCO₃质量浓度,在此基础上研究藻-菌混合培养、添加NaHCO₃培养和二者结合培养对栅藻生长与脂类合成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种及培养基

栅藻(*Scenedesmus obliquus*)培养液(含杂菌)购自中科院武汉水生生物研究所。

1.5N-BBM培养基:NaNO₃ 375 mg/L, KH₂PO₄

175 mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 75 mg/L, K₂HPO₄ 75 mg/L, EDTANa₂ 50 mg/L, KOH 31 mg/L, NaCl 25 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 25 mg/L, H₃BO₃ 11.4 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 8.82 mg/L, MnCl₂ · 4H₂O 1.44 mg/L, Na₂MoO₄ 1.79 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 1.57 mg/L, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.49 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 4.98 mg/L, H₂SO₄ 1 mL/L。

LB培养基:酵母膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂 18 g/L。

PDA培养基:马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 18 g/L。

1.1.2 仪器与设备

GXZ-300D光照培养箱, HZQ-QG全温振荡器, 723N可见分光光度计, LRH-150S恒温恒湿培养箱, XSZ-H光学显微镜, LG16-B台式高速离心机, JY96-II超声波细胞粉碎机, YX280加压灭菌锅, DH-101-0S电热恒温鼓风干燥箱。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌栅藻的制备

在100 mL栅藻培养液中加入15 μL硫酸卡霉素(90 μg/mL)与80 μL硫酸庆大霉素(90 μg/mL), 置于光照培养箱内培养3 d(温度25℃, 光照强度60 μmol/(m² · s))。离心收集藻细胞(8 500 r/min, 10 min), 将藻细胞用无菌水稀释至10⁻⁴, 涂布在添加2%葡萄糖的BBM固体培养基(NaNO₃质量浓度250 mg/L), 置于光照培养箱培养5 d(温度25℃, 光照强度60 μmol/(m² · s))。将生长出的单藻落转接至BBM液体培养基内培养制备成种子培养液。

1.2.2 栅藻共生微生物的分离与种类确定

栅藻的共生微生物通过稀释涂布法分离。取0.5 mL栅藻培养液稀释至10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵, 分别涂布在添加2%葡萄糖的BBM固体培养基, 置于光照培养箱培养5 d(温度25℃, 光照强度60 μmol/(m² · s)), 根据菌落不同的形态特征挑选单菌落, 分别转接至LB或PDA培养基内培养。将分离得到的微生物进行显微镜观察与革兰氏染色, 确定微生物种类。

1.2.3 促进栅藻生长微生物的筛选

在装有100 mL 1.5N-BBM培养基的锥形瓶中分别接入10 mL无菌栅藻(1.15 × 10⁷ 个/mL)和1接种环1.2.2分离的菌体, 置于光照培养箱内培养10 d(温度25℃, 光照强度60 μmol/(m² · s)), 测定生物量和脂类含量。

1.2.4 藻-菌混合培养(M)

细菌接种液的制备:将筛选的细菌接种至LB

培养基内,置于恒温摇床培养 3 d(温度 25 °C,摇床速度 120 r/min),细菌发酵液细胞浓度约为 2×10^8 个/mL。取 4 mL 细菌发酵液于 8 500 r/min 离心 10 min,收集细胞,用无菌水洗涤 2 次,稀释,制备细菌接种液(1×10^8 个/mL)。

混合培养:在 100 mL 1.5N - BBM 培养基内加入 10 mL 无菌栅藻(2.5×10^7 个/mL)及不同体积细菌接种液,使接种比例(藻菌细胞浓度比)达到 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,置于光照培养箱内培养 10 d(温度 25 °C,光照强度 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),测定生物量和脂类含量。

1.2.5 添加 NaHCO_3 培养栅藻(C)

在 100 mL 1.5N - BBM 培养基中加入 10 mL 无菌栅藻(2.5×10^7 个/mL)与不同体积 NaHCO_3 溶液(10 g/L,无菌过滤),使培养液中 NaHCO_3 质量浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L,置于光照培养箱内培养 10 d(温度 25 °C,光照强度 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),测定生物量和脂类含量。

1.2.6 添加 NaHCO_3 的藻 - 菌混合培养(MC)

按 1.2.4、1.2.5 确定的藻菌最佳接种比例和 NaHCO_3 质量浓度进行添加 NaHCO_3 的藻 - 菌混合培养(MC),以栅藻单独培养(CK)、藻 - 菌混合培养(M)、添加 NaHCO_3 培养(C)3 种培养方式为对照,置于光照培养箱内培养 16 d(温度 25 °C,光照强度 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),测定不同培养方式下的生物量和脂类含量。

1.2.7 反应参数测定

1.2.7.1 生物量及细胞生长动力学参数

栅藻生物量(细胞干重,DCW)参照 Dong 等^[13]的方法测定。

细胞生长动力学参数参照文献[26 - 27]按下式计算。

$$\text{比生长速率} = \frac{\ln X_n - \ln X_0}{t_n - t_0} \quad (1)$$

$$\text{生长速率} = \frac{X_n - X_0}{t_n - t_0} \quad (2)$$

式中: X_n 与 X_0 分别为时间 t_n 与 t_0 时的生物量。

1.2.7.2 培养液中硝态氮浓度

硝态氮浓度按 Hecht 等^[28]的方法分析测定。

1.2.7.3 培养液 pH

取 5 mL 栅藻培养液,离心,取上清液用 pH 计测定。

1.2.7.4 脂类含量、合成动力学参数及脂肪酸组成
脂类含量的测定参照文献[26]方法按下式计算。

$$\text{脂类含量} = \frac{G_L}{VX} \quad (3)$$

式中: G_L 为总脂量; V 为藻液体积, X 为细胞浓度(生物量)。

脂类合成动力学参数参照文献[26 - 27]按下式计算。

$$\text{合成速率} = \frac{X_n G_n - X_0 G_0}{t_n - t_0} \quad (4)$$

$$\text{比合成速率} = \frac{r}{X_n} \quad (5)$$

式中: X_0 、 X_n 与 G_0 、 G_n 分别为 t_0 与 t_n 时的生物量与脂类含量; r 为脂类合成速率。

脂类脂肪酸组成参照文献[26]方法进行分析。

2 结果与讨论

2.1 无菌栅藻

按照 1.2.1 方法制备无菌栅藻,发现经抗生素处理后稀释的栅藻在平板上形成了无菌的单藻落(见图 1)。用接种环将单藻转接至 BBM 液体培养基中培养得无菌栅藻种子培养液用于后续实验。

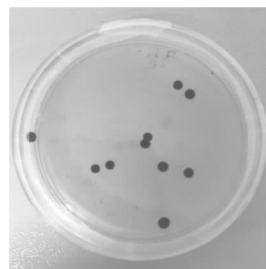
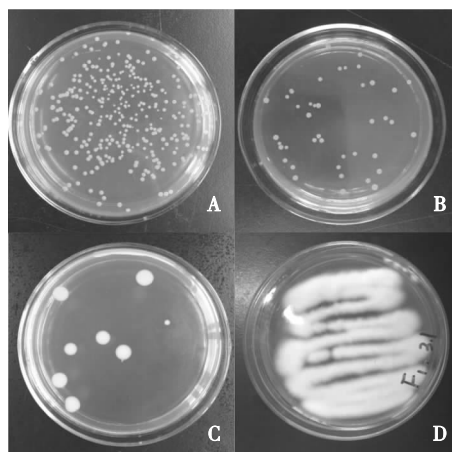


图 1 栅藻在平板上形成的藻落

2.2 栅藻的共生微生物

按照 1.2.2 分离栅藻的共生微生物,得到 4 种微生物,其在平板上形成的菌落见图 2。



注:A.黄色菌(B_1);B.红色菌(B_2);C.白色菌(B_3);D.白色菌(F_1)。

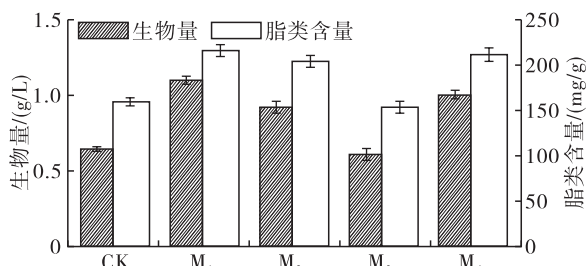
图 2 4 种微生物在平板上形成的菌落

由图 2 可看出,分离得到的 4 种微生物中 A、B

和C平板菌落为球形,表面及边缘光滑,呈现黄色、红色和白色。显微镜观察和革兰氏染色结果表明: B_1 、 B_2 和 B_3 细胞呈球状,直径 $1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$,革兰氏染色分别为阴性、阳性和阴性,故 B_1 、 B_2 、 B_3 属于细菌。D平板的菌落为疏松的毛绒状,营养菌丝为白色毛绒状,直径为 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$,孢子囊自孢子梗生出,因此 F_1 属于真菌。将分离的4种微生物分别制备斜面菌种保存。

2.3 促进栅藻生长的微生物

按1.2.3方法将得到的4种微生物接种至无菌栅藻中培养,测定栅藻与不同微生物混合培养的生物量和脂类含量,结果见图3。



注:CK. 栅藻单独培养;M₁. 栅藻与 B_1 混合培养;M₂. 栅藻与 B_2 混合培养;M₃. 栅藻与 B_3 混合培养;M₄. 栅藻与 F_1 混合培养。

图3 栅藻与不同微生物混合培养的生物量和脂类含量

由图3可知,实验结束时 M_1 、 M_4 和 M_2 的生物量与脂类含量均高于CK (0.64 g/L , 158.4 mg/g),生物量分别达到 1.1 、 1.0 、 0.92 g/L ,脂类含量分别为 215.6 、 211.2 、 203.4 mg/g ,而 M_3 的生物量与脂类含量 (0.61 g/L , 153.6 mg/g) 则低于CK,说明细菌 B_3 对栅藻的生长有抑制作用,而细菌 B_1 、真菌 F_1 和细菌 B_2 则能促进栅藻的生长。其中细菌 B_1 对栅藻生长的促进效果最显著,因此将细菌 B_1 作为促进栅藻生长的最佳微生物用于进一步的实验。

2.4 栅藻与细菌 B_1 混合培养的最佳接种比例

按照1.2.4方法考察栅藻与细菌 B_1 不同接种比例混合培养的生物量和脂类含量,结果见图4。

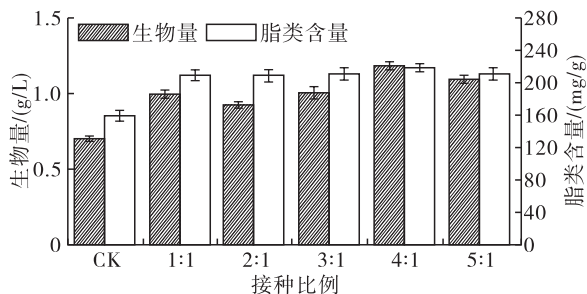


图4 栅藻与细菌 B_1 不同接种比例混合培养的生物量和脂类含量

由图4可知:栅藻与细菌 B_1 接种比例为4:1

时,栅藻生物量与脂类含量分别达到最高值 (1.38 g/L , 217.1 mg/g),较栅藻单独培养(CK)的生物量 (0.7 g/L) 与脂类含量 (158.3 mg/g) 分别提高了 68.6% 、 37.1% 。因此,后续实验中均以栅藻与细菌 B_1 的最佳接种比例4:1进行实验。

2.5 促进栅藻生长的最佳 NaHCO_3 质量浓度

按照1.2.5方法考察栅藻在不同 NaHCO_3 质量浓度条件下的生物量和脂类含量,结果见图5。

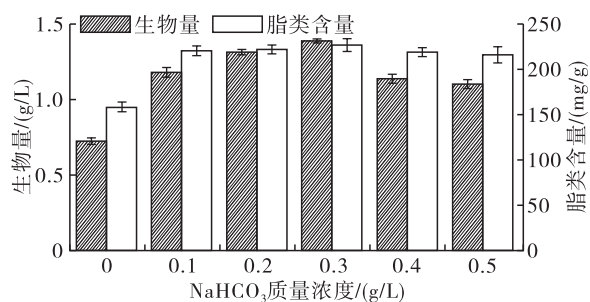
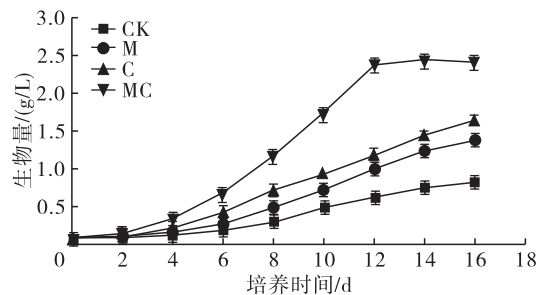


图5 栅藻在不同 NaHCO_3 质量浓度条件下的生物量和脂类含量

由图5可知,与栅藻单独培养 (0.72 g/L , 156.8 mg/g) 相比, NaHCO_3 质量浓度为 0.3 g/L 时栅藻的生物量与脂类含量均达到最大值 (1.38 g/L , 225.1 mg/g),分别提高 91.7% 和 43.6% ,因此添加 NaHCO_3 培养栅藻的最佳 NaHCO_3 质量浓度为 0.3 g/L ,后续实验中 NaHCO_3 的添加量按此质量浓度进行。

2.6 不同培养方式下反应参数的比较

2.6.1 生物量及生长动力学参数(见图6、表1)



注:CK. 栅藻单独培养;M. 栅藻与 B_1 以接种比例4:1混合培养;C. 添加 0.3 g/L NaHCO_3 培养栅藻;MC. 0.3 g/L NaHCO_3 条件下,栅藻与 B_1 以接种比例4:1混合培养。下同。

图6 不同培养方式下栅藻的生长曲线

由图6可知:CK的生物量初期增长较为缓慢,8d后上升速度加快,14d后趋于稳定,最终达到 0.82 g/L ;M和C的生物量分别从6d和4d开始快速上升,培养结束时分别达到 1.38 g/L 和 1.63 g/L ;MC的生物量则在3d即开始迅速上升,至12d时趋于稳定,培养结束时达到 2.42 g/L 。与CK相比,M、C

和 MC 的生物量分别提高了 68.3%、98.8% 和 195.1%。

表 1 不同培养方式下的细胞生长动力学参数

培养方式	平均比生长速率/ d^{-1}	平均生长速率/ $(mg/(L \cdot d))$
CK	0.15 ± 0.02	46.9 ± 2.6
M	0.18 ± 0.03	81.2 ± 3.2
C	0.19 ± 0.02	97.4 ± 3.7
MC	0.22 ± 0.03	146.3 ± 5.3

由表 1 可知,与栅藻单独培养相比,M、C 和 MC 平均比生长速率分别提高了 20.0%、26.7% 和 46.7%,平均生长速率分别提高 73.1%、107.7% 和 211.9%。其中,M 促进栅藻生长的机理可能与其他光合自养条件下藻-菌混合培养^[29-32]的机理相似,即栅藻光合作用释放的氧气和胞外有机物被细菌吸收代谢后,解除了高浓度氧对栅藻光合作用的抑制并释放出 CO_2 促进了光合作用。而 C 促进栅藻生长的原因显然是提高了反应体系内 CO_2 的浓度,进而提高了光合作用效率。MC 比 M 和 C 更能促进栅藻的细胞生长是由于提高了栅藻对 $NaHCO_3$ 的吸收。

2.6.2 培养液中硝态氮质量浓度(见图 7)

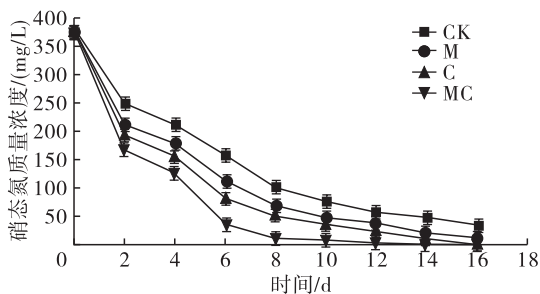


图 7 不同培养方式下培养液中硝态氮质量浓度变化曲线

由图 7 可知,不同栅藻培养液的硝态氮质量浓度在 0~2 d 均快速下降,这可能与实验过程中的锥形瓶瓶壁吸附或硝态氮快速进入细胞但未被利用有关。2~4 d 硝态氮质量浓度下降缓慢,4 d 开始快速下降,其中 MC 的下降速率最快,至 12 d 降为 0,实验结束时 M 和 C 的硝态氮质量浓度分别为 11.8 mg/L 和 0.1 mg/L,CK 中硝态氮的下降速率最慢,实验结束时的质量浓度仍然较高,达到 33.2 mg/L。MC 的硝态氮质量浓度下降速率比 M 和 C 以及 CK 的快,说明 MC 较 M 和 C 促进了栅藻对 $NaNO_3$ 的吸收和利用。

2.6.3 培养液 pH(见图 8)

由图 8 可知,CK 和 M 的 pH 由初始值 6.2 缓慢上升,10 d 后 M 的 pH 趋于平稳,而 CK 的 pH 继续升高,实验结束时 CK 和 M 的 pH 分别达到 8.45 和

8.14,整个培养过程中 M 的 pH 始终比 CK 的低。C 和 MC 由于添加了 $NaHCO_3$,其 pH 初始值较高,培养过程中 C 的 pH 由初始 8.2 迅速升高至 9.9 后开始逐渐下降,最终稳定在 8.6;MC 的 pH 在 4 d 时升高至 10.1 后趋于稳定,8 d 后开始缓慢下降,培养结束时达到 8.91。藻类光合自养培养过程中,由于藻细胞对生理碱性盐的吸收,导致培养液 pH 上升。CK 的 pH 缓慢上升主要是由于栅藻对 $NaNO_3$ 的吸收所致,而 M 的 pH 低于 CK 的 pH 可能是由于细菌 B_1 释放的 CO_2 和分泌的酸性胞外产物造成的。相比之下,C 和 MC 的 pH 上升是由于栅藻对 $NaNO_3$ 和 $NaHCO_3$ 的吸收导致的,而整个培养过程中 MC 的 pH 始终高于 C 的 pH,说明 MC 比 C 促进了 $NaHCO_3$ 的吸收和利用。

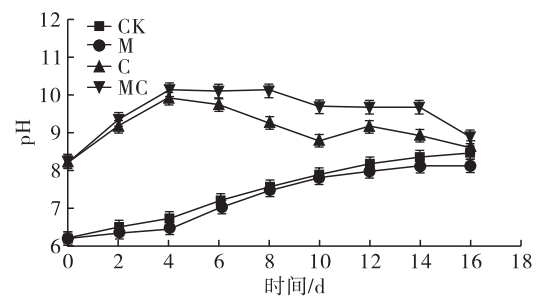


图 8 不同培养方式下培养液 pH 变化曲线

2.6.4 栅藻脂类含量(见表 2)

表 2 不同培养方式下的栅藻脂类含量、合成速率和比合成速率

培养方式	脂类含量/ (mg/g)	合成速率/ $(mg/(L \cdot d))$	比合成速率/ $(mg/(g \cdot d))$
CK	162.5 ± 4.8	0.81 ± 0.12	0.99 ± 0.03
M	220.4 ± 5.2	1.89 ± 0.18	1.36 ± 0.07
C	230.1 ± 3.7	2.34 ± 0.21	1.44 ± 0.05
MC	244.4 ± 4.2	3.68 ± 0.11	1.53 ± 0.04

由表 2 可知,与 CK 相比,M、C、MC 体系栅藻的脂类含量,分别提高了 35.6%、41.6%、50.4%,脂类合成速率分别提高了 133%、189%、354%,脂类比合成速率分别提高了 37.4%、45.5%、54.5%。与 CK 相比,M 和 C 均能提高反应体系的 C/N,MC 的 $NaNO_3$ 质量浓度比 M 和 C 的低,具有更高的 C/N,因而更有利于细胞内碳代谢通量流向脂类合成方向,促进了脂类的合成^[33]。MC 在 12 d 时的 $NaNO_3$ 质量浓度已降为 0,使藻细胞提前进入“氮饥饿”状态,而高 C/N 和“氮饥饿”均能促进藻类脂类合成^[33-35]。

2.6.5 栅藻脂类的脂肪酸组成(见表 3)

由表 3 可知,栅藻在不同培养方式下的脂类脂肪酸组成基本相同,碳原子数介于 14~22 之间,其

中 C16:0、C18:1 和 C18:2 含量较高。与 CK 相比, M、C、MC C16:0 含量分别提高 20.4%、27.9%、38.3%, C18:1 含量分别提高了 17.0%、30.9%、47.4%, C18:2 含量提高了 7.1%、14.7%、20.5%。

表3 不同培养方式下栅藻的脂肪酸组成及含量 %

脂肪酸	CK	M	C	MC
C14:0	2.58 ± 0.11	2.24 ± 0.10	1.67 ± 0.09	1.47 ± 0.08
C16:0	17.64 ± 1.14	21.24 ± 1.21	22.56 ± 1.33	24.39 ± 1.17
C16:1	7.31 ± 0.48	7.08 ± 0.37	6.27 ± 0.31	4.45 ± 0.22
C16:2	5.83 ± 0.17	5.74 ± 0.13	5.57 ± 0.11	4.93 ± 0.14
C16:3	4.24 ± 0.21	4.11 ± 0.11	3.41 ± 0.13	2.58 ± 0.12
C18:0	3.01 ± 0.15	4.14 ± 0.12	4.36 ± 0.14	4.47 ± 0.17
C18:1	15.52 ± 1.03	18.16 ± 0.99	20.31 ± 1.12	22.88 ± 1.19
C18:2	16.21 ± 0.82	17.36 ± 1.03	18.59 ± 1.11	19.53 ± 1.03
C18:3	8.05 ± 0.34	6.33 ± 0.27	5.49 ± 0.16	5.24 ± 0.22
C20:0	7.89 ± 0.29	7.27 ± 0.21	7.29 ± 0.19	7.27 ± 0.23
C20:1	6.01 ± 0.16	3.49 ± 0.12	2.65 ± 0.09	1.48 ± 0.11
C22:1	5.71 ± 0.17	2.84 ± 0.09	1.83 ± 0.04	1.31 ± 0.05

3 结论

藻-菌混合培养和添加 NaHCO₃ 培养均能提高栅藻的生物量和脂类含量,而添加 NaHCO₃ 的藻-菌混合培养则进一步提高了栅藻的生物量和脂类含量以及脂类组成中 C16:0、C18:1 和 C18:2 的含量。因此,添加 NaHCO₃ 的藻-菌混合培养比单独的藻-菌混合培养和添加 NaHCO₃ 培养更能促进细胞生长和脂类合成,是一种高效的生物柴油原料生产模式。

参考文献:

[1] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 294-306.

[2] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 621-639.

[3] 王盛林,赵震宇,刘平怀. 10种热带富油微藻生物量、总脂含量及脂肪酸组成分析[J]. *中国油脂*, 2017, 42(8): 93-97.

[4] SAJJADI B, CHEN W Y, RAMAN A A A, et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: a comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2018, 97: 200-232.

[5] 涂泽敏,吴芳燕,罗剑飞,等. 产油脂微藻的分离、鉴定及筛选[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(12): 181-186.

[6] SCOTT S A, DAVEY M P, DENNIS J S, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects[J]. *Curr Opin Bio-*

tech, 2010, 21(3): 277-286.

[7] QUINN J C, DAVIS R. The potentials and challenges of algae based biofuels: a review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling[J]. *Biore-sour Technol*, 2015, 184: 444-452.

[8] MANAF I S A, EMBONG N H, KHAZAAI S N M, et al. A review for key challenges of the development of biodiesel industry[J]. *Energ Convers Manage*, 2019, 185: 508-517.

[9] MAGDOULI S, BRAR S K, BLAIS J F. Co-culture for lipid production: advances and challenges[J]. *Biomass Bioenerg*, 2016, 92: 20-30.

[10] PADMAPERUMA G, KAPOORE R V, GILMOUR D J, et al. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(5): 690-703.

[11] 卫治金,李晓,王皓楠,等. 小球藻与固氮菌 *Mesorhizobium* sp. 共培养对小球藻生长和油脂积累的促进效果[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(7): 56-64.

[12] XIE S X, SUN S, DAI S Y, et al. Efficient coagulation of microalgae in cultures with *Filamentous fungi*[J]. *Algal Res*, 2013, 2(1): 28-33.

[13] DONG Q L, ZHAO X M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*[J]. *Catal Today*, 2004, 98(4): 537-544.

[14] SINGH P, KUMARI S, GULDHE A, et al. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2016, 55: 1-16.

[15] 尚海,薛林贵,马萍,等. 小球藻藻菌共生体系在产油方面的特性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(10): 2280-2288.

[16] LEPINAY A, TURPIN V, MONDEGUER F, et al. First insight on interactions between bacteria and the marine diatom *Haslea ostrearia*: algal growth and metabolomic fingerprinting[J]. *Algal Res*, 2018, 31: 395-405.

[17] BERTHOLD D E, SHETTY K G, JAYACHANDRAN K, et al. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture[J]. *Biomass Bioenerg*, 2019, 122: 280-289.

[18] 郑洪立,高振,张齐,等. 无机碳源对小球藻自养产油脂的影响[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 436-444.

[19] LOHMAN E J, GARDNER R D, PEDERSEN T, et al. Optimized inorganic carbon regime for enhanced growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8(1): 82 [2019-12-16]. DOI:10.1186/s13068-015-0265-4.

[20] SOMERS M D, QUINN J C. Sustainability of carbon delivery to an algal biorefinery: a techno-economic and life-cycle assessment[J]. *J CO₂ Util*, 2019, 30: 193-204.

- [21] 杜奎,梁芳,耿亚洪,等.利用烟道气培养微藻的机制与应用[J].生物技术通报,2015,31(2):1-9.
- [22] CHI Z Y, O'FALLON J V, CHEN S L. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture[J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(11): 537-541.
- [23] KESAANO M, GARDNER R D, MOLL K, et al. Dissolved inorganic carbon enhanced growth, nutrient uptake, and lipid accumulation in wastewater grown microalgal biofilms[J]. Bioresour Technol, 2015, 180: 7-15.
- [24] THOMAS D M, MECHERY J, PAULOSE S V. Carbon dioxide capture strategies from flue gas using microalgae: a review[J]. Environ Sci Pollut, 2016,23(17):16926-16940.
- [25] VUPPALADADIYAM A K, YAO J G, FLORIN N, et al. Impact of flue gas compounds on microalgae and mechanisms for carbon assimilation and utilization[J]. Chem Sus Chem, 2018, 11(2): 334-355.
- [26] 董庆霖,王瑜琴,邢向英,等.共生真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 促进衣藻生长和脂类合成[J].微生物学通报,2018,45(12):2639-2647.
- [27] 董庆霖,王瑶,邢向英,等.淡紫拟青霉 TD16 促进雨生红球藻生长和油脂合成的研究[J].中国油脂,2019,44(8):102-108.
- [28] HECHT U, MOHR H. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings [J]. Physiol Plantarum, 1990, 78(3): 379-387.
- [29] WANG R M, TIAN Y, XUE S Z, et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of *Scenedesmus obliquus* and *Candida tropicalis* in an autotrophic system[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2016, 91(5): 1387-1396.
- [30] 郭琪,郑凌凌,沈伟,等.不同二氧化碳浓度培养对两株栅藻碳固定速率及油脂积累的影响[J].水生生物学报,2016,40(2):414-418.
- [31] 段露露,程蔚兰,张靖洁,等.共生菌促进斜生栅藻生长和油脂合成[J/OL].应用生态学报,2020(2):1-13 [2019-12-16]. DOI: 10.13287/j.1001-9332.202002.034.
- [32] 王倩雅,罗舒怀,张莹,等.不同初始氮浓度下尖状栅藻同化硝态氮和 CO₂ 的研究[J].植物科学学报,2017,35(4):583-591.
- [33] GARDNER R, PETERS P, PEYTON B, et al. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta[J]. J Appl Phycol, 2011, 23(6): 1005-1016.
- [34] 刘金丽,王俊峰,刘天中,等.缺氮条件对栅藻油脂积累与光合作用的影响[J].海洋科学,2013,37(7):13-19.
- [35] 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[J].中国油脂,2014,39(5):53-56.
- (上接第 75 页)
- [6] ZÜGE L C B, MEIEVES H A, SILVEIRA J L M, et al. Use of avocado phospholipids as emulsifier[J]. LWT - Food Sci Technol,2017, 79:42-51.
- [7] NI X, ZHANG Y, MUSTAFA I. An investigation of droplet size and size distribution in methylmethacrylate suspensions in a batch Oscillatory - Baffled reactor[J]. Chem Eng Sci, 1998, 53(16):2903-2919.
- [8] 孙德伟,李波,陈洪建,等.南极磷虾脂质的亚临界提取及磷脂分析[J].中国油脂,2017,42(10):1-4.
- [9] LEE P E, CHOO W S. Characterization of flaxseed oil emulsions[J]. J Food Sci Tech Mys, 2015, 52(7):4378-4386.
- [10] CAPEK I. Degradation of kinetically - stable O/W emulsions [J]. Adv Colloid Interfac, 2004, 107(2/3): 125-155.
- [11] PALAZOLO G G, SORAGENTINI D A, WAGER J R. Coalescence and flocculation in O/W emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloid, 2005, 19: 595-604.
- [12] 张维,李明远,林梅钦,等.电导率与 O/W 乳状液的稳定性[J].石油学报(石油加工),2008,24(5):592-597.
- [13] JAHANZAD F, CROMBIE G, INNES R, et al. Catastrophic phase inversion via formation of multiple emulsions: a prerequisite for formation of fine emulsions[J]. Chem Eng Res Des, 2009, 87(4):492-498.
- [14] THAKUR R K, VILLETTE C, AUBRY J M, et al. Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin - based emulsions[J]. Colloid Surface A, 2008, 315(1/2/3):285-293.
- [15] MARTI - MESTRES G, NIELLOUD F. Emulsions in health care applications—an overview[J]. J Disper Sci Technol, 2002, 23(1):419-439.
- [16] LOBTO - CALLEROS C, SOSA - PÉREZ A, RODRÍGUEZ - TAFOYA J, et al. Structural and textural characteristics of reduced - fat cheese - like products made from W₁/O/W₂ emulsions and skim milk[J]. LWT - Food Sci Technol, 2008, 41(10):1847-1856.
- [17] 刘文丽,焦纬洲,刘有智,等. W/O/W 型多重乳液的稳定性和应用研究进展[J].日用化学工业,2012(5):58-62.
- [18] 卢锦丽.食品级纯胶 O/W 乳液稳定性及流变特性研究[D].杭州:浙江工商大学,2013.
- [19] MADADLOU A, KHOSROSHAHI A, MOUSAVI M E. Rheology, microstructure, and functionality of low - fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet[J]. J Dairy Sci, 2005, 88(9):3052-3062.
- [20] PAL R. Viscosity models for multiple emulsions [J]. Food Hydrocolloid, 2008, 22(3):428-438.