

环境因子对微藻胞外多聚物主要成分的影响

吴琪璐, 崔文倩, 沈亮*, 卢英华

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 胞外多聚物 (extracellular polymeric substances, EPS) 对于微藻细胞的生长和用途具有重要的影响。以 1 株葡萄藻、1 株栅藻和 2 株小球藻为对象, 考察氮源含量改变时, 微藻 EPS 中主要组分多糖和蛋白质的变化情况。选取长势最优的葡萄藻, 研究 pH 值、温度和培养方式改变时, 其 EPS 组分变化情况。结果表明, 缺氮的生长环境会引起 EPS 中蛋白质含量的减少, 最多可减少 43%; 微藻 EPS 中最多的是胞外多糖, 占总 EPS 组分的 58.08%~89.78%, 而胞外蛋白质含量则占 5.73%~13.45%; 相比葡萄藻和栅藻, 小球藻胞外存在更多的多糖和蛋白质。对于葡萄藻, pH 值为 11 时 EPS 中多糖和蛋白质含量 (按每克细胞计) 与 pH 值为 7 时相比分别增加 0.135 和 0.018 g; 降低温度使 EPS 含量从 0.014 g 急剧增加到 0.600 g; 异养培养时 EPS 中多糖含量更高而自养培养时蛋白质含量更高。

关键词: 微藻; 胞外多聚物; 多糖; 蛋白质

中图分类号: Q 89 **文献标志码:** A

利用微藻处理污水的生态修复修复技术已经成为世界上有关于环境治理和能源发展方面最热门的研究方向之一。污水中含有大量的氮、磷等元素, 如果这些污水直接排放到水体中, 将会造成受纳水体的富营养化, 加重水质的浑浊度, 增加水中的毒性, 导致水中的生物多样性减少, 水域生态功能下降。鉴于微藻的培养需要大量的基础营养, 可以通过在污水中培养微藻来脱除污水中的营养元素, 同时从成熟的微藻中获得所需的生物质, 将其转化为生物燃料和其他有价值的副产品。然而, 利用污水培养微藻往往面临环境条件波动大、营养元素不均衡等问题。为了得到更好的污水处理效果及生物燃料生产技术, 需要进一步研究微藻的生长特性, 包括其胞外多聚物 (extracellular polymeric substances, EPS) 的成分。一般而言, EPS 是由微生物分泌到胞外的复杂混合产物, 主要包括多糖、蛋白质、脂质、核酸和其他一些高分子聚合物^[1-2]。根据空间分布, EPS 又可分可溶性 EPS (soluble EPS, S-EPS) 和

收稿日期: 2017-07-13 **录用日期:** 2017-12-28

基金项目: 国家自然科学基金 (21736009); 福建省高校自然科学基金青年重点项目 (JZ160401); 厦门市科技计划项目 (3502Z20173018)

***通信作者:** shenliang@xmu.edu.cn

结合性 EPS (bound EPS, B-EPS) [3-4]。S-EPS 主要存在于培养基质中或者轻轻附着在细胞表面, B-EPS 则紧密结合在细胞表面。

微藻的 EPS 不仅对于藻细胞本身的生长生存过程起到重要作用,而且还被应用于食品、动物饲料、生物燃料、医药和营养学等领域[5]。目前对于 EPS 成分的研究主要针对胞外多糖以及蛋白质:多糖是 EPS 中含量最高的组成部分,除个别藻细胞分泌的胞外多糖为均聚物,大部分微藻的 EPS 中含有的均为带有不同取代基的杂多糖[6];蛋白质是 EPS 的另一个重要组分,目前发现绿藻的 EPS 中多为糖蛋白[7]。不同生长时期和条件下,微藻的蛋白质在 EPS 中所占比例不同,富氮培养条件下蛋白质所占比例更高[8]。

EPS 的产生受到许多外界因素的影响。首先,培养基质的不同会对 EPS 产量产生影响,研究发现在活性污泥中醋酸盐作为碳源比葡萄糖作为碳源产生更多的 EPS[9]。其次,微生物的兼养、自养和异养间的变化对 EPS 也会产生影响,从兼养变为异养会给微生物带来压力,从而产生更多 EPS[10]。再者,不同的营养元素含量也会产生很大影响,如:在污水中生长的微藻受到氮、磷等营养元素含量的影响,当氮和磷含量都低于标准液体培养基的含量时,藻细胞会产生大量 EPS[11];活性污泥产生的 EPS 则随着环境中碳氮比的降低,其蛋白质和多糖的比例升高[12]。此外,还有一些其他外在条件影响微藻 EPS 的分泌,其中常见的是一些有毒成分,如重金属元素的存在会加剧微藻 EPS 的分泌[13]。

EPS 在细胞的生长、聚集和生物膜形成等方面发挥很重要的作用。EPS 的存在会影响微藻的絮凝,这在微藻污水处理后收集藻细胞中起到关键作用。本研究选择 4 种常见的淡水微藻作为研究对象,分别考察氮源含量、pH 值、温度和培养方式对 EPS 成分和含量的影响,以期获得更多微藻对于环境的适应性生长条件,为微藻污水处理应用和藻细胞收集提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中使用的微藻包括葡萄藻 (*Botryococcus* sp. NJD-1)、栅藻 (*Scenedesmus* sp. NJD-5)、小球藻 A (*Chlorella* sp. NJD-3) 以及小球藻 B (*Chlorella* sp. NJD-10), 由本课题组从本地一家污水处理厂污水环境中分离得到,均属于绿藻。

1.2 绿藻的培养

采用 BG11 液体培养基,进行无菌分批培养。培养过程包括预培养和培养两个阶段。

在异养条件下，预培养阶段持续 4 d，首先在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL（含 10 g/L 葡萄糖）灭菌液体培养基，pH 值调整至 7，再加入 10 mL 藻液，置于 30 °C、150 r/min 的恒温摇床中培养。培养阶段持续 12 d，首先在 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL（含 10 g/L 葡萄糖）灭菌液体培养基，用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调整至 7 或所需数值，向其中加入一定量预培养的藻液，其他条件与预培养阶段一致。

在自养条件下，预培养阶段持续 4 d，首先配制 500 mL 灭菌液体培养基，pH 值调整至 7，再向其中加入 10 mL 藻液，24 h 光照（飞利浦 TWG121/2005 型支架灯管四根，功率 21 W），恒温 30 °C，经过灭菌过滤膜通入纯二氧化碳气体（纯度 \geq 99.9%），气体流量保持在 100 mL/min。培养阶段持续 12 d，首先配制 1 L 灭菌液体培养基，用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调整至 7 或所需数值，向其中加入一定量预培养的藻液，其他条件与预培养阶段一致。

上述条件即为标准培养（Standard）条件。进行环境因子对微藻 EPS 影响的研究中，仅改变单一环境条件，其他条件均不改变。其中缺氮（Less N）条件指仅将培养基中氮的含量减少 50%。

1.3 EPS 的提取

绿藻 EPS 的分离提取选用超声降解法^[14]：首先在不同培养时间的摇瓶中取 4 mL 绿藻样品，在 9 000 r/min 转速下离心 15 min，上清液即为 S-EPS；沉淀重新用磷酸盐缓冲液（10 mmol/L NaCl，1.2 mmol/L KH_2PO_4 ，6 mmol/L Na_2HPO_4 ）溶解，将样品放入冰水中，在 40% 最大功率条件下进行超声处理 2 min；然后在 9 000 r/min 转速下离心 15 min，上清液即 B-EPS^[8]。利用丙酮提取的方法测定总的 EPS 的干质量：取一定量培养过程中的微藻样品，用 Whatman No.1 滤膜进行过滤，保留清液，1 000 r/min 离心 10 min；取上清液，加入等体积的丙酮，在 4 °C 条件下保存 48 h；之后 10 000 r/min 离心 10 min，保留沉淀，冻干 24 h 即得 EPS 并称量其干质量^[15]。

1.4 藻细胞生长指标测定与成分分析

取 4 mL 微藻样品于离心管，10 000 r/min 转速离心 10 min 后倒去上清液，保留沉淀，放入 60 °C 烘箱烘干 24 h 后进行称量，该质量减去空管质量即为藻细胞干质量；同时采用双光束紫外-可见分光光度计在 680 nm 波长条件下检测同一微藻样品的光密度（OD），绘制 OD 值与藻细胞干质量的标准曲线。蛋白质测定采用考马斯亮蓝法^[16]，使用 Bradford 染色剂。多糖测定采用苯酚-硫酸法^[17]。所有实验重复 3 次，结果取平均值。

2 结果与讨论

2.1 缺氮对不同微藻 EPS 的影响

2.1.1 标准条件下微藻 EPS 组分对比

在异养标准培养状态下测定 4 种绿藻的 EPS 组分含量（按每克细胞计，下同），结果如图 1 所示：小球藻 B 的 EPS 中总多糖含量明显远大于其他 3 种绿藻，经过最初微藻迅速生长的变化阶段，从第 8 天开始稳定在约 0.56 g；小球藻 A 的总多糖含量次之，从第 4 天开始稳定在约 0.21 g；葡萄藻和栅藻中总多糖含量均较低（图 1(a)）。小球藻 B 的 EPS 中总蛋白质含量最高，最大值达到 0.12 g；小球藻 A 的总蛋白质含量则基本稳定在 0.030 g 左右，即 50 mg/L(上清液)，与前人研究结果相似^[8]；而栅藻的总蛋白含量最低，最大值仅 0.0014 g（图 1(b)）。综上，可以发现 2 种小球藻分泌的 EPS 中多糖与蛋白质的含量高于其他 2 种绿藻。

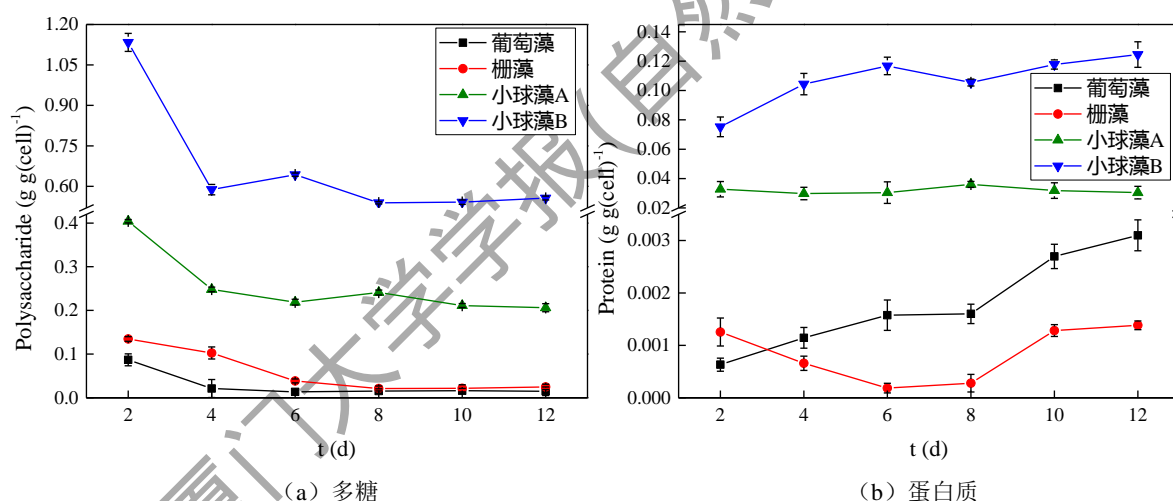


图 1 4 种绿藻 EPS 中总的多糖 (a) 和蛋白质 (b) 含量的对比

Fig. 1 Total contents of polysaccharide (a) and protein (b) in EPS of four different strains

对 4 种微藻在标准生长条件下的生物量情况进行分析，结果显示葡萄藻最快（第 4 天）达到生物量最大值 14.97 g/L，另外 3 种微藻在第 6 天以后才达到生物量最大值（栅藻：第 8 天 16.67 g/L；小球藻 A：第 6 天 1.64 g/L；小球藻 B：第 6 天 0.95 g/L）。虽然葡萄藻长势最好，但是以单位生物量来衡量 EPS 组分含量时发现葡萄藻的 EPS 多糖含量最低。微生物细胞在底物限制时可利用 EPS 中的物质作为碳源和能量来源^[18]，由于葡萄藻和栅藻生长速率

较快、生物量较高，相同培养条件下葡萄藻和栅藻更容易受底物限制，所以可能葡萄藻和栅藻会吸收更多的 EPS 多糖作为自身能量的来源。

2.1.2 缺氮条件下四种微藻 EPS 组分对比

氮作为微藻生长过程中重要的营养元素，起着至关重要的作用。有机氮存在于许多生物基质中，如肽、蛋白质、酶、叶绿素、能量转移分子 (ADP、ATP) 和基因材料 (RNA、DNA)。有机氮的无机来源包括硝酸根 (NO_3^-)、亚硝酸根 (NO_2^-)、硝酸 (HNO_3)、铵根 (NH_4^+)、氨 (NH_3) 和氮气 (N_2)。微藻在无机氮通过同化作用转化为有机氮的过程中起着决定性作用。

对葡萄藻、栅藻、小球藻 A 和小球藻 B 进行标准 (Standard) 和缺氮 (Less N) 2 种条件下的实验，结果显示 2 种条件下的多糖含量均远大于蛋白质含量，但是在微藻的生长过程中两者变化趋势不尽相同 (图 2)。

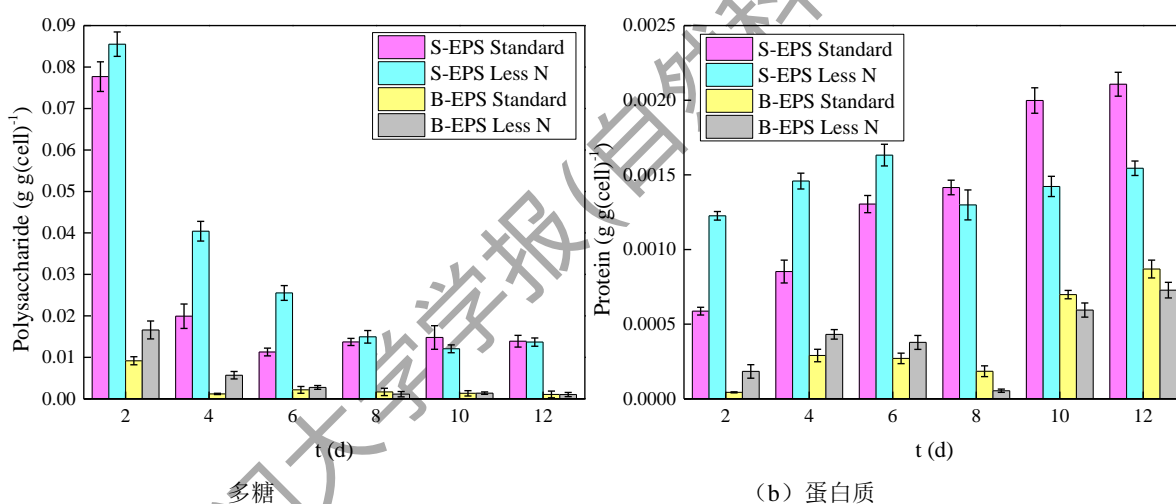


图 2 葡萄藻的 EPS 中多糖 (a) 及蛋白质 (b) 含量的变化

Fig. 2 Changes of polysaccharide (a) and protein (b) contents in EPS of *Botryococcus* sp. NJD-1

葡萄藻 EPS 中多糖含量的变化如图 2 (a) 所示。总体来看，多糖基本上均呈下降趋势，并且前 6 天的下降速率极快。生长初期不论是在 S-EPS 还是 B-EPS 中缺氮培养条件下的多糖含量均高于标准培养，其中第 4 天和第 6 天的 S-EPS 中多糖含量均高出 50% 以上；但生长至第 10 天后，葡萄藻生长状态趋于稳定，藻细胞内代谢反应与环境的物质交换达到动态平衡，两种培养条件下多糖的含量基本相同，随之趋于稳定，S-EPS 中的多糖含量均维持在 0.014 g 左右；而在同一培养条件下，S-EPS 中的多糖含量远高于 B-EPS 中，到稳定期时 B-EPS 中的多糖已经含量很低，仅有 0.001 g。

而葡萄藻 EPS 中蛋白质含量的变化如图 2 (b) 所示。从图中可以看出, S-EPS 中的蛋白质含量均大于 B-EPS 中。标准培养条件下葡萄藻的 S-EPS 中蛋白质含量不断增加, 前 6 天虽低于缺氮条件下, 但在生长稳定期逐渐超过缺氮条件下, 在第 12 天达到 0.0021 g。这可能是由于缺氮培养的微藻在生长初期会因为缺氮带来的环境压力促使细胞分泌更多蛋白质, 但到了后期, 环境中缺少氮源, 葡萄藻开始吸收之前释放的蛋白质来满足生长的营养需求; 然而在标准培养条件下, 微藻生长迅速, 其细胞数量更多, 在分批培养初始底物浓度相同情况下死亡的细胞也更多, 细胞死亡破裂释放出的蛋白质导致了蛋白质含量的不断增加。

综上, 葡萄藻 EPS 中多糖含量逐渐减少, 而蛋白质含量略微增多, 这可能是由于葡萄藻在逐渐分泌 EPS 的同时也会吸收 EPS 中的成分, 其对 EPS 中多糖的吸收量大于分泌量, 而对蛋白质的吸收量小于分泌量, 因而出现上述变化趋势^[19]。

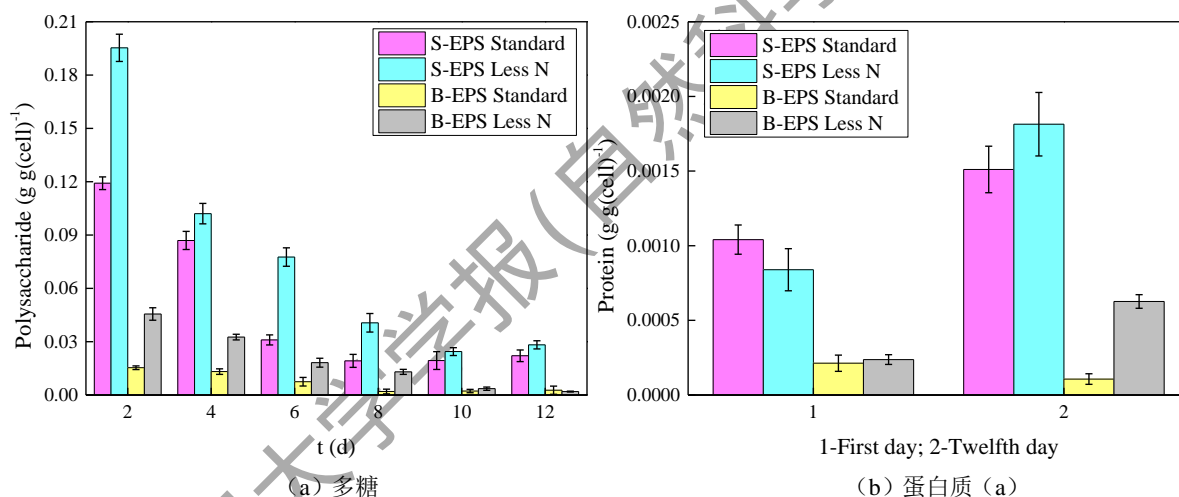


图 3 栅藻的 EPS 中多糖 (a) 及蛋白质 (b) 含量的变化

Fig. 3 Changes of Polysaccharide (a) and protein (b) contents in EPS of *Scenedesmus* sp. NJD-5

栅藻 EPS 中多糖含量的变化与葡萄藻类似。如图 3(a)所示, 总体上多糖在生长前期处于急速下降的状态, 缺氮培养条件下的多糖含量均高于标准培养条件, 但到了生长稳定期 (第 10 天后), 标准培养和缺氮培养条件下的 S-EPS 中多糖含量分别稳定在 0.025 和 0.030 g。这可能是由于微藻生长后期大量的微藻细胞衰老并死亡, 从而造成细胞破裂, 释放出一定量的多糖。同时, S-EPS 中的多糖含量始终高于 B-EPS 中。由于栅藻 EPS 中蛋白质含量相对较低, 测定误差较大, 所以仅选取培养初期 (第 2 天) 和末期 (第 12 天) 进行对比。由图 3(b)可知, 两种培养条件下的栅藻, 其 S-EPS 中的蛋白质含量都有所增加, 与葡萄藻的

规律相同，但 B-EPS 中的蛋白质含量在标准条件下变化不大，甚至略有减少，而在缺氮条件下则有所增加。

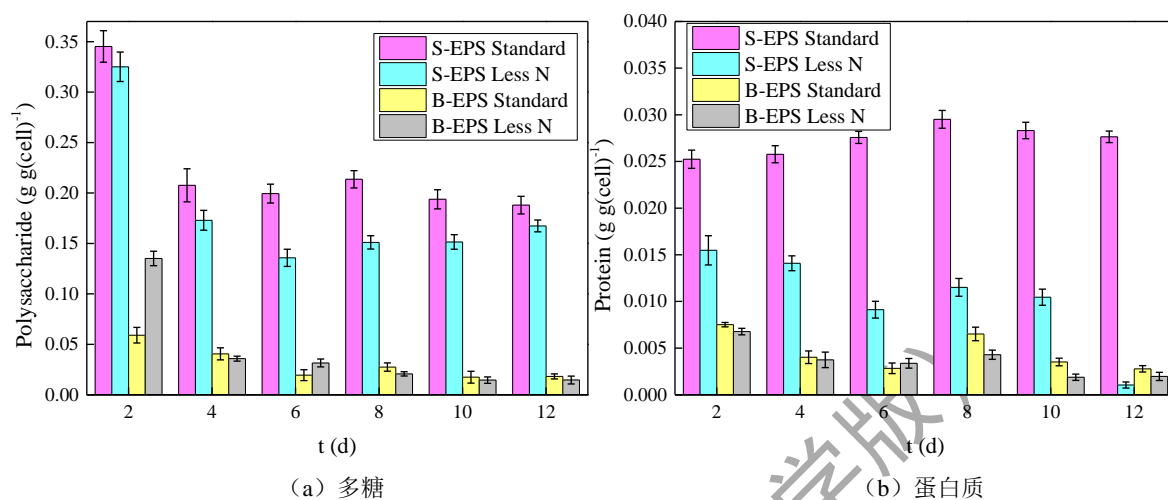


图 4 小球藻 A 中 EPS 中多糖 (a) 及蛋白质 (b) 含量的变化
Fig. 4 Polysaccharide(a) and Protein(b) in EPS of *Chlorella* sp. NJD-3

小球藻 A 的 EPS 中多糖含量的变化如图 4 (a) 所示，在标准培养条件下 S-EPS 中多糖含量明显高于缺氮培养条件下，而 B-EPS 则基本相同，这与葡萄藻和栅藻的结果不同，但整体变化趋势基本一致。小球藻 A 的 EPS 中蛋白质含量的变化与葡萄藻和栅藻有所差别，如图 4 (b) 所示，除了标准培养下的 S-EPS 中蛋白质含量变化不大，其余 EPS 中蛋白质均呈减少趋势。小球藻 A 在缺氮条件下生物量反而更大，且生长速率更快，因此需要更多的氮源，此时蛋白质可作为有效的氮源被细胞吸收利用，也就造成了生长过程中蛋白质的逐渐减少。此外与葡萄藻类似，小球藻 A 的 S-EPS 中蛋白质的含量始终高于 B-EPS 中，标准培养条件下的 S-EPS 中蛋白质含量最高可达到 0.030 g，明显高于缺氮条件下 B-EPS 中蛋白质含量 0.012 g。

如图 5 (a) 所示，小球藻 B 的 S-EPS 中多糖含量的变化与小球藻 A 类似，在两种培养条件下，生长至第 4 天后均稳定在 0.45 g 左右，B-EPS 中则稳定在相对较低的水平。标准培养条件下，B-EPS 中多糖含量最后维持在 0.11 g，而缺氮条件下仅为 0.041 g，这可能与其生长稳定期的细胞数量较低有一定关系。从图 5 (b) 中可见，生长至稳定期后，S-EPS 中的蛋白质含量明显高于 B-EPS 中，这与多糖的结果一致；并且在缺氮条件下，由于微藻细胞对 EPS 中蛋白质的吸收利用，蛋白质的含量整体呈下降趋势。

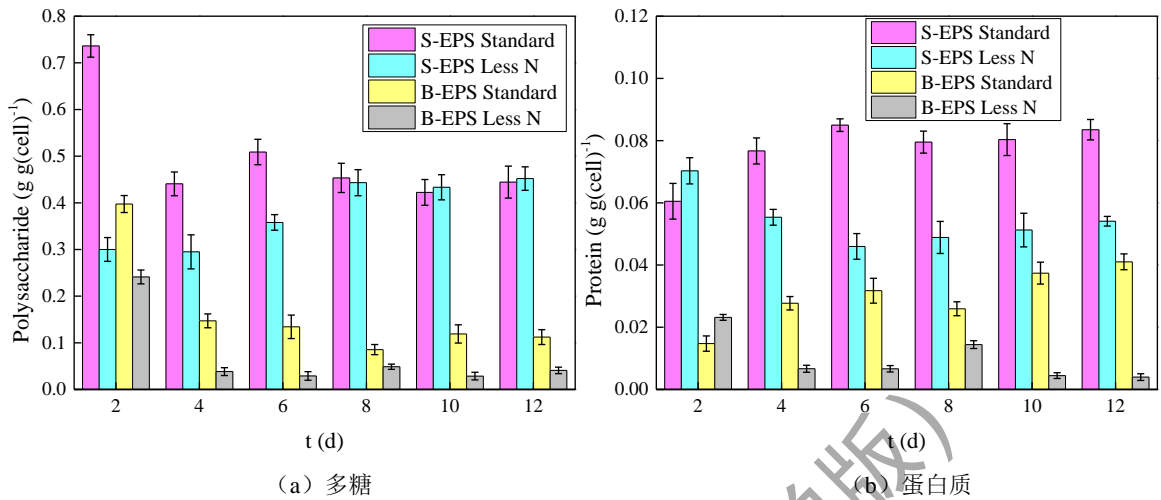


图 5 小球藻 B 中 EPS 中多糖 (a) 及蛋白质 (b) 含量的变化

Fig. 5 Changes of polysaccharide(a) and protein(b) contents in EPS of *Chlorella sp. NJD-10*

2.1.3 不同微藻 EPS 中多糖和蛋白质含量的比较

由于栅藻的 EPS 中多糖含量的变化与葡萄藻类似且蛋白质含量极少，表 1 仅列出了葡萄藻、小球藻 A 和小球藻 B 在异养标准培养和缺氮培养两种条件下 EPS 的总量及其中多糖和蛋白质的质量占比。由表 1 可知，绿藻在缺氮条件下 EPS 中多糖和蛋白质的占比相对标准条件下有所降低，其中多糖占比降低最多的为葡萄藻，减少了 17%，而蛋白质占比降低最多的为小球藻 A，下降了 43%。这说明缺氮条件会导致 EPS 的组成发生变化，多糖和蛋白质占比的减少也表明了其他组分占比的增多，如脂质、核酸等。葡萄藻和小球藻 B 的 EPS 总量在缺氮条件下都有所减少，而小球藻 A 在缺氮培养条件下相对标准条件下增加了约 29%，这可能与小球藻 A 在缺氮条件下生长更好有关，符合已有文献报道的培养条件改变会导致微生物细胞胞外聚合物各成分比例发生改变，且变化趋势和微生物种类、生长情况和改变的培养条件等有关^[20-22]。

综合以上结果及微藻自身的生长情况，鉴于葡萄藻有一定代表性，且能在不适宜生长的条件中保持稳定生长，后续实验选择用葡萄藻进行 pH 值、温度和生长方式对 EPS 影响的研究。

表 1 3 种微藻的 EPS 总量及多糖和蛋白质组分质量占比

Tab.1 Total amounts of EPS and proportions of polysaccharide and protein in EPS of three different strains

微藻种类	培养条件	EPS 总量/ (g·L ⁻¹)	多糖占比/%	蛋白质占比/%
葡萄藻	标准	0.360	75.16	10.81
	缺氮	0.318	58.08	8.59
小球藻 A	标准	0.392	89.78	13.01
	缺氮	0.507	79.36	5.73
小球藻 B	标准	0.654	74.62	13.45
	缺氮	0.534	69.84	9.65

2.2 pH 值对葡萄藻 EPS 组分的影响

2.2.1 多糖含量

分别在 pH 值为 5、7、9 和 11 条件下进行葡萄藻的培养及 EPS 组分的分析, 所得 EPS 中多糖含量的变化结果如图 6 所示。由图 6(a)可知, 当 pH 值为 11 时, S-EPS 中的多糖含量始终大于同时期其他 pH 条件下的多糖含量, 到第 12 天时仍能达到 0.15 g, 而 pH 值为 7 时, 生长稳定后的 S-EPS 中多糖含量最低。B-EPS 中的多糖含量如图 6 (b) 所示, 整体上远小于 S-EPS 中的多糖含量, pH 值为 11 时的最大值也仅有 0.020 g。与 S-EPS 中的结果类似, pH 值为 11 时的 B-EPS 中多糖含量始终高于同时期其他 pH 条件下的多糖含量, 且 pH 值为 7 时, 生长稳定后的 B-EPS 中多糖含量最低。

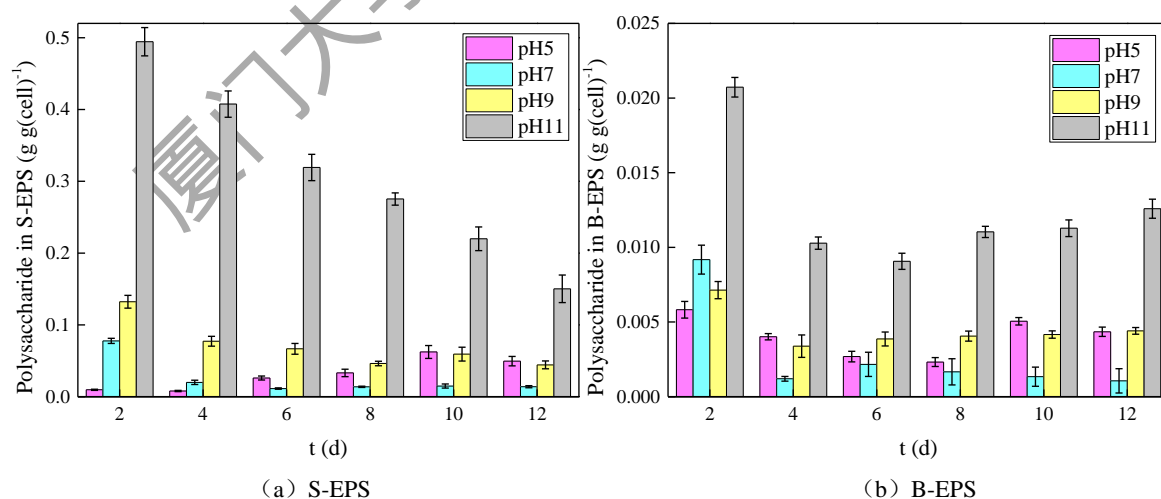


图 6 葡萄藻在不同条件下 S-EPS(a)和 B-EPS(b)中多糖含量的变化

Fig. 6 Changes of polysaccharide contents in S-EPS(a) and B-EPS(b) of *Botryococcus* sp. NJD-1 under different pH values

2.2.2 蛋白质含量

pH 值对 EPS 中蛋白质含量的影响如图 7 所示。由图 7(a)可知, S-EPS 中蛋白质的含量随着葡萄藻的生长整体呈增大趋势, 其中 pH 值为 5 时最低的蛋白质含量在生长稳定后明显大于其他 pH 条件下, 最高达到 0.0045 g, 但在 pH 值为 9 时, 生长稳定后的蛋白质含量最低。因为葡萄藻 B-EPS 中蛋白质含量相对较低, 测定结果存在较大误差, 所以选取培养初期(第 2 天)和培养末期(第 12 天)进行蛋白质含量的测定并对比, 结果如图 7 (b) 所示: 生长初期, pH 值为 11 时的蛋白质含量最高, 达 0.0026 g, 而 pH 值为 7 时最低; 但是随着葡萄藻的生长, 到了生长末期, pH 值为 11 时的蛋白质含量明显降低, 仅有 0.00040 g, 而 pH 值为 7 时的蛋白质含量则明显升高, 达 0.0016 g。

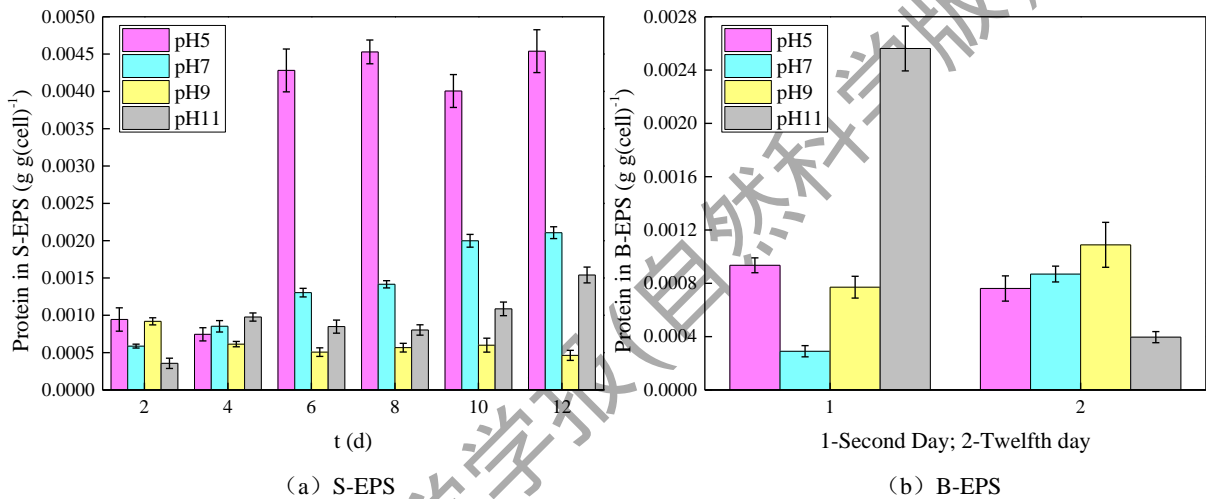


图 7 葡萄藻在不同 pH 条件下 S-EPS(a)和 B-EPS(b)中蛋白质含量的变化

Fig. 7 Changes of protein contents in S-EPS (a) and B-EPS (b) of *Botryococcus sp. NJD-1* under different pH values

2.3 温度对葡萄藻 EPS 组分的影响

葡萄藻在不同温度条件下 EPS 中多糖含量的变化如图 8 (a) 所示。总体来看, 多糖含量随着葡萄藻的生长呈降低趋势, 温度为 25 °C 时葡萄藻倾向于分泌更多的多糖, S-EPS 和 B-EPS 中的多糖含量均高于 30 °C 时。这一现象也印证了 EPS 的分泌是微藻对环境变化或是环境恶劣的一种响应机制: 在 30 °C 时, 葡萄藻处于适宜的生长环境当中, EPS 的分泌较少; 而当温度降低到 25 °C 时, 温度条件偏离了葡萄藻适应的数值, 葡萄藻进而减缓生长, 分泌出更多的多糖。

不同温度条件下，EPS 中蛋白质含量的变化如图 8 (b) 所示。当温度为 25 °C 时，S-EPS 中的蛋白质含量随着葡萄藻的生长快速增加，B-EPS 中则在早期快速增加后趋于稳定。与 25 °C 相比，30 °C 时 S-EPS 和 B-EPS 中的蛋白质含量均维持在极低的水平，与多糖韩浪的结果一致。

图 8 葡萄藻在不同温度条件下 EPS 中多糖 (a) 和蛋白质 (b) 含量的变化

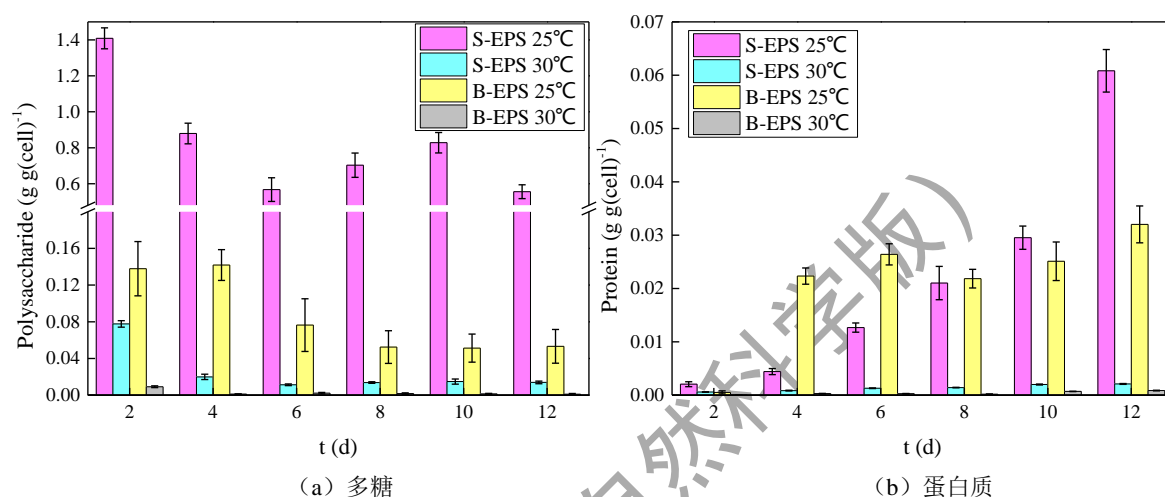


Fig. 8 Changes of polysaccharide (a) and protein (b) contents in the EPS of *Botryococcus* sp. NJD-1 at different temperature

2.4 自养和异养对葡萄藻 EPS 化学成分的影响

将葡萄藻在自养和异养两种条件下培养的 EPS 组分进行对比分析，结果如图 9 所示。从图 9 (a) 可以明显看出，葡萄藻在自养培养条件下时，多糖含量在初期处于下降后趋于稳定啊，且生长稳定后 S-EPS 中的多糖含量 (约 0.0063 g) 远低于异养条件下。蛋白质含量的变化如图 9 (b) 所示，异养培养条件下的葡萄藻 EPS 中蛋白质含量整体呈上升趋势，而自养培养条件下的葡萄藻则一开始分泌出大量蛋白质后，随着细胞的生长而蛋白质含量逐渐降低，在生长到达稳定期后蛋白质含量又有所上升。在葡萄藻生长过程中，自养培养条件下的蛋白质含量明显高于异养培养条件下，与多糖含量的结果刚好相反。此外，在相同培养条件下多糖的总含量始终大于蛋白质的总含量，印证了之前相关研究所得的结论^[14]。

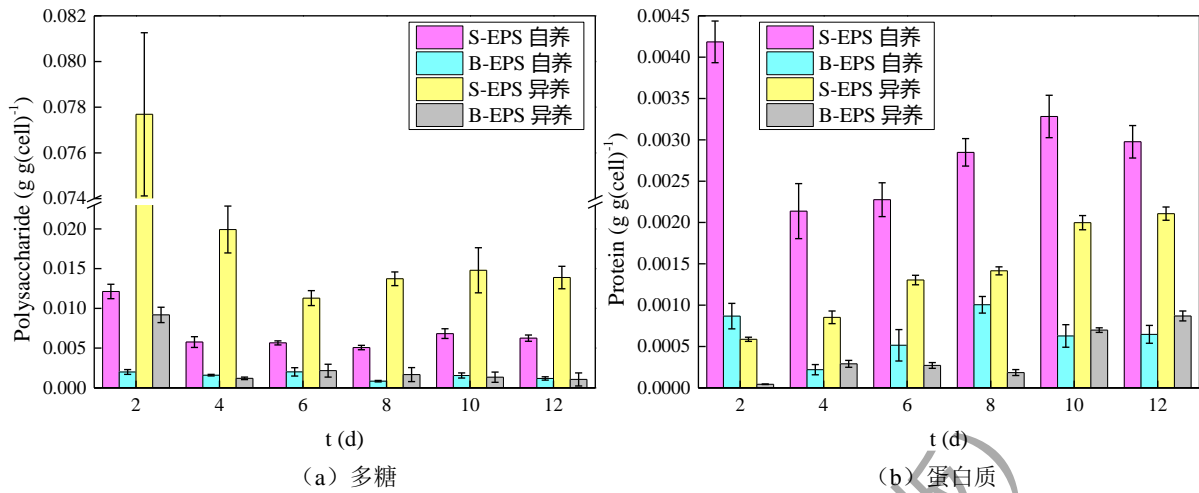


图9 葡萄藻异养/自养条件下EPS的多糖(a)和蛋白质(b)含量的变化

Fig. 9 Changes of polysaccharide(a) and protein(b) contents in EPS of *Botryococcus* sp. NJD-1 under autotrophic condition

3 结论

微藻在适宜的培养基中生长时，EPS中多糖的含量会随着细胞增加而下降，蛋白质含量则呈现相反趋势。本研究中的4种绿藻相比，小球藻与葡萄藻和栅藻释放更多的EPS多糖和蛋白质。氮作为微藻生长的必要元素，其减少不一定会抑制微藻的生长，但会迫使微藻细胞从其他来源吸收营养，所以缺氮条件会造成EPS中蛋白质含量的减少。环境呈碱性（pH值为11）会刺激葡萄藻产生更多EPS多糖和蛋白质，含量与中性（pH值为7）时相比分别增加0.135和0.018g。温度的降低（从30℃至25℃）可使葡萄藻EPS中多糖和蛋白质的含量急剧增加，最高达约40倍。自养和异养培养类型的改变对葡萄藻EPS中多糖和蛋白质含量的影响不同，自养会导致微藻EPS中出现大量蛋白质，而异养则会产生更多的多糖，这与其对于碳源利用方式的不同有关。综上，本研究初步探讨了各种外部环境条件对微藻EPS多糖和蛋白质的影响规律，对于了解微藻处理污水时的生长情况和取得更好的集藻效果有一定指导意义。

参考文献:

[1] PARK C, NOVAK J T, HELM R F, et al. Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated

- sludges[J]. *Water Research*, 2008, 42(14): 3879-3889.
- [2] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [3] YANG Z, KONG F, SHI X, et al. Changes in the morphopogy and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) during flagellate grazing(1)[J]. *Journal of Phycology*, 2008, 44(3): 716-720.
- [4] QU F, LIANG H, WANG Z, et al. Ultrafiltration membrane fouling by extracellular organic matters (EOM) of *Microcystis aeruginosa* in stationary phase: influences of interfacial characteristics of foulants and fouling mechanisms[J]. *Water Research*, 2012, 46(5): 1490-1500.
- [5] XIAO R, ZHENG Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(7): 1225-1244.
- [6] DE JESUS RAPOSO M F, DE MORAIS A M M B, DE MORAIS R M S C. Bioactivity and Applications of Polysaccharides from Marine Microalgae[M]// RAMAWAT K G, MERILLON J-M. Polysaccharides: bioactivity and biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2015: 1683-1727.
- [7] PAULSEN B, ASLAKSEN T, S. FREIRE-NORDI C, et al. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 1998, 34(4): 638-641.
- [8] WANG M, KUO-DAHAB W C, DOLAN S, et al. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 154: 131-137.
- [9] LI X Y, YANG S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge[J]. *Water Research*, 2007, 41(5): 1022-1030.
- [10] SHIPIN O V, MEIRRING P, PHASWANA R, et al. Integrating ponds and activated sludge process in the PETRO concept[J]. *Water Research*, 1999, 33(8): 1767-1774.
- [11] BOONCHAI R, KAEWSUK J, SEO G. Effect of nutrient starvation on nutrient uptake and extracellular polymeric substance for microalgae cultivation and separation[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2014, 55(2): 360-367.
- [12] LIU Y, FANG H H P. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2003,

33(3): 237-273.

[13] 陈长平, 徐华林, 梁君荣, 等. 镉离子对红树林底栖硅藻新月筒柱藻胞外多糖的影响[J]. 厦门大学学报(自然版), 2013, 52(1): 122-126.

[14] XU H, CAI H, YU G, et al. Insights into extracellular polymeric substances of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* using fractionation procedure and parallel factor analysis[J]. *Water Research*, 2013, 47(6): 2005-2014.

[15] ABREU I, CERDA M E, DE NANCLARES M P, et al. Boron deficiency affects rhizobia cell surface polysaccharides important for suppression of plant defense mechanisms during legume recognition and for development of nitrogen-fixing symbiosis[J]. *Plant and Soil*, 2012, 361(1): 385-395.

[16] HAMMOND J B W, KRUGER N J. The Bradford method for protein quantitation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1994, 32(32): 9.

[17] TAYLOR K A C C. A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, 53(3): 207-214.

[18] DURMAZ B, SANIN F D. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge[J]. *Water Science and Technology*, 2001, 44(10): 221-229.

[19] GEYIK A G, ÇEÇEN F. Production of protein- and carbohydrate-EPS in activated sludge reactors operated at different carbon to nitrogen ratios[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(2): 522-531.

[20] LIU L Z, HUANG Q, ZHANG Y L, et al. Excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analyses of the effects of N and P nutrients on the extracellular polymeric substances of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Limnologica*, 2017, 63: 18-26.

[21] METIVIER R, BOURVEN I, LABANOWSKI J, et al. Interaction of erythromycin ethylsuccinate and acetaminophen with protein fraction of extracellular polymeric substances (EPS) from various bacterial aggregates[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2013, 20(10): 7275-7285.

[22] ZHANG W J, CAO B D, WANG D S, et al. Variations in distribution and composition of extracellular polymeric substances (EPS) of biological sludge under potassium ferrate conditioning: effects of pH and ferrate dosage[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 106: 37-47.

The Effect of Environmental Factors on the Principal Components of Microalgal Extracellular Polymeric Substances

WU Qilu, CUI Wenqian, SHEN Liang*, LU Yinghua

(College of Chemistry & Chemical Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005 China)

Abstract: Extracellular polymeric substances (EPS) have an important effect on cell growth, flocculation, biofilm formation, etc. In this paper, one strain of *Scenedesmus*, one strain of *Botryococcus*, and two strains of *Chlorella* were selected to investigate the polysaccharide and protein in EPS when the nitrogen content, pH, temperature and the culture mode changed. The results showed that the nitrogen-deficient growth environment caused a reduction of up to 43% in protein. Polysaccharides accounted for 58.08% to 89.78% of EPS, while proteins accounted for approximately 5.73% to 13.45%. There were more polysaccharides and proteins in *Chlorella* than in other species. As elaborated in the representative *Botryococcus* strain, when the pH value was 11, the polysaccharide and protein contents (per gram of cell weight) in EPS approximately increased to 0.135 g and 0.018 g, respectively, compared with the data at pH 7. The content of polysaccharide also increased from 0.014 g to 0.600 g as the temperature decreased. When the culture mode changed, the polysaccharide content in EPS of the heterotrophic cultivation was higher than that of the autotrophic cultivation, while the protein content showed the opposite trend.

Key words: microalgae; extracellular polymeric substances; polysaccharide; protein