

研究论文

小球藻在蔗渣酶解液中的异养生长及其脂肪酸生成

王 闻¹, 杨 康¹, 朱 顺 妮¹, 冯 佳¹, 尚 常 花¹, 王 忠 铭¹, 袁 振 宏^{1,2}, 庄 新 姝¹, 胡 磊³

(¹中国科学院可再生能源重点实验室, 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 中国科学院广州能源研究所, 广东 广州 510640; ²生物质能源河南省协同创新中心, 河南 郑州 450002; ³淮阴师范学院, 江苏省生物质能与酶技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)

摘要: 在高温液态水处理的甘蔗渣酶解过程中添加 Tween80 可使聚糖转化率提高 11.4%。根据蔗渣酶解液中糖的种类及含量, 用葡萄糖、木糖和纤维二糖标准品模拟蔗渣酶解液组成配制成相应的混合糖培养基, 同时配制仅含葡萄糖的培养基, 在有、无 Tween80 和 BG11 (Blue-Green 11) 的条件下, 考察小球藻在不同培养基中的异养生长及脂肪酸生成。结果显示 Tween80 对小球藻的生长具有抑制作用, 纤维二糖也会影响小球藻的生长; 小球藻在添加 BG11 的葡萄糖培养基中的生物量最高, 为 $1.97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在添加 BG11 的蔗渣酶解液中的生物量高出未添加 BG11 的 2 倍, 在含有 Tween80 和 BG11 的蔗渣酶解液中的总脂肪酸含量最高, 达到 6.90%, 在所有培养基中产生的脂肪酸以 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{18:3}$ 、 $\text{C}_{20:1}$ 和 $\text{C}_{20:4}$ 为主; 培养基组成优化可进一步提高微生物量和油脂产量。

关键词: 微藻; 生物质; 生物催化; 异养培养; 生物柴油; 高温液态水

DOI: 10.11949/j.issn.0438-1157.20150977

中图分类号: TK 6

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2016) 04—1549—08

Cell growth and fatty acid production of heterotrophic microalgae *Chlorella* sp. cultivated in enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse

WANG Wen¹, YANG Kang¹, ZHU Shunni¹, FENG Jia¹, SHANG Changhua¹, WANG Zhongming¹,
YUAN Zhenhong^{1,2}, ZHUANG Xinshu¹, HU Lei³

(¹Key Laboratory of Renewable Energy, Chinese Academy of Sciences, Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China; ²Collaborative Innovation Center of Biomass Energy, Zhengzhou 450002, Henan, China; ³Jiangsu Key Laboratory for Biomass-based Energy and Enzyme Technology, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, Jiangsu, China)

Abstract: After adding Tween80 into the enzymatic hydrolysis process, the glycan conversion of sugarcane bagasse (SCB) pretreated by liquid hot water (LHW) was improved 11.4%. The enzymatic hydrolyzates with and without Tween80 were prepared as media to cultivate heterotrophic *Chlorella* sp.. According to the compositional feature of enzymatic hydrolyzate, the synthetic media composed of glucose, xylose and cellobiose were prepared to mimic the media containing enzymatic hydrolyzate. The medium which only contained glucose was used as the positive control. The glucose concentration in all of the media was $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The synthetic media containing

2015-06-24 收到初稿, 2015-11-09 收到修改稿。

联系人: 袁振宏。第一作者: 王闻 (1985—), 男, 博士, 助理研究员。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目子课题 (2011CB200905); 国家自然科学基金项目 (51476177); 留学回国人员科研启动基金 ([2013]693 号); 江苏省生物质能与酶技术重点实验室开放课题基金 (JSBEET1316)。

Received date: 2015-06-24.

Corresponding author: Prof. YUAN Zhenhong, yuanzh@ms.giec.ac.cn

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2011CB200905), the National Natural Science Foundation of China (51476177), The Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry ([2013] 693) and Open Foundation of Jiangsu Key Laboratory for Biomass-based Energy and Enzyme Technology (JSBEET1316).

Tween80 or not were mixed with BG11 which did not contain carbonate, while the hydrolyzates media were prepared with or without the foregoing BG11. The cell growth and fatty acids yield of heterotrophic *Chlorella* sp. cultivated on the above media were investigated. The results showed that Tween80 could inhibit the cell growth of *Chlorella* sp., and cellobiose could also put negative impact on the biomass of *Chlorella* sp.. *Chlorella* sp. cultivated on medium containing glucose and BG11 attained the maximum biomass of $1.97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The biomass of *Chlorella* sp. growing on enzymatic hydrolyzate media with BG11 was 2 times more than that on enzymatic hydrolyzate media without BG11. 6.90% of maximum fatty acid content was achieved when *Chlorella* sp. was cultured in enzymatic hydrolyzate media containing Tween80 and BG11. The chief fatty acids produced in all media were $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:3}$, $\text{C}_{20:1}$ and $\text{C}_{20:4}$. The addition of inorganic and organic nutrients into cellulolytic hydrolyzate can enhance the biomass and lipid content of microalgae.

Key words: microalgae; biomass; biocatalysis; heterotrophic cultivation; biodiesel; liquid hot water

引 言

小球藻 (*Chlorella*) 生长较快、可自养和异养生长、油脂产量高, 在生物柴油生产中具有较好的应用前景^[1]。小球藻的异养培养能够获得比自养培养更高的生物量和油脂积累^[2]。然而, 用于异养培养的培养基成本较高, 阻碍了其产业化。据估计葡萄糖的成本占据了培养基总成本的 80%^[3], 因此, 寻找廉价的葡萄糖替代物成为小球藻异养培养商业化的必经之路。

木薯淀粉水解液、甜高粱茎秆汁液、畜牧业养殖废水、牛奶加工副产物等均被用于培养小球藻, 获得了较好的效果^[4-7]。利用木质纤维素水解糖液培养微藻亦有研究但不多^[8-9]。由于木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素通过共价和非共价的方式互相连接形成了致密结构, 导致其原料的酶解效率低^[10], 因此木质纤维素在酶解之前需要预处理。木质纤维素经预处理后会产生糠醛、5-羟甲基糠醛等副产物抑制微藻的生长^[11]。已有的利用木质纤维素酶水解液培养微藻的研究均采用化学试剂预处理木质纤维素原料^[8-9], 一方面增加了预处理成本, 另一方面预处理后固体残渣需要脱毒和水洗以消除化学试剂本身及副产物对后续酶解和发酵的影响^[12]。而高温液态水预处理除了水以外无需添加其他任何化学试剂, 通过控制反应体系的压力使水在高温下维持液体状态完成对生物质的处理, 产生的抑制物浓度低, 剩余固体残渣可不经洗涤直接被酶解用于微生物培养, 简化操作过程, 节约用水^[13-14]。在处理过程中, 水在高温下自发电离产生的水合氢离子攻击半纤维素中的杂环醚键产生低聚糖, 同时半纤维素中的乙酰基被分离出来形成乙酸, 乙酸自发电离产生水合氢离子参与多糖的降解, 在高温液态水

处理过程的中后期, 水合氢离子主要来自乙酸^[13], 乙酸是小球藻的良好碳源^[11]。本研究以廉价的蔗渣为原料, 通过高温液态水处理和酶解的方法获得蔗渣酶解糖液, 考察了小球藻在葡萄糖和蔗渣酶解液配制的培养基中的生长状况及脂肪酸的生成, 并与已报道的结果比较, 为生物质水解糖液的能源化高效利用提供数据支持。

1 试验材料和方法

1.1 材料

甘蔗渣 (sugarcane bagasse, SCB) 是甘蔗经榨汁后的剩余残渣, 由广西凭祥丰浩酒精有限公司提供, 经粉碎后用筛子筛分出粒径为 0.25~0.42 mm 的颗粒, 水洗后于 105℃ 烘干至质量恒定, 于室温下保存于干燥器中备用。小球藻 (*Chlorella* sp.) 为本实验室保存。纤维素酶购自宁夏和氏璧生物技术有限公司, 产自一种青霉菌 (*Penicillium* sp.), 其滤纸酶活 (FPA) 为 $113.8 \text{ U} \cdot (\text{g 粉末})^{-1}$ 。BG11 溶液除了未添加 Na_2CO_3 外, 其余成分与文献[5]相同。1 L 种子培养基中含有 30 g 葡萄糖, 4 g 酵母粉和 1 ml BG11, 经 115℃ 灭菌 30min 备用。

1.2 高温液态水预处理

高温液态水 (liquid hot water, LHW) 预处理方法参考文献[14], 处理条件为 190℃, 4 MPa, 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 反应 20 min。预处理残渣于 60℃ 烘干后, 贮存在干燥器中, 作为组分分析和下一步酶解试验的原料。

1.3 酶水解

称取 20 g 预处理后的甘蔗渣置于 500 ml 三角瓶中, 加入 200 ml $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液 (pH4.8), 以 $30 \text{ FPU} \cdot (\text{g 生物质})^{-1}$ 的量加入纤维

素酶, 置于 50°C , $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中, 振荡水解 96 h 后, 将水解液转移至 100 ml 离心管中, 于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 收集水相。另一组试验与上述方法相同, 只是在水解体系中以 $0.125 \text{ ml} \cdot (\text{g 干物质})^{-1}$ 的量加入 Tween80。

1.4 异养培养小球藻

取小球藻保存种, 接种于种子培养基, 置于 25°C , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养活化, 取活化后藻种再接种于种子培养基中, 置于 25°C , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 24 h 后, 取 16 个已灭菌并已称重的 2 ml EP 管, 在 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 1 min 收集藻种 0.15 g (湿重), 用无菌去离子水洗涤 2 次后, 弃去水相, 加入 1 ml 相应的培养基 (表 1), 混匀后接入到相应的培养基中, 置于 25°C , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 120 h, 每个试验组做两个重复。在培养过程中每隔 24 h 取 5 ml 培养液置于已称重的 7 ml EP 管中, 于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集水相和藻体。藻体用无菌去离子水洗涤 2 次, 置于 50°C 烘干后称重, 扣除空 EP 管的质量即得小球藻的生物量。取样过程均为无菌操作。

1.5 分析方法

酶活力测定参考 Ghose 的方法^[15], 取 $1.0 \text{ cm} \times 6.0 \text{ cm}$ 的 Whatman 1 号滤纸置于 25 ml 刻度试管中, 加入 1.0 ml $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液 (pH4.8) 和 0.5 ml 酶液, 置于 50°C 孵育 60 min 后取出, 立即加入 3.0 ml DNS 溶液 (3,5-二硝基水杨酸溶液), 沸水浴 5.0 min 后, 立即取出置于冷水中, 加入 20 ml 去离子水混匀后置于 540 nm 下测量吸光度。同时配制系列浓度的葡萄糖标准溶液, 取 0.5 ml 标准糖液与 1.0 ml $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸缓冲液 (pH4.8) 混匀后, 加入 3.0 ml DNS 溶液, 按照上述相同的方法测定吸光度建立糖浓度-吸光度的标准曲线。将所测的酶反应液的吸光度与标准曲线对照, 取对应 2.0

$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 标准糖浓度的吸光度按照文献[15]公式进行计算, 得到滤纸酶活。

甘蔗渣原料和预处理料的组分分析参考美国可再生资源实验室 (NREL) 的两步酸水解的方法^[16], 先用 72% 浓硫酸在 30°C 振荡水解物料 1 h 后, 加水稀释硫酸浓度为 4%, 置于 121°C 水解 1 h, 过滤获得糖液和未溶解残渣, 未溶解残渣经烘干后称重, 即为克拉松木素和灰分的质量。本研究中的糖液、糠醛、5-羟甲基糠醛用高效液相色谱 (HPLC, Waters e2695) 测定, 糖液分析使用双折光示差检测器 (RI 2414), 糠醛、5-羟甲基糠醛的检测用紫外检测器 (2998 PDA), 分析柱为 Shodex SH1011, 分析条件为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液作为流动相, 流速为 $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温及检测器的温度为 50°C , 聚糖组成及转化率计算分别参考文献[16-17]。

小球藻中脂肪酸组成及各组分的百分比分析参考文献[18]略有修改, 取 20 mg 藻粉, 加入 2.5 ml 含 2% 硫酸的甲醇溶液, 80°C 下搅拌加热 2.5 h, 冷却至室温后加入 1 ml 饱和氯化钠溶液和 1 ml 正己烷, 振荡后 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min 分层, 吸取上层至另一洁净的玻璃管中, 对下层溶液用 1 ml 正己烷反复抽提 2~3 次, 收集上层液体, 在氮吹下蒸发溶剂; 配制 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 正十七烷酸甲酯溶液作为内标, 取 1 ml 内标溶液置于已吹干的玻璃管中, 振荡均匀后用岛津 GC2010 气相色谱进行定量分析, 检测器为 FID。升温程序为: 190°C 保持 5 min, 以 $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 250°C , 再保持 7 min。色谱柱为: DB-WAX, 厚度 $0.25 \mu\text{m}$, 长度 30 m, 内径 $0.25 \mu\text{m}$ 。以正十七烷酸甲酯为标样。

2 试验结果与讨论

2.1 高温液态水处理甘蔗渣的酶解

木质纤维素经高温液态水处理后, 大部分半纤

表 1 不同试验组的培养基配方

Table 1 Media composition in different tests

Tests	Media
A	1 g glucose dissolved in 100 ml $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution
B	1 g glucose and 0.137 ml Tween80 dissolved in 100 ml $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution
C	100 ml $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution containing $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, $1.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose and $1.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose
D	100 ml $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution containing $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, $1.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ cellobiose, $1.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose and $1.37 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ Tween 80
E	100 ml enzymatic hydrolyzate of LHW-treated SCB containing $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose
F	50 ml enzymatic hydrolyzate of LHW-treated SCB containing $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose mixed with 50 ml $2 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution
G	100 ml enzymatic hydrolyzate of LHW-treated SCB containing $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose and Tween80
H	50 ml enzymatic hydrolyzate of LHW-treated SCB containing $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose and Tween80 mixed with 50 ml $2 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ BG11 solution

表 2 甘蔗渣经高温液态水处理前后的成分组成

Table 2 Compositions of raw and LHW-treated SCB

Sugarcane bagasse	Glucan/%	Xylan/%	Acid-insoluble lignin and ash/%
raw	35.3±0.5	20.1±0.3	24.2±0.0
pretreated	53.6±0.04	8.9±0.3	29.5±0.4

纤维素会被脱除。从表 2 可以看出, 甘蔗渣经高温液态水处理后, 其木聚糖(代表半纤维素)在物料中所占比例显著减少, 葡聚糖(代表纤维素)所占比例显著增加, 酸不溶性木质素所占比例也有所增加。

研究发现^[14,19], 经高温液态水处理的生物质在添加 Tween80 后, 其酶解效率会显著增加。在经高温液态水处理的甘蔗渣酶解中, 以 $0.125 \text{ ml} \cdot (\text{g 干物料})^{-1}$ 的量添加 Tween80 其酶解效率最高^[19]。因此本研究考察了在有、无添加 Tween80 的条件下甘蔗渣预处理料酶解 96 h 后的产物种类及产量, 扣除酶中的糖含量后, 结果见表 3。从表中可以看出, 添加 Tween80 后, 纤维二糖、葡萄糖和木糖产量均比未添加 Tween80 的高, 聚糖转化率提高 11.4%。Tween80 之所以能够提高木质纤维素的酶解效率, 是因为其与木质素的吸附强度要强于纤维素酶与木质素的吸附强度, 从而屏蔽了木质素对纤维素酶的有效吸附, 使参与纤维素酶解的有效酶量增加^[20-21]。

表 3 经高温液态水处理的甘蔗渣在有、无 Tween80 条件下的酶解

Table 3 Enzymatic hydrolysis of LHW-treated SCB with and without Tween80

Item	Cellobiose /g · L ⁻¹	Glucose /g · L ⁻¹	Xylose /g · L ⁻¹	Glycan conversion/%
without Tween80	1.6	50.5	7.5	85.7
with Tween80	2.0	57.2	8.3	97.1

2.2 小球藻在不同培养基中生物量的变化

小球藻的异养培养以葡萄糖为主要有机碳源, 扣除无机碳源, 并根据蔗渣酶解结果配制相应的培养基, 配方见表 1, 葡萄糖浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Tween80 的添加量由酶解中原始添加量扣除甘蔗渣对 Tween80 的吸附量^[20]计算获得。以相同的接种量将小球藻接入不同的培养基中, 置于 25°C , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 120 h, 每组试验重复两次, 每隔 24 h 取样, 测定其生物量及培养液中葡萄糖含量, 结果见图 1, 图中曲线随时间延长呈增长趋势的为生物量, 呈降低趋势的为葡萄糖浓度。

从图 1(a)中可以看出, 不同试验组中小球藻生物量均在 48 h 达到最大; 未添加 Tween80 的合成培

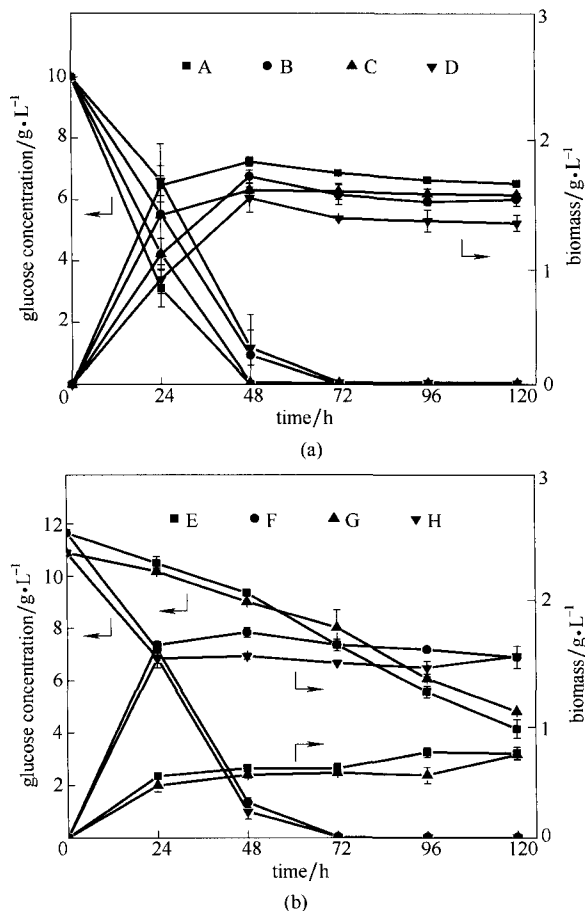


图 1 小球藻在合成培养基 (a) 和蔗渣酶解液 (b) 中生物量的变化及培养体系中葡萄糖含量的变化(A~H 与表 1 对应)
Fig.1 Biomass of *Chlorella* sp. cultured in synthetic media (a) and enzymatic hydrolyzate of LHW-treated SCB (b), and glucose consumption curve in culture system (A—H are corresponding to those in Table 1)

培养基中葡萄糖含量在 48 h 降到 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 添加 Tween80 的合成培养基中的葡萄糖含量在 72 h 降到 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 且未添加 Tween80 试验组中的小球藻生物量高于添加 Tween80 相应试验组, 可能是因为 Tween80 的存在影响了小球藻对无机异养物质的吸收^[22], 从而抑制了小球藻的生长; 含有木糖和纤维二糖的培养基中小球藻生物量均低于仅含有葡萄糖的培养基, 说明木糖或纤维二糖对小球藻的生长具有抑制作用。据报道^[8,23], 小球藻中存在己糖转运系统, 葡萄糖可以高效诱导己糖转运蛋白的合成, 而戊糖和二糖不能诱导该蛋白的合成, 小球藻对二糖利用率较低, 而木糖可通过磷酸戊糖途径参与小球藻的油脂合成。由此推测很可能是因为纤维二糖在结构上与葡萄糖存在相似, 当葡萄糖激活小球藻中己糖转运蛋白表达后, 纤维二糖结合到转运蛋白

上,降低了其对葡萄糖的转运效率,从而导致了小球藻生物量的下降。

从图 1(b) 中可以看出,小球藻在添加 BG11 的水解液中的生物量在 48 h 达到最大,而在不添加 BG11 的水解液中生物量分别在 72 h 和 96 h 后有所上升;不含 Tween80 的蔗渣水解液中小球藻的生物量也高于含 Tween80 的蔗渣水解液;添加 BG11 的水解液在 72 h 后葡萄糖含量降到 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,未添加 BG11 的水解液中葡萄糖含量在 120 h 分别降到 $4.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.82 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,且小球藻在添加 BG11 的水解液中的生物量是未添加 BG11 的水解液的 2 倍多,说明在异养培养中,无机营养的缺乏会影响小球藻对葡萄糖的同化,从而影响其生物量的积累,这与 Ren 等^[24]的研究结果相同。对比图 1(a)、(b)可以看出,小球藻在仅含有葡萄糖的培养基中的生物量比其他培养基高,最高量为 $1.97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另外,木质纤维素在经高温液态水处理后会产生糠醛、5-羟甲基糠醛等副产物,会抑制微藻生长^[11,25]。有资料表明^[11], $0.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 糠醛、 $1.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-羟甲基糠醛就会抑制微藻的生长。从图 1(a)、(b)可以看出,葡萄糖、木糖和纤维二糖配制的模拟培养基中,小球藻的最高生物量分别为 $1.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (不含 Tween80) 和 $1.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (含 Tween80),而在相应的蔗渣水解液中,小球藻的最高生物量分别为 $1.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (不含 Tween80) 和 $1.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (含 Tween80),说明高温液态水处理的蔗渣经本研究处理后,其副产物如糠醛、5-羟甲基糠醛等未对小球藻的生长造成负面影响。本研究中以液固比 10:1 的量在 50°C 下振荡洗涤经高温液态水处理的甘蔗渣,离心收集洗涤液,采用 HPLC 分析其中的糠醛、5-羟甲基糠醛等副产物,虽然有检测峰出现,但未显示出浓度,说明糠醛、5-羟甲基糠醛等副产物的含量很低,未达到抑制小球藻生长的浓度。

2.3 不同培养基中小球藻的脂肪酸组成及产量

小球藻在不同培养基(表 1)中培养 120 h 后,离心收集样品,冷冻干燥后,称取一定质量的藻粉分析其中脂肪酸组成及含量。总脂肪酸含量(总脂肪酸占生物量的质量分数)见图 2,脂肪酸组成及其含量见表 4。

从图 2 可以看出,虽然在仅含有葡萄糖和 BG11 培养基(A)中培养的小球藻生物量最高,但其总脂肪酸含量不是最高。在含有 Tween80 和 BG11 的蔗渣水解液(H)中培养的小球藻的总脂肪酸含量最高,达到 6.90%。在不含有 BG11 的蔗渣水解液

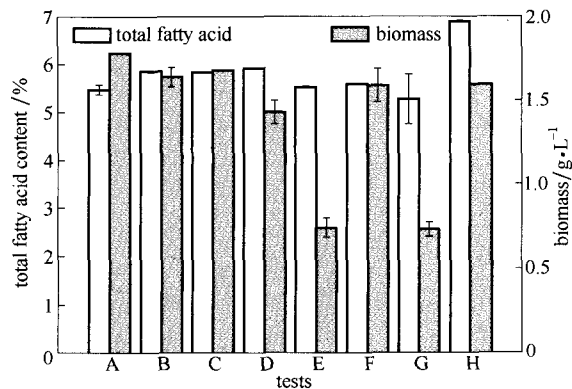


图 2 小球藻在不同培养基中培养 120 h 后的生物量及总脂肪酸含量(A~H 与表 1 对应)

Fig.2 Biomass and total fatty acid content of *Chlorella* sp. cultured in different media for 120 h (A~H are corresponding to those in Table 1)

(不含 Tween80 的 E 和含 Tween80 的 G)中培养的小球藻虽然生物量在所有试验组中最低,但是其总脂肪酸的百分含量与其他试验组接近,分别为 5.54% (E) 和 5.27% (G),说明在小球藻异养培养中,无机营养对其生物量的增加是必需的,而无机营养缺乏对脂肪酸的合成影响较小可能是因为培养体系中乙酸基被小球藻同化用于合成碳水化合物、脂肪酸等物质的碳骨架^[23]。从图 2 还可以看出,在总脂肪酸百分含量接近的条件下,小球藻的生物量越高,则总脂肪酸的产量越高。

从表 4 可以看出,小球藻在所有培养基中产生的脂肪酸以 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{18:3}$ 、 $\text{C}_{20:1}$ 和 $\text{C}_{20:4}$ 为主。在以葡萄糖等标准物配制的培养基中,A (葡萄糖+BG11)、B (葡萄糖+BG11+Tween80) 和 C (葡萄糖+木糖+纤维二糖+BG11), $\text{C}_{18:1}$ 产量最高,其后依次为 $\text{C}_{18:3}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{20:4}$ 和 $\text{C}_{20:1}$, D (葡萄糖+木糖+纤维二糖+BG11+Tween80) 以 $\text{C}_{18:3}$ 产量最高,其后依次为 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{20:4}$ 和 $\text{C}_{20:1}$;在蔗渣水解液配制的培养基中(E、F、G、H), $\text{C}_{18:3}$ 产量最高,在不加 BG11 的蔗渣水解液培养基中(E、G),其后产量由高到低依次为 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{20:4}$ 和 $\text{C}_{20:1}$,在添加 BG11 的蔗渣水解液培养基中(F、H),其后产量由高到低依次为 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 、 $\text{C}_{20:1}$ 和 $\text{C}_{20:4}$,此外,在所有蔗渣水解液培养基中培养的小球藻均检测出 $\text{C}_{14:0}$ 的存在,而在葡萄糖等标准物配制的培养基中培养的小球藻未检测出 $\text{C}_{14:0}$ 的存在,这些说明蔗渣水解液中存在的某些成分(如纤维素酶的降解产物)影响了小球藻的脂肪酸组成,且无机营养物也能影响小球藻的脂肪酸组成。因此,可以根据实际需要

表 4 不同培养基中小球藻的脂肪酸组成及其占总脂肪酸的比重

Table 4 Fatty acid compositions and yields in *Chlorella* sp. cultured in different media

Fatty acids	Proportion in total fatty acid/%							
	A	B	C	D	E	F	G	H
C _{14:0}	ND	ND	ND	ND	3.23	3.15	3.67	2.52
C _{14:1}	0.00	0.73	0.00	0.00	0.61	0.00	0.00	0.29
C _{16:0}	14.96	15.26	15.34	14.85	19.42	18.10	19.13	13.60
C _{16:1}	0.00	0.00	0.00	ND	ND	0.00	0.00	1.94
C _{18:0}	4.87	4.79	4.66	5.53	6.00	5.82	6.20	4.87
C _{18:1}	30.47	30.03	27.84	25.23	16.51	18.82	16.01	13.88
C _{18:2}	5.90	5.12	5.00	5.31	3.81	5.17	3.81	4.56
C _{18:3}	23.54	20.22	22.65	25.61	26.96	36.84	26.85	32.97
C _{20:1}	9.01	10.46	10.70	10.78	11.75	11.99	12.47	11.25
C _{20:2}	4.79	7.19	8.08	7.48	6.39	5.67	7.14	6.57
C _{20:4}	9.54	11.14	13.82	13.64	13.75	10.65	16.13	11.05
C _{20:3}	2.24	2.30	5.29	3.09	5.71	1.66	5.65	4.75
C _{20:5}	3.25	3.31	0.00	3.22	3.55	3.25	4.94	3.61
C _{22:0}	1.07	0.90	1.86	0.00	0.74	0.00	0.82	0.68
C _{24:0}	0.00	0.00	0.10	0.11	0.00	0.12	0.00	0.00
C _{22:6}	5.31	4.54	0.00	0.00	4.83	0.00	0.00	3.86

Note: ND—no detection. A—H are the same as Table 1.

表 5 生物质水解糖液用于培养小球藻产油的比较

Table 5 Comparison on biomass hydrolyzate used for biodiesel production from *Chlorella* sp.

Components of media	Time/h	Total fatty acid or lipid content ^① /g · L ⁻¹	Ref.
10 g · L ⁻¹ glucose	120	0.10 (total fatty acid) 0.49 (total lipid) ^②	this study
enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse containing 10 g · L ⁻¹ glucose	120	0.11 (total fatty acid) 0.43 (total lipid) ^②	
10 g · L ⁻¹ glucose	120	0.10 (total fatty acid) ^② 0.50 (total lipid)	[8]
enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse containing 10 g · L ⁻¹ reducing sugars	96	0.51 (total fatty acid) ^② 1.97 (total lipid)	
enzymatic hydrolyzate of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> containing 10 g · L ⁻¹ reducing sugars	144	1.91 (total lipid)	[9]
10 g · L ⁻¹ glucose	120	0.40 (total fatty acid) ^② 1.97 (total lipid)	[6]
juice from stem of sweet sorghum containing 10 g · L ⁻¹ glucose	120	0.69 (total fatty acid) ^② 2.68 (total lipid)	
10 g · L ⁻¹ glucose	240	0.28 (total fatty acid) 1.38 (total lipid)	[4]
hydrolyzate of cassava starch containing 10 g · L ⁻¹ glucose	240	0.53 (total fatty acid) 2.05 (total lipid)	

① Total fatty acid or lipid content = biomass of microalgae × percentage of total fatty acid or lipid.

② Calculated by ratio of total fatty acid to total lipid in Ref. [4].

优化培养基配方，提高小球藻中目标产物的产量。

2.4 生物质水解糖液异养培养小球藻产油的比较

通过 2.3 节的讨论可知，无机营养在提高微藻

生物量方面具有重要作用。研究表明^[6]，在小球藻异养培养中不同的有机碳源对生物量的积累有较大影响。表 5 总结了小球藻在不同培养基中异养培养

的生物量及油脂产量情况。从表中可以看出, 本研究所得的微藻生物量及油脂产量最低, 可能的原因是本研究所用培养基无机营养组成未经优化, 且未在培养基中添加有机营养。无机盐如铁盐、镁盐、钙盐、硝酸盐、磷酸盐等和有机营养物如酵母粉、蛋白胨、氨基酸、尿素、维生素等在合适的浓度下均可提高微藻在异养培养中的生物量和总脂肪酸产量^[1,23-24,26]。文献[4,6,8-9]的研究均对无机营养组成进行了优化且添加了有机营养, 文献[4,8]在培养基中添加了尿素, 文献[6]添加了酵母粉、甘氨酸和维生素 B₁, 其营养成分最为丰富, 因此所得油脂产量最高。这也说明了在小球藻异养培养中优化培养基组成可以提高其生物量及油脂产量。

3 结 论

(1) Tween80、纤维二糖会影响小球藻生物量的积累, 添加 BG11 的蔗渣水解液培养小球藻的效果与标准糖液相当, 甚至更好;

(2) 无机营养物能增加小球藻在异养培养中的生物量, 影响小球藻中的脂肪酸组成;

(3) 蔗渣水解液中可能存在某些成分影响小球藻中的脂肪酸组成;

(4) 小球藻的生物量及油脂产量可通过培养基优化得到进一步提高。

References

- [1] KIM D G, HUR S B. Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species [J]. *Algae*, 2013, **28** (1): 101-109.
- [2] MIAO X, WU Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil [J]. *Bioresour Technology*, 2006, **97**: 841-846.
- [3] LI X, XU H, WU Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **98**: 761-771.
- [4] WEI A, ZHANG X, WEI D, et al. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, **36**: 1383-1389.
- [5] HUO S H, WANG Z M, ZHU S N, et al. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China [J]. *Bioresour Technology*, 2012, **121**: 76-82.
- [6] GAO C, ZHAI Y, DING Y, et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Applied Energy*, 2010, **87**: 756-761.
- [7] ESPINOSA-GONZALEZ I, PARASHAR A, BRESSLER D C. Heterotrophic growth and lipid accumulation of *Chlorella protothecoides* in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production [J]. *Bioresour Technology*, 2014, **155**: 170-176.
- [8] MU J, LI S, CHEN D, et al. Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Bioresour Technology*, 2015, **185**: 99-105.
- [9] GUI X, WANG G, LI X, et al. Fungus-assisted mild acid pretreatment of *Glycyrrhiza uralensis* residues to enhance enzymatic hydrolysis and oil production by green microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, **62**: 466-473.
- [10] MALHERBE S, CLOETE T E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications [J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2002, **1**: 105-114.
- [11] MIAZEK K, REMACLE C, RICHEL A, et al. Effect of lignocellulose related compounds on microalgae growth and product biosynthesis: a review [J]. *Energies*, 2014, **7**: 4446-4481.
- [12] ALVIRA P, TOMÁS-PEJÓ E, BALLESTEROS M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review [J]. *Bioresour Technology*, 2010, **101**: 4851-4861.
- [13] GARROTE G, DOMÍNGUEZ H, PARAJÓ J C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials [J]. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 1999, **57**: 191-202.
- [14] WANG W, ZHUANG X S, YUAN Z H, et al. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water [J]. *Bioresour Technology*, 2012, **108**: 252-257.
- [15] GHOSE T K. Measurement of cellulose activities [J]. *Pure & Applied Chemistry*, 1987, **59**: 257-268.
- [16] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Technical Report NREL/TP-510-42618 [R]. 2008.
- [17] WANG W, ZHUANG X S, YUAN Z H, et al. Effect of structural changes on enzymatic hydrolysis of eucalyptus, sweet sorghum bagasse, and sugarcane bagasse after liquid hot water pretreatment [J]. *Bioresour Technology*, 2012, **7** (2): 2469-2482.
- [18] 黄伟, 朱顺妮, 王忠铭, 等. 氮缺乏条件下小球藻碳水化合物与脂肪酸的合成规律研究 [J]. *太阳能学报*, 2014, **35** (12): 2559-2564.
- [19] HUANG W, ZHU S N, WANG Z M, et al. Synthesis patterns of carbohydrate and fatty acid under nitrogen starvation in microalgae *Chlorella zofingiensis* [J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 2014, **35** (12): 2559-2564.
- [20] WANG W, ZHUANG X, YUAN Z, et al. Highly efficient conversion of sugarcane bagasse pretreated with liquid hot water into ethanol at high solid loading [J]. *International Journal of Green Energy*, 2014, DOI:10.1080/15435075.2014.961467.
- [21] 王闻, 庄新姝, 袁振宏, 等. 离子及表面活性剂对甜高粱秆渣酶解的影响 [J]. *化工学报*, 2013, **64**: 3767-3774.
- [22] WANG W, ZHUANG X S, YUAN Z H, et al. Effects of ions and surfactant on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse [J]. *CIESC Journal*, 2013, **64**: 3767-3774.
- [23] 姚兰, 赵建, 谢益民, 等. 木质素结构以及表面活性剂对木质素吸附纤维素酶的影响 [J]. *化工学报*, 2012, **63**: 2612-2616.

- YAO L, ZHAO J, XIE Y M, *et al.* Effect of lignin structure and surfactant on cellulase adsorption by lignin [J]. *CIESC Journal*, 2012, **63**: 2612-2616.
- [22] 周晓见. 表面活性剂对海洋微藻的生理生化影响 [D]. 大连: 大连海事大学, 2000.
- ZHOU X J. The research to the effect to ocean micro-algal on physio-chemistry by surface active agent [D]. Dalian: Dalian Marine University, 2000.
- [23] PEREZ-GARCIA O, ESCALANTE F M E, DE-BASHAN L E, *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products [J]. *Water Research*, 2011, **45**: 11-36.
- [24] REN H Y, LIU B F, KONG F Y, *et al.* Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition [J]. *Bioresource Technology*, 2014, **169**: 763-767.
- [25] YU Q, ZHUANG X S, YUAN Z H, *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **144**: 210-215.
- [26] AZMA M, MOHAMED M S, MOHAMAD R, *et al.* Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, **53**: 187-195.