

## 纱布固定丛粒藻细胞产烃的研究

杨康婉 王修垣

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用纱布作固相载体, 研究了富含烃的群生绿藻——丛粒藻 (*Botryococcus braunii* Kütz.) 细胞的直接吸附。结果表明, 纱布是固定化这类细胞维持生长(生物量)和光合活性(释放  $O_2$ ) 的良好新载体。固定在纱布上的 *B. braunii* 细胞产烃速度比得上游离细胞。它们产生相同的烃类, 主要是  $C_{21}$ — $C_{31}$  的奇碳数的二烯同系物。在气升式培养条件下, 主要胞外烃的分布不受固定化的影响。在光照摇床上培养 14 天, 固定在纱布上的 *B. braunii* 的  $O_2$  释放量、生物量和产烃量分别为  $1.84\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ 、 $1.44\text{g}/\text{L}$  和  $0.82\text{g}/\text{L}$ , 与游离细胞的相似。

扫描电镜的观察指出, 固定化的丛粒藻细胞附着在纱布的表面; 在观察期间, 其形态与游离细胞的相似。

**关键词** 丛粒藻; 烃的生产; 固定化细胞

微生物合成烃类的研究始于本世纪 30—40 年代, 主要目的在于阐明微生物在石油形成和有机物富集过程中的作用。随着气相色谱技术的发展, 使微量烃类的定性和定量分析较为简易可行, 从而促进了查明微生物细胞烃类组份作为其分类特征的研究的发展。现已查明, 在藻类(绿藻、蓝绿藻、红藻、褐藻和硅藻)、光合细菌和非光合细菌、真菌和酵母菌中均有许多种具有合成微量烃类的能力<sup>[1]</sup>, 而以淡水生的丛粒藻 (*B. braunii* Kütz., 又译葡萄藻)<sup>[2-3]</sup> 和海水生的盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*)<sup>[6]</sup> 的产烃量高。

群生的绿藻 *B. braunii* 是广泛分布于内陆水域的世界性浮游藻类, 已在外国和我国北部湾沿岸、渤海湾沿岸等地的第三纪石油有机物沉积中发现了这种藻类的化石<sup>[7-9]</sup>。该藻含石油烃类高达 15—75% (细胞干重)<sup>[4,5]</sup>, 故又称为“油藻”。有报告指出, 在有石油沉积的地方, 几乎所有的有机质都是由 *B. braunii* 造成的<sup>[10]</sup>。由于该藻有可能提供用作燃料或原料的可再生

烃类和蛋白质, 有些国家已有专门的研究单位进行研究<sup>[5,7,9,10]</sup>我国至今尚未见到与此有关的报告。

本文报道固定在纱布上的 *B. braunii* 细胞的形态、生长、光合活性和烃的生产。

### 材料和方法

#### (一) 藻株

试验用的藻株 *B. braunii* Kütz. 购自本院武汉水生生物研究所。

#### (二) 载体

纱布用于固定藻类细胞的载体, 是北京市卫生材料厂的产品。将纱布剪成边长约 5mm 的小块, 用蒸馏水洗净, 置 80℃ 干燥备用。

#### (三) 培养基和培养条件

1. 游离细胞的接种和培养: 在 250ml 三角瓶内装 70ml 改良的 CHU3 培养基<sup>[10]</sup>, 灭菌后接入在同一培养基中静止培养 1 个月的 *B. braunii* 培养液 30ml, 置旋转式摇床 (100r/min, 偏心距 2.5cm,  $23\pm 2^\circ\text{C}$ ) 光照连续培养 (日光灯  $25\text{W}/\text{m}^2$ ) 10—14 天。以无菌操作将培养液离心 2000r/

本文于 1988 年 4 月 25 日收到。

min, 10min。弃去上清液,加少量无菌生理盐水配成浓的藻细胞悬浮液(约含藻细胞 5mg/ml)作为接种物。取此悬浮液 5ml 接入装有 95ml 培养液的三角瓶中,置上述摇床条件下培养。

2. 固定化细胞的制备和培养: 向装有 95ml 培养液和 1.5g 纱布小块的 250ml 三角瓶中接入上述浓的藻细胞悬浮液 5ml, 置上述摇床条件下培养 10—14 天,游离的藻细胞被吸附到载体上成为固定化细胞接种物。以无菌手续将此培养液倒入布氏漏斗中抽滤,用无菌生理盐水淋洗 1—2 次固定化的藻细胞后,将它接入含有 95ml CHU<sub>3</sub> 培养液的 250ml 三角瓶中,置同样的摇床条件下培养。

3. 气升式培养: 将游离细胞和固定化细胞接种物分装到含有 100ml 培养液的玻璃管 (3.5 × 30cm) 内,置 25℃ 恒温箱内光照通气培养。无菌的空气中含有 1% CO<sub>2</sub>,从玻璃管的底部通入,气量约为 5L/h。光照密度约为 460μE/m<sup>2</sup>/min。

#### (四) 测定方法

1. O<sub>2</sub> 的测定: 参照 Bailliez 等<sup>[11]</sup>的方法,用 YS153 型 O<sub>2</sub> 电极检测器测定。

2. 细胞干重的测定: 取 5ml 游离细胞培养液和含有 0.1g 载体的固定化细胞,分别在恒重的滤纸上抽滤后,加 30ml 蒸馏水洗涤,置 80℃ 干燥 1 天,称其干重。

3. 烃类的分析: 胞外烃的提取及纯化方法见文献<sup>[10]</sup>。烃组份的分析用 H.P 5890 气相色谱仪进行,以正-三十碳烷作为内标物。

4. 形态观察: 取 *B. braunii* 的游离细胞和固定化细胞分别放入含有 6% 蔗糖的 0.1mol/L

磷酸缓冲液 (pH 7.2) 中,加 1% 戊二醛,置 4℃ 冰箱中处理 1 天;再用含有 12% 蔗糖的 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗 3 次。洗涤后的细胞放入含有 1% 钨酸的上述缓冲液中,室温处理 2 小时,用同一缓冲液洗 3 次;再用一系列不同浓度 (50、70、80、90 和 100%) 的乙醇依次各脱水 15min。样品经临界点 CO<sub>2</sub> 干燥、溅射镀金后,置日本日立 S-570 扫描电镜下观察。

## 结果和讨论

### (一) 形态观察

*B. braunii* 的游离细胞和固定化细胞在摇床上振荡培养 21 天,按前述方法处理后,置扫描电镜下观察。可以看出,该藻的两种培养物均形成 2 个、4 个或更多个细胞联系在一起的群体(图版 1)。固定在纱布纤维上的(图版 I-A)细胞形态与其游离细胞(图版 I-B)无明显区别,表明这种载体对该藻的形态无显著影响。

### (二) *B. braunii* 的生长和光合活性

在培养期间每隔 1 周测定培养物中的生物量和释放的 O<sub>2</sub> 量 (表示光合活性)。结果表明,固定在纱布纤维上的 *B. braunii* 的生物量和释放的 O<sub>2</sub> 量均与其游离细胞的相类似(表 1, 2)。固定在纱布上的细胞培养 14 天,氧的释放和生物量均达到最高,分别为 1.84 μmol/min/L (游离细胞

表 1 固定在纱布上的 *B. braunii* 细胞及其游离细胞释放氧量随培养时间的变化  
Table 1 Variations in O<sub>2</sub> evolution, against culture duration, of *B. braunii* cells immobilized on cotton gauze and of its free cells

试 验 Test	氧 的 释 放 O <sub>2</sub> evolution (μmol/min/L culture)			
	0(d)	7(d)	14(d)	21(d)
游离细胞对照 Free cell control	0.42	1.48	1.80	1.54
固定在纱布上的细胞 Cells immobilized on cotton gauze	0.42	1.36	1.84	1.60

表2 固定在纱布上的 *B. braunii* 细胞及其游离细胞的干重随培养时间的变化  
Table 2 Variations in biomass, against culture duration, of *B. braunii* cells immobilized on cotton gauze and of its free cells

试 验 Test	生 物 量 干 重 Dry biomass (g/L culture)			
	0(d)	7(d)	14(d)	21(d)
游离细胞对照 Free cell control	0.30	0.68	1.40	0.95
固定在纱布上的细胞 Cells immobilized on cotton gauze	0.30	0.66	1.44	0.98

表3 丛粒藻的烃产量  
Table 3 Hydrocarbon yields produced by *B. braunii*\*

试 验 Test	总生物量干重 Total biomass (dry weight; g/L culture)	烃 产 量 Hydrocarbon yield (g/L culture)	总烃水平 Total hydrocarbon yield (as % of the biomass)
游离细胞对照 Free cell control	4.1	0.84	20.6
在纱布上的细胞 Cells on cotton gauze	3.8	0.82	21.3

\* 起始细胞干重为 0.32g/L。接种物培养在气升式条件下 21 天。

\* The initial dry cells were 0.32 g/L culture. The samples were incubated at 25°C for 21 days under air-lift culture conditions.

表4 丛粒藻产生的主要胞外烃类的性质和分布  
Table 4 Nature and distribution of the major external hydrocarbon produced by *B. braunii*\*

试 验	相 对 丰 度 Relative abundances (%)					
	2ΔC <sub>25</sub>	2ΔC <sub>27</sub>	2ΔC <sub>29</sub>	3ΔC <sub>29</sub>	2ΔC <sub>31</sub>	3ΔC <sub>31</sub>
游离细胞对照 Free cell control	1.5	10.9	44.5	15.8	24.6	2.7
在纱布上的细胞 Cells on cotton gauze	1.5	10.8	41.3	15.9	28.2	2.5

\* 样品在 25°C、气升式条件下培养 21 天。

\* The samples were incubated at 25°C for 21 days under air-lift culture conditions.

为 1.80 μmol/min/L, 表 1) 和 1.44g/L (游离细胞为 1.40g/L, 表 2), 至 21 天略有下降。

### (三) 烃的产量及其成分

固定在纱布纤维上的 *B. braunii* 在气升式培养条件下培养 21 天, 烃产量为 0.82g/L, 总烃水平超过 20% 生物量, 与游

离细胞的相近(表 3)。

固定在纱布载体上的 *B. braunii* 细胞及其游离细胞胞外烃类的气相色谱分析结果表明, 它们产生的烃类的组份相同, 而相对丰度略异(表 4, 图 1)。该藻产生的胞外烃是同系的奇数 C 不分枝的烯烃: 从 C<sub>25</sub> 到 C<sub>31</sub> 的二烯烃和 C<sub>29</sub> 及 C<sub>31</sub> 的三烯

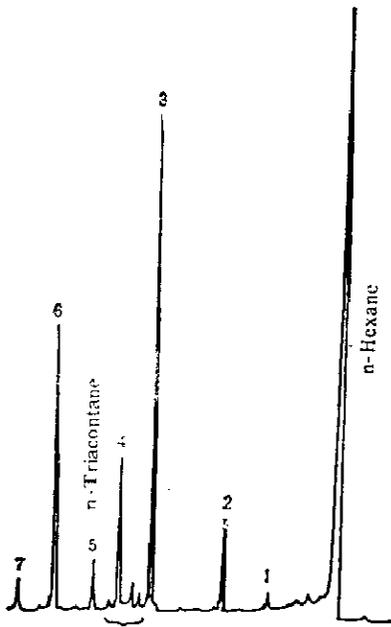
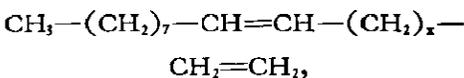


图1 *B. braunii* 产生的烃类组份的气相色谱在气升式批式培养条件下 25°C 培养 21 天

Fig. 1 Gas chromatogram of the hydrocarbon constituents produced by *B. braunii* under air-lift batch condition at 25°C for 21 days  
1.  $2\Delta C_{25}$ ; 2.  $2\Delta C_{27}$ ; 3.  $2\Delta C_{29}$ ; 4.  $3\Delta C_{29}$ ; 5. *n*-三十烷作为内标物 *n*-triacontane as internal reference; 6.  $2\Delta C_{31}$ ; 7.  $3\Delta C_{31}$

烃的衍生物。各组份的相对丰度从高到低依次为： $2\Delta C_{29}$  (>40%)， $2\Delta C_{31}$  (>20%)， $3\Delta C_{29}$  (>15%)， $2\Delta C_{27}$  (>10%)， $3\Delta C_{31}$  和  $2\Delta C_{25}$  (二者均 <3%)。烃的产量比 Largeau 等<sup>[18]</sup>和 Bailliez 等<sup>[16]</sup>报道的结果分别高出约 1 和 4 倍。

Bailliez 等<sup>[16]</sup>提出，丛粒藻产生的主要烃类的通式为：



对于  $C_{25}$ 、 $C_{27}$ 、 $C_{29}$  和  $C_{31}$  的二烯烃， $x$  分别为 13、15、17 或 19。我们将在今后的工作中进行验证。

以前关于 *B. braunii* 产烃的研究主要涉及它的形态结构、营养要求及烃类组份等<sup>[2,3,10-15]</sup> Hillen 和 Wake<sup>[5,7]</sup> 根据他

们对澳大利亚达尔文河水库中 *B. braunii* 的研究结果估算，该藻在水库中的产油率可达每年每公顷 35 吨。若用 100 万公顷养殖这种藻类，每年可提供 3500 万吨烃类。他们还从成本核算上论证了它的合理性。近几年来，Bailliez 等<sup>[16,17]</sup>和 Largeau 等<sup>[18]</sup>先后报道了用海藻酸钙凝胶和聚氨基甲酸乙酯泡沫塑料作为载体固定 *B. braunii* 细胞产烃的研究结果。我们将该藻固定在纱布上并与其游离细胞相比较，通过形态观察、生物量、光合活性和产烃量的测定表明，该藻细胞直接吸附在纱布纤维的表面上；其产烃量接近游离细胞的，并高于上述两种载体固定化细胞的。从而证明，纱布适于作为固定该藻生产烃类的一种新载体。它之所以优于文献中已报道的两种载体，可能是由于后者有些毒性，透光性差；而纱布则是天然棉花的织物，无毒性，表面有许多棉纤维便于细胞附着。纱布又是薄薄的片状，透光度较好。它还具有制备简单、价格便宜等优点。因此，纱布有可能是一种用于连续生产烃类的新载体，值得进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Дедюхина Э. Г., В. К. Ерошин: Успехи соврем. Биол., 76(3):351—362, 1973.
- [2] Maxwell, J. R. et al.: *Phytochem.*, 7: 2157, 1968.
- [3] Brown, A. C. et al.: *ibid.*, 8: 543, 1969.
- [4] Weete, J. D.: *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes* (ed. Kolattukudy, P. E.), Elsevier, Amsterdam, p. 350, 1976.
- [5] Hillen, L. W. et al.: Solar Oil-Liquid Hydrocarbon Fuels from Solar Energy Via Algae. Aie National Conference, Newcastle, 5—9, Feb., 1979.
- [6] Tornabene, T. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96: 1349, 1980.
- [7] Wake, L. V. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22(8): 1637—1656, 1980.
- [8] 何承全: 古生物学报, 20(2): 115—125, 1981.
- [9] 周光甲等: 第二届有机地球化学讨论会论文集, 石油工业出版社, p. 177—190, 1984.

- [10] Largeau, C. et al.: *Phytochem.*, **19**: 1043—1051, 1980.
- [11] Largeau, C. et al.: *ibid.*, **19**: 1081—1085, 1980.
- [12] Schnepf, E. et al.: *Bot. Jahrb.*, **99**: 370, 1978.
- [13] Gelpi, E. et al.: *Science*, **161**(3842): 700—702, 1968.
- [14] Gelpi, E. et al.: *Phytochem.*, **9**: 603, 1970.
- [15] Knights, B. A. et al.: *ibid.*, **9**: 1317, 1970.
- [16] Bailliez, C. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 99—105, 1985.
- [17] Bailliez, C. et al.: *ibid.*, **23**: 361—366, 1986.
- [18] Largeau, C. et al.: Proceedings of International Congress of the Applied Algalogy Society. Marine, France, p. 1—9, 1987.

## STUDIES ON THE HYDROCARBON PRODUCTION BY *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* CELLS IMMOBILIZED ON COTTON GAUZE

Yang Lianwan Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Direct adsorption of the hydrocarbon rich green colonial alga *Botryococcus braunii* Kützigg cells was examined by using the cotton gauze as solid support. The results indicated that the cotton gauze was a novel good material for immobilization of this type of cells to support both growth (biomass) and photosynthetic activity ( $O_2$  evolution). *B. braunii* cells immobilized on the cotton gauze produced hydrocarbon at a rate comparable to that of free cells. They produced the same hydrocarbons, chiefly a series of homologous dienic unbranched compounds with odd carbon number from  $C_{25}$  to  $C_{31}$  and distribution of the major external hydrocarbons were not affected by immobilization. under air-lift

culture conditions. During 14 days on a shaker culture in light, the biomass,  $O_2$  evolution and hydrocarbon production of the *B. braunii* cells immobilized on cotton gauze were 1.44 g/L, 1.84  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$  and 0.82 g/L, respectively.

Scanning electron microscopy showed that the immobilized *B. braunii* cells were adhering to the surface of cotton gauze with the same morphological structure as that of its free cells at the stage observed.

### Key words

*Botryococcus braunii* Kützigg; Hydrocarbon production; Immobilized cells

### 图版说明

Explanation of plate

*B. braunii* (21天)的扫描电镜摄影

A. 固定在纱布上的细胞; B. 游离细胞 600 $\times$

Scanning electron micrographs of *B. braunii* cells after 21 days

A. Cells on cotton gauze; B. Free cells. 600 $\times$