

# 15% CO<sub>2</sub>胁迫下雨生红球藻积累油脂制生物柴油

李珂, 程军, 仇亿, 田江磊, 周俊虎, 岑可法

(浙江大学能源清洁利用国家重点实验室, 杭州 310027)

**摘 要:** 采用经<sup>60</sup>Co-γ射线核辐射诱变和15% CO<sub>2</sub>驯化后的雨生红球藻突变藻株为对象, 研究15% CO<sub>2</sub>对雨生红球藻制备生物柴油潜力的影响。结果表明: 随着高光照和15% CO<sub>2</sub>协同胁迫时间的延长, 油脂合成相关乙酰辅酶A羧化酶、β-酮酰基-ACP缩合酶Ⅲ和二酰基甘油酰基转移酶相对表达量分别提高至初始水平的1.2、1.4和1.3倍。15% CO<sub>2</sub>胁迫下雨生红球藻饱和油脂含量由2% CO<sub>2</sub>条件下的33.0%升至35.2%。15% CO<sub>2</sub>胁迫下雨生红球藻细胞孔径增大15%, 孔面积增加2.3倍。萃取虾青素后的雨生红球藻渣亲水性指数为4.98, 高于未处理生物物质的亲水性指数。差示扫描量热分析(DSC)结果表明, 藻渣制备的生物柴油的结晶度和熔点分别为-1.3℃和6.1℃。

**关键词:** 生物柴油; 微藻; 碳捕集; 基因表达; 雨生红球藻; 细胞孔隙度

中图分类号: TK6

文献标志码: A

## 0 引 言

在全球温室效应恶化和化石能源短缺的双重压力下, CO<sub>2</sub>捕集与封存技术和替代能源的开发受到广泛关注。其中, 微藻因其较高的固碳效率和可持续的碳循环利用成为热点之一。微藻固碳效率是陆生植物的10~50倍, 被吸收的CO<sub>2</sub>转化为生物质, 可用于制备生物柴油等可持续能源。然而, 目前生物柴油成本远高于柴油, 是阻碍其工业化应用的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。而在微藻的产业化养殖中, 40%的能耗用于空气泵持续提供空气, 维持微藻生长。因此, 不少研究致力于采用烟气养殖微藻, 提高生产效率并降低生产成本<sup>[3-4]</sup>。此外, 采用微藻分级利用、高附加值产品与生物柴油多联产生工艺也是降低生物柴油的生产成本, 促进其商业化的有效手段之一。

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是目前投入虾青素商业化应用的唯一藻类。雨生红球藻细胞脂类的合成和积累研究表明: 雨生红球藻中含有较高的油酸含量(C18:1), 是制备生物柴油最合适的有效成分, 同时雨生红球藻中的虾青素可增强油脂的抗氧化性, 稳定性更高, 更有利于生物柴油的运输和使用<sup>[5-7]</sup>。因此, 雨生红球藻是一种极具潜力的生物柴油原料<sup>[8]</sup>。然而, 烟气浓度CO<sub>2</sub>对雨生红球藻生物柴油特性的影响和萃取虾青素后的藻渣制取生物柴油的潜力仍未可知。

## 1 材料与方 法

### 1.1 雨生红球藻藻种和培养条件

本实验采用的雨生红球藻藻种为经<sup>60</sup>Co-γ射线核辐射诱变和15% CO<sub>2</sub>驯化后的突变藻株<sup>[9]</sup>。在绿色阶段(营养生长), 采用BBM(Bold's Basal Medium)培养基培养, 在25℃, 低光照强度3500 lux条件下培养7 d, 其间持续不断通入2%或15% CO<sub>2</sub>, 通气量为40 mL/min; 在红色阶段(高光诱导诱导虾青素和油脂积累), 将营养生长7 d后的雨生红球藻转入高光强13000 lux条件下培养, 其间持续不断通入2%或15% CO<sub>2</sub>, 通气量为120 mL/min。

### 1.2 雨生红球藻成分测定

生物质干重采用重量法测定。将在红色阶段培养15 d的雨生红球藻离心收获, 经去离子水洗涤2遍后, 放入设定温度为80℃的烘箱中, 烘干24 h, 称量其生物质干重。

油脂采用称重法测定。向收获后的藻泥中加入甲醇、氯仿和硫酸后, 置于90℃条件下反应6 h, 冷却至室温后, 加入氯仿和去离子水, 震荡离心后去下层含油溶液, 置于60℃烘箱中烘至恒重, 称重得油脂重量。采用配置HP-INNOWAX柱子及氢火焰离子化检测器的Agilent 7890A气相色谱进行油脂成分分析。

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 国家重点研发项目(2016YFE0106700); 国家自然科学基金(51476141)

通信作者: 程军(1974—), 男, 博士、教授、博士生导师, 主要从事生物质能及CO<sub>2</sub>减排利用方面的研究。juncheng@zju.edu.cn

### 1.3 酯交换制备生物柴油工艺

雨生红球藻生物柴油采用湿藻生物质微波辅助酯交换工艺制备,该工艺不仅可降低干燥微藻生物质所需能耗,而且可将油脂萃取和转化的过程一步完成,简化了生物柴油的制备工艺。具体制备过程为:将 1.0 g 雨生红球藻湿藻或萃取虾青素后的藻渣生物质放入微波消解罐,然后向消解罐中加入 8 mL 氯仿,8 mL 甲醇,0.4 mL 浓硫酸(98%),置于微波消解仪中进行酯交换及酯化。萃取条件为 600 W 功率下加热到 90 °C,然后在 90 °C,500 W 功率下保持 30 min。将反应物冷却至室温后,加入 8 mL 氯仿及 8 mL 水震荡 5 min 进行生物柴油的萃取。完成油脂萃取后离心分层,将下层含有油脂的氯仿相转移到称量瓶中,在 60 °C 下烘干获得生物柴油。

### 1.4 PCR 分析(实时荧光定量分析)

取红色阶段在 15% CO<sub>2</sub> 条件下培养 0、6、12、24、48、100 h 的雨生红球藻进行 PCR 分析。利用 QuantiFast<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen,德国)在 LightCycler<sup>®</sup> 480 II 型荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)上进行反应,依据扩增曲线,计算基因相对表达量。

### 1.5 红外光谱分析(FTIR)

采用 Agilent Nicolet 5700 型红外光谱分析仪在光谱范围 400~4000 cm<sup>-1</sup> 下对冷冻干燥后的雨生红球藻生物质和萃取虾青素后的藻渣进行分析。

### 1.6 差示扫描量热分析(DSC)

采用 TA Q200 型差示扫描量热仪测定雨生红球藻基生物柴油在加热和冷却过程中吸收和放出的热量,升温速率为 10 °C/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 15% CO<sub>2</sub> 对雨生红球藻油脂含量的影响

经 <sup>60</sup>Co-γ 核辐射诱变和 15% CO<sub>2</sub> 驯化后,雨生红球藻生物量干重达到 3.4 g/L,油脂产量为 15.0 g/L。图 1 所示为在 15% CO<sub>2</sub> 和高光照协同胁迫下,油脂和虾青素合成相关基因在时间尺度上的变化规律。结果表明,在暴露于胁迫环境中 12 h 内,脂肪酸合成第一关键酶 ACC(乙酰辅酶 A 羧化酶)的相对表达量提高了 1.25 倍。ACC 利用 ATP 把 CO<sub>2</sub> 转移给乙酰辅酶 A,是脂肪酸合成的第一步。15% CO<sub>2</sub> 条件下,细胞内 CO<sub>2</sub> 浓度较高,促进催化反应的正向进行,从而刺激 ACC 的合成。

启动脂肪酸酰基链合成的 FABH(β-酮酰基-ACP 缩合酶)和甘油三酯合成酶 DGAT(二酰基甘油酰基转移酶)均在暴露于胁迫环境 48 h 后相对表达量上升,分别提高至初始水平的 1.4 倍和 1.3 倍。15% CO<sub>2</sub> 和高光照协同胁迫下与单一高光照胁迫下 FABH 和 DGAT 的变化规律相似,然而在时间尺度上略有延迟<sup>[5]</sup>。在 CO<sub>2</sub> 充足环境中,施加高光照可使生物量在 48 h 内增加 2 倍以上<sup>[10]</sup>。由于合成淀粉效率更高,合成过程中能量耗散更低,能量和碳源首先流向淀粉合成途径,以提高光合作用效率,然后淀粉分解,碳源流向油脂合成途径<sup>[11]</sup>。与油脂合成相关基因表达相似,在 15% CO<sub>2</sub> 和高光照协同胁迫下,雨生红球藻虾青素合成相关基因相对表达量也在暴露于胁迫环境 48 h 后上升,CRTZ(β-胡萝卜素羟化酶),PSY(八氢番茄红素合成酶)和 PDS(八氢番茄红素脱氢酶)分别较初始水平提高 34.8%、35.2%、46.7%。而在 12~24 h 之间,虾青素合成基因均较初始水平有所降低,这可能是由于在此期间细胞快速生长和分裂导致虾青素合成基因表达受到抑制。

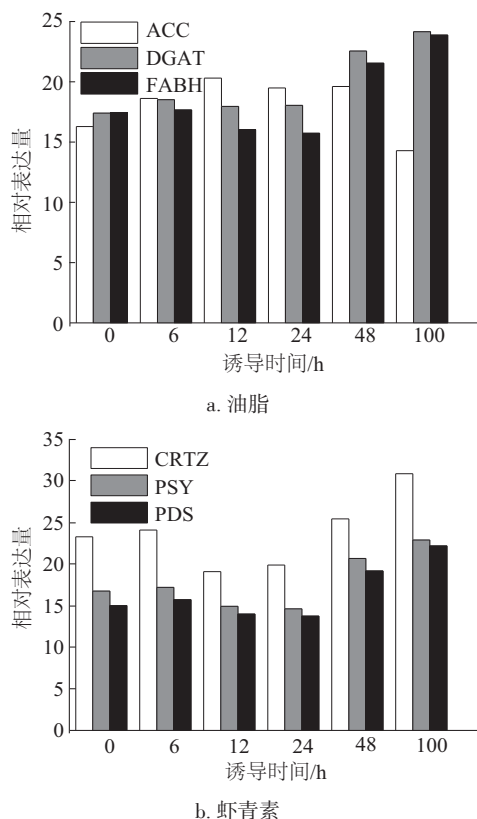


图1 15% CO<sub>2</sub>胁迫下合成相关基因相对表达量随胁迫时间的变化

Fig. 1 Time-dependent transcript expression changes related to lipid and astaxanthin biosynthesis pathways of *H. pluvialis* mutant under 15% CO<sub>2</sub>

雨生红球藻细胞油脂中的脂肪酸碳链以 C16 和 C18 为主,在不同浓度胁迫下积累的脂肪酸比例略有不同(表 1)。在 15% CO<sub>2</sub> 条件下,饱和油脂含量由 2% CO<sub>2</sub> 条件下的 33.0% 升至 35.2%,不饱和油脂含量下降 1.7%。然而 15% CO<sub>2</sub> 胁迫下 C18 链的脂肪酸含量下降 2.7%,这可能是由于脂肪酸碳链由 C16 延长为 C18 的脱碳反应受到了高浓度的 CO<sub>2</sub> 抑制。

表 1 15% CO<sub>2</sub>胁迫下雨生红球藻突变藻株  
积累油脂的主要成分

油脂成分	CO <sub>2</sub> 浓度/%	
	2	15
C16:0	29.36	32.53
C16:1	0.91	0.86
C18:0	3.63	2.64
C18:1	23.35	24.01
C18:2	27.46	24.74
C18:3	12.52	12.90
饱和油脂	33.00	35.20
不饱和油脂	64.20	62.50

## 2.2 15% CO<sub>2</sub>对雨生红球藻细胞孔隙结构的影响

近年来,直接从湿藻中提取油脂已成为微藻油制生物柴油的热门生产工艺,然而湿藻中的水分和致密的细胞壁阻碍了细胞内油脂和萃取剂的接触,导致酯交换效率较低。氮吸附仪对雨生红球藻细胞的比表面积和孔隙分析结果表明(表 2),15% CO<sub>2</sub> 条件下雨生红球藻细胞孔径增大了 15%,孔面积增加了 2.3 倍,而孔体积减小了 37%。这是由于在 15% CO<sub>2</sub> 条件下细胞生长迅速,导致细胞个体变大、细胞壁变薄,因此细胞壁孔隙横向扩大,而纵向缩短。此外,在 15% CO<sub>2</sub> 引起的酸性环境中,藻细胞分泌的膨胀素会引起 H 键的断裂,导致细胞壁多糖分子间结构交织点破裂<sup>[12]</sup>,使细胞壁松弛,孔隙增多。一方面,孔隙增多使 CO<sub>2</sub> 气体(分子直径 0.33 nm)在更多点与细胞壁接触,通过更多的细胞壁通道进入细胞内促进光合作用反应;另一方面,在湿藻制备生物柴油的过程中,让更多甲醇(分子直径 0.43 nm)进入到细胞内部,进行胞内酯交换,将大分子的脂肪酸甘油三酯转化为直链的脂肪酸甲酯,进而提高萃取效率。

表 2 15% CO<sub>2</sub>胁迫对雨生红球藻突变藻株细胞  
孔隙结构的影响

Table 2 Surface area and pore structure of *H. pluvialis* mutant induced with 15% CO<sub>2</sub>

孔隙结构指标	CO <sub>2</sub> 浓度/%	
	2	15
比表面积/m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	0.306	0.310
孔面积/m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	0.53	1.74
孔半径/nm	5.49	6.34
孔体积/cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup>	0.0019	0.0012

## 2.3 萃取虾青素后雨生红球藻藻渣制生物柴油

提取虾青素后的雨生红球藻渣与雨生红球藻微生物物质的 FTIR 对比结果表明(图 2),提取虾青素后,油脂的特征峰(2800~3000 cm<sup>-1</sup>)减弱,这是由于在萃取虾青素的过程中,部分油脂和与游离虾青素酯化的脂肪酸流失;藻渣中亲水性—OH 的特征峰(3400 cm<sup>-1</sup>)的吸收强度明显高于微藻生物质,这可能是由于在提取虾青素过程中,多糖(细胞壁的主要成分)在甲醇中水解,导致—OH 增多。利用 FTIR 不同峰的强度(—OH 特征峰、—COOH 特征峰 1600 cm<sup>-1</sup>, R—H 特征峰 1420 cm<sup>-1</sup> 和 Ar—H 特征峰 3030 cm<sup>-1</sup>)定量计算微藻生物质和藻渣的亲水性指数(计算方法如式(1)所示)<sup>[13]</sup>,得到藻渣的亲水性指数为 4.98,高于微藻生物质的亲水性指数 3.39,更有利于与甲醇的接触。

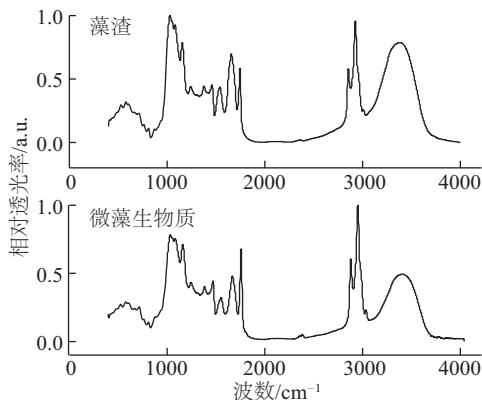


图 2 雨生红球藻藻渣和微藻生物质傅里叶红外吸收光谱  
Fig. 2 FTIR spectra of *H. pluvialis* mutant biomass and biomass residual from astaxanthin extraction

$$\text{亲水性指数} = \frac{\text{透光率}_{\text{COOH}} + 2 \cdot \text{透光率}_{\text{OH}}}{\text{透光率}_{\text{R-H}} + \text{透光率}_{\text{Ar-H}}} \quad (1)$$

## 2.4 雨生红球藻藻渣生物柴油的物理特性

对雨生红球藻生物质和萃取虾青素后藻渣制备的

生物柴油进行 DSC 分析,结果表明藻渣制备的生物柴油的结晶度和熔点分别为-1.3 和 6.1 °C,均高于生物质制备的生物柴油(-6.7 和 3.4 °C)。在雨生红球藻中,约 70%的虾青素以与脂肪酸形成的单酯形式存在,其中,游离虾青素更易于和 C18:1 的脂肪链结合<sup>[14]</sup>。因此,在萃取虾青素过程中,部分不饱和脂肪酸随之流失到萃取液中,进而生物柴油饱和脂肪酸含量提高,结晶度上升<sup>[15]</sup>。微藻生物质制生物柴油的结晶阈值明显大于藻渣制生物柴油的结晶阈值,并且在-125 °C 时,微藻生物质制备的生物柴油开始出现明显的玻璃化转变,而在藻渣制备的生物柴油中,玻璃化转变不明显(图 3)。这说明微藻生物质制备的生物柴油中含有非晶态高分子等其他杂质,而藻渣制备的生物柴油成分更加单一。

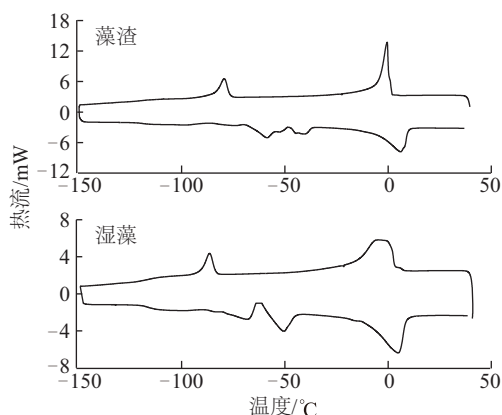


图 3 雨生红球藻生物柴油的 DSC 曲线

Fig. 3 DSC curve of biodiesel derived from biomass of *H. pluvialis* mutant

### 3 结 论

本文采用 15% CO<sub>2</sub>(一般燃煤电厂烟气中的 CO<sub>2</sub> 浓度)培养雨生红球藻,研究在此高浓度 CO<sub>2</sub> 条件下雨生红球藻油脂的积累和组成以及细胞孔隙结构变化。研究结果表明,在 15% CO<sub>2</sub> 条件下培养的雨生红球藻细胞壁孔隙直径更大、数量更多,能有效提高细胞内外的传质效率,促进酯交换反应的进行。萃取虾青素后的雨生红球藻渣中仍含有部分油脂,可用于制备生物柴油,实现生物质分级利用,降低生物柴油生产成本。

#### [参考文献]

[1] 杨艳丽. 基于开放池培养的微藻生物柴油经济成本分析[J]. 太阳能学报, 2015, 36(2): 295-304.  
YANG Y L. Economic cost analysis of biodiesel from microalgae cultivated in open pond [J]. Acta energiae

solaris sinica, 2015, 36(2): 295-304.

- [2] 朱顺妮, 王亚杰, 黄伟, 等. 缺氮培养对小球藻碳水化合物和油脂积累的影响[J]. 太阳能学报, 2016, 37(8): 2118-2122.  
ZHU S N, WANG Y J, HUANG W, et al. Effect of nitrogen starvation cultivation on carbohydrate and lipid accumulation in *Chlorella* sp. [J]. Acta energiae solaris sinica, 2016, 37(8): 2118-2122.
- [3] BHAKTA J N, LAHIRI S, PITTMAN J K, et al. Carbon dioxide sequestration in wastewater by a consortium of elevated carbon dioxide-tolerant microalgae [J]. Journal of CO<sub>2</sub> utilization, 2015, 10: 105-112.
- [4] CHENG J, HUANG Y, FENG J, et al. Mutate *Chlorella* sp by nuclear irradiation to fix high concentrations of CO<sub>2</sub> [J]. Bioresource technology, 2013, 136: 496-501.
- [5] GWAK Y, HWANG Y, WANG B, et al. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(15): 4317-4334.
- [6] SAHA S K, MCHUGH E, HAYES J, et al. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource technology, 2013, 128: 118-124.
- [7] KNOTHE G. "Designer" biodiesel: optimizing fatty ester (composition to improve fuel properties [J]. Energy & fuels, 2008, 22(2): 1358-1364.
- [8] CECILIA D M, POPOVICH C A, CONSTENLA D, et al. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock [J]. Bioresource technology, 2010, 101(11): 3801-3807.
- [9] CHENG J, LI K, YANG Z B, et al. Gradient domestication of *Haematococcus pluvialis* mutant with 15% CO<sub>2</sub> to promote biomass growth and astaxanthin yield [J]. Bioresource technology, 2016, 216: 340-344.
- [10] CHENG J, LI K, ZHU Y X, et al. Transcriptome sequencing and metabolic pathways of astaxanthin accumulated in *Haematococcus pluvialis* mutant under 15% CO<sub>2</sub> [J]. Bioresource technology, 2017, 228: 99-105.
- [11] LI Y T, SOMMERFELD M, CHEN F, et al. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) [J]. Journal of applied phycology, 2010, 22(3): 253-263.



- [12] GROSS W. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments[J]. *Hydrobiologia*, 2000, 433(1-3): 31-37.
- [13] XIA W C, YANG J, LIANG C, et al. The effects of conditioning time on the flotation of oxidized coal [J]. *Energy sources part A-recovery utilization and environmental effects*, 2014, 36(1): 31-37.
- [14] CHEN G Q, WANG B B, HAN D X, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) [J]. *Plant journal*, 2015, 81(1): 95-107.
- [15] 罗文, 袁振宏, 谭天伟, 等. 生物柴油理化性质与组分关系的研究[J]. *太阳能学报*, 2008, 29(7): 878-882.
- LUO W, YUAN Z H, TAN T W, et al. Study on the relationship between the fuel properties and components of biodiesel [J]. *Acta energiae solaris sinica*, 2008, 29(7): 878-882.

## POTENTIAL USE OF ACCUMULATING LIPID AS A BIODIESEL FEEDSTOCK *Haematococcus pluvialis* INDUCED BY 15% CO<sub>2</sub>

Li Ke, Cheng Jun, Qiu Yi, Tian Jianglei, Zhou Junhu, Cen Kefa

(State Key Laboratory of Clean Energy Utilization, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** The potential use of lipid in *Haematococcus pluvialis* mutant induced with 15% CO<sub>2</sub> as a biodiesel feedstock was discussed in this study, and the *H. pluvialis* mutant was isolated from <sup>60</sup>Co-γ irradiated strains and domesticated with 15% CO<sub>2</sub>. The results show that with time-series transcript level change under 15% CO<sub>2</sub>, the expression of ACC, FABH and DGAT are upregulated by 1.2-, 1.4- and 1.3-fold, respectively. The saturated lipid content of the *H. pluvialis* induced with 15% CO<sub>2</sub> is 35.2%, which is higher than that with 2% CO<sub>2</sub> (33.0%). The pore diameter and pore area of *H. pluvialis* under 15% CO<sub>2</sub> increases by 15% and 2.3-fold, respectively, compared with that under 2% CO<sub>2</sub>. The hydrophilicity index of biomass residual from astaxanthin extraction is 4.98. The crystallization temperature and melting temperature of the biodiesel from the biomass residual are -1.3 and 6.1 °C, respectively.

**Keywords:** biodiesel; algae; carbon capture; gene expression; *Haematococcus pluvialis*; pore structure