

# 利用纤维床反应器驯化原壳小球藻提高对蔗渣水解液耐受性研究

魏东, 陈娇敏, 区影施

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 原壳小球藻可快速利用蔗渣水解液中的可发酵糖, 但水解液中副产物对细胞生长有抑制作用。为了提高其在高浓度水解液中的异养生长能力, 本研究利用纤维床反应器(FBB)驯化细胞, 系统研究了蔗渣水解液的制备及其组成、分批补料培养种子液、FBB中的细胞固定化, 并在FBB中利用水解液为培养基进行细胞驯化。结果表明, 蔗渣经酸解酶解后, 其水解液的主要成分为葡萄糖、木糖、乙酸、纤维二糖和阿拉伯糖, 浓度分别为18.40 g/L、16.17 g/L、6.13 g/L、5.10 g/L和2.29 g/L; 在发酵罐中采用Basal培养基补料分批培养细胞, 117 h后细胞密度可达到12.37 g/L; 将发酵罐与FBB连接并循环培养基33 h后形成了固定化细胞床; 随后以水解液培养基代替Basal培养基, 通过逐级提高水解液培养基浓度来驯化培养固定化细胞, 最终从纤维床上分离获得了能在含有35 g/L葡萄糖的水解液中异养生长的高耐受性藻株, 而野生型藻株不能生长。

**关键词:** 蔗渣; 原壳小球藻; 纤维床反应器; 驯化; 耐受性

文章编号: 1673-9078(2015)3-138-143

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.024

## Domestication of *Chlorella protothecoides* for High Tolerance to Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using a Fibrous-bed Bioreactor

WEI Dong, CHEN Jiao-min, OU Ying-shi

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** *Chlorella protothecoides* can rapidly utilize fermentable sugars in sugarcane bagasse hydrolysate (SCBH), but its cell growth is inhibited by by-products in the hydrolysate. In this study, to enhance the heterotrophic growth capability in high-concentration SCBH, *C. protothecoides* was cultured in a fibrous-bed bioreactor (FBB). The preparation and components of SCBH, seed culture by batch-fed fermentation, cell immobilization in FBB, and cell domestication in SCBH medium in an FBB were systemically studied. The results showed that after acid hydrolysis and enzymolysis, the main components of SCBH were glucose, xylose, acetic acid, cellobiose, and arabinose with concentrations of 18.40, 16.17, 6.13, 5.10, and 2.29 g/L, respectively. The cell density was up to 12.37 g/L for batch-fed cultures in Basal medium after 117 hours in a fermenter. The immobilized cell bed formed when the medium was recycled for 33 hours after connecting the fermenter with the FBB. Then, the Basal medium was replaced with SCBH medium, and the concentration of the SCBH medium was gradually increased to domesticate the immobilized cells. A highly tolerant strain, which grew heterotrophically in SCBH medium containing 35 g/L glucose, was isolated from the fibrous bed, while the wild-type strain was unable to grow.

**Key words:** sugarcane bagasse; *Chlorella protothecoides*; fibrous-bed bioreactor; domestication; tolerance

随着化石燃料的日益枯竭、气候变化和环境污染的日益加剧, 可再生生物燃料已成为世界各国的研究开发重点<sup>[1]</sup>。生物燃料具有可替代、可再生、无毒、碳排放平衡等优点, 但第一代生物燃料(原料为农作

收稿日期: 2014-07-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划 2013AA066802); 国家海洋局海洋可再生能源专项资金资助项目(GHME2011SN04); 国家973项目(2011CB200901)

作者简介: 魏东(1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事工业生物技术研究开发

物)和第二代生物燃料(原料为木质纤维素基的植物和森林残留物)都存在与人争粮、与农林业争水争地的问题。第三代生物燃料以微藻生物物质为原料, 很多种类的微藻能在露天池塘、废水或发酵罐中生长, 生长速率快, 含油量高, 能利用工业排放二氧化碳光合转化积累油脂, 是一种公认的具有产能、减排应用潜力的生物燃料原料<sup>[2]</sup>。然而, 目前微藻生物燃料的生产成本较高, 主要是因为原料油生产成本低, 离大规模商业化生产还有相当距离, 需要大力研发高效生产技术。

原壳小球藻 (*Chlorella protothocoides*) 是单细胞绿藻—小球藻 (*Chlorella*) 的一种, 具有光合自养 (autotrophic)、混养 (mixotrophic) 和异养 (heterotrophic) 生长能力, 尤其是在利用葡萄糖、乙酸以及其他五碳糖和有机酸作为碳源进行异养发酵时, 能获得较高的生物量和油脂含量, 脂肪酸组成符合生物柴油的要求, 故其生物量是一种优良的生物燃料原料<sup>[3]</sup>。

为了降低异养发酵生产小球藻生物量的成本, 有效途径之一是采用廉价、高效的有机碳源, 这是因为培养基成本约占生产总成本的 50%, 而最佳有机碳源葡萄糖的成本占异养培养基成本的 80%<sup>[4]</sup>。目前, 相关研究专注于木薯淀粉水解液、甜高粱水解液等可替代性原料用于异养培养原壳小球藻<sup>[5-6]</sup>。甘蔗渣是我国华南地区的大宗廉价废弃生物质, 水解后可获得高浓度的可发酵糖, 是一种可代替葡萄糖进行异养发酵原壳小球藻的碳源, 但其水解副产物 (如糠醛、5-羟甲基糠醛等) 可能抑制小球藻的异养生长。因此, 通过驯化获得高耐受性的藻种是利用蔗渣水解液的关键。纤维床生物反应器 (fibrous bed bioreactor, FBB) 是一种固定化细胞反应器, 具有高细胞密度、高比表面积、高渗透性等优势, 不仅能大大提高发酵产率, 而且由于细胞的适应性和自发突变能提高细胞对抑制物的耐受性<sup>[7]</sup>。本文旨在研究利用 FBB 驯化提高原壳小球藻对蔗渣水解液的耐受能力, 获得高耐受性藻株, 为利用高浓度蔗渣水解液进行大规模发酵生产小球藻生物质奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

原壳小球藻 (*Chlorella protothocoides* CS-41) 购自 CSIRO Marine Laboratory (Hobert, Australia); 蔗渣来自广东江门甘蔗化工集团有限公司; 纤维素酶 Accelerase 1500 (CMCase, 2274 U/g; beta-glucosidase, 553 pNPG U/g; xylanase, 982 U/g 蛋白) 购自美国 Genencor 公司; D-阿拉伯糖、D-木糖、纤维二糖为生化试剂, 购自上海聚源生物科技有限公司; 葡萄糖、乙酸、硝酸钠、盐酸、NaOH、Tween 80 均为分析纯。

AL104 型电子天平、SevenEasy 型 pH 计, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Allegra 25R 型高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; DHZ-DA 型恒温摇床, 太仓实验设备厂; BFM-6BII 型高压灭菌锅, 英国 ASTELL 公司; HPLC 系统, 四元梯度泵

1525、示差折光检测器 2414, 美国 Waters 公司; SBA-80 生物传感分析仪, 山东省科学院生物所。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蔗渣酸解-酶解液的制备

按 15% (m/V) 的物料比称取 150 g 超微粉碎蔗渣 (粒径约 100  $\mu\text{m}$ ), 加入 0.10 N HCl 850 mL, 完全震荡混匀, 分装于 2 个 1 L 蓝盖瓶中, 放入灭菌锅中于 121  $^{\circ}\text{C}$  下酸解 20 min。取出冷却到室温, 转移到灭菌的 2 L 三角瓶中, 磁力搅拌下加入固体 NaOH 调节 pH 至 4.80, 随后加入 0.10% (V/V) 的 Tween 80, 再按 0.40 mL/g 蔗渣的剂量加入纤维素酶 Accelerase 1500, 在恒温培养箱内于 50  $^{\circ}\text{C}$ 、磁力搅拌 (150 r/min) 下酶解 48 h。冷却至室温, 静置过滤后得上清液, 利用高效液相色谱 (HPLC) 分析组分及其含量。按此方法制备蔗渣酸解-酶解液 16 L, 其中 12 L 以温度 55~60  $^{\circ}\text{C}$ 、真空度 0.095 MPa 的条件按实验需要进行浓缩, 浓缩和未浓缩的水解液都冻存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱里备用。

#### 1.2.2 小球藻悬浮细胞补料分批培养及其固定化

##### 1.2.2.1 藻种活化及种子液制备

从斜面上挑取一环原壳小球藻藻落, 在 121  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 下灭菌的含 10 g/L 葡萄糖的 Basal 培养基平板上划线, 2000 lux、28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 5 d。从平板上挑取一个单藻落, 接种于装有 100 mL Basal 培养基 (含 10 g/L 葡萄糖) 的 250 mL 三角瓶中, 在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、2000 lux、150 r/min 条件下培养 5 d。

##### 1.2.2.2 悬浮细胞补料分批培养

在 7 L 发酵罐 (发酵罐罐体用锡纸和牛皮纸遮光处理) 中加入葡萄糖浓度为 13.80 g/L 的 Basal 培养基 3 L, 在 121  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 灭菌后, 以 10% 的接种量接入种子液, 在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min、pH 6.50、DO $\geq$ 50% 的条件下发酵培养。待葡萄糖浓度接近 0 时加入补料培养基 (含 60 g/L 葡萄糖、18 g/L 硝酸钠的 Basal 培养基) 进行第二次分批培养, 使初始葡萄糖浓度为 18.60 g/L。继续培养至葡萄糖浓度接近 0 时开始细胞固定化。培养过程中每 10~12 h 取样 10 mL, 离心, 上清液分析葡萄糖浓度, 沉淀藻泥用无菌水离心洗涤 3 次后冷冻干燥, 测定细胞干重。

##### 1.2.2.3 高密度悬浮细胞的固定化

细胞固定化装置如图 1 所示<sup>[8]</sup>, 由 7 L 发酵罐和 0.5 L FBB 组成。将螺旋盘绕在金属网上的纯棉毛巾置入玻璃柱中构成 FBB, 在 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 60 min 后与发酵罐相连, 通过发酵液在发酵罐和 FBB 之间的循环形成

固定化细胞床<sup>[9]</sup>。

第二次分批培养结束时已形成了高密度细胞悬液。再向发酵罐中加入补料培养基使葡萄糖浓度达到 42.50 g/L, 同时将发酵罐与 FBB 连接形成循环回路, 蠕动泵调节培养基循环速率为 20 mL/min, 保持此循环速率 24 h, 之后加大循环速率到 100 mL/min, 直至葡萄糖浓度低于 3 g/L, 形成高密度细胞床。

### 1.2.3 FBB 中小球藻的驯化培养

在 Basal 培养基中完成细胞固定化后, 将 7 L 发酵罐中的培养基全部放出, 更换为含有 18.40 g/L 葡萄糖的蔗渣水解液配制的 Basal 培养基, 以 100 mL/min 速率循环, 控制发酵罐在 28 °C、200 r/min、DO≥50% 的条件下进行第一批驯化培养; 待葡萄糖消耗完后, 更换为浓缩的蔗渣水解液配制的 Basal 培养基(含 24.6 g/L 葡萄糖), 在相同条件下进行第二批驯化培养; 待葡萄糖浓度再次消耗完后, 更换为浓缩的蔗渣水解液配制的 Basal 培养基(含 33.60 g/L 葡萄糖), 在相同条件下进行第三批驯化培养。在驯化过程中每 10~12 h 取样 10 mL, 离心得上清液用于分析葡萄糖浓度。

### 1.2.4 驯化藻株与出发藻株的耐受性比较

在无菌操作下, 先将纯棉毛巾纤维床取出, 再将床上的细胞用无菌水洗下来。将藻液在 3000 r/m 下离心, 弃去上清液, 再将藻泥用无菌水洗 4 遍, 加入无菌水重悬使藻细胞密度为 2500 cells/mL。挑取藻悬液在含 35 g/L 葡萄糖的蔗渣水解液固体培养基上划线, 28 °C 下黑暗培养。出发藻株同样划线培养作为对照。

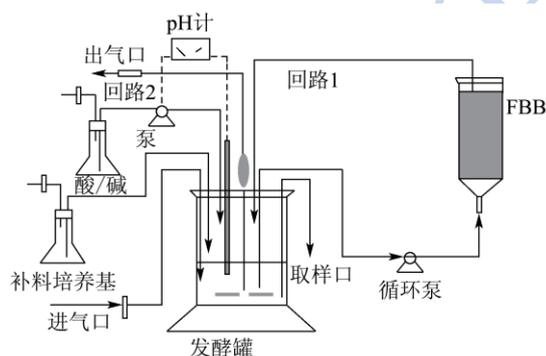


图 1 由发酵罐与纤维床生物反应器形成的驯化系统装置连接图

Fig.1 Diagram of the set-up of a domestication system consisting of a fermenter and FBB

## 1.3 分析测试

### 1.3.1 蔗渣水解液主要组分分析

采用 Waters HPLC 进行分析测定。色谱条件为: Rezex ROA 有机酸柱(8%, 300×7.8 mm, 8 μm, Phenomenex Inc., Torrance, USA), Waters 2414 型示差

检测器, Waters 1525 液相泵, 流动相 0.05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.60 mL/min, 柱温和检测器温度为 45 °C, 进样量 20 μL。根据五种主要成分标品(葡萄糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖、乙酸)的保留时间进行定性分析, 糖分的定量分析根据各种糖的外标曲线进行计算。

### 1.3.2 细胞干重

取样 10 mL, 分别装于称重过的 2 mL 离心管中, 在高速冷冻离心机中以 8000 r/min 离心 8 min, 收集上清液; 藻泥用纯水离心洗涤三次, 置于烘箱中 60 °C 烘干至恒重, 称重并计算差重, 折算成细胞干重。

### 1.3.3 细胞比生长速率

$$\text{比生长速率} / \mu = (\ln B_2 - \ln B_1) / (T_2 - T_1)$$

注:  $\mu$ : 比生长速率 ( $d^{-1}$ );  $B_1$ 、 $B_2$ :  $T_1$ 、 $T_2$  时的细胞干重 (g/L);  $T_1$ 、 $T_2$ : 两次测定时培养时间 (d)

### 1.3.4 葡萄糖浓度

采用 SBA-80 生物传感分析仪进行测定, 矫正范围为 0.5~1.0 g/L。测定过程中先用 1 g/L 的葡萄糖标准溶液进行定标, 然后将样品的葡萄糖浓度稀释到矫正范围内, 进样 25 μL 进行分析, 测得葡萄糖含量的读数乘以稀释倍数即得样品中葡萄糖含量。

## 1.4 数据分析

采用 Microcal Origin V8.0 Software 对数据进行处理和统计。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蔗渣水解液的主要组分及其含量

葡萄糖、木糖、乙酸、纤维二糖和阿拉伯糖五种成分的混合标样的 HPLC 色谱图如图 2 所示, 蔗渣水解液主要成分的 HPLC 色谱图如图 3 所示。对比可知, 蔗渣经酸解、酶解后, 水解液中的主要成分为葡萄糖、木糖、乙酸、纤维二糖和阿拉伯糖。根据五种糖的标准曲线, 可计算得出上述组分的浓度分别为 18.40 g/L、16.17 g/L、6.13 g/L、5.10 g/L 和 2.29 g/L。

蔗渣主要由 41.6% 纤维素、26.4% 半纤维素和 19.8% 木质素组成<sup>[9]</sup>。酸解过程中盐酸释放的质子能破坏由纤维素和半纤维素形成的聚合物链中糖单体间的杂环醚键, 这些键的断裂能释放几种化合物, 主要是木糖和葡萄糖, 还将糖转化为乙酸、糠醛等副产物<sup>[10]</sup>。在稀酸预处理中, 半纤维素几乎被全部水解; 虽然木质素溶解度较小, 但能使木质素剥离, 从而增加纤维素酶对纤维素和半纤维素的可及性<sup>[11]</sup>。利用纤维素酶 Accelerase 1500 对酸处理过的蔗渣进行酶解, 可进一步降解纤维素和半纤维素为纤维二糖、葡萄糖和木糖、

阿拉伯糖 (见图 3)。

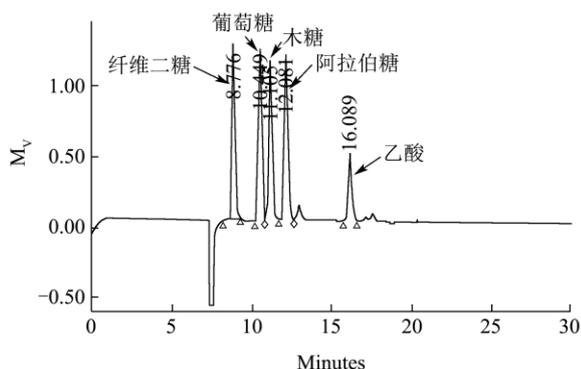


图 2 混合标样的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC plot of mixed standard compounds

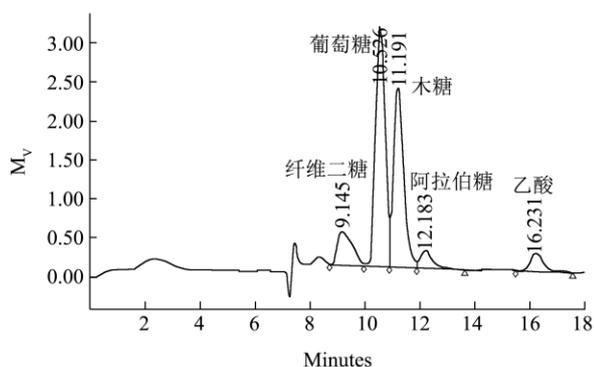


图 3 蔗渣水解液中主要成分的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC plot of the main components in sugarcane bagasse hydrolysate

## 2.2 小球藻悬浮细胞的补料分批培养及其固定化

小球藻在 7 L 发酵罐中分批培养的生长曲线和葡萄糖消耗曲线如图 4 所示。第一批发酵过程 (图中第一阶段) 结束时小球藻干重浓度为 6.83 g/L, 第二批发酵过程 (图中第二阶段) 结束时达到 12.37 g/L。结果表明, 小球藻的生长在第一批发酵过程中存在延滞期, 说明起始密度为 1.12 g/L 的小球藻要适应葡萄糖浓度为 13.80 g/L 的培养环境需要近 24 h。Xian-Ming Shi 等人的研究中也表明, 小球藻在相对低葡萄糖浓度下没有延滞期, 而在高浓度葡萄糖下存在延滞期<sup>[12]</sup>。小球藻在第二批发酵过程中没有延滞期, 直接进入对数期, 在短时间内达到了最大生物量。Xiufeng Li 等人通过多次补料使葡萄糖浓度维持在 10 g/L 左右, 实现了小球藻在发酵罐中的持续生长, 在 184 h 干重达到了 15.50 g/L<sup>[4]</sup>。分批补料发酵方法能及时补加营养、降低底物限制, 使小球藻持续处于对数生长阶段, 快速实现高密度细胞培养。小球藻在第一批发酵过程中的平均比生长速率为 0.63 d<sup>-1</sup>, 第二批发酵过程中为

0.53 d<sup>-1</sup>。可能由于第一批发酵过程中小球藻产生的代谢物对小球藻的生长有一定抑制作用。

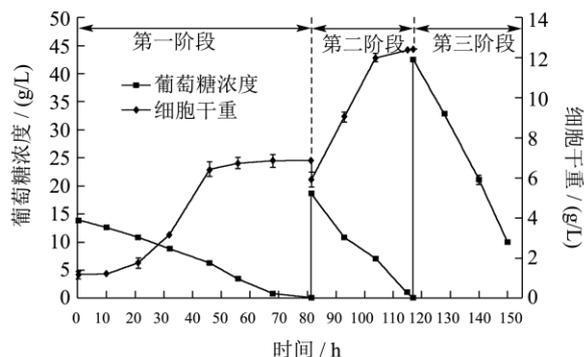


图 4 原壳小球藻在补料分批培养及细胞固定化过程中细胞干重和葡萄糖浓度变化

Fig.4 Changes in cell dry weight and glucose concentration in batch-fed cultures and cell immobilization of *Chlorella protothecoides*

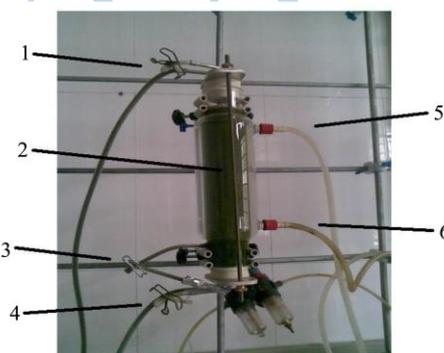


图 5 形成原壳小球藻高密度固定化细胞床的 FBB 装置

Fig.5 The FBB equipment for the formation of a high-density immobilized cell bed of *Chlorella protothecoides*

注: 1-循环藻液出口, 2-纤维床, 3-取样口, 4-循环藻液入口, 5-循环水出口, 6-循环水入口。

第二批发酵结束后获得了 12.37 g/L 的高细胞密度, 此时补加培养基使发酵液葡萄糖浓度达到 42.50 g/L, 并将发酵罐与 FBB 连接起来形成回路进行固定化培养 (第三阶段)。FBB 细胞固定化装置如图 5 所示, 发酵罐中的游离细胞随着发酵液的循环逐渐固定在 FBB 上, 发酵罐中的绿色游离细胞逐渐减少。固定化过程中的葡萄糖浓度消耗 (第三阶段) 如图 4。葡萄糖平均消耗速率在第一阶段为 0.17 g/h, 第二阶段为 0.52 g/h, 固定化过程的第三阶段为 0.99 g/h, 可知在固定化过程中小球藻能固着在 FBB 上继续更高密度的生长, 致使利用葡萄糖进行正常新陈代谢的速率要远高于游离细胞阶段。本结果表明, FBB 是一种高效固定化培养原壳小球藻的装置, 形成的细胞床见图 5。

## 2.3 在 FBB 中驯化小球藻提高对蔗渣水解液

### 的耐受性

将培养基全部更换为蔗渣水解液配制的 Basal 培养基后,以其中葡萄糖浓度为指标进行三个压力梯度的驯化,葡萄糖的消耗过程如图 6 所示。三个驯化阶段中蔗渣水解液浓缩程度逐渐上升,即初始葡萄糖浓度分别为 18.40 g/L、24.6 g/L、33.60 g/L。第一阶段驯化用的蔗渣水解液未经过浓缩,葡萄糖的平均消耗速率 0.36 g/h 远远低于固定化阶段的 0.99 g/h,说明蔗渣水解液中除了原壳小球藻能利用的可发酵糖外,还有一些抑制细胞生长的物质存在。已知在蔗渣水解液中不仅含有五种主要成分,还含有多种副产物。研究表明,木质纤维素水解液中的主要副产物分别是糠醛、糠醛衍生物和酚类物质等,对细胞的生长有抑制作用<sup>[13]</sup>。第二阶段驯化过程使用浓缩的蔗渣水解液,葡萄糖平均消耗速率 0.22 g/h,低于上一驯化阶段,进一步说明蔗渣水解液中的抑制性成分对小球藻的生长有抑制作用。第三阶段驯化过程中的葡萄糖平均消耗速率 0.39 g/h,均高于第一和第二驯化阶段,说明 FBB 中固定化小球藻在前两次驯化过程中已经发生了变化,能适应含有更高浓度可发酵糖和抑制物的蔗渣水解液环境。Supapom Suwannakham 等人比较了产酸丙酸杆菌在 FBB 固定化状态下和在悬浮状态下对丙酸抑制的耐受性,发现 FBB 固定化的产酸丙酸杆菌能耐受更高浓度的丙酸,一是由于细菌外部形态发生了变化,另一方面是因为细菌内有关代谢途径中的酶活性增强了<sup>[14]</sup>。

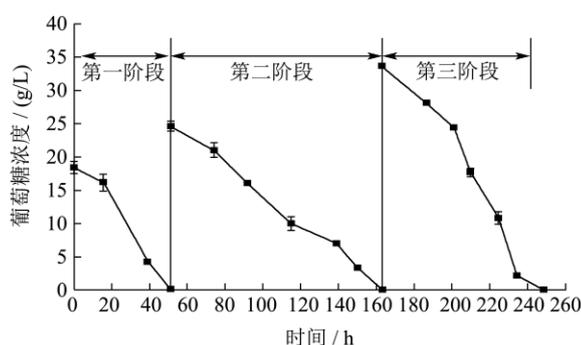


图 6 原壳小球藻在蔗渣水解液驯化过程中葡萄糖浓度的变化

Fig.6 Change in glucose concentration during domestication of *Chlorella protothecoides* grown in sugarcane bagasse hydrolysate

### 2.4 驯化藻株与出发藻株耐受性的比较

FBB 驯化后分离得到的藻株和出发藻株同时在含 35 g/L 葡萄糖的蔗渣水解液平板上的生长结果如图 7 所示。经过 FBB 驯化的分离藻株能在该平板上正常生长,而出发藻株完全不能生长。这说明经过 FBB 驯

化的原壳小球藻对蔗渣水解液中可发酵糖浓度和抑制物的耐受性增强了,能很好地适应生长环境。驯化过程中,为了适应抑制性环境可能在形态和代谢活性方面发生了改变,也可能发生了有利于生存的自发突变,所以驯化后的藻株其耐受性和适应性大大提高,深层次机理研究有待进一步探索。



驯化藻株

出发藻株

图 7 驯化藻株和出发藻株在蔗渣水解液琼脂平板上的生长

Fig.7 The growth of domesticated and wild-type strains of *Chlorella protothecoides* on an SCBH agar plate

### 3 结论

本研究通过酸解-酶解过程制备了蔗渣水解液,主要含有可发酵糖(葡萄糖、木糖、纤维二糖和阿拉伯糖)和乙酸,能为原壳小球藻提供生长所需的碳源,特别是葡萄糖能被原壳小球藻快速利用转化为细胞内成分,但同时蔗渣水解液中含有糠醛、糠醛衍生物和酚类等生长抑制物。采用补料分批发培养可获得干重浓度为 12.37 g/L 的悬浮细胞培养液,经过藻液在发酵罐和 FBB 间的循环,在 FBB 中形成了高密度固定化细胞床,说明 FBB 是一种高效的固定化培养原壳小球藻的装置。利用固定化细胞床,通过三阶段逐步提高驯化压力的培养,获得了能耐受蔗渣水解液中高浓度葡萄糖和抑制性环境的适应性藻株,该藻株能在含 35 g/L 葡萄糖的蔗渣水解液平板上正常生长。这就为利用高浓度蔗渣水解液发酵培养原壳小球藻获得廉价生物燃料原料提供了高耐受性藻株。

### 参考文献

[1] Chun-Yen Chen, Kuei-Ling Yeh, Rifka Aisyah, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 71-81

[2] Gholamhassan Najafi, Barat Ghobadian, Talal F Yusaf. *Biofuel from microalgae: alternative, sustainable and renewable fuel* [C]//10th International Conference on Sustainable Energy Technologies, Istanbul. 2011: 1-5

[3] L Campenni, B P Nobre, C A Santos, et al. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella*

- prothecoides under nutritional, salinity and luminosity stress conditions [J]. *Bioenergy and Biofuels*, 2013, 97: 1383-1393
- [4] Xiufeng Li, Han Xu, Qingyu Wu. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98: 764-771
- [5] Aili Wei, Xuewu Zhang, Dong Wei, et al. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* [J]. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2009, 36: 1383-1389
- [6] Chunfang Gao, Yan Zhai, Yi Ding, et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides* [J]. *Applied Energy*, 2010: 756-761
- [7] Ling Jiang, Jufang Wang, Shizhong Liang, et al. Production of butyric acid from glucose and xylose with immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160: 350-359
- [8] Yu Liang Huang, Zetang Wu, Likun Zhang, et al. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82: 51-59
- [9] Dong Wei, Xiaoguang Liu, Shang-Tian Yang. Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 553-560
- [10] R Aguilar, J A Ramirez, G Garrote, et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse [J]. *Journal of Food Engineering*, 2002, 55: 309-318
- [11] 岳建芝,李刚,张全国.促进木质纤维素类生物质酶解的预处理技术综述[J].*江苏农业科学*,2011,39(3):310-343  
YUE Jian-zhi, LI Gang, ZHANG Quan-guo. Promotion about enzymatic hydrolysis pretreatment technology of lignocellulose review [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(3): 310-343
- [12] Xian-Ming Shi, Hui-Jun Liu, Xue-Wu Zhang, et al. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 34: 341-347
- [13] Eva Palmqvist, Barbel Hahn-Hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I : inhibition and detoxification [J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 17-24
- [14] Suporn Suwannakham, Shang-Tian Yang. Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(3): 325-337