

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.S2.028

一株高生物量链带藻分离筛选与培养条件优化*

季方¹ 郝睿² 刘颖^{1,2} 李道义³ 周宇光^{1,2} 董仁杰^{1,2}

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 农业部可再生能源清洁化利用技术重点实验室, 北京 100083;

3. 中国农业机械化科学研究院, 北京 100083)

摘要: 为了得到具有高生物量累积特性的微藻及其最优培养条件, 从自然水样中分离筛选出一株生物量较高的微藻属, 经 18s rRNA 及 ITS1 鉴定为链带藻属 (*Desmodesmus* sp.), 命名为 EJ12-3。通过单因素试验及响应面分析对其培养条件进行优化, 得到最大生物量累积的条件为: 温度 28℃, 光照强度 131 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期 15:9 (光暗时间比), pH 值为 6, 在此条件下, 其培养 14 d 后的生物量累积可达 (0.648 ± 0.015) g/L。并得到这些环境因素对链带藻 EJ12-3 生长的交互影响, 得到二次方程模型, 该模型的拟合较好 (R^2 为 0.950), 有一定的应用价值。

关键词: 链带藻 分离筛选 生物量累积 培养条件 响应面分析

中图分类号: TK6 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2013)S2-0149-06

Optimization of Environmental Factors for Biomass Production of Isolated Strain of *Desmodesmus* sp. EJ12-3

Ji Fang¹ Hao Rui² Liu Ying^{1,2} Li Daoyi³ Zhou Yuguang^{1,2} Dong Renjie^{1,2}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Key Laboratory of Clean Production and Utilization of Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China

3. Chinese Academy of Agricultural Mechanization Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: With the aim of isolating a high biomass accumulation strain and optimize environmental factors to enhance its biomass production, an unicellular green algae was isolated from fresh water samples, the morphological and genomic characterization identification of this strain was carried out by using 18s rRNA and ITS1 analysis. This newly isolated strain named EJ12-3 was identified as *Desmodesmus* sp. The environmental factors for biomass production of *Desmodesmus* sp. EJ12-3 was optimized by using response surface methodology (RSM). The experimental and the predicted values were very close which reflected the accuracy and the applicability of RSM ($R^2 = 0.950$). According to the results, the optimal condition for biomass production within the experimental range of the variables studied was: temperature of 28℃, light intensity of 131 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, light/dark cycle of 15:9 and pH value of 6.0. Under this condition, the predicted biomass production value was up to (0.648 ± 0.015) g/L.

Key words: *Desmodesmus* sp. Isolation Biomass accumulation Culture conditions Response surface methodology

引言

自第一次石油危机以来, 各国均致力于燃油替

代品的研发。生物燃油具有环境友好、低碳排放等优点, 是一种优质可再生能源^[1]。目前生物燃油原料主要来自油料植物^[2], 存在与农作物争地争水和

收稿日期: 2013-05-24 修回日期: 2013-07-10

* “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD47B03)、国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2013AA065802)、中国博士后科学基金面上资助项目(2011M500451)、中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2013YJ007)和生物质工程交叉学科北京市重点学科建设项目

作者简介: 季方, 博士生, 主要从事微藻培养利用研究, E-mail: ji_fang1984@163.com

通讯作者: 周宇光, 讲师, 博士, 主要从事农业生物质特性及利用研究, E-mail: zhouyg@cau.edu.cn

原料成本较高等问题,限制了生物燃油进一步推广应用。微藻作为第三代可再生能源的原料来源,具有光合作用效率高、生长周期短、不占用耕地资源、可高密度大规模生产^[3-4],适应极端环境能力强^[5]等特点,是未来最有潜力的化石燃料替代资源之一。

现阶段制约微藻能源规模化的主要原因是生产成本^[6],而提高微藻的生物物质产量是降低生产成本的关键因素^[7]。近年来大量具有各种性状的野生型藻株已被筛选出^[8-10],但仍有许多优势藻种未被发现,还需筛选生物物质产量高、富含油脂、生长速度快、抗逆性强的微藻^[11]。同时,结合环境因子对微藻生物物质生长的影响机制,培养高生物量微藻,再度成为当前能源微藻资源开发研究的热点和难点^[12-13]。本文通过筛选分离得到高生物量微藻,并就温度、pH 值、光强及光周期对其生物量累积的影响进行讨论和优化,以期得到高生物量累积的能源微藻藻种及最适培养条件。

1 试验材料与方法

1.1 主要材料

藻种于 2011 年 9 月分离自北京奥林匹克森林公园湿地水样。藻株培养采用 BG-11 培养基^[14]。藻种 DNA 提取使用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),DNA 聚合酶购置于 New England Biolabs,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 主要仪器设备

TGradient 型梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司);PGX-350C 型光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);UV-7504PC 型紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);UB200i 型光学显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);PL403-IC 型分析天平(梅特勒-托利多集团);FE200 型 pH 计(梅特勒-托利多集团);DT-8809A 型照度计(深圳华盛昌机械实业有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 藻种分离筛选和培养

藻种分离采用稀释平板及划线法^[15]分离得到目标藻株,编号为 EJ12-3。

试验使用 100 mL 三角瓶作为培养容器,有效容积为 50 mL。初始培养条件为(25 ± 1)℃,光照强度为(80 ± 2) μmol/(m²·s)、光周期为 14:10(光暗时间比)的光照培养箱中连续培养 14 d。每天手动摇匀 3 次。

1.3.2 藻种鉴定

以提取的微藻 DNA 为模板,使用 DNAMAN 和

Primer 5.0 软件设计引物(正向:5' AAGTATAAACTGCTTATACTGTGAA 3',反向:5' CCTACGGAAACCTTGTACGACT 3')。对 18s rRNA 基因进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系为:DNA 模板 1 μL,引物各 1 μL,dNTP 4 μL,5 × Q5 buffer 10 μL,Q5 DNA 聚合酶 0.5 μL,5 × Q5 High GC Enhancer 10 μL。PCR 反应条件为:98℃ 预变性 60 s,98℃ 变性 20 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,37 个循环,72℃ 延伸 180 s。PCR 产物经检测后,将所得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比较。

设计 ITS1 基因 PCR 扩增引物(正向:5' AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG 3',反向:5' TATGCTTAAGTTCAGCGGTAAT 3')。将退火温度设为 52℃,其他反应体系和反应条件同上。

1.3.3 微藻生物量测定

微藻生物量测定采用浊度法:取 50 mL 藻液样品经 0.45 μm 水系膜过滤后 80℃ 干燥至质量恒定,得到样品质量^[16],用紫外分光光度计测定波长 680 nm 下藻液的吸光度来表示生长密度^[17],得到吸光度与干重之间的线性关系。

1.3.4 单因素试验

选择温度(15、20、25 和 30℃)、光照强度(40、80、120 和 200 μmol/(m²·s))、光周期(24:0、18:6、14:10 和 6:18)和 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)4 个环境因素做单因素试验,以培养 14 d 之后的微藻生物量累积作为试验指标,确定各因素的合适范围。

1.3.5 响应面法优化试验设计

在单因素试验结果基础上,运用 4 因素 5 水平二次回归正交旋转中心复合试验设计原理,以温度(X_1)、光照强度(X_2)、光周期(X_3)和 pH 值(X_4)为考察变量(大写为真实值,小写为编码值),以微藻生物量累积(Y)为响应值,并对其进行分析。各变量的编码见表 1。所有得到的数据均系 5 次平行试验求平均所得,应用 Minitab 15 对试验数据进行分析处理,并进行响应面分析。

表 1 各试验因素水平编码

Tab. 1 Levels and factors

编码	因素			
	温度	光照强度	光周期	pH 值
	$X_1/℃$	$X_2/μmol·(m^2·s)^{-1}$	X_3	X_4
2	30	200	24:0	10
1	26	160	19:5	9
0	22	120	14:10	8
-1	18	80	9:15	7
-2	14	40	4:20	6

2 结果与讨论

2.1 高生物量藻种筛选与鉴定

从采集的水样中分离纯化出 18 株藻株,以单位体积藻液内微藻的生物量为表征,筛选出 1 株生物量相对较高的藻株,命名为 EJ12-3。对该藻株进行显微观察,该藻体呈绿色,为单细胞或无一定数目细胞的群体,细胞呈椭圆形,细胞长为 4 ~ 6 μm ,宽为 3 ~ 4 μm ,细胞壁平滑(图 1)。

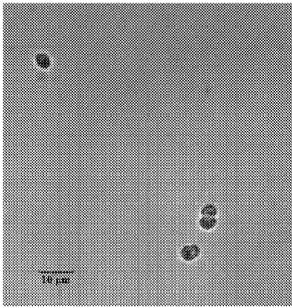


图 1 EJ12-3 显微照片

Fig. 1 Morphological graph of EJ12-3

对该藻株进行 PCR 扩增后,得到 18s rRNA 和 ITS1 的片断,测序后得到该藻 18s rRNA 的片断长度为 1 043 bp,ITS1 片断的长度为 615 bp。将此序列与 NCBI 进行序列同源性分析,发现其与链带藻 (*Desmodesmus* sp.) 的亲缘关系最近,18s rRNA 序列的同源性达到 99%。使用 MEGA 5.10 对其 ITS 序列构建系统发育树,结果如图 2 所示。

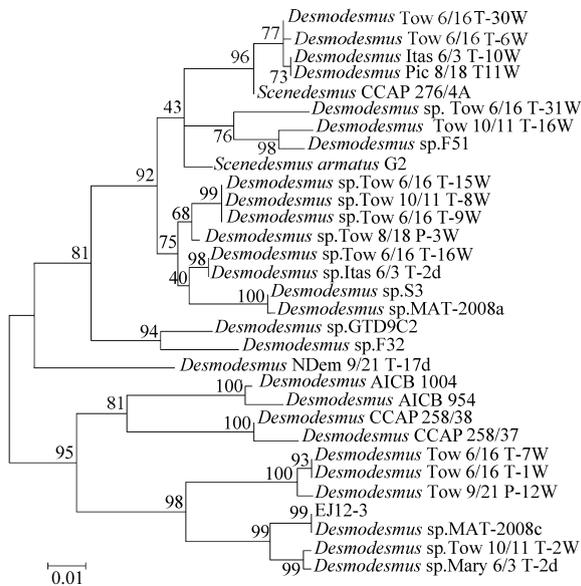


图 2 基于 ITS1 构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS1 sequences

2.2 单因素试验

2.2.1 温度

温度变化对微藻生物量产量有很大影响,大部分微藻最适生长温度为 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ [18~20]。在光照强

度为 $(80 \pm 2) \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期为 14:10、pH 值为 7.0 的培养条件下,链带藻 EJ12-3 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时生长最好,培养 14 d 后生物量产量达 0.549 g/L,其次为 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,生物量为 0.480 g/L,在 15 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 时生长状况不佳,生物量分别为 0.430 g/L 和 0.435 g/L(图 3)。

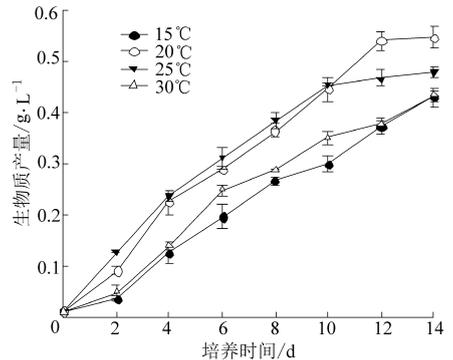


图 3 温度对链带藻 EJ12-3 生物量产量的影响曲线

Fig. 3 Effect of temperatures on dry cell weight of

Desmodesmus sp. EJ12-3

2.2.2 光照强度

对于光自养的微藻:光照强度超过光补偿点时,其生物量才会增加,其光合速率随着光强增加而上升,并达到最大值;若光照强度继续上升,则会产生光损伤,反而影响微藻生物量的累积[21]。由图 4 可以看出,链带藻 EJ12-3 光照强度从 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 至 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时,其生物量随着光照强度增加而增加,在 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时生物量累积达到最大,培养 14 d 后达到 0.558 g/L,而随着光照强度的继续增加,其生物量累积反而下降。

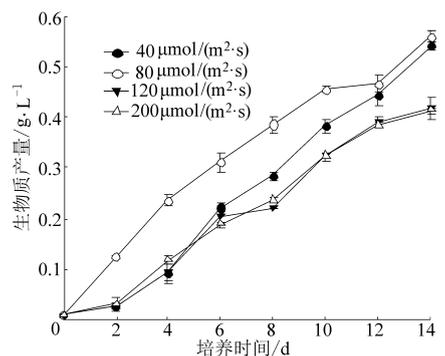


图 4 光照强度对链带藻 EJ12-3 生物量产量的影响曲线

Fig. 4 Effect of light intensity on dry cell weight of

Desmodesmus sp. EJ12-3

2.2.3 光周期

由图 5 可以看出,光周期对链带藻 EJ12-3 的生长有着一定的影响。培养 14 d 后,微藻生物量差异明显。光周期是 18:6 和 24:0 时,微藻生物量产量水平较高,分别为 0.569 g/L 和 0.530 g/L。而在光照时间较短的培养条件下,生物量累积水平相对较低。

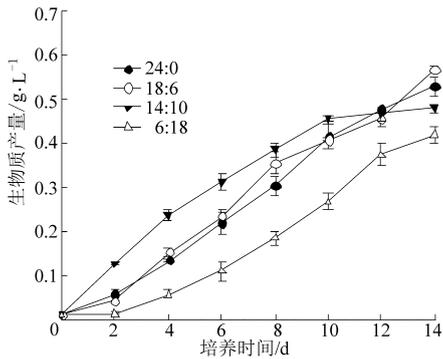


图5 光周期对链带藻 EJ12-3 生物质产量的影响曲线

Fig. 5 Effect of light/dark cycle on dry cell weight of *Desmodesmus* sp. EJ12-3

2.2.4 pH 值

pH 值为 5 ~ 10 时,对链带藻 EJ12-3 生物量累积影响并不大,如图 6 所示。在 pH 值为 7 ~ 10 时,其生物量的差异不大,为 0.469 ~ 0.489 g/L;而在酸性条件下,微藻生长相对较好;pH 值为 6.0 时,其培养 14 d 的生物量为 0.556 g/L,在 pH 值为 5.0 时,生物量累积达到顶峰,为 0.586 g/L。

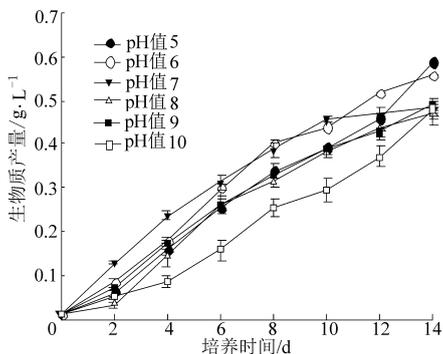


图6 pH 值对链带藻 EJ12-3 生物质产量的影响曲线

Fig. 6 Effect of pH value on dry cell weight of *Desmodesmus* sp. EJ12-3

2.3 微藻培养条件响应面优化

2.3.1 试验设计与结果

根据二次回归正交旋转中心复合试验设计原理,并用单因素试验结果确定各变量的范围设计试验,试验设计及结果见表 2。

对表 2 的试验结果进行了方差分析。由表 3 可知,所有变量的一次项均达到显著水平 ($P < 0.05$),表明这些因素对链带藻 EJ12-3 的生物量累积的线性效应显著,二次项 x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2 对其生物量累积的曲面效应极为显著,交互项 x_1x_4 、 x_2x_4 的交互效应显著。同时,模型的 R^2 为 0.950,说明该模型拟合程度良好,试验误差小,能够反映响应值的变化。

2.3.2 微藻培养条件响应面优化

根据试验结果作各因素响应面分析图(图 7)。从图中可以看出,除了 pH 值,其余任意 2 个因素均

表 2 响应面试验设计及结果

Tab. 2 Design and result based on RSM

试验序号	温度 x_1	光照强度 x_2	光周期 x_3	pH 值 x_4	生物质产量 $Y/g \cdot L^{-1}$
1	1	1	1	1	0.367 ± 0.009
2	1	1	1	-1	0.523 ± 0.014
3	1	1	-1	1	0.374 ± 0.029
4	1	1	-1	-1	0.542 ± 0.006
5	1	-1	1	1	0.490 ± 0.015
6	1	-1	1	-1	0.549 ± 0.005
7	1	-1	-1	1	0.465 ± 0.020
8	1	-1	-1	-1	0.482 ± 0.021
9	-1	1	1	1	0.368 ± 0.005
10	-1	1	1	-1	0.397 ± 0.002
11	-1	1	-1	1	0.365 ± 0.019
12	-1	1	-1	-1	0.352 ± 0.004
13	-1	-1	1	1	0.475 ± 0.024
14	-1	-1	1	-1	0.444 ± 0.013
15	-1	-1	-1	1	0.482 ± 0.019
16	-1	-1	-1	-1	0.405 ± 0.016
17	2	0	0	0	0.468 ± 0.019
18	-2	0	0	0	0.339 ± 0.009
9	0	2	0	0	0.351 ± 0.026
20	0	-2	0	0	0.448 ± 0.024
21	0	0	2	0	0.415 ± 0.026
22	0	0	-2	0	0.276 ± 0.029
23	0	0	0	2	0.473 ± 0.028
24	0	0	0	-2	0.560 ± 0.007
25	0	0	0	0	0.539 ± 0.013
26	0	0	0	0	0.520 ± 0.019
27	0	0	0	0	0.550 ± 0.007
28	0	0	0	0	0.537 ± 0.027
29	0	0	0	0	0.564 ± 0.014
30	0	0	0	0	0.554 ± 0.013

表 3 回归模型的方差分析

Tab. 3 Regression analysis of full second-order polynomial model

项目	平方和	自由度	均方	P
x_1	0.024 2	1	0.024 2	0.000 **
x_2	0.020 1	1	0.020 1	0.000 **
x_3	0.007 5	1	0.007 5	0.005 **
x_4	0.009 7	1	0.009 7	0.002 **
x_1x_2	0.001 2	1	0.001 2	0.189
x_1x_3	0.000 0	1	0.000 0	0.895
x_1x_4	0.015 2	1	0.015 2	0.000 **
x_2x_3	0.000 7	1	0.000 7	0.345
x_2x_4	0.008 7	1	0.008 7	0.003 **
x_3x_4	0.008 5	1	0.008 5	0.277
x_1^2	0.027 7	1	0.027 7	0.000 **
x_2^2	0.029 4	1	0.029 4	0.000 **
x_3^2	0.059 4	1	0.059 4	0.000 **
x_4^2	0.000 2	1	0.000 2	0.623
残差	0.009 5	14	0.000 7	—
失拟	0.009 0	10	0.000 9	0.037
误差	0.000 5	4	0.000 1	—

注: ** 为极显著 ($P < 0.01$)。

存在比较明显的交互作用,最佳落点在试验考察的区域内。由图 7a、7b、7d 可知,温度、光照强度、光周期的交互作用均为随着因素取值的不断增大,响应值不断增大,在中心点过后开始下降,在中心点附近时,生物量累积较高。由图 7c、7e、7f 可知,随着 pH

值不断下降,响应值进一步升高,当 pH 值下降为 6.0 时,生物量累积达到最大。由以上响应面分析可知,当 pH 值为 6.0,其他各因素在中心点附近的环境因素对链带藻 EJ12-3 的生物量累积最为有利。

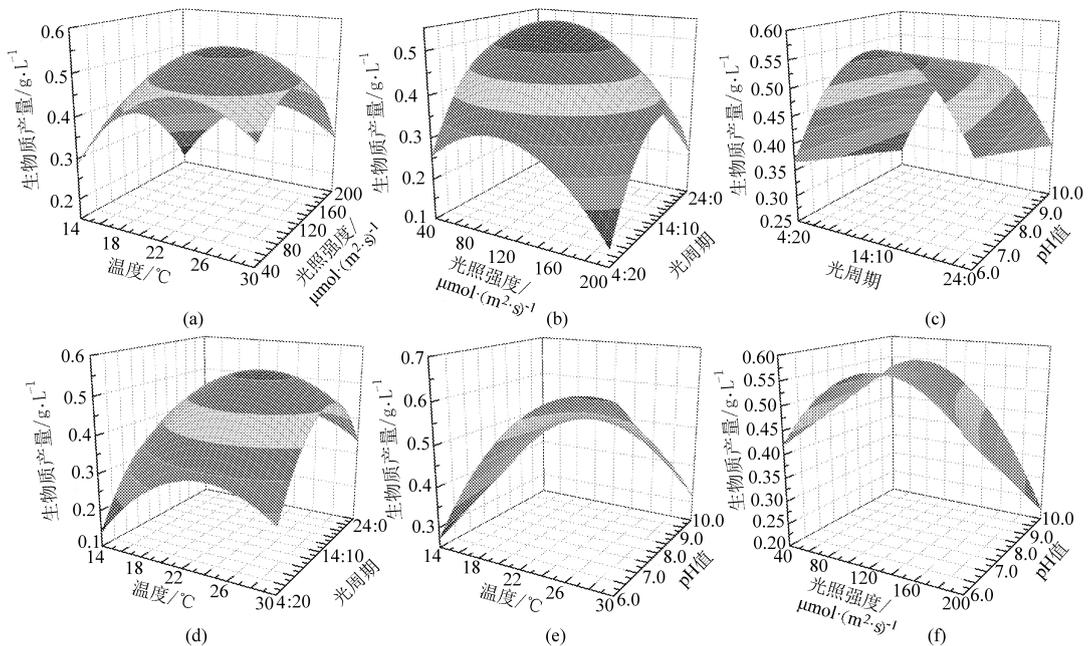


图 7 各因素对链带藻 EJ12-3 生物量累积的响应面图

Fig. 7 Response surfaces of environmental factors effects biomass accumulation on *Desmodesmus* sp. EJ12-3

2.3.3 最佳培养条件确定与验证

分析二次方程模型可得,4 个环境因素的最佳组合为:温度 28℃,光照强度 131 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期 15:9,pH 值为 6.0,其培养 14 d 的理论生物产量为 0.656 g/L,经过在该条件下的试验检验,其实际生物量为 (0.648 ± 0.015) g/L,与理论值较为接近,验证了该模型的有效性。

3 结论

(1)从自然水样中分离纯化出一株生物量较高

的微藻,经 18s rRNA 及 ITS1 鉴定为链带藻,命名为 EJ12-3。

(2)通过单因素试验及响应面分析对其培养条件进行优化,得到 EJ12-3 最大生物量累积的培养条件为:温度 28℃,光照强度 131 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期 15:9,pH 值为 6.0,在此条件下,其培养 14 d 后的生物量累积可达 (0.648 ± 0.015) g/L。并得到这些环境因素对链带藻 EJ12-3 生长的交互影响,得到二次方程模型,该模型的拟合较好, R^2 为 0.950,有一定的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Wijffels R H, Barbosa M J. An outlook on microalgal biofuels [J]. *Science*, 2010, 329(5993): 796 ~ 799.
- 2 FAO. The state of food and agriculture 2008 [M]. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008.
- 3 Scott S A, Davey M P, Dennis J S, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 277 ~ 286.
- 4 Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters [J]. *Applied Energy*, 2011, 88(10): 3425 ~ 3431.
- 5 匡廷云, 马克平, 白克智. 生物质能研发展望 [J]. *中国科学基金*, 2005, 19(6): 326 ~ 330.
Kuang Tingyun, Ma Keping, Bai Kezhi. Prospects of bioenergy exploitation [J]. *Bulletin of National Natural Science Foundation of China*, 2005, 19(6): 326 ~ 330. (in Chinese)
- 6 Behzadi S, Farid M M. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel [J]. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2007, 2(5): 480 ~ 486.
- 7 Fishman D, Majumar R, Morello J, et al. National algal biofuels technology roadmap [R]. Maryland, 2010.
- 8 Mishra A, Jha B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliellasalina* under salt stress [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13): 3382 ~ 3386.

- 9 Schwenzfeier A, Wierenga P A, Gruppen H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19):9 121 ~9 127.
- 10 Yoshida N, Ikeda R, Okuno T. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(15):1 843 ~1 849.
- 11 范晓蕾, 郭荣波, 魏东芝. 能源微藻与生物炼制[J]. *中国基础科学*, 2009(5): 59 ~63.
Fan Xiaolei, Guo Rongbo, Wei Dongzhi. Key basic research in biorefinery of energy microalgae [J] *China Basic Science*, 2009 (5): 59 ~63. (in Chinese)
- 12 Nasreen A, Muhammad I, Iqbal S Z, et al. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr(III) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(2): 231 ~239.
- 13 Chen C, Yeh K, Su H, et al. Strategies to enhance cell growth and achieve high level oil production of a *Chlorella vulgaris* isolate [J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(3):679 ~686.
- 14 Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 111(1):1 ~61.
- 15 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- 16 Chae S R, Hwang E J, Shin H S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(2):322 ~329.
- 17 Moon N J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1983, 55(3):453 ~460.
- 18 Soletto D, Binaghi L, Ferrari L, et al. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 39(2):369 ~375.
- 19 Mata M T, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review [J]. *Renewable & Sustainable Energy Review*, 2010, 14(1):217 ~232.
- 20 Xenopoulos M A, Frost P C, Elser J J. Joint effects of UV radiation and phosphours supply on algal growth rate and elemental composition [J]. *Ecology*, 2002, 83(2):423 ~435.
- 21 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京: 科学出版社, 2003.