

产油微藻的分离筛选与鉴定

王玉荣^{1,2}, 师文静¹, 佟明友^{*1}, 毛海龙²

(1. 中国石化抚顺石油化工研究院, 辽宁 抚顺 113001; 2. 辽宁石油化工大学, 辽宁 抚顺 113001)

摘要: 微藻所含的油脂是制备生物柴油的理想原料。为了筛选具有产油能力的微藻, 作者从自然界水体中分离出 8 株微藻, 对他们的生长特性和产油能力进行评价, 旨在筛选出生长速度快、生物量高、油脂含量高的优良藻种。实验结果得到一种油脂产率较高的 CC-B3 藻株, 它的总脂质量分数为 36.30%, 生物量达到 2.43 g/L, 油脂产率为 62.9 mg/(L·d)。符合优良藻种的条件, 是一株高效产油微藻。通过 18s rDNA 鉴定, 该藻株为斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*), 构建了该藻株的进化树。

关键词: 产油微藻; 分离纯化; 筛选; 鉴定

中图分类号: TK 6; S 216.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)01—0077—05

Isolation and Characterization of Oil-Producing Microalgae

WANG Yurong^{1,2}, SHI Wenjing¹, TONG Mingyou^{*1}, MAO Hailong²

(1. Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals of SINOPEC, Fushun 113001, China; 2. Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China)

Abstract: The oil contained in the microalgae was considered as an ideal raw material for biodiesel. In order to screen microalgae that have the potential to produce oil, eight strains of microalgae were isolated from natural water and evaluated for their growth, biomass and fat content. A highly efficient oil-producing microalga CC-B3 was found with the total lipid content 36.30%, biomass 2.43 g/L and oil yield 62.9 mg/(L·d). Base on the 18s rRNA, the strain of algae was identified to be *Scenedesmus obliquus* and its phylogenetic tree was thus constructed.

Keywords: Oil-producing microalgae, separation and purification, screening, identification

生物质能源具有绿色和再生性, 发展生物质能是解决全球能源危机的最理想途径之一^[1]。为实现经济和环境的可持续发展, 可再生、无污染的生物质能源的开发与利用已成为研究的热点^[2]。由于微藻具有光合作用效率高、生长周期短、生长速度快, 大多分布在江海湖泊中, 不与农作物争地, 可以整

年生长的优点, 是制备生物柴油燃料的理想原料。利用微藻生产生物柴油最初是在 20 世纪 50 年代提出的, 而自 20 世纪 70 年代起, 一些国家政府开始资助研究培养微藻生产可再生液体燃料项目^[3]。

不同种类微藻产油能力不同, 油脂质量分数最低仅为 4.5%, 仅有少数微藻油脂质量分数较高^[4], 最

收稿日期: 2014-10-22

基金项目: 中国石化集团微藻生物柴油成套技术开发项目(210080)。

* 通信作者: 佟明友(1955—), 男, 辽宁抚顺人, 理学博士, 教授级高级工程师, 主要从事生物质能源研究。E-mail: tongmingyou@163.com

高可以达到 80%^[9]。自然界中存在约 40 000 种微藻,但被人类开发利用的数量不多^[9]。因此,开发自然界微藻资源,筛选高产油微藻用来生产生物柴油,是生物能源产业化的关键。

产油微藻的筛选过程如图 1^[2]所示,根据其生物量和油脂含量两个指标分别进行初步筛选、二次筛选,最后得到综合性能较好的优良藻种。微藻培养过程中,生物量的积累和油脂含量是体现产油微藻应用价值的两个重要特征,也是微藻筛选的重要指标^[7]。作者利用简易的通气培养装置,以单位体积总脂产率为指标,对 8 株经过初步生长筛选的微藻进行培养,旨在获得生长速度快、生物量高、油脂含量高的优良藻种,为微藻生物柴油研发提供原料来源。图 1 为筛选微藻藻种简略图。

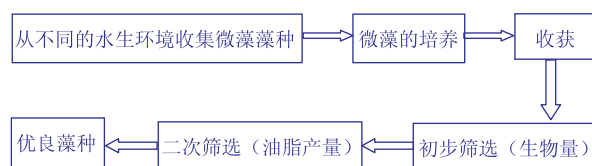


图 1 筛选微藻藻种简略图

Fig. 1 Schematic diagram of screening microalgae species

1 材料与方法

1.1 微藻藻种采集

含藻种的水样采自大庆黑鱼湖、绥芬河、长春北湖。采集水样用采样瓶装好,在实验室进行分离纯化。

1.2 藻株的分离与纯化

采用平板划线法对水样中的微藻进行分离、纯化。吸取少量稀释的水样接种于灭菌的固体培养基上,在适宜的条件下培养 2~3 周,用接种环挑出单藻落,在大口三角瓶中纯化培养,3~4 周后镜检,重复数次,直到获得单克隆纯的目标藻株。

1.3 培养条件

微藻分离纯化与筛选评价试验均采用 BG-11 培养基,使用内径 3.6 cm,高 34 cm 的柱状光生物反应器(装液量为 200 mL)培养,装置示意图见图 2^[8]。培养温度(25±1)℃,光暗时间比为 12:12,光照强度为 200 μmol/(m²·s),持续通入压缩空气(体积分数 1%CO₂)。

1.4 实验方法

首先将藻种接入 50 mL 大口三角瓶中静置培

养 7 d,筛选生长快、不贴壁、不结团的藻种,初选出的藻种移至 1 L 三角瓶(600 mL 藻液)扩大培养,置水平摇床培养 3~5 d,收集藻细胞,最后用新鲜培养基在微藻培养装置中接种。将藻种的初始浓度统一为 $A_{689\text{nm}}=0.1$ 。培养周期为 14 d,每 3 d 测一次 $A_{689\text{nm}}$ 值,检测藻种生长速率,收集第 14 d 的藻液,10 000 r/min 离心 5 min 收集藻细胞,冻干后分析测定油脂含量。

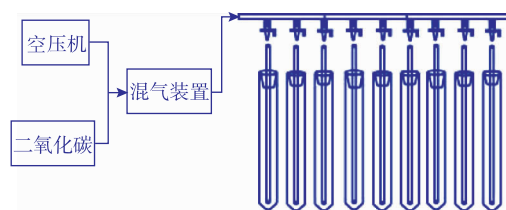


图 2 微藻培养装置

Fig. 2 Microalgae culture device

1.5 优良藻种的 18S rDNA 鉴定

离心收集对数生长期的藻细胞,CTAB 法^[9]提取基因组总 DNA。PCR 扩展其 18S rDNA 的 PCR 反应体系(50 μL):10×PCR 缓冲液 5 μL,20 mmol/L MgCl₂ 3 μL,2.5 mmol/L dNTP 1 μL,引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,5 U/μL Taq Polymerase 0.4 μL,模板 DNA 1 μL,用超纯水定容至 50 μL。反应程序:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,74℃ 延伸 90 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。用于扩增 18SrDNA 的引物序列为 18S-1:5'-CCAACCTGGTTGATCCTG CCAGTA-3',18S-2:5'-CCTTGTTAACGACTTCACCTTCCTCT-3'。PCR 产物的测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.6 分析方法

1.6.1 藻液细胞密度与 $A_{689\text{nm}}$ 关系的测定 将藻液稀释成 7 种密度梯度,以 BG11 培养基为空白,利用 754-UV 分光光度计测其 $A_{689\text{nm}}$,同时应用血球计数板进行显微镜计数(每个藻样重复 3 次取平均值),对 $A_{689\text{nm}}$ 与相对应的细胞个数进行回归分析。

1.6.2 藻种比生长速率的测定 藻种的比生长速率用来评价微藻在一定时期内的整体生长情况,计算公式如下:

$$\text{比生长速率} = (\ln N_2 - \ln N_1) / (T_2 - T_1)$$

N_1 为接种时 OD 值, N_2 为培养结束时的 OD 值, T_1 和 T_2 分别是培养开始和培养结束的时间。

1.6.3 生物量的测定 将培养得到的藻液 10 000 r/

min 离心 5 min 得到藻泥, -50 °C 下冷冻干燥至恒重, 称重得到藻细胞干重。单位体积生物量产率公式如下:

$$\text{单位体积生物量产率}(\text{g/L}\cdot\text{d})=(m_t-m_0)/(t-t_0)$$

式中: m_t 为收获时藻的干重(g/L), m_0 为接种时藻的干重 (g/L), t 和 t_0 分别是培养开始和培养结束的时间

1.6.4 油脂质量分数测定方法 采用乙酸乙酯/正己烷混合溶剂萃取法对藻粉的总脂质量分数进行测定。

1.6.5 计算藻细胞的油脂产率 油脂产率=(生物量×油脂质量分数/培养天数)×100%

2 实验结果

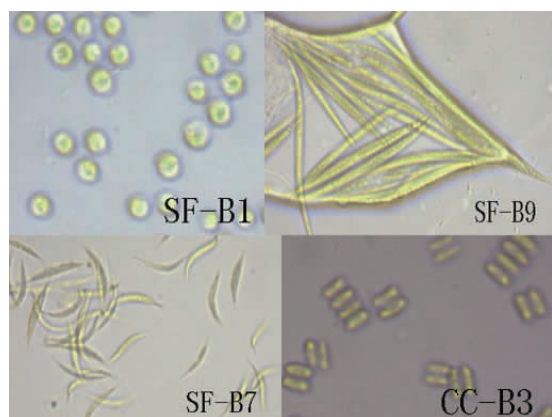
2.1 藻株的分离纯化及初步鉴定

从采集的水样中分离纯化出 8 株藻株, 以微藻的显微照片及其生长特征为依据, 参照《中国淡水藻类——系统、分类及生态》, 将这些微藻初步鉴定为小球藻、栅藻、小环藻和单针藻。各藻种来源、细胞形态等见表 1, 部分藻株形态见图 3。

表 1 藻种来源及特征

Table 1 Sources and characteristics of algae species

编号	来源	细胞形态	分类	培养液颜色	沉降程度
HY-B1	大庆黑鱼湖	圆形, 有细胞核	小球藻	绿色, 后期变为黄绿色	好
HY-B3	大庆黑鱼湖	椭圆形, 丛生	四尾栅藻	绿色	好
HY-B7	大庆黑鱼湖	对生, 带凸头的栅藻	栅藻变种	绿色	好
SF-B1	绥芬河	圆形, 内有核, 藻细胞似环状	小环藻	绿色	较好
SF-B7	绥芬河	柳叶形	单针藻	绿色, 后期变为淡绿色	差
SF-B9	绥芬河	长叶形	单针藻	绿色	差
CC-B2	长春北湖	单生, 对生, 椭圆形	栅藻	谈绿色	好
CC-B3	长春北湖	纺锤形	斜生栅藻	绿色	较好



SF-B1 小球藻; SF-B9 单针藻; SF-B7 单针藻; CC-B3 斜生栅藻

图 3 部分藻种的显微镜照片(×100)

Fig. 3 Optical microscope of four algae (× 100)

从表 1 可知, 不同微藻种的细胞形态、培养液颜色、沉降程度都有一定差异, 同一藻种在培养前后期的培养液颜色也不一样。从图 3 中可看出, 栅藻属藻种细胞以群体形态存在, 小球藻、小环藻以单细胞状态存在。

2.2 藻液细胞密度与 $A_{689\text{nm}}$ 的相关性

按照 1.6.1 的方法, 以藻液 $A_{689\text{nm}}$ 为横坐标(X), 以显微镜得到的细胞密度为纵坐标(Y)作图(见图 4), 并回归分析得回归方程为: $y=(1.705x - 0.2624)\times 10^7$, $R^2=0.9954$, 表明藻液 $A_{689\text{nm}}$ 与细胞密度呈显著正相关, 说明藻液细胞密度可以用 $A_{689\text{nm}}$ 值间接地表示。

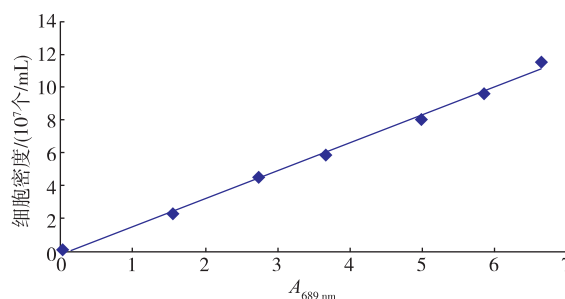


图 4 藻液细胞密度与 $A_{689\text{nm}}$ 相关性分析

Fig. 4 Correlation between Algal cell density and $A_{689\text{nm}}$

2.2 不同藻种的生长曲线及生长速率

在相同光照强度(200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)、温度(25±1°C)和通气量等培养条件下, 8 株微藻生长曲线如图 5 所示, 除了 HY-B1 藻株在第 10 d 时 OD 值开

始下降和 SF-B9 仍然在对数期外, 其余藻株在第 10 d 进入稳定期后, 至第 13 d 生物量的增长趋于稳定。微藻培养周期内出现的最高生物量(Maximal dry weight)作为评价其性能的指标较收获时更具有科学性。图 6 为 8 种藻种的比生长速率的比较, 从图中得知比生长速率最高的是 SF-B9, 达到 0.4197 d^{-1} , 说明 SF-B9 具有较高生物量积累能力, 生长速度最快, 其次比生长速率较高的还有 SF-B1、HY-B7 和 CC-B3。

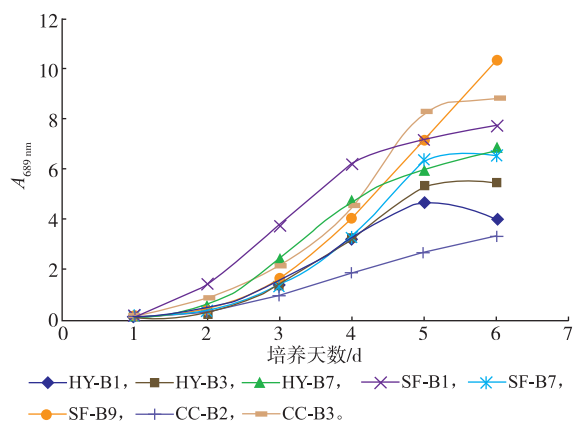


图 5 微藻藻种的生长曲线图

Fig. 5 Growth curves of microalgae species

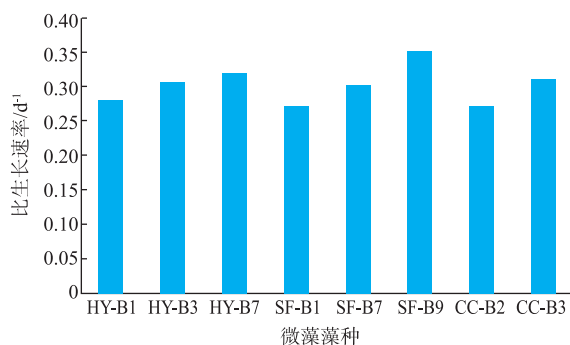


图 6 微藻的比生长速率曲线图

Fig. 6 Specific growth rates of microalgae species

2.3 微藻生物量和油脂质量分数的测定

对 8 种微藻的生物量和油脂质量分数进行统计分析, 结果如表 2 所示, 生物量超过 2 g/L 的有 5 种, 分别是 HY-B3、HY-B7、SF-B1、SF-B9 和 CC-B3, 其中生物量最高的是 SF-B9, 达到 2.69 g/L 。

单位体积生物量产率可以反映藻细胞生物量的积累速率, 由表 2 看出, 生物量和单位体积生物量产率呈正相关, 生物量高的其单位体积生物量产率也高, 其中 SF-B9 的单位体积生物量产率为 $192 \text{ mg/(L}\cdot\text{d)}$ 。

$\text{mg/(L}\cdot\text{d)}$ 。

由表 2 看出, 不同微藻藻种在相同培养条件下油脂的积累量具有明显的差异。油脂含量超过 40% 的有两种, 分别是 HY-B1 和 SF-B7, 他们的油脂质量分数分别达到 43.20% 和 40.92%。油脂质量分数在 30%~40% 之间有 4 种, 分别是 HY-B7、SF-B1、CC-B2、CC-B3。

表 2 分离藻株生物量及油脂质量分数的比较

Table 2 Biomass concentrations and lipid contents of the collected strains

编号	生物量/(g·L)	单位体积生物量产率/(mg/(L·d))	油脂质量分数/%
HY-B1	1.94	138.52	43.20
HY-B3	2.17	154.76	26.48
HY-B7	2.31	164.95	32.71
SF-B1	2.47	176.62	32.88
SF-B7	1.90	135.57	40.92
SF-B9	2.69	192.00	26.48
CC-B2	1.55	110.62	31.54
CC-B3	2.43	173.29	36.30

2.4 微藻藻种的产油潜力评价

从表 2 可以看出, 生物量产率高的藻种, 油脂含量不一定高, 因此利用生物量和油脂质量分数作为产油藻种的评价标准较为片面, 据此引入油脂产率作为重要的参考指标(评价指标), 它是微藻油脂质量分数与单位体积生物量产率的乘积, 表示每天实际收获的油脂量。8 种微藻的油脂产率见图 7。从图中可知 8 种微藻的油脂产率为 $34.9\sim 62.9 \text{ mg/(L}\cdot\text{d)}$ 。其中 CC-B3 的油脂产率最高, 为 $62.9 \text{ mg/(L}\cdot\text{d)}$ 。因此, 选择 CC-B3 为优良藻种。

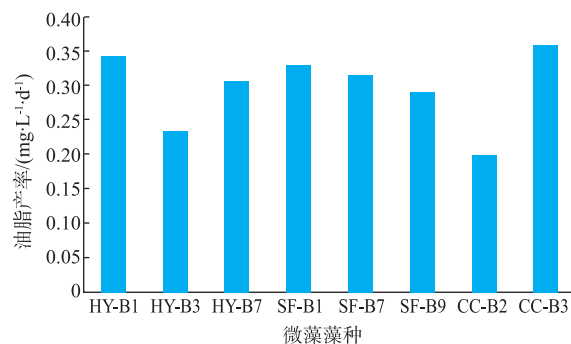


图 7 微藻的油脂产率比较

Fig. 7 Comparison of microalgae oil yields

2.5 CC-B3 藻株的鉴定分类

将 PCR 获得的藻株 CC-B3 的 18S rDNA

(1 782 bp) 在 NCBI Genbank 数据库中进行序列同源性比对,对获得的相近细菌 18S rDNA 序列进行多序列匹配排列,并构建系统发育树,如图 8 所示。

结果发现 CC-B3 与栅列藻属亲缘关系最近,与多个栅藻的 18S rDNA 序列相似度达到 99%,初步确定该藻属于斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)。

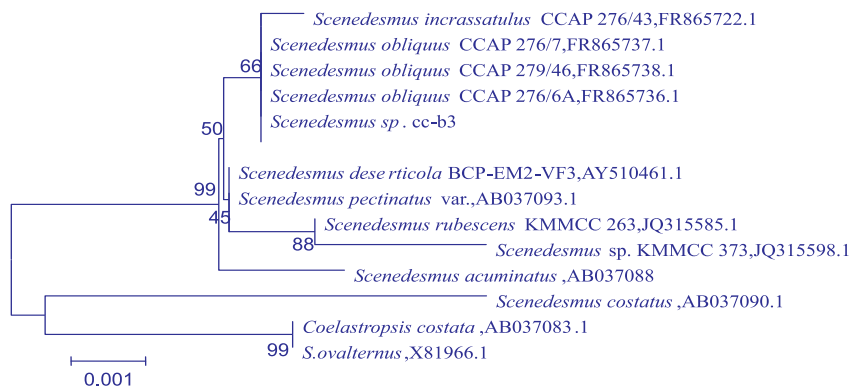


图 8 CC-B3 的 18S rDNA 序列系统发育树

Fig. 8 18S rDNA sequence phylogenetic tree of CC-B3

3 结 语

作者从东北地区 3 个水域中分离出 8 种微藻,并对其产油水平评价,获得油脂质量分数超过 30% 的微藻有 6 株,其中有 2 株高于 40%。试验观察到,微藻的油脂质量分数与微藻培养物的颜色存在一定关系,油脂含量较高的藻株在培养后期,培养物的颜色发生明显变化。

从生物量和油脂质量分数分析可知,有的微藻的生物量高,但油脂质量分数却不高,如藻株 SF-B9 生物量可达 2.69 g/L,油脂质量分数仅有

26.48%;有的藻种的生物量低,油脂质量分数却较高,如藻株 SF-B7 的生物量为 1.90 g/L,油脂质量分数为 40.92%。所以,应该综合生物量与油脂质量分数来评价一株微藻是否符合高效产油微藻的性能。

以油脂产率作为重要的筛选条件,获得的栅藻中, HY-B7、CC-B2 和 CC-B3 的油脂质量分数分别达到 32.71%、31.54%、36.30%,油脂产率也高于国内其他研究者所报道的水平,因此将选择其确定为具有高效产油潜力的微藻藻种。后续拟开展其培养条件的优化,以进一步提高其产油能力。

参考文献:

[1] TURNER J A. A realizable renewable energy future[J]. *Science*, 1999, 285(5427):687-689.

[2] 梁颖,冯俊丽,徐方娇,等.一株产油微藻—小球藻的纯化鉴定与培养基的筛选[J]. *科技通报*, 2013, 29(3):40-46.
LIANG Ying, PENG Junli, XU Fangjiao, et al. Identification of an oil-producing microalgae-chlorella and its medium selected[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2013, 29(3):40-46. (in Chinese)

[3] Nasrin M, Reza R, Alireza A, et al. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35:1935-1939.

[4] Solovchenko A E, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, et al. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*[J]. *Appl Phycol*, 2008, 20:245-251.

[5] Huerlimann R, de Nys R, Heimann K. Growth, Lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107:245-247.

[6] He G Q, Deng Z P, Tao L, et al. Screen and fermentation optimization of microalgae with high lipid productivity [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(6):1046-1053.

[7] 郝宗娣,刘平怀,杨勋,等.热带淡水产油微藻的分离筛选与鉴定[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(3):547-552.
HAO Zongdi, LIU Pinghui, YANG Xun, et al. Screen and identification of tropical freshwater microalgae for lipid production[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3):547-552. (in Chinese)

[8] 李涛,李爱芬,桑敏,等.富油能源微藻的筛选及产油性能评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(4):98-105.
LI Tao, LI Aifen, SANG Min, et al. Screening oleaginous microalgae and evaluation of the oil-producing characteristic [J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(4):98-105. (in Chinese)