

# 富含碳水化合物微藻的筛选、鉴定及其在不同氮浓度条件下的产糖分析

肖仕圆<sup>1,2</sup>, 许敬亮<sup>1†</sup>, 袁涛<sup>1,2</sup>, 赵月<sup>1,2</sup>, 吴浩<sup>1</sup>,  
李谢昆<sup>1,2</sup>, 袁振宏<sup>1</sup>

(1. 中国科学院广州能源研究所, 中国科学院可再生能源重点实验室, 广州 510640;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 以实验室保存的4株藻株为研究对象, 分析了它们的生长速率和淀粉等糖类的含量, 其中1株富含碳水化合物的微藻#3, 其生长速率和淀粉含量分别可达0.086 g/(L·d)和225.2 mg/L。18S rDNA聚类分析表明, 其属于栅藻科链带藻属 *Desmodesmus* sp. 缺N条件下, 微藻生长速率慢, 总糖积累快; 而在其他不同N浓度条件下, 生长速率趋势一致, 总糖积累速度不尽相同。

**关键词:** 微藻; 18S rDNA; 总糖

中图分类号: TK6 文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.2095-560X.2015.05.004

## Screening and Identification of Carbohydrate-rich Microalgae and Carbohydrate Production under Different Concentrations of Nitrogen

XIAO Shi-yuan<sup>1,2</sup>, XU Jing-liang<sup>1</sup>, YUAN Tao<sup>1,2</sup>, ZHAO Yue<sup>1,2</sup>, WU Hao<sup>1</sup>,  
LI Xie-kun<sup>1,2</sup>, YUAN Zhen-hong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The growth rate and starch content of four strains of microalgae preserved in our laboratory were analyzed. A carbohydrate-rich microalgae #3, as one of the four, was screened. Its growth rate and starch content could attain to 0.086 g/(L·d) and 225.2 mg/L, respectively. Further, microalgae #3 was identified as *Desmodesmus* sp. based on 18s rDNA cluster analysis. The growth rate of *Desmodesmus* sp. #3 was low and the total sugar accumulation was fast when cultured without adding nitrogen. The growth rate change at different nitrogen concentration was almost similar, but total sugar accumulation speed presented different change tendency.

**Key words:** microalgae; 18S rDNA; total sugar

## 0 引言

当前, 能源、资源和环境问题已经成为制约人类社会和谐发展的桎梏, 寻找开发清洁替代能源是解决这些问题的有效途径之一<sup>[1]</sup>。燃料乙醇作为清洁、可再生的能源, 能有效减少汽车尾气中的PM2.5和CO<sub>2</sub>排放, 同时具有较高的辛烷值等优点而备受

人们青睐<sup>[2]</sup>。微藻<sup>[3-4]</sup>作为高效的光合微生物, 能将太阳能、H<sub>2</sub>O和CO<sub>2</sub>通过光合作用转化为碳水化合物存储在细胞内。许多藻类细胞内含有大量的淀粉和纤维素<sup>[5]</sup>, 有些微藻淀粉含量可与玉米、小麦等相媲美; 另外, 微藻细胞内木质素和半纤维素含量较低, 而且与植物细胞中的纤维素I $\beta$ 不同, 微藻细胞内为I $\alpha$ 型纤维素, 其氢键较弱, 更易被降解为单

\* 收稿日期: 2015-07-13 修订日期: 2015-08-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划, 2013AA065803); 国家自然科学基金(2117623, 21211140237); 广东省科技攻关项目(2013B010403021); 广州市科技攻关项目(2013J4300026)

† 通信作者: 许敬亮, E-mail: xjl@ms.giec.ac.cn

糖，因此是作为燃料乙醇生产的优良原料<sup>[6]</sup>。微藻中可溶性碳水化合物含量的高低，是制约利用微藻制备燃料乙醇成本高低的关键。因此，选育生长速率快、碳水化合物含量高的藻株，对实现第三代燃料乙醇的高效制备至关重要。

本研究以实验室前期保存的 4 株藻株为研究对象，通过对它们的生长速率和含糖量进行分析，以期筛选出生长速率快和总糖含量高的藻株。同时，研究在不同 N 浓度条件下微藻生长和产糖的变化，为后期利用微藻制备燃料乙醇技术开发奠定基础。

表 1 藻株、菌株与质粒的性质和来源

Table 1 The properties and sources of microalgae, bacterial strains and plasmids

Strains	Properties	Sources
Microalgae SO	unknown	Guangzhou Institute of Energy Conversion
Microalgae CZ	unknown	Guangzhou Institute of Energy Conversion
Microalgae PM2	unknown	Guangzhou Institute of Energy Conversion
Microalgae #3	unknown	Guangzhou Institute of Energy Conversion
E. coli TRANS1-T1	F-φ80 lac ZΔM15Δ(lacZYA-arg F) U169 endA1recA1hsdR17(rk-,mk+)supE44-thi-1 gyrA96relA1phoA	TRANS
pEASY-T1	PT7 Kan+ Amp+ LacZ	TRANS
pEA-18S1	PT7 Kan+ Amp+ LacZ 18S1	this work
pEA-18S2	PT7 Kan+ Amp+ LacZ 18S2	this work

大肠杆菌 LB 培养基：1%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，1% NaCl，固体培养基加入 2%的琼脂粉；藻株采用 BG11 培养基进行培养，配方见表 2。

表 2 BG11 培养基配方

Table 2 Composition of BG11 medium

Composition	Mass concentration (g·L <sup>-1</sup> )
Citric acid	6.0 × 10 <sup>-3</sup>
ammonium ferric citrate	6.0 × 10 <sup>-3</sup>
NaNO <sub>3</sub>	1.5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.6 × 10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0 × 10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.5 × 10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
EDTA Na <sub>2</sub>	1.0 × 10 <sup>-3</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.0 × 10 <sup>-5</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.9 × 10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.8 × 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2 × 10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	8.0 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.9 × 10 <sup>-4</sup>

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验使用的藻株、菌株和质粒见表 1；Trans Start Taq 聚合酶链式反应试剂盒、DNA Loading Buffer、DNA Marker、卡那霉素等购自北京全式金生物公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技公司；其余试剂均为国产分析纯或生化级。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生长曲线和生长速率测定

在 BG11 培养基中培养 4 株藻株，每天取藻液测吸光度 OD<sub>550</sub>，连续检测 8 天，以吸光度值为纵坐标，时间为横坐标，绘制菌体的生长曲线。

在藻株生长的对数期，微藻生长速率 (μ) 使用以下方程测得<sup>[7]</sup>：

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_t - t_0}$$

其中：N<sub>0</sub> 是指在开始时刻 t<sub>0</sub> 时微藻细胞数；N<sub>t</sub> 是指在 t<sub>t</sub> 时微藻细胞数。

藻细胞干重采用差重法，即取一定体积藻培养液，经去离子水冲洗，用 GF/C 玻璃纤维滤纸抽滤，真空度在 (0.075 ~ 0.090) MPa 范围内。在 105℃ 烘箱中烘干至衡重<sup>[8]</sup>，并利用下式计算生物量。

$$B = (M_2 - M_1) / V$$

其中：B 为生物量，g/L；M<sub>1</sub> 表示滤膜烘干后质量，g；

$M_2$  表示藻液烘干后滤膜质量, g;  $V$  为藻液体积, L。

### 1.2.2 总糖和淀粉含量测定

(1) 葡萄糖标准曲线: 取一定量分析纯葡萄糖粉末, 80℃烘至恒重; 准确称取 20 mg 烘干后的葡萄糖粉末溶解于超纯水中, 定容至 500 mL; 准确称取 30 g 分析纯苯酚溶于 470 mL 超纯水中, 并用棕色试剂瓶低温保存; 取具塞比色管, 按表 4 加入葡萄糖标准液及超纯水, 并快速加入苯酚溶液 1 mL 及浓硫酸 (98%) 5 mL; 室温静置 10 min 后摇匀, 避光静置 20 min 后测定 490 nm 波长处的吸光度; 每个浓度设置 3 个平行, 绘制葡萄糖标准曲线。

表 3 葡萄糖标准液与超纯水用量表

Table 3 The glucose standard solution with ultrapure water use scale

No.	Standards (mL)	ddH <sub>2</sub> O (mL)
1	0.0	2.0
2	0.2	1.8
3	0.4	1.6
4	0.6	1.4
5	0.8	1.2
6	1.0	1.0
7	1.2	0.8
8	1.4	0.6
9	1.6	0.4
10	1.8	0.2

(2) 藻液中总糖含量测定: 取 1 mL 藻液, 经 12 000 rpm 离心 4 min, 去掉上层清液; 加入超纯水至适当浓度, 取 2 mL 藻液加入比色管中, 并快速加入苯酚溶液 1 mL 及浓硫酸 (98%) 5 mL;

室温静置 10 min 后摇匀, 避光静置 20 min 后测定 490 nm 波长处吸光度; 利用标准曲线计算出稀释后液体中的总糖浓度, 再换算为原藻液中总糖浓度。

(3) 标准曲线: 将表 3 中葡萄糖浓度作为  $x$  轴, 测得的吸光值作为  $y$  轴, 算出形如  $y = ax + b$  ( $R^2 = 0.995 \sim 0.999$ ) 的线性渐进趋势线, 确定  $a$ 、 $b$  的值。培养液中总糖的含量为:

$$TC = \frac{(A-b)}{2a} \times D$$

其中:  $TC$  为培养液中总糖的含量, g/L;  $A$  为吸光值;  $a$ 、 $b$  为标准曲线中的数值;  $D$  为加入的超纯水体积。

(4) 淀粉含量: 根据 FERNANDES 等<sup>[9]</sup>的方法测定其中的淀粉含量。

### 1.2.3 18S rDNA 的 PCR 扩增

取处于对数生长期的藻株 #3 藻液 1.5 mL 于离心管中, 以 12 000 rpm 离心 2 min。弃去上层清液, 用灭菌的去离子水洗涤沉淀, 然后加入液氮研磨沉淀, 其它提取藻株 #3 基因组 DNA 的步骤参照 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书。

按照真菌分类鉴定中的 18S rDNA 和 ITS 核酸序列分析方法, 设计了 2 对相应的通用引物 (表 4)。以藻株 #3 基因组 DNA 为模板, 按照 Taq 聚合酶链式反应试剂盒的反应体系进行 PCR 实验, 用 NS1 和 NS8 作为引物对得到的产物是 18S1, 用 ITS1 和 ITS2 作为引物对得到的产物是 18S2。反应程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s; 55℃退火 30 s; 72℃延伸, 延伸时间按 1 kb 的长度用时 1 min; 72℃延长 10 min; 4℃终止反应。循环数 35 次。

表 4 引物序列

Table 4 The sequence of primer

Primer name	Primer order (5'→3')
NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

### 1.2.4 阳性重组子的鉴定和测序

PCR 产物 18S1、18S2 和克隆载体 pEASY-T1 通过 A-T 碱基互补配对, 25℃恒温 30 min, 得到重组质粒 T-18S1 和 T-18S2, 经过 42℃热击转化进 *E. coli* TRANS1-T1 感受态细胞中, 培养于含卡那霉素终浓度为 50 μg/mL 的 LB 培养基中, 挑取单菌落, 经菌落 PCR 初步鉴定, 验证得到的阳性克隆子, 菌液送去上海立菲生物技术有限公司测序, 结果在 NCBI 中进行比对。

### 1.2.5 不同 N 浓度对碳水化合物累积的影响

微藻对氮源的需求仅次于碳源, 氮源的浓度会对藻体细胞内营养组分的分布产生影响。在藻株 BG11 培养基基础上剔除 NaNO<sub>3</sub>, 配成 5 L 培养基, 高温灭菌后, 往 5 只柱式光生物反应器中加入 455 mL 体积的培养基, 再加入约 10% 体积的藻液, 然后分别加入之前配好并已灭菌的一定体积不同浓度的 NaNO<sub>3</sub> 溶液, 使柱式光合反应柱中 NaNO<sub>3</sub> 浓度分别为 0 g/L、0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L, 其

中 1.5 g/L 为正常条件<sup>[10]</sup>。藻株的培养条件<sup>[11-12]</sup>为：培养温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ；光为单侧冷光白炽灯管（光强： $150 \pm 50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ）；持续通入空气或含 12% 体积  $\text{CO}_2$  的混合气。

## 2 结果和分析

### 2.1 富含碳水化合物微藻的筛选

#### 2.1.1 生长情况

4 株藻株在通气培养的过程中，生长规律如图 1a 所示，微藻 CZ 进入对数生长期较为迟缓，而其余 3 株微藻第 2 天即进入对数生长期，在第 6~7 天进入稳定生长期。

在藻株生长的对数期取样对其生长速率进行对比（图 1b），可以看出，藻株#3 的生长速率最快，可达  $0.086 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ ，SO 次之，为  $0.079 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ ，PM2 为  $0.076 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ ，CZ 生长速率最慢，为  $0.047 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 。

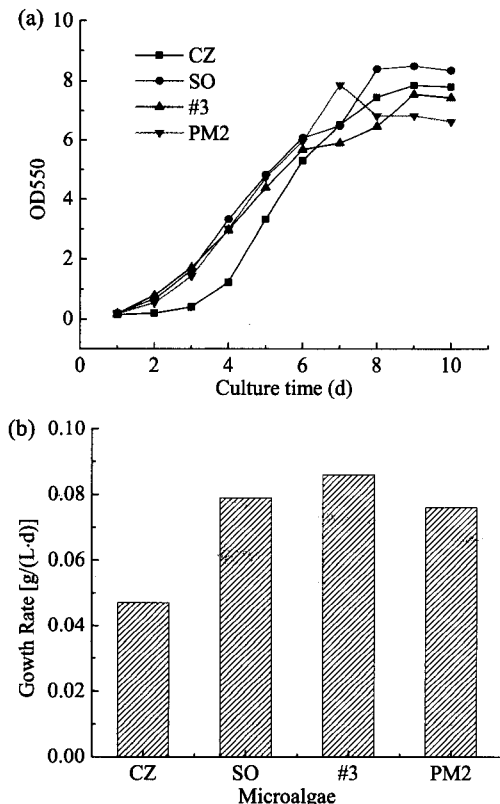


图 1 四种微藻的生长曲线 (a) 和生长速率 (b)  
Fig. 1 Growth curve (a) and growth rate (b) of four microalgae

#### 2.1.2 总糖和淀粉含量分析

进一步对 4 株微藻的总糖和淀粉含量进行了分析，发现不同藻株的总糖含量差异明显。CZ 的总糖含量最高，为  $745 \text{ mg}/\text{L}$ ；#3 次之，为  $556 \text{ mg}/\text{L}$ ；PM2

为  $469 \text{ mg}/\text{L}$ ；SO 最少，为  $436.2 \text{ mg}/\text{L}$ 。但就淀粉含量而言，#3 淀粉含量最高，为  $225.2 \text{ mg}/\text{L}$ ，CZ 为  $137.8 \text{ mg}/\text{L}$ ，PM2 为  $134.7 \text{ mg}/\text{L}$ ，SO 为  $113.4 \text{ mg}/\text{L}$ ，含量最低。此结果表明，微藻总糖含量的多少和淀粉等易还原性糖类的含量高低没有相关的关系。考虑到后期发酵产乙醇需要，淀粉等可溶性糖更容易被转化利用，选取生长速率最快和淀粉含量最高的藻株 #3 作为进一步的实验研究对象。

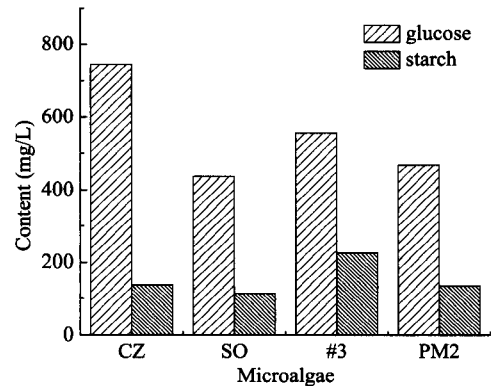


图 2 淀粉含量和总糖含量  
Fig. 2 Starch content and total sugar content

### 2.2 微藻的 18s rDNA 鉴定结果

以藻株 #3 基因组 DNA 为模板，用引物对 NS1 和 NS8、ITS1 和 ITS2 进行 PCR 扩增，用 1.2% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳，得到和理论大小  $2000 \text{ bp}$ 、 $634 \text{ bp}$  接近的目的条带（图 3），初步判定扩增成功。

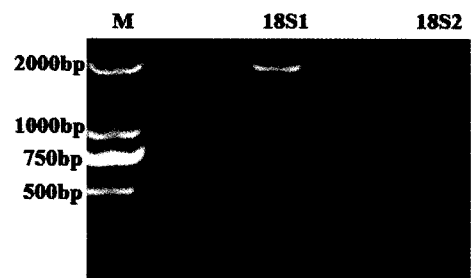


图 3 18s rDNA 基因克隆  
Fig. 3 18s rDNA gene cloning  
M: DL2000 DNA Marker

经 PCR 扩增的产物和 pEASY-T1 连接，转化进感受态细胞 *E. coli* TRANS1 中，菌落 PCR 获得阳性克隆子，菌液测序，将测序的结果在 NCBI 网站上使用 Blastn 程序进行比对。结果表明：所获得的序列与众多隶属于栅藻科链带藻属 *Desmodesmus* sp. 的多个物种的 18S DNA 有很高的同源性，其中相似性最高的是与栅藻科链带藻属 *Desmodesmus*

sp., 仅有一个碱基有差异, 一致性达到 99%以上。依据以上结果, 可以初步鉴定该藻株隶属于栅藻科的链带藻属 *Desmodesmus* sp.。

## 2.3 不同 N 浓度条件下藻体碳水化合物累积变化

### 2.3.1 *Desmodesmus* sp. 生长情况

实验设置了 5 组不同质量浓度的  $\text{NaNO}_3$  溶液, 研究了氮浓度对 *Desmodesmus* sp. #3 生长的影响, 结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出, 除了在缺氮条件, 其它氮浓度条件下藻株的生长曲线基本一致, 表明 N 浓度的增加对藻株的生长影响并不大。可能的原因是, 当氮源不足时, 藻细胞内叶绿素总量减少, 对光照强度和  $\text{CO}_2$  浓度需求降低, 光合作用和呼吸作用均减弱, 从而导致菌体生长缓慢; 当氮源浓度增加时, 微藻快速生长。研究表明, 该藻种可以在低浓度的氮源环境下生长。

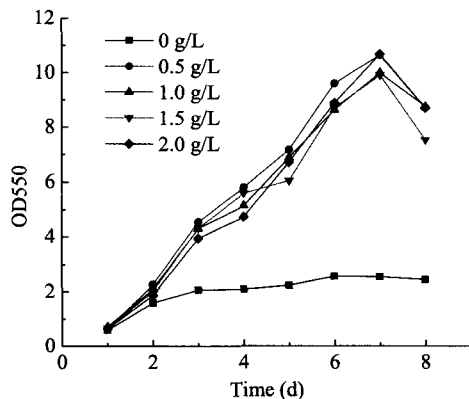


图 4 不同 N 浓度条件下藻株的生长曲线

Fig. 4 The growth curve under different concentrations of nitrogen

### 2.3.2 总糖含量

在缺 N 条件下, 微藻总糖含量在第 2 天迅速达到最高值 (图 5), 占细胞干重的 55.4%, 然后迅速下降, 最后维持在干重的 9.2%; 第二组 (0.5 g/L) 前两天总糖并无太大变化, 为最低值, 占干重的 11.6%, 从第 3 天开始上升, 在第 4 天达到最高值, 占干重的 24.9%, 之后处于平稳状态, 总糖含量变化不大; 第三组 (1 g/L) 从第 1 天开始总糖含量就处于上升当中, 在第 4 天达到最高值, 达到占干重的 38.3%, 之后就不停下降, 最终维持在 17.5%。第四组 (1.5 g/L) 正常条件培养下, 总糖含量从第 1 天开始上升, 在第 3 天达到最高值, 占干重的 32.6%, 之后迅速下降, 在第 4 天较低占干重的 11.7%, 之

后又迅速上升到占干重的 25.2%, 然后又缓慢下降。第五组 (2.0 g/L) 属于富 N 培养, 和正常条件类似的是, 前 3 天总糖含量急速增加, 在第 3 天达到峰值, 达到干重的 31.3%, 之后又迅速下降, 第 4 天为占干重的 12.8%, 之后达到了平稳的状态缓。从结果可以推测, 在氮源限制条件下, 藻细胞中需要 N 元素参与合成的营养组成如蛋白质、叶绿素等含量会下降, 从而糖类、脂类等不需要氮元素参与合成的营养组成含量上升, 这些结果和尤珊<sup>[13]</sup>、Lin<sup>[14]</sup>等的报道一致。

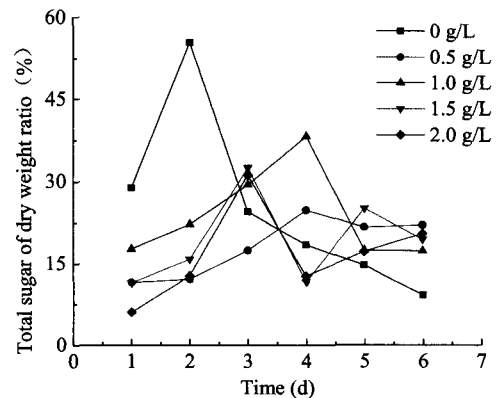


图 5 总糖含量变化曲线

Fig. 5 The change curve of total carbohydrate

## 3 结 论

通过对比 4 株不同微藻的生长速率和产糖情况, 获得了 1 株生长速率大且产糖量高的藻株 #3。通过对微藻 #3 其 18S rDNA 分析, 鉴定该藻株隶属于栅藻科的链带藻属 *Desmodesmus* sp.。缺 N 条件下是有利于微藻积累淀粉的, 但是不利于微藻生长; 富 N 条件在一定程度上能够促进微藻的生长, 但是不利于微藻积累糖类。综合考虑, 在浓度为 0.5 g/L 的  $\text{NaNO}_3$  BG11 培养基溶液中, 该藻株具有最大的研究价值。

### 参考文献:

- [1] NEIL S. The ideal biofuel[J]. Nature, 2011, 474: 9-11.
- [2] 郭美华, 杜宝杰. 乙醇汽油混合燃料的燃烧和排放特点分析[J]. 叉车技术, 2010, 33(2): 22-26.
- [3] SMITH V H, STUM B S M, DENOYELLES F J, et al. The ecology of algal biodiesel production[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2010, 25(5): 301-309.
- [4] COSTA J A, DE MORAIS M G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(1): 2-9.

- [5] DAROCH M, GENG S, WANG G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks[J]. *Applied Energy*, 2013, 102: 1371-1381.
- [6] LI X, HU H, GAN K, et al. Effect of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5494-5500.
- [7] WOOD A M, EVERROAD R C, Wingard L M. Measuring growth rates in microalgal cultures[J]. *Algal culturing techniques*, 2005: 269-286.
- [8] YOO C, JUN S Y, LEE J Y, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 71-74.
- [9] DE MORAIS M G, COSTA J A V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29: 1349-1352.
- [10] RICHMOND A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*[M]. Blackwell, 2004.
- [11] 季方, 郝睿, 刘颖, 等. 一株高生物量链带藻分离筛选与培养条件优化[J]. *农业机械学报*, 2013, 45(2): 149-154.
- [12] 张蕾, 胡光荣, 范勇, 等. 高产油突变藻株 *Desmodesmus* sp. D90G-19 的光合作用特征[J]. *海洋科学*, 2013, 11(37): 21-26.
- [13] 尤珊, 郑必胜, 郭祀远. 氮源对螺旋藻生长及胞外多糖的影响[J]. *食品科学*, 2004, 25(4): 32-35.
- [14] LIN Q, LIN J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 1615-1621.

### 作者简介:

肖仕圆(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物质能源生化转化技术研究。

许敬亮(1977-), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事生物质能源生化转化和纤维素燃料乙醇研究。