

应用黄金分割法优选小球藻的培养温度

刘志媛, 周俊如, 崔玉兵, 郑阵兵, 王 珺

(海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 利用黄金分割(0.618)优选法测定了两株分离自海南近岸海域的小球藻(*Chlorella* spp.)的最适生长温度。结果表明, 黄金分割优选法可以较少的实验次数找到小球藻的最适培养温度。两株小球藻在 15~40℃ 温度范围内均可生长。小球藻 HNC11 的最适生长温度为 34~36.5℃; 小球藻 HNC2 的最适生长温度为 28~30.5℃ 左右。

关键词: 小球藻(*Chlorella* spp.); 0.618; 温度优选; 生长

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)04-0037-04

微藻是一类个体微小的单细胞或多细胞植物, 能够有效地利用太阳能, 通过光合作用将无机物转化为脂类、蛋白质、多糖及色素等高附加值的代谢产物。微藻用途广泛, 不仅是鱼、虾、贝类幼体或成体的直接或间接的活饵料, 还是药品和保健品的原料^[1]。此外, 含油量高的微藻被认为是生物柴油的理想生物原料^[2-4]。

海南光热充足, 微藻资源丰富, 具有开发微藻产业的巨大优势。筛选微藻资源, 研究其生物学性状, 优化其培养条件, 是微藻资源开发和利用的必要前提。温度是影响微藻生长和代谢产物积累的关键环境因子之一, 因而温度培养条件最佳点的选择是微藻资源评价以及微藻生物质生产高产和优质的关键。然而微藻最适温度培养条件选择是一项极其繁琐和耗时的工作, 需要在温度控制仪器中进行多次实验获得, 且实验次数的增加必然会增加实验误差, 降低实验结果的准确性。为减少实验次数, 缩短实验周期, 本研究以两株分离自海口近岸海域的小球藻(*Chlorella* spp.)为材料, 采用黄金分割优选法对其最适生长温度进行优化, 以期提高微藻培养温度优化实验的效率。

黄金分割法优选法又称 0.618 优选法, 是一种较简单的优选方法, 首先由数学家华罗庚等在 20 世纪 70 年代初在酿酒等生产单位开始推广并大量应用。其基本思想是: 以区间的 0.618 处作为探测点, 通过取探测点和探测点上函数值的比较, 使包含极值点的搜索区间不断缩短至任意小^[5]。本研究结果表明, 利用黄金优选法, 通过 3~4 个温度点实验即可找出

小球藻的最佳生长温度范围, 是微藻培养条件优化的一种较简易、有效的方法。

1 材料与方法

1.1 温度优选实验设计

首先根据小球藻的生物学特性, 以 15~40℃ 作为小球藻温度优选的试验范围。温度优选试验分为几次进行。第 1 次实验: 以 15~40℃ 范围的 0.618 处, 即 30.5℃ 作为第 1 个温度试验点, 将其对称点 24.5℃ 作为第 2 个温度试验点, 比较小球藻在这两个温度点的生长状况, 去掉“劣”点温度一端部分。第 2 次实验: 取已试验点(“优”点)的对称点作为第 3 次试验点, 在第 3 次试验点处试验, 将其结果与第 1 次试验留下的“优”点处试验结果进行比较, 再去掉“劣”点, 留下“优”点。第 3 次实验: 确定在留下部分中该“优”点的对称点为第 4 次试验点, 实验结果与第 2 次实验的“优”点结果比较, 再去“劣”留“优”。如此, 每次实验可以去掉试验范围的 38.2%, 经过多次试验, 逐步缩小试验范围, 直至取得满意的结果。

1.2 藻种与培养

实验藻种小球藻 HNC11(*Chlorella* sp.HNC11)分

收稿日期: 2012-10-12; 修回日期: 2012-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(40966002); 海南省自然科学基金项目(409001); 海南大学 2009 科研项目(hd09xm56); 海南大学青年基金项目(qnjj1152)

作者简介: 刘志媛(1974-), 女, 山东淄博人, 博士, 副教授, 主要从事藻类生物学的教学和研究工作, E-mail: liuzhiyuan111@163.com; 王珺, 通信作者, 高级实验师, E-mail: 72206wj@163.com

离自海南大学丘海湖, 小球藻 HNC2(*Chlorella* sp.HNC2)分离自海口市白沙门公园。采用不加 Si 的 f/2 培养基^[6], 单藻种静止培养。海水取自海口市白沙门海水浴场, 经过滤后高压灭菌。培养基 pH8.1, 盐度 35。

取指数生长期的藻种按 1:5 比例接种于 5 L 玻璃三角瓶中。摇匀后分装于 250 mL 三角瓶中, 每瓶 200 mL 藻液。每个处理(温度实验点)4 次重复。所有实验处理培养光强为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗周期为 12h:12 h, 起始细胞密度为 3×10^6 个/mL。

1.3 分析方法

1.3.1 生长分析

培养液中小球藻的细胞密度与其在 500 nm 处的光密度值线性相关^[7]。用可见分光光度计(B722s 上海棱光技术有限公司)测定小球藻活体藻液的 A_{500} 值, 据公式(1)换算成细胞密度。

$$y = 2 \times 10^7 x, R^2 = 0.993 (P < 0.01) \quad (1)$$

式中, y 为每 mL 藻液细胞数; x 为 500 nm 处的光密度值。

据公式(2)计算指数生长期的藻种在 1~8 d 的相对生长速率。

$$K = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \\ T = 0.6931 / K \quad (2)$$

式中, K 为相对生长速率; t_1 、 t_2 为对应的培养时间; N_1 和 N_2 分别为 t_1 、 t_2 时期的细胞密度; T 为细胞的平均倍增时间。

1.3.2 统计分析

对 4 次平行试验结果, 用 DPS 数据处理系统进行统计分析^[8], Duncan 新复极差法检验各处理间差异。

2 结果与分析

2.1 小球藻 HNC11(*Chlorella* sp.HNC11)温度优选实验

实验结果表明, 小球藻 HNC11 在 15 和 40 条件下均可生长。静止培养条件下, 相对生长速率分别为 0.11 d^{-1} 和 0.14 d^{-1} , 细胞倍增时间分别为 6.38 d 和 4.85 d。因而, 以 15~40 作为温度优选实验范围。15~40 范围的黄金分割点为 30.5, 其对称点为 24.5, 因此, 首先以 30.5 和 24.5 作为第 1 次实验的第 1 个和第 2 个温度实验点(图 1a), 比较小球藻在两个温度条件下的相对生长速率。结果表明, 小球藻 HNC11 在 30.5 条件下的相对生长速率显著高于

在 24.5 条件下的相对生长速率($P < 0.05$, 表 1)。因此, 30.5 为“优”点, 24.5 为“劣”点, 去掉“劣”点一端部分, 则留下部分的温度区间为 24.5~40 (图 1b)。

以 30.5 在 24.5~40 区间的对称点 34 作为第 3 个温度实验点, 进行第 2 次试验(图 1b), 比较小球藻 HNC11 在 34 与 30.5 条件下的相对生长速率。为减小不同批次实验中因藻种生长状态等非处理因素引起的实验误差, 在第 2 次实验中同时进行了 34 与 30.5 两个处理。结果表明, 34 条件下小球藻 HNC11 的相对生长速率和平均倍增时间显著优于($P < 0.05$)在 30.5 条件下的(表 1), 因此 34 为这个实验区间的“优”点。去掉“劣”点 30.5 一端, 则可以确定第 3 次实验的温度区间为 30.5~40 (图 1c)。小球藻在第 1 和第 2 次实验中的 30.5 温度点条件下的相对生长速率无显著差异($P > 0.05$, 表 1)。

第 3 次实验(图 1c): 第 2 次实验的“优”点“34”在 30.5~40 温度区间的对称点为 36.5。因而, 以 36.5 为第 4 个实验点, 比较小球藻 HNC11 在 34 和 36.5 条件下的生长速率。结果表明, 小球藻 HNC11 在两个温度条件下的相对生长速率和平均倍增时间无显著差异($P > 0.05$, 表 1)。因而可以确定其最适生长温度为 34~36.5。第 2 次和第 3 次实验中 34 温度点的小球藻的相对生长速率无显著差异($P > 0.05$, 表 1)。

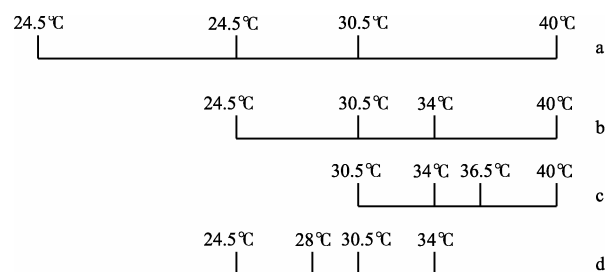


图 1 黄金分割优选法的温度实验点

Fig. 1 Temperatures selected with golden section method

2.2 小球藻 HNC2(*Chlorella* sp.HNC2)温度优选实验

静止培养条件下, 小球藻 HNC2 在 15 和 40 条件下的相对生长速率分别为 0.16 d^{-1} 和 0.14 d^{-1} , 细胞倍增时间分别为 4.3 d 和 4.9 d。

第 1 次实验(图 1a): 以 15~40 温度范围的黄金分割点 30.5 为第 1 个实验点, 以其对称点 24.5 为第 2 个实验点, 比较小球藻 HNC2 在这两个温度条件

下的生长速率。结果表明, 小球藻 HNC2 在 30.5 °C 下的相对生长速率显著高于($P < 0.05$) 在 24.5 °C 下的相对生长速率(表 1)。因此, 30.5 °C 为“优”点, 24.5 °C 为“劣”点, 去掉“劣”点一端部分, 则留下部分的温度区间为 24.5 ~ 40 °C (图 1b)。

第 2 次实验(图 1b): 以 30.5 °C 在 24.5 ~ 40 °C 区间的对称点 34 °C 作为第 3 个温度实验点, 比较 30.5 °C 与 34 °C 条件下的相对生长率。结果表明, 34 °C 条件下, 小球藻 HNC2 的相对生长速率显著低于($P < 0.05$) 30.5 °C 条件下的相对生长速率(表 1), 34 °C 条件下与

24.5 °C 条件下的相对生长速率无显著差异($P > 0.05$)。因此, 30.5 °C 为“优”点, 34 °C 为“劣”点, 去掉“劣”点一端部分, 则留下部分的温度区间为 24.5 ~ 34 °C (图 1d)。

第 3 次实验(图 1d): 以 30.5 °C 在 24.5 ~ 34 °C 区间的对称点 28 °C 作为第 3 个温度实验点, 进行第 2 次试验。结果表明, 30 °C 条件下, 小球藻 HNC2 的相对生长速率与 28 °C 条件下的相对生长速率无显著差异($P > 0.05$)。由此推断, 小球藻 HNC2 的最适生长温度为 28 ~ 30.5 °C。

表 1 不同温度条件下小球藻 HNC11 和 HNC2 的相对生长速率和平均倍增时间

Tab. 1 Relative growth rate and average generation time of *Chlorella* sp. HNC11 and *Chlorella*.sp. HNC2 under different temperature conditions

温度 (°C)	HNC11 相对生长速率 (d ⁻¹)	HNC11 平均倍增时间 (d)	HNC2 相对生长速率 (d ⁻¹)	HNC2 平均倍增时间 (d)
34 (1)	0.26 ^a	2.64 ^a	0.21 ^b	3.32 ^b
34 (2)	0.25 ^a	2.76 ^a		
36.5	0.25 ^{ab}	2.81 ^{ab}		
30.5 (1)	0.23 ^{bc}	3.04 ^{bc}	0.25 ^a	2.74 ^a
30.5 (2)	0.22 ^c	3.22 ^c	0.24 ^a	2.91 ^a
28			0.24 ^a	2.91 ^a
24.5	0.18 ^d	3.88 ^d	0.19 ^b	3.72 ^b

注: 新复极差检验, 同一列内, 上标有相同字母的表示处理平均数之间在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异不显著($P > 0.05$); 第一列内的“(1)”和“(2)”分别表示在两次实验中该温度点实验

3 讨论

我国著名数学家华罗庚先生从 1964 年起, 在全国推广优选法, 利用“0.618 优选法”解决了生产实践中的许多问题^[9]。在单因素优选问题中, 黄金分割优选法在选择配比方法、操作工艺及农业生产方面都起到了重要作用, 不仅减少了试验成本, 降低了消耗, 而且提高了质量和产量^[10-12]。我们实验结果表明, 应用黄金分割优选法, 可以用较少的实验次数快速地找到小球藻的最适培养温度。

在温度优选实验中, 为减少误差, 每次实验同时做两个实验点, 如 HNC11 的 30.5 °C 实验点在第 1 次和第 2 次实验中各做了 1 次。而我们的结果表明, 当藻种的接种密度、培养基和生态因子等培养条件一致时, 小球藻在不同批次的实验中, 同一温度下的相对生长速率无显著差异($P > 0.05$)。因此在利用黄金优选法时, 在控制藻种的接种密度、培养基及生态因子等培养条件一致性的情况下, 每个温度点仅做一次实验即可, 试验数将比本次实验的实验数减

少。如小球藻 HNC11 在第 2 次实验中, 只测定 34 °C 条件下的相对生长率即可, 然后与第 1 次实验的“优”点(30.5 °C)结果比较即可。因而, 将黄金分割优选法应用在微藻最适培养温度条件的选择上, 将显著地减少实验次数, 提高优化效率。

小球藻是绿藻门小球藻科中的一个重要属, 其环境适应强, 分布较广, 生长快, 易大量培养, 在特定条件下可积累大量油脂^[13-14], 因而不但是重要的饵料藻, 也是生产蛋白、色素及制备生物柴油的良好藻种。筛选适应不同生长环境的藻种有利于微藻的开发和利用。温度优选法的实验结果表明, 在海口近岸海域分离的小球藻株喜温耐热, 适宜在热带和亚热带地区培养。

参考文献:

- [1] 江红霞, 郑 怡. 微藻的药用、保健价值及研究开发现状[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(1): 68-72.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnol Adv, 2007, 25: 294-306.

- [3] Huntley M E, Redalje D G .CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal [J] . Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 2007, 12: 573-608 .
- [4] Haag A L . Algae bloom again [J] . Nature, 2007, 447: 520-521 .
- [5] 华罗庚. 优选学[M] . 北京: 科学出版社出版, 1981.
- [6] Guillard R R, Ryther J H . Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) [J]. Gran Can J Microbiol, 1962, 8(2): 229-239 .
- [7] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C . Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J] .Bioresour Technol, 2008, 99: 4717-4722 .
- [8] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统 [M]. 北京:科学出版社,2007.
- [9] 徐伟宣. 华罗庚与优选法统筹法[J]. 高等数学研究, 2006, 8(6): 63- 64.
- [10] 崔春红, 刘亚. 优选法在农业科学试验中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(4): 185- 186.
- [11] 赵迎路, 王月梅. 应用经济数学方法推动汾酒经济发展[J]. 酿酒, 2003, 30(3): 8- 9.
- [12] 谭杰, 刘羽. 0.618 优选法在水电站正常蓄水位优化选择中的应用[J]. 吉林水利, 2007, 298 (4): 1-2.
- [13] 刘志媛, 王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程 [J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 56-73.
- [14] Illman A M, Scragg A H, Shales S W . Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium[J] . Enzyme Microb Tech, 2000, 27: 631-635.

Growth temperature optimization of *Chlorella* spp. with Golden section optimization method

LIU Zhi-yuan, ZHOU Jun-ru, CUI Yu-bing, ZHENG Zhen-bing, WANG Jun
(College of Oceanology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Received: Oct.,12,2012

Key words: *Chlorella* spp.; 0.618; temperature optimization; growth

Abstract: The golden section (0.618) optimization method was used to determine the optimal growth temperature of two *Chlorella* strains isolated from Hainan coastal seawater. Results showed that the optimal growth temperature could be determined by golden section optimization method with a small number of experiments. Both strains could survive at temperatures ranging from 15 to 40 . The optimal growth temperature range for *Chlorella* sp. HNC11 is 34~36.5 and the one for *Chlorella* sp. HNC2 is 28~ 30.5 .

(本文编辑: 梁德海)