

海洋小球藻 (*Chlorella* sp.) 高密度培养条件优化研究

彭爱红, 高爽, 陈俊, 庄梅珍, 王凡, 陈晓梅, 林郑忠, 黄志勇

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为提高小球藻 (*Chlorella* sp.) 的生物量, 须对 f/2 配方培养基进行响应面优化。首先须确定小球藻培养基的最佳 pH 值和盐度。在此基础上, 利用 Plackett-Burman 设计方案筛选出影响小球藻生长的 3 个主要因素分别为 NaHCO_3 、 KNO_3 和维生素 B_{12} , 然后通过 Box-Behnken 设计试验确定这 3 个主要因素的最佳质量浓度参数。结果表明, 当培养基组成为: NaHCO_3 0.93 g/L、 MgSO_4 0.40 g/L、 KNO_3 0.46 g/L、 K_2HPO_4 0.020 g/L、维生素 B_1 0.60 mg/L、维生素 B_{12} 1.8 $\mu\text{g/L}$ 、生物素 2.0 $\mu\text{g/L}$ 时, 小球藻经实验室培养 72 h 后的生物量达到 4.5×10^7 个/mL, 较优化前提高了 32.5%。

[关键词] 海洋小球藻; 高密度; 培养基; 优化; 响应面分析法

[中图分类号] S 811.6

Optimization of Culture Condition for High Density of *Chlorella* sp.

PENG Ai-hong, GAO Shuang, CHEN Jun, ZHUANG Mei-zhen, WANG Fan,

CHEN Xiao-mei, LIN Zheng-zhong, HUNG Zhi-yong

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to increase the biomass yield of *Chlorella* sp., the culture conditions of f/2 medium were optimized by the response surface method. It was found that pH 5 and salinity 40 of the medium were suitable for the algal growth. Three important substrates in the culture medium screened via Plackett-Burman were sodium bicarbonate, potassium nitrated and Vitamin B_{12} , and their concentrations were further optimized by Box-Behnken. The optimized culture conditions were as follows: 0.93 g/L of sodium bicarbonate, 0.40 g/L of magnesium sulphate, 0.46 g/L of potassium nitrate, 0.020 g/L of potassium phosphate dibasic, 0.60 mg/L of Vitamin B_1 , 1.8 $\mu\text{g/L}$ of Vitamin B_{12} , and 2.0 $\mu\text{g/L}$ of biotin. After optimization, the cell density of the algae cultured for 72 hours was 4.5×10^7 cell/mL, which was 32.5% more than that in the original culture medium.

Keywords: *Chlorella* sp.; high density; culture medium; optimization; response surface method

0 引言

海洋小球藻 (*Chlorella* sp.) 是绿藻门绿藻纲绿球藻目小球藻科的一种单细胞藻^[1], 富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、多种维生素等多种营养成分^[2]。研究表明, 海洋小球藻是一种理想的

[收稿日期] 2015-11-08

[修回日期] 2016-01-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (21305050); 福建省自然科学基金项目 (2015J01615); 厦门市海洋经济发展专项 (14GZP67NF31); 集美大学创新团队基金资助项目 (2010A007)

[作者简介] 彭爱红 (1968—), 女, 副教授, 从事食品安全检测技术研究。通信作者: 黄志勇 (1963—), 男, 教授, E-mail: zhyhuang@jmu.edu.cn。

蛋白质资源,它易于大规模高密度培养、生产成本低廉、来源丰富,且藻细胞内含有类金属硫蛋白(metallothioneins-like,简称 MTs-like)^[3-6]。实验证明,经重金属(锌、铜等)诱导的海洋小球藻产生的 MTs-like 蛋白的生理活性功能与哺乳动物提取的 MTs 有一定的相似性,目前由于 MTs 原材料提取贵、工艺复杂,造成 MTs 的生产成本很高。因此,利用小球藻开发生产 MTs 对进一步拓展 MTs 的用途具有现实意义。

关于海洋小球藻的培养条件已有大量的研究报道^[7-10]。总体上,营养盐的组成和培养条件对小球藻的生长速率有显著影响,常规的 f/2 配方虽然适用于大部分微藻的生长,但基于小球藻不同株系的差异,仍需进行优化。因此,本文拟考察 pH 值、盐度对海洋小球藻(*Chlorella* sp.)生长的影响,并用响应面法对培养基的成分进行了优化,以期为高密度小球藻的生长和 MTs-like 蛋白的提取开发提供物质基础。

1 材料方法

1.1 材料与仪器

海洋小球藻(*Chlorella* sp.)藻种(编号 CCMA-410)由厦门大学海洋与地球学院提供。基础培养基为 f/2 培养基^[11]。

PGX 多段光照培养箱(宁波莱福科技有限公司);UV-2100 紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小球藻的培养

用灭菌海水配制培养基,并进行扩大培养。初始培养基组成为:NaHCO₃ 1.0 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、KNO₃ 0.50 g/L、K₂HPO₄ 0.020 g/L、维生素 B₁(VB₁) 0.60 mg/L、维生素 B₁₂(VB₁₂) 2.0 μg/L、生物素 2.0 μg/L。培养基 pH 值为 7,盐度为 30。在多段光照培养箱内进行扩大培养,设置的培养条件为:温度(25±1)℃,光照强度 2500 lx,光暗比 20 h:4 h。

1.2.2 小球藻生物量的测定

小球藻细胞密度采用光密度法测定^[12],根据小球藻液吸光度与小球藻的密度存在的对应关系可间接测定小球藻生物量^[13]。

1.2.3 单因素筛选

1) pH 值试验 取培养至对数生长期的藻液,分别用冰醋酸和 2 mol/L 的 NaOH 调节培养基的 pH 值分别至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,且 V(培养基):V(藻液)=50 mL:50 mL。每组设定 3 个平行,置于光照培养箱内进行扩大培养。72 h 后测定每组的吸光度值,并确定培养基的最佳 pH 值。

2) 盐度试验 调节培养基的盐度分别至 25、30、35、40、45,且 V(培养基):V(藻液)=50 mL:50 mL。每组设 3 个平行,置于光照培养箱内进行扩大培养。72 h 后测定每组的吸光度值,并确定培养基最佳盐度值。

3) 单因素试验 在最佳 pH 值和盐度的基础上,考察不同 ρ(NaHCO₃)、ρ(MgSO₄)、ρ(KNO₃)、ρ(K₂HPO₄)、ρ(VB₁)、ρ(VB₁₂)、ρ(生物素)对小球藻生长的影响。V(培养基):V(藻液)=50 mL:50 mL,每组设 3 个平行,置于光照培养箱内进行扩大培养。72 h 后测定其吸光度值。

采用 SPSS 17.0 软件对 pH 值、盐度试验及单因素试验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),采用 q 检验法进行多重比较,P<0.01 表示组间的差异有高度统计学意义,P<0.05 表示组间的差异有统计学意义。

1.2.4 培养基的优化设计

1) Plackett-Burman (P-B) 筛选试验设计 按照最佳盐度和 pH 值配制培养基,根据单因素实验结果,利用 Minitab 17.0 软件设计 P-B 试验(n=12),测定响应值为 72 h 后的藻液吸光度值,从而

有效地筛选出重要营养素对小球藻生长的影响。

2) Box-Behnken (B-B) 试验设计 在 P-B 试验的基础上, 用 Deign-Expert 8.0.6 软件对 P-B 试验筛选得到的显著因素进行 Box-Behnken 设计, 并对实验结果进行回归分析和误差分析, 以获得培养基最佳培养条件。

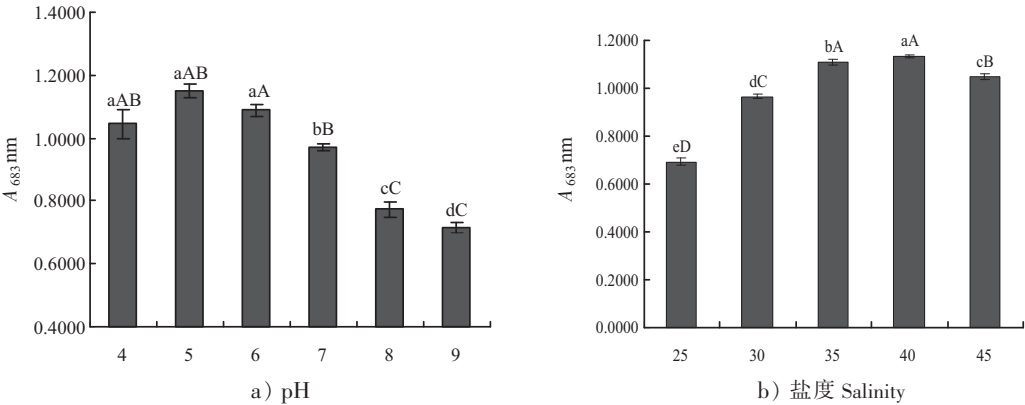
2 结果与讨论

2.1 小球藻生物量的测定

试验结果表明: 小球藻藻液在 683 nm 处的藻细胞生物量 (Q) 与吸光度值 (A) 呈线性关系, 线性方程为 $Q = 3.26A + 0.0755$, 相关系数 r 为 0.9988。因此, 本试验通过在 683 nm 处测定藻液的吸光度值, 获得小球藻的生物量。

2.2 培养基 pH 值和盐度对小球藻生长的影响

培养基的 pH 值和盐度是影响藻类生长代谢的重要因子, 不同 pH 值和盐度的培养基对小球藻生长的影响如图 1 所示。由图 1 可知, 培养基 pH 值为 4~6、盐度为 35~40 时, 小球藻生长良好, pH 值为 5 和盐度为 40 时小球藻的生长量达到最大。



说明:标有不同大写字母者表示组间差异有高度统计学意义($P<0.01$),标有不同小写字母者表示组间差异有统计学意义($P<0.05$),标有相同小写字母者表示组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

Notes:Different captial letters indicated high statistical significant difference among groups ($P<0.01$),different lowercase letters indicated statistical significant difference among groups($P<0.05$),same lowercase letters indicated no statistical significant difference($P>0.05$).

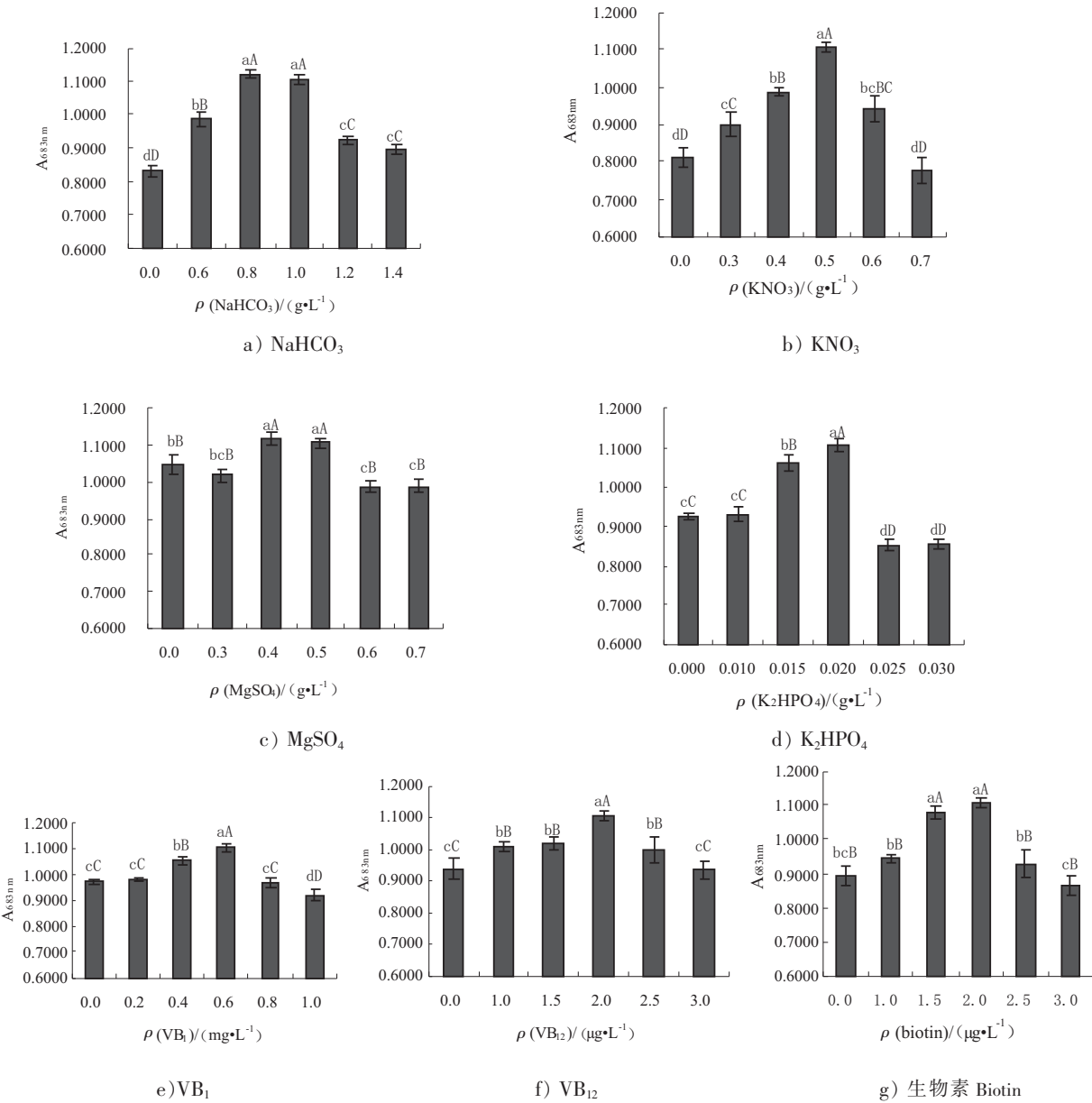
图1 pH值和盐度培养基对小球藻生长的影响
Fig.1 Effect of different pH and salinity medium on algal growth

2.3 营养素的单因素试验结果及分析

在改进的 f/2 配方基础上, 设定培养基中不同单一营养素的质量浓度, 考察其对小球藻生长的影响。单因素的试验结果如图 2 所示, 7 种营养素的最佳质量浓度分别为: NaHCO_3 0.80 g/L、 KNO_3 0.50 g/L、 K_2HPO_4 0.015 g/L、 MgSO_4 0.40 g/L、维生素 B_1 0.60 mg/L、维生素 B_{12} 2.0 $\mu\text{g/L}$ 和生物素 2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4 Plackett-Burman (P-B) 试验设计及结果分析

P-B 试验选取 NaHCO_3 、 KNO_3 等影响小球藻生物量的 7 个因素进行考察, 每个因素分高、低两个水平, 其中高水平为低水平的 2 倍。由表 1 可以看出, 影响小球藻生物量的重要因素 (置信度 $> 95\%$) 为 NaHCO_3 、 KNO_3 和 VB_{12} , 其中 NaHCO_3 和 VB_{12} 的主效应极显著 ($P = 0.002 < 0.01$), 而其他因素的影响不显著。因此, 将 NaHCO_3 、 KNO_3 、 VB_{12} 这 3 个培养基组分作为主要因素做进一步的响应面法优化。



说明:标有不同大写字母者表示组间差异有高度统计学意义($P<0.01$),标有不同小写字母者表示组间差异有统计学意义($P<0.05$),标有相同小写字母者表示组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

Notes:Different capital letters indicated high statistical significant difference among groups ($P<0.01$),different lowercase letters indicated statistical significant difference among groups ($P<0.05$),same lowercase letters indicated no statistical significant difference among groups($P>0.05$).

图 2 不同质量浓度的单一营养素对小球藻生长的影响
Fig.2 Effect of different nutrient concentrations on algal growth

2. 5 小球藻培养基成分配方的 Box-Behnken 设计及结果分析

用 Deign-Expert 8. 0. 6 软件对实验方案进行 Box-Behnken 设计, 结果见表 2 和表 3。以小球藻藻液的吸光度值为响应值 A , 通过 Design-Expert 8. 0. 6 软件对试验结果进行回归分析及回归拟合, 得到响应值 A 和因素 X 之间的回归方程为 $A = - 2. 880 + 2. 450X_1 + 8. 250X_2 + 1. 484X_3 + 0. 305X_1X_2 - 0. 350X_1X_3 + 0. 482X_2X_3 - 1. 270X_1^2 - 10. 08X_2^2 - 0. 404X_3^2$ 。

以上二次多项回归方程的方差分析和显著性检验结果见表 4。由表 4 可知, 回归模型高度显著

($P = 0.0043 < 0.01$), 失拟项不显著 ($P = 0.0740 > 0.05$), 即无失拟因素存在, 且 $\text{Adjusted } R^2 = 0.8979$ 、 $\text{Adep precision} = 12.065 > 4$, 可知回归方程拟合度和可信度均较高, 因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。由回归方程系数显著性检验结果可知, 方程二次项中 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对小球藻液吸光度影响显著, 各因素对小球藻液吸光度的影响大小分别为 $X_2 > X_1 > X_3$, 即 $\rho(\text{KNO}_3) > \rho(\text{NaHCO}_3) > \rho(\text{VB}_{12})$ 。

表 1 P-B 试验设计及结果
Tab. 1 Design and results of Plackett-Burman experiments

因素 Factors	水平 Levels		<i>T</i> <i>t</i> - Values	<i>P</i> Prob > <i>t</i>	重要性排列 Rank
	Low level (-1)	High level (+1)			
$\rho(\text{NaHCO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.60	1.2	-7.50	0.002**	1
$\rho(\text{KNO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.30	0.60	-2.71	0.054	3
$\rho(\text{MgSO}_4)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.30	0.60	-0.73	0.507	6
$\rho(\text{K}_2\text{HPO}_4)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.015	0.030	-0.65	0.553	7
$\rho(\text{VB}_1)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.40	0.80	-2.39	0.075	4
$\rho(\text{VB}_{12})/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.2	2.4	6.98	0.002**	1
$\rho(\text{Biotion})/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.2	2.4	-2.15	0.098	5

说明: * 表示在 5 % 的显著性水平通过检验; ** 表示在 1 % 的极显著性水平通过检验。
Notes: * significant at 5% level; ** very significant at 1% level。

表 2 Box-Behnken 试验因素与水平
Tab. 2 Factors and levels in Box-Behnken design

因素 Factors		水平 Levels		
		-1	0	1
X_1	$\rho(\text{NaHCO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.60	0.90	1.2
X_2	$\rho(\text{KNO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.30	0.45	0.60
X_3	$\rho(\text{VB}_{12})/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.2	1.8	2.4

表 3 BBD 试验设计及结果
Tab. 3 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号 Run	X_1 $\rho(\text{NaHCO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	X_2 $\rho(\text{KNO}_3)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	X_3 $\rho(\text{VB}_{12})/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Response value <i>A</i>
1	0.60	0.30	1.8	0.9603
2	1.2	0.30	1.8	0.9421
3	0.60	0.60	1.8	1.0205
4	1.2	0.60	1.8	1.0480
5	0.60	0.45	1.2	0.9709
6	1.2	0.45	1.2	1.1280
7	0.60	0.45	2.4	1.1251
8	1.2	0.45	2.4	1.0723
9	0.90	0.30	1.2	0.9741
10	0.90	0.60	1.2	0.9674
11	0.90	0.30	2.4	0.7987
12	0.90	0.60	2.4	0.9654
13	0.90	0.45	1.8	1.3136
14	0.90	0.45	1.8	1.3021
15	0.90	0.45	1.8	1.2806

表 4 回归方程的方差分析及其系数显著性检验

Tab. 4 Variance analysis of regression equation and significance test of the regression coefficients

方差来源	自由度	平方和	均方和	<i>F</i>	<i>P</i>
Sources of variation	DF	Sum of squares	Mean square	<i>F</i> -Values	<i>P</i> -Values
模型 Model	9	0.2960	0.0329	14.677	0.0043 **
X_1	1	0.0016	0.0016	0.720	0.4349
X_2	1	0.0133	0.0133	5.931	0.0590
X_3	1	0.0008	0.0008	0.346	0.5821
$X_1 X_2$	1	0.0005	0.0005	0.234	0.6493
$X_1 X_3$	1	0.0110	0.0110	4.916	0.0774
$X_2 X_3$	1	0.0075	0.0075	3.356	0.1265
X_1^2	1	0.0232	0.0232	10.332	0.0236 *
X_2^2	1	0.1900	0.1900	84.806	0.0003 **
X_3^2	1	0.0782	0.0782	34.886	0.0020 **
残差 Error	5	0.0112	0.0022		
失拟项 Lack of fit	3	0.0106	0.0035	12.682	0.0740
误差项 Pure error	2	0.0006	0.0003		
总和 Total	14	0.3072			

$R^2 = 0.9635$, Adjusted $R^2 = 0.8979$, Adep precision = 12.065

说明：* 表示在 5 % 的显著性水平通过检验；** 表示在 1 % 的极显著性水平通过检验。

Notes：* significant at 5% level；** very significant at 1% level。

用 Design Expert 8.0.6 软件根据回归方程进行绘图分析，得到三维响应曲面图和等高线图（如图 3—图 5 所示）。三维响应曲面图将任意两个自变量对响应值的影响直观地反映在球面上，响应值的最大值位于球面的最高点，等高线形状反映两个自变量的交互作用^[14-15]。由图 3—图 5 可知， $X_1 X_3$ 对响应值的等高线形状呈椭圆形，表明这两个自变量间有一定的交互效应， $X_1 X_2$ 和 $X_2 X_3$ 的交互作用较弱。

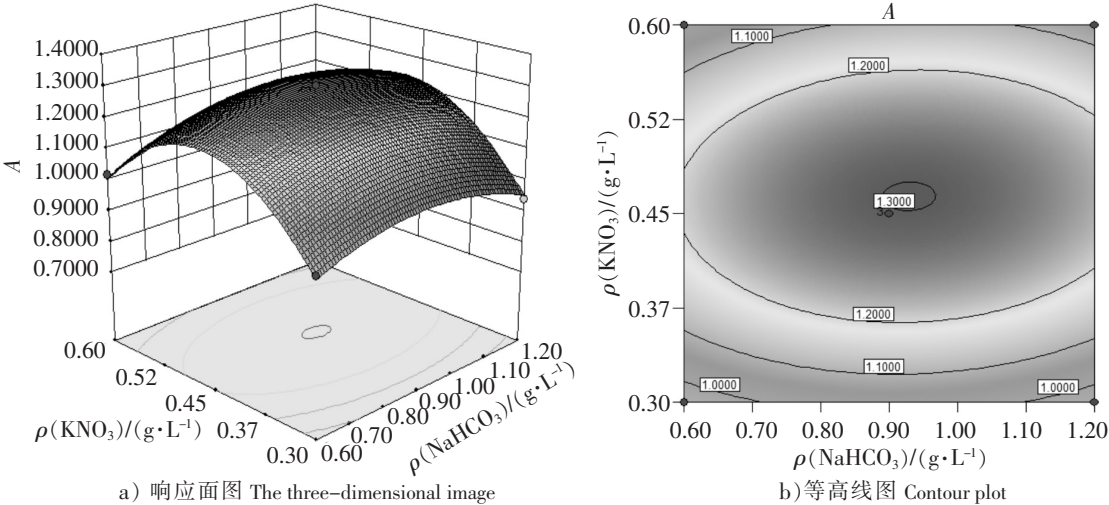


图 3 $y=f_1(X_1, X_2)$ 响应面图及等高线图
Fig.3 The three-dimensional image and contour plot of $y=f_1(X_1, X_2)$

对回归方程用 SAS 8.2 软件中 rsreg 语句的岭脊分析求出最佳值，得极值点坐标 $x_1 = 0.93$ ， $x_2 = 0.46$ ， $x_3 = 1.78$ 时相应因素及对应值分别为：NaHCO₃ 0.93 g/L、KNO₃ 0.46g/L、维生素 B₁₂ 1.8 μg/L，预测响应值（72 h 小球藻液吸光度）1.301。用此模型条件培养小球藻，72h 小球藻液的吸光度值为 1.308（与预测值差 0.57%），较优化前培养基培养的小球藻的吸光度值提高了 32.5%，对应的小球藻液的生物量（细胞密度）达到 4.5 × 10⁷ 个/mL，高于文献 [16-18] 中报道的自养培养条件下小球藻的生物量。

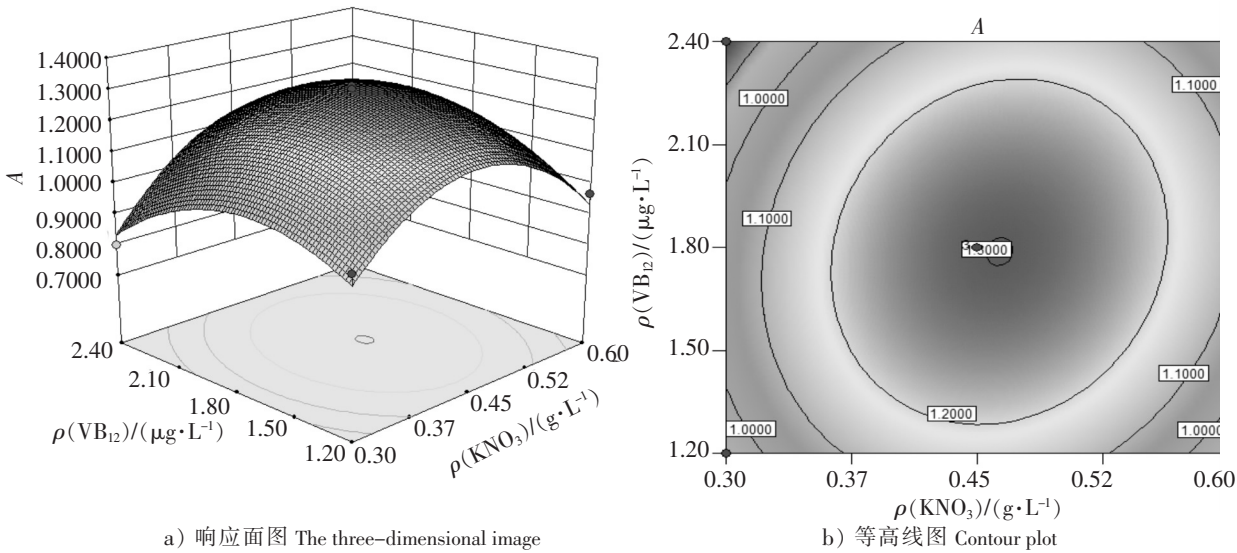


图 4 $y=f_2(X_2, X_3)$ 响应面图及等高线图

Fig.4 The three-dimensional image and contour plot of $y=f_2(X_2, X_3)$

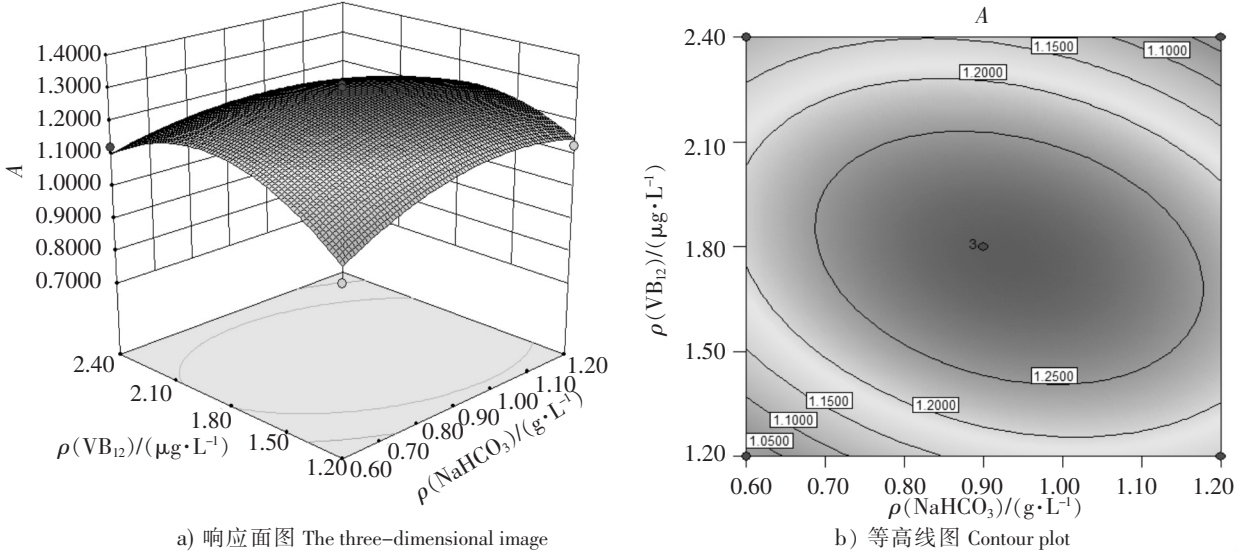


图 5 $y=f_3(X_1, X_3)$ 响应面图及等高线图

Fig.5 The three-dimensional image and contour plot of $y=f_3(X_1, X_3)$

3 结论

本文首先确定, 在光照培养箱中培养小球藻时, 培养基的最佳 pH 值为 5 和最佳盐度为 40, 再通过单因素试验发现小球藻营养盐配方中 7 种单一营养元素对小球藻的生物量均有一定影响, 并且确定了 7 种营养元素的最佳质量浓度分别为: NaHCO_3 0.80 g/L、 MgSO_4 0.40 g/L、 KNO_3 0.50 g/L、 K_2HPO_4 0.020 g/L、维生素 B_1 0.60 mg/L、维生素 B_{12} 1.8 $\mu\text{g/L}$ 和生物素 2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

利用 Plackett-Burman 设计试验对 NaHCO_3 等影响小球藻生物量的 7 个因素进行考察, 得出影响小球藻藻液吸光度值的重要因子 (置信度 >95%) 为 NaHCO_3 、 KNO_3 和维生素 B_{12} 。然后通过 Box - Behnken 设计试验对小球藻培养基中重要的影响因素 (包括 NaHCO_3 、 KNO_3 和维生素 B_{12}) 进行质量浓度优化, 优化后的培养基中 NaHCO_3 0.93 g/L、 KNO_3 0.46 g/L 和维生素 B_{12} 1.8 $\mu\text{g/L}$, 而其他成分的质量浓度保持不变。最后利用优化后的培养基在实验室条件下进行培养, 小球藻液生物量达到了 4.5×10^7 个/mL, 较优化前提高了 32.5%。

[参考文献]

- [1] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 55-91.
- [2] 张旗, 尚小玉, 王娜. 小球藻营养活性研究进展. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 139-142. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.13.037.
- [3] YANG H, HUANG Z Y, LI J, et al. MT-like proteins: potential bio-indicators of *Chlorella vulgaris* for zinc contamination in water environment. Ecological Indicators, 2014, 45: 103-109. DOI:10.1016/j.eco/ind.2014.03.017.
- [4] 李连平, 黄志勇, 王志聪, 等. 小球藻锌结合金属硫蛋白 (Zn-MT-like) 的抗氧化活性研究. 中国食品学报, 2009, 9(4): 23-27. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2009.04.004.
- [5] HUANG Z Y, LI L P, HUANG G L, et al. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. Aquatic Toxicology, 2009, 91(1): 54-61. DOI:10.1016/j.aquatox.2008.10.003.
- [6] 李连平, 梁英, 黄志勇, 等. 小球藻锌结合类金属硫蛋白的提取和分离. 食品与发酵工业, 2009, 35(6): 188-192. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2009.106.002.
- [7] 王方方, 杜风光, 刘钺, 等. 异养小球藻培养基优化筛选. 食品与发酵科技, 2015, 51(3): 23-26, 63.
- [8] 胡慧慧, 徐年军. 不同培养基及组成对 2 种小球藻生长和油脂的影响. 生物学杂志, 2012, 29(4): 12-16. DOI:10.3969/j.issn.2095-1736.2012.04.012.
- [9] 王俊彩, 赵阳国, 师振华, 等. 小球藻培养条件优化及油脂积累特征. 海洋环境科学, 2013, 32(1): 11-16.
- [10] 李金穗, 汪苹, 董黎明. 小球藻高密度培养及油脂提取条件的优化. 微生物学通报, 2012, 39(4): 486-494. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2012.04.016.
- [11] BOROWITZKA M A, BOROWITZKA L J. Micro-algal biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988: 457-465.
- [12] 沈萍萍, 王朝晖, 齐雨藻, 等. 光密度法测定微藻生物量. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2001, 22(3): 115-119. DOI:10.3969/j.issn.100-9965.2001.03.024.
- [13] 杨洪, 黄志勇. 锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响. 生态学报, 2012, 32(22): 7117-7123. DOI:10.5846/stxb.201110231567.
- [14] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 38-41. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2006.01.01.
- [15] ZOU T B, WANG M, GAN R Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(5): 3006-3017. DOI:10.3390/ijms12053006.
- [16] 张正洁, 汪苹. 自养小球藻培养条件的优化. 北京工商大学学报 (自然科学版), 2011, 29(1): 54-58. DOI:10.3969/j.issn.1671-1513.2011.01.012.
- [17] 尹继龙, 唐小红, 郑洪立, 等. 不同光质对小球藻光自养培养积累油脂的影响. 生物加工过程, 2014, 12(5): 62-68. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.05.011.
- [18] 李连平. 小球藻类金属硫蛋白结构表征及抗氧化与抗菌活性研究. 厦门: 集美大学, 2009.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)