

热带海洋富油微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率的响应面法优化研究

刘积光^{1,2}, 李 昂¹, 刘平怀¹, 王盛林¹, 赵震宇¹

(1. 海南大学 材料与化工学院, 海口 570228; 2. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 为了提高热带海洋富油微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 的油脂产率, 采用响应面法对其自养培养条件进行优化研究。通过单因素试验初步确定了影响 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率的 9 个因素的最佳条件。利用 Plackett - Burman 试验从中筛选出了显著影响 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率的 4 个因素, 运用 Box - Behnken 试验原理及响应面分析确定了 4 个因素的最佳参数为: 初始 OD_{680} 0.33, 氮浓度 10 mmol/L, 盐度 1.6% 和初始 pH 6.5。在优化后的条件下培养 *Desmodesmus* sp. WC08 的油脂产率为 141.47 mg/(L·d), 较优化前提高了 147.33%。

关键词: 富油微藻; 油脂产率; 氮浓度; Plackett - Burman 试验; 响应面法

中图分类号: TS222; Q936

文献标识码: A

文章编号: 1003 - 7969(2018)04 - 0096 - 05

Optimization of oil yield of tropical rich - in - oil microalgae *Desmodesmus* sp. WC08 by response surface methodology

LIU Jiguang^{1,2}, LI Ang¹, LIU Pinghuai¹, WANG Shenglin¹, ZHAO Zhenyu¹

(1. Department of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to improve the tropical rich - in - oil microalgae *Desmodesmus* sp. WC08 oil yield, the response surface methodology was adopted for autotrophic study on optimization of culture conditions. By single factor experiment, nine factors optimal concentrations which could promote oil yield of *Desmodesmus* sp. WC08 were obtained. Based on Plackett - Burman experiment, four significant factors were screened owing to *Desmodesmus* sp. WC08 oil yield. The optimal conditions were determined through the Box - Behnken experiment and response surface methodology as follows: nitrogen concentration 10 mmol/L, salinity 1.6%, initial OD_{680} 0.33, initial pH 6.5. Under the optimal conditions for cultivating *Desmodesmus* sp. WC08, the oil yield was 141.47 mg/(L·d), increased by 147.33% than that without optimization.

Key words: rich - in - oil microalgae; oil yield; nitrogen concentration; Plackett - Burman experiment; response surface methodology

收稿日期: 2017 - 08 - 17; 修回日期: 2018 - 01 - 18

基金项目: 国家科技型中小企业技术创新基金项目(13C26244604892); 海南省产学研一体化项目(CXY20150034); 海南省中药现代化科技专项(ZY201327); 国家科技支撑计划项目(2011BAD14B01); 海口市海藻生物资源研究与利用技术创新平台(2017044)

作者简介: 刘积光(1994), 男, 硕士研究生, 研究方向为药食同源植物/微藻及其代谢产物的研究开发(E-mail)467174664@qq.com。

通信作者: 刘平怀, 教授, 博士生导师(E-mail)twlph@163.com。

微藻是一种可再生资源, 具有分布广、生物量大、光合效率高、环境适应能力强、生长周期短、油脂含量高和环境友好等突出特点。因此, 微藻在解决能源问题上具有很大的潜力。然而, 理想的生物柴油微藻原料, 应兼具高含油量和高生物量这两个指标, 而高含油量与高生物量却往往又不能兼顾, 如微藻 *C. sorokiniana* 拥有高生物量却不具备高含油量^[1], 微藻 *Botryococcus* 含油量为 80% 却生长极为缓慢^[2]。为此, 微藻的油脂产率成为富油微藻培养条件优化的一个综合指标。微藻培养条件的优化是

一个复杂的过程,响应面法通过合理设计试验并对数据进行统计分析,可以减少试验次数、缩短周期,还可研究几个因素间的交互作用,具有优化过程条件、提高产品质量、提高适应能力的优点^[3]。近年来响应面法在优化微藻培养基方面的应用也取得了良好的效果。曾文炉等^[4]利用响应面法优化了转小鼠金属硫蛋白-I基因聚球藻7002的培养基,在2 L光生物反应器中其生物量较优化前提高了9倍,效果显著。本文以提高油脂产率为目的,采用单因素试验、Plackett-Burman因素筛选试验、响应面法对热带海洋微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 光合自养培养的诸多因素进行考察和优化,以期获得较高油脂产率的综合培养条件,为后续规模化的培养奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用藻种分离自海南省文昌市周围海域,经多次平板划线获得纯种,尼罗红染色初步确定为富油微藻。经18S rDNA和ITS测序鉴定为绿藻门栅藻科链带藻属(*Desmodesmus*),编号为WC08,由海南大学生物工程实验室藻种库保藏。使用人工海水BG11基础培养基初步培养,培养10 d生物量达1.97 g/L,总脂含量为29%,油脂产率为57.2 mg/(L·d)。

TU-1810紫外可见分光光度计,日立CR-22G II离心机,LDJ-25C冷冻干燥系统,日本SANYO高压蒸汽灭菌锅,柱状玻璃管(高60 cm,直径3 cm)。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方法

以BG11为基础培养基,每升水添加15 g粗海盐配制人工海水(粗海盐购自海南莺歌海盐场),并添加1.5 g NaNO₃, 0.04 g K₂HPO₄, 0.075 g MgSO₄·7H₂O, 0.036 g CaCl₂·H₂O, 0.006 g 柠檬酸, 0.006 g 柠檬酸铁铵, 0.02 g Na₂CO₃, 0.001 g EDTA·Na₂, 2.860 g H₃BO₃, 0.220 g ZnSO₄·7H₂O, 1.810 g MnCl₂·4H₂O, 0.079 g CuSO₄·5H₂O, 0.049 g Co(NO₃)₂·6H₂O, 0.390 g Na₂MoO₄·2H₂O, 采用直径为3 cm,高度为60 cm,培养液体积为300 mL的玻璃管,周围安装灯管,控制光照强度为4 500~8 500 lx,光照周期为12 h:12 h,室温下培养,并通入无菌空气,通气比为0.25,培养周期为15 d。

1.2.2 测定方法

1.2.2.1 生物量的测定

将培养藻液于对数生长末期采用离心方式进行

收集,以8 000 r/min转速离心5 min。所得藻泥用去离子水洗涤两次。然后采用真空冷冻干燥方法进行干燥,除湿机下迅速称重计算细胞干重。所得干燥样品研磨成粉末后于-20℃下保存备用^[5]。按下式计算生物量。

$$\text{生物量} = \text{冻干藻粉质量} / \text{培养液体积}$$

1.2.2.2 总脂含量及油脂产率的测定

采用稍加修改的Folch等^[6]方法进行总脂含量的测定。称取0.1 g藻粉于试管中,加入2 mL氯仿-甲醇(体积比2:1)溶液。室温水浴超声30 min,加入磁石,磁力搅拌3~6 h。4 000 r/min离心5 min,将上清液取出收集。再加入2 mL氯仿-甲醇溶液磁力搅拌3 h,重复若干次至藻泥变为灰白色或提取液颜色不变。向收集得到的上清液中加入0.2倍体积的0.9% NaCl溶液洗涤分层,旋涡混匀。将下层氯仿相用氮吹仪吹干至恒重。按下式计算总脂含量及油脂产率。

$$\text{总脂含量} = \text{总粗油脂质量} / \text{藻粉质量} \times 100\%$$

$$\text{油脂产率} = \text{藻粉质量} \times \text{总脂含量} / (\text{藻液体积} \times \text{培养时间})$$

1.2.3 试验设计

1.2.3.1 单因素试验

由于本课题组前期研究^[7-11]已有碳浓度、氮浓度、磷浓度、盐度、钙浓度、镁浓度、铁浓度7种因素,在此进行最佳接种OD₆₈₀和初始最适pH的单因素试验。

试验选取处于对数生长期的藻液,无菌状态下离心浓缩后,在接种藻液体积相同的条件下,通过添加不同体积的浓缩液来将初始接种OD₆₈₀分别设置为0.2、0.3、0.35、0.4、0.45。通过设置初始pH分别为5、6、7、8、9,考察初始OD₆₈₀、初始pH对微藻生长和油脂产率的影响。

1.2.3.2 Plackett-Burman因素筛选试验

根据*Desmodesmus* sp. WC08自养产油培养过程特点,结合本课题组前期研究^[7-11],选取9种可能影响*Desmodesmus* sp. WC08油脂产率的因素,分别是碳浓度(Na₂CO₃)、氮浓度(CO(NH₂)₂)、磷浓度(K₂HPO₄)、盐度、初始pH、初始OD₆₈₀、钙浓度(CaCl₂·H₂O)、镁浓度(MgSO₄·7H₂O)、铁浓度(柠檬酸铁铵),采用软件Design-Expert (Version 8.0.5)进行Plackett-Burman因素筛选试验方案设计,进行12次试验^[12]。每个因素取2个水平,以前期确定的最佳条件为中间值来确定低水平和高水平^[13]。

采用 Design - Expert 8.06 软件对试验结果进行方差分析,结果见表3。由表3可知,9个因素中初始 OD_{680} 、氮浓度、初始 pH、盐度4个因素为显著影响的因素。

表3 Plackett - Burman 试验方差分析

自变量	回归系数	效应值	影响率	显著性
碳浓度	4.08	8.160 4	3.561 1	
钙浓度	-2.48	-4.960 1	1.315 6	
初始 OD_{680}	8.91	17.821 4	16.983 8	*
dummy	-1.15	-2.309 2	0.285 1	
磷浓度	-3.26	-6.511 2	2.267 1	
铁浓度	-0.94	-1.880 6	0.189 1	
氮浓度	10.38	20.767 0	23.062 1	*
dummy	-5.77	-11.538 1	7.119 1	
镁浓度	12.46	24.919 0	8.205 8	
初始 pH	-7.46	-14.923 4	11.909 4	*
盐度	0.69	13.789 5	33.302 5	*

注: * 为显著影响的因素。

结合课题组前期研究^[8-12]成果可知,除去初始 OD_{680} 、初始 pH、氮浓度、盐度,其他各因素最优条件为:碳浓度 0.754 mmol/L、钙浓度 0.05 mmol/L、磷浓度 0.5 mmol/L、铁浓度 0.02 μ mol/L、镁浓度 0.09 mmol/L。

2.3 响应面法优化

根据 Plackett - Burman 因素筛选结果,对显著影响 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率的重要因素,依据 Box - Behnken 试验原理采用 Design - Expert 8.06 软件进行响应面中心组合试验设计及分析,找到最优化的组合,依据设计结果进行四因素三水平试验,因素及编码水平见表4,试验因素水平设计及结果见表5,回归模型系数的显著性检验见表6。

表4 Box - Behnken 试验设计因素及编码水平

因素	水平		
	-1	0	1
C 初始 OD_{680}	0.25	0.30	0.35
G 氮浓度/(mmol/L)	8	10	12
K 盐度/%	1.4	1.6	1.8
J 初始 pH	6.0	7.0	8.0

利用 Design - Expert 8.06 软件进行初始 OD_{680} 、氮浓度、盐度和初始 pH 对油脂产率(Y)影响的回归分析,建立多元二次响应面回归方程: $Y = 89.74 + 7.14C + 15.23G + 7.888J - 9.33K - 3.27CG + 5.85CJ - 1.10CK + 6.07GJ - 17.76GK - 2.63JK + 6.21C^2 + 14.53G^2 - 3.20J^2 - 0.71K^2$ 。

由表6可知,本试验所选用模型极显著($P < 0.0001$),拟合度好,模型能够反映响应值的变化;

模型的相关系数 $R^2 = 0.9019$,预测值与试验值具有较高的相关性;失拟项不显著,说明残差由随机误差引起。因此,该模型可用来对微藻油脂产率进行分析和预测。一次项 C、J、K 项显著,G 极显著;二次项 G^2 极显著, C^2 、 J^2 、 K^2 不显著;交互项 CG、CJ、CK、GJ、JK 项不显著,GK 极显著。可见试验因素与响应值并不是简单的线性关系。结合回归方程可知 C、G、J 系数为正,对油脂产率起正作用,K 系数为负,对油脂产率起负作用,二次项 C^2 、 G^2 系数为正,对油脂产率起正作用, J^2 、 K^2 系数为负,对油脂产率起负作用。影响油脂产率的因素大小顺序为:G 氮浓度 > K 盐度 > J 初始 pH > C 初始 OD_{680} 。

表5 Box - Behnken 试验设计及结果

试验号	C	G	J	K	油脂产率/(mg/(L·d))
1	0	0	0	0	88.39
2	-1	0	0	1	87.41
3	1	0	0	1	105.75
4	1	1	0	0	126.29
5	0	0	0	0	98.50
6	1	0	-1	0	88.95
7	1	0	0	-1	110.07
8	0	0	0	0	83.13
9	-1	0	1	0	90.92
10	0	-1	0	1	89.17
11	0	1	0	1	82.15
12	0	0	-1	-1	91.95
13	-1	0	0	-1	87.31
14	0	-1	-1	0	90.42
15	-1	-1	0	0	90.07
16	0	0	0	0	87.86
17	0	0	-1	1	72.42
18	1	-1	0	0	108.31
19	0	0	1	1	89.18
20	0	-1	1	0	90.95
21	0	1	-1	0	116.64
22	0	1	1	0	141.46
23	-1	0	-1	0	90.03
24	1	0	1	0	113.24
25	0	0	1	-1	119.23
26	-1	1	0	0	121.13
27	0	-1	0	-1	82.72
28	0	0	0	0	90.82
29	0	1	0	-1	146.73

根据回归模型及 Design - Expert 8.06 软件分析,得出油脂产率的最佳工艺参数为初始 OD_{680} 0.33、氮浓度 10 mmol/L、盐度 1.6% 和初始 pH 6.5,此条件下油脂产率预测值为 145.873 mg/(L·d)。为了检验模型的可靠性,用此模型的最佳工艺条件

培养 *Desmodesmus* sp. WC08 所得实际油脂产率为 141.47 mg/(L·d), 与预测值相对误差仅为 3.02%, 说明该回归方程与实际情况拟合较好, 该模型可以较好地模拟和预测油脂产率。

表 6 回归模型系数的显著性检验

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
C	612.61	1	612.61	9.42	0.008 3	*
G	2 783.43	1	2783.43	42.80	<0.000 1	**
J	745.29	1	745.29	11.46	0.004 4	*
K	1 044.03	1	1 044.03	16.05	0.001 3	*
CG	42.77	1	42.77	0.66	0.431 0	
CJ	136.89	1	136.89	2.10	0.168 9	
CK	4.88	1	4.88	0.08	0.788 1	
GJ	147.50	1	147.50	2.27	0.154 3	
GK	1 261.32	1	1 261.32	19.39	0.000 6	**
JK	27.67	1	27.67	0.43	0.524 8	
C ²	250.21	1	250.21	3.85	0.070 0	
G ²	1 369.59	1	1 369.59	21.06	0.000 4	**
J ²	66.40	1	66.40	1.02	0.329 4	
K ²	3.30	1	3.30	0.05	0.825 1	
模型	8 369.17	14	597.80	9.19	<0.000 1	**
残差	910.53	14	65.04			
失拟	783.57	10	78.36	2.47	0.199 0	
纯误差	126.95	4	31.74			
总和	9 279.69	28				

注: ** 为 $P < 0.001$, 表示差异极显著; * 为 $P < 0.05$, 表示差异显著。

3 结论

利用 Plackett - Burman 对可能影响 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率的 9 个因素进行效应评价, 筛选出 4 个影响显著的因素, 采用响应面中心组合试验建立其油脂产率预测模型, 获得预测的最大油脂产率并确定 4 个因素最适参数。最终确定当每升培养基中含有 0.6 g $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.087 g K_2HPO_4 , 0.022 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.006 45 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.006 g 柠檬酸, 0.009 76 mg 柠檬酸铁铵, 0.080 g Na_2CO_3 , 0.001 g $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, 2.860 g H_3BO_3 , 0.220 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.810 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.049 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.390 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 光照强度在 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (约 8 333 lx) 左右, 并控制无菌空气通气比为 0.25, 初始接种 OD_{680} 为 0.33, 培养液初始 pH 为 6.5, 盐度 1.6% 时 *Desmodesmus* sp. WC08 油脂产率达到最高为 141.47 mg/(L·d), 比优化前 (57.2 mg/(L·d)) 提高了 147.33%。

参考文献:

- [1] GRIFFITHS M J, HARRISON S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production [J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21(5): 493 - 507.
- [2] ZHILA N O, KALACHEVA G S, VOLOVA T G. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus* [J]. *J Appl Phycol*, 2005, 17(4): 309 - 315.
- [3] 郑洪立, 高振, 黄和, 等. 响应面法优化自养小球藻产生生物柴油油脂 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(8): 106 - 111.
- [4] 曾文炉, 赵飞飞, 曹照根, 等. 利用响应面方法优化转小鼠金属硫蛋白 - I 基因聚球藻 7002 的培养基成分 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24(1): 130 - 136.
- [5] GAO Y Y, YANG M C, WANG C H. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 147: 484 - 491.
- [6] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497 - 509.
- [7] 罗宁, 张森, 刘平怀. 氮、磷对热带海洋富油微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 生长及油脂积累的影响 [J]. *食品工业科技*, 2016(4): 223 - 227.
- [8] 张森, 刘平怀, 王影, 等. 铁、镁及钙对微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 生长和油脂积累的影响 [J]. *广东农业科学*, 2014(4): 126 - 130.
- [9] ZHAO Z Y, MA S S, LI A, et al. Effects of trophic modes, carbon sources, and salinity on the cell growth and lipid accumulation of tropic ocean oilgae strain *Desmodesmus* sp. WC08 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 180(3): 1 - 12.
- [10] 刘平怀, 郝宗娣, 杨勋, 等. 不同氮源对 2 种微藻生长及总脂含量的影响 [J]. *生态环境学报*, 2012, 21(8): 1429 - 1433.
- [11] 刘平怀, 张森, 杨勋, 等. 氮、磷源及海盐对微藻细胞生长和油脂积累的影响 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 186 - 189.
- [12] PLACKETT R L, BURMAN J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. *Biometrika*, 1946, 33(4): 305 - 325.
- [13] 譙顺彬, 迟海洋, 张奕婷, 等. 螺旋藻混合营养培养基响应面法的优化研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 109 - 113.
- [14] 仪超. 以生活污水为底物的产油微藻筛选与培养条件优化研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [15] 蒋文凯, 张国庆, 邓湘云, 等. 初始 pH 和碳酸氢钠对威氏海链藻生长的影响 [J]. *海洋渔业*, 2014, 36(1): 51 - 56.