

# 响应面法优化普通小球藻混合营养培养基组成生产生物物质

杨 琪 王科荣 孔维宝\* 杨 红 曹 海 张馨允

(西北师范大学生命科学学院 兰州 730070)

**摘要** 利用响应面法优化了混合营养培养普通小球藻生产生物物质的培养基组成。首先采用 Plackett-Burman 设计对 11 个相关营养因素的效应进行了评价,并筛选出影响小球藻细胞生长的 3 个主要因素为  $\text{KNO}_3$ 、葡萄糖和  $\text{NaCl}$ ;然后结合 Box-Behnken 设计建立了以小球藻浓度为响应值的二次回归方程模型,获得优化的培养基组成为  $\text{KNO}_3$  1.64g/L、葡萄糖 45g/L、 $\text{NaCl}$  1.57g/L;模型预测的最大浓度为 5.28g/L,验证值为 5.68g/L;验证结果表明,所建立模型预测精度较好,可用于优化小球藻的混养培养基组成。优化条件下混养小球藻细胞的蛋白质和色素含量较优化前降低,而可溶性糖和油脂含量提高,脂肪酸以棕榈酸和油酸为主;细胞组分分析结果显示,混养培养所得小球藻生物物质具有作为生产微藻生物能源原料的潜力。

**关键词** 普通小球藻 响应面法 混合营养 培养基组成 生物物质

**中图分类号** Q819

随着全球碳排放和能源短缺问题的日益凸显,生物物质能源的开发受到世界各国的广泛关注和研究。其中,利用微藻生产生物柴油被认为是最有前景的可再生绿色能源<sup>[1]</sup>。但是,高成本问题严重制约了微藻生物柴油工业化发展的进程。因此,高密度培养微藻也成为开发微藻生物柴油亟待解决的关键技术之一<sup>[2]</sup>。

目前,微藻的大规模培养通常采用开放池进行光合自养培养。该方法虽然具有不占用耕地、成本相对低廉和能耗低等优势,但是由于微藻培养密度低、周期长、占地面积大和培养液易污染等缺点,使其进一步发展受到制约<sup>[3]</sup>。因此,开发新型、高效的微藻培养技术成为能源微藻研究领域的重要课题之一<sup>[4]</sup>。混合营养指微藻既能进行光合作用合成有机物,又能通过利用培养基中的有机碳源来满足其营养和繁殖的一种营养方式<sup>[5]</sup>。混合营养方式使微藻不仅依赖于光合作用生长,而且有机碳源也可促进藻细胞的生长<sup>[6]</sup>。与开放池培养体系中培养的微藻相比,混合营养方式可实现微藻的快速率、短周期、高密度培养<sup>[7]</sup>。而且由于微藻

培养密度的显著提高可大大缩小生物反应器的容积,从而减少基建投资<sup>[8]</sup>。因此,混合营养方式培养微藻可能是微藻生物柴油生产的重要策略<sup>[9]</sup>。

培养基组成的优化是一个复杂的过程,涉及大量的试验研究。响应面法(response surface methodology, RSM)克服了传统的单因素试验次数多、试验周期长和结果不准确等缺点,已被成功应用于培养基和培养条件的优化<sup>[10]</sup>。本文以普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)为模式微藻,采用 Plackett-Burman(P-B)设计对影响小球藻混合营养培养生产生物物质的相关营养因素进行评价,并通过 Box-Behnken(B-B)设计对筛选得到的显著因素进一步优化,确定优化的混合营养培养基组成,以期对混合营养高密度培养小球藻生产生物物质和微藻生物柴油的开发提供实验依据和技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 藻种 小球藻(*C. vulgaris*-31)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。

1.1.2 培养基 藻种光合自养培养基为土壤浸出液

收稿日期:2012-03-07 修回日期:2012-05-18

\* 通讯作者,电子邮箱:kwbao@163.com

培养基(SoilEM), 组成为(L):0.25g NaNO<sub>3</sub>, 0.175g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.075g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 75mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 25mg NaCl, 25mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 40ml 土壤浸出液, 1ml A<sub>5</sub> 溶液。A<sub>5</sub> 溶液组成(g/L):H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86, MnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1.81, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.222, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.079, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.390。

1.1.3 试剂与仪器 试验用水为蒸馏水, 培养基营养盐等均为分析纯试剂。

电子天平(日本岛津)、TDL-5000B 低温冷冻离心机(上海飞鸽)、LDZX-40B1 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安)、DHZ-C 型大容量恒温振荡器(江苏太仓)、超净工作台(江苏安泰)、电热烘箱(上海一恒)、Agilent 2890A/5975C GC/MS(美国安捷伦)。

1.2 方 法

1.2.1 培养方法 无菌条件下吸取对数期的藻种培养液 10ml 接入装有 90ml 培养液的三角瓶中, 摇匀后置于光照恒温振荡器内摇瓶培养, 摇瓶转速 120r/min, 光照强度 2 500lx, 光暗比:12h:12h, 温度为(25±1)℃。培养基灭菌条件为 121℃, 0.1MPa, 20min。

1.2.2 培养基的优化设计 ①Plackett-Burman (P-B) 试验设计:结合小球藻生长所需营养元素种类和预期试验结果, 选取葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、酵母浸出物、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、NaCl、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、EDTA-Na<sub>2</sub> 和 A<sub>5</sub> 溶液 11 个因素作为 P-B 设计进行考察和筛选的因素, 每个因素取高(+1)和低(-1)两个水平, 响应值为小球藻浓度(Y), 并对试验结果进行分析, 确定显著因素。

②Box-Behnken (B-B) 试验设计:采用 B-B 设计对 P-B 试验筛选得到的显著因素进一步优化, B-B 试验设计见表 1。以 P-B 试验筛选得到的 KNO<sub>3</sub>(X<sub>1</sub>)、葡萄糖(X<sub>2</sub>)和 NaCl (X<sub>3</sub>) 浓度为自变量, 按下式进行编码转换:

$$X_1 = (x_1 - 1.2)/0.8; X_2 = (x_2 - 25)/20; X_3 = (x_3 - 3)/2$$

用标准多项式回归方法对试验数据进行拟合, 得到响应值与自变量关系的二次多项式:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_{ii}^2 \tag{1}$$

式(1)中,β<sub>0</sub>为截距;β<sub>i</sub>为线性系数;β<sub>ii</sub>为平方系数;β<sub>ij</sub>为交互作用系数;X<sub>i</sub>、X<sub>j</sub>为编码转换后的自变量;Y为预测响应值即小球藻浓度。

试验设计与数据分析均采用 Design-Expert 7.0 软

件完成。

表 1 B-B 试验设计因素和水平

Table 1 B-B experimental design factors and levels

| 编号             | 试验因素                   | 水平  |     |     |
|----------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                |                        | -1  | 0   | +1  |
| X <sub>1</sub> | KNO <sub>3</sub> (g/L) | 0.4 | 1.2 | 2.0 |
| X <sub>2</sub> | 葡萄糖 (g/L)              | 5   | 25  | 45  |
| X <sub>3</sub> | NaCl (g/L)             | 1   | 3   | 5   |

1.3 分析方法

培养基优化设计试验中, 小球藻摇瓶培养 6d 后, 取摇匀的藻液 4ml 置于事先干燥称重的离心管中, 5 000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用蒸馏水充分洗涤藻泥, 同样条件下离心弃去洗涤液, 将装有藻泥的离心管在 80℃烘箱中干燥至恒重, 取出离心管置于干燥器中使其自然冷却后称重, 计算小球藻细胞浓度, 以 g/L 表示。

藻细胞蛋白质含量的测定采用微量凯氏定氮法<sup>[11]</sup>, 光合色素、可溶性糖含量的测定参照文献<sup>[11]</sup>, 油脂提取采用索氏提取法<sup>[11]</sup>, 脂肪酸甲酯的制备参考国标 GB/T 17376-2008 中的三氟化硼甲醇法<sup>[12]</sup>。

GC-MS 测定条件:GC 汽化室温度 290℃, 美国 J&W. HP-5 (30m×0.25mm×0.25μm) 弹性石英毛细管柱, 以 6℃/min 的升温速率由 60℃(恒温 2min)程序升温至 290℃(恒温 5min), 载气为高纯氮。MSD 离子源为 EI 源, 离子源温度 230℃, 电子能量 70eV;使用美国 NIST05 谱库。

2 结果与分析

2.1 P-B 设计及结果分析

营养元素对藻细胞生物量的积累有重要影响。P-B 试验选取葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub> 和 KNO<sub>3</sub> 等 11 个因素进行全面考察, 选用 n=12 的 P-B 设计, 每个因素选高低 2 个水平, 以小球藻浓度为响应值(Y), 按表 2 和表 3 设计进行试验。

由表 3 分析可知, 各因素中 x<sub>1</sub>、x<sub>3</sub>、x<sub>4</sub>、x<sub>5</sub>、x<sub>7</sub> 和 x<sub>9</sub> 对小球藻生物质的生产具有正效应, 而 x<sub>2</sub>、x<sub>6</sub>、x<sub>8</sub>、x<sub>10</sub> 和 x<sub>11</sub> 为负效应。混合营养培养基组分中显著影响小球藻浓度的因素依次为:KNO<sub>3</sub>、葡萄糖和 NaCl, 贡献率分别为 70.025%、13.825% 和 3.718%, 效应值分别为 1.512、0.672 和 0.348。因此, 选取 KNO<sub>3</sub>、葡萄糖和 NaCl 作为显著因素, 进一步优化。

表 2 P-B 试验设计表及其结果  
Table 2 P-B experimental design matrix and results

| Run | $x_1$ | $x_2$ | $x_3$ | $x_4$ | $x_5$ | $x_6$ | $x_7$ | $x_8$ | $x_9$ | $x_{10}$ | $x_{11}$ | 小球藻浓度 (g/L) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|-------------|
| 1   | +1    | +1    | -1    | +1    | +1    | +1    | -1    | -1    | -1    | +1       | -1       | 0.97        |
| 2   | -1    | +1    | +1    | -1    | +1    | +1    | +1    | -1    | -1    | -1       | +1       | 2.13        |
| 3   | +1    | -1    | +1    | +1    | -1    | +1    | +1    | +1    | -1    | -1       | -1       | 3.11        |
| 4   | -1    | +1    | -1    | +1    | +1    | -1    | +1    | +1    | +1    | -1       | -1       | 1.18        |
| 5   | -1    | -1    | +1    | -1    | +1    | +1    | -1    | +1    | +1    | +1       | -1       | 1.94        |
| 6   | -1    | -1    | -1    | +1    | -1    | +1    | +1    | -1    | +1    | +1       | +1       | 0.99        |
| 7   | +1    | -1    | -1    | -1    | +1    | -1    | +1    | +1    | -1    | +1       | +1       | 1.45        |
| 8   | +1    | +1    | -1    | -1    | -1    | +1    | -1    | +1    | +1    | -1       | +1       | 0.84        |
| 9   | +1    | +1    | +1    | -1    | -1    | -1    | +1    | -1    | +1    | +1       | -1       | 3.10        |
| 10  | -1    | +1    | +1    | +1    | -1    | -1    | -1    | +1    | -1    | +1       | +1       | 1.71        |
| 11  | +1    | -1    | +1    | +1    | +1    | -1    | -1    | -1    | +1    | -1       | +1       | 3.46        |
| 12  | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1       | -1       | 0.95        |

表 3 P-B 设计因素水平及效应分析  
Table 3 Effect analysis of P-B design factors and levels

| 编号       | 因素   | 水平    |       | 效应值    | 平方和   | 贡献率    | 显著性排序 |
|----------|--|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
|          |  | 低(-1) | 高(+1) |        |       |        |       |
| $x_1$    | 葡萄糖 (g/L)                                    | 4.0   | 20.0  | 0.672  | 1.353 | 13.825 | 2     |
| $x_2$    | NaHCO <sub>3</sub> (g/L)                     | 0.2   | 1.0   | -0.328 | 0.323 | 3.303  | 4     |
| $x_3$    | KNO <sub>3</sub> (g/L)                       | 0.4   | 2.0   | 1.512  | 6.855 | 70.025 | 1     |
| $x_4$    | 酵母浸出物 (g/L)                                  | 0.4   | 2.0   | 0.168  | 0.085 | 0.868  | 9     |
| $x_5$    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)        | 0.4   | 2.0   | 0.072  | 0.015 | 0.157  | 11    |
| $x_6$    | MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/L)  | 0.4   | 2.0   | -0.312 | 0.291 | 2.977  | 5     |
| $x_7$    | NaCl (g/L)                                   | 1.0   | 5.0   | 0.348  | 0.364 | 3.718  | 3     |
| $x_8$    | CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (mg/L) | 50    | 250   | -0.228 | 0.156 | 1.598  | 7     |
| $x_9$    | FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O (mg/L) | 10    | 50    | 0.198  | 0.118 | 1.205  | 8     |
| $x_{10}$ | EDTA-Na <sub>2</sub> (mg/L)                  | 20    | 100   | -0.252 | 0.190 | 1.941  | 6     |
| $x_{11}$ | A <sub>5</sub> 溶液 (ml/L)                     | 1.0   | 5.0   | -0.112 | 0.037 | 0.382  | 10    |

2.2 B-B 设计及结果分析

2.2.1 模型的建立与方差分析 以 KNO<sub>3</sub>、葡萄糖和 NaCl 为自变量, B-B 设计因素及编码水平如表 1 所示, 结果见表 4。

表 4 B-B 试验设计及结果  
Table 4 B-B experimental design matrix and results

| 试验号 | $X_1$ (KNO <sub>3</sub> ) (g/L) | $X_2$ (葡萄糖) (g/L) | $X_3$ (NaCl) (g/L) | 小球藻浓度 (g/L) |      |
|-----|---------------------------------|-------------------|--------------------|-------------|------|
|     |                                 |                   |                    | 实测值         | 预测值  |
| 1   | -1                              | -1                | 0                  | 2.23        | 1.82 |
| 2   | +1                              | -1                | 0                  | 3.48        | 2.96 |
| 3   | -1                              | +1                | 0                  | 4.09        | 4.61 |
| 4   | +1                              | +1                | 0                  | 3.34        | 3.75 |
| 5   | -1                              | 0                 | -1                 | 2.38        | 2.42 |
| 6   | +1                              | 0                 | -1                 | 2.83        | 2.98 |
| 7   | -1                              | 0                 | +1                 | 3.11        | 2.96 |
| 8   | +1                              | 0                 | +1                 | 2.74        | 2.70 |
| 9   | 0                               | -1                | -1                 | 2.34        | 2.71 |
| 10  | 0                               | +1                | -1                 | 6.39        | 5.83 |
| 11  | 0                               | -1                | +1                 | 3.60        | 4.16 |
| 12  | 0                               | +1                | +1                 | 5.00        | 4.63 |
| 13  | 0                               | 0                 | 0                  | 5.16        | 4.81 |
| 14  | 0                               | 0                 | 0                  | 4.31        | 4.81 |
| 15  | 0                               | 0                 | 0                  | 4.94        | 4.81 |
| 16  | 0                               | 0                 | 0                  | 4.84        | 4.81 |
| 17  | 0                               | 0                 | 0                  | 4.81        | 4.81 |

通过 Design-Expert 7.0 软件对表 4 数据进行二次多项回归拟合获得编码的回归方程为

$$Y=4.81+0.073X_1+0.90X_2+0.064X_3-0.50X_1X_2-0.20X_1X_3-0.66X_2X_3-1.55X_1^2+0.020X_2^2-0.50X_3^2 \quad (2)$$

由回归方程(2)得出的小球藻浓度预测值见表 4, 回归模型及方差分析结果见表 5。

表 5 二次多项回归模型及方差分析表  
Table 5 Table for secondary polynomial regression models and ANOVA

| 方差来源     | 平方和    | 自由度 | 均方差    | F 值    | Prob > F | 显著性* |
|----------|--------|-----|--------|--------|----------|------|
| 模型       | 20.967 | 9   | 2.330  | 7.328  | 0.008    | *    |
| $X_1$    | 0.042  | 1   | 0.042  | 0.132  | 0.727    |      |
| $X_2$    | 6.426  | 1   | 6.426  | 20.212 | 0.003    | *    |
| $X_3$    | 0.033  | 1   | 0.033  | 0.102  | 0.759    |      |
| $X_1X_2$ | 1.000  | 1   | 1.000  | 3.145  | 0.119    |      |
| $X_2X_3$ | 0.168  | 1   | 0.168  | 0.529  | 0.491    |      |
| $X_1X_3$ | 1.756  | 1   | 1.756  | 5.522  | 0.051    |      |
| $X_1^2$  | 10.080 | 1   | 10.080 | 31.704 | 0.001    | *    |
| $X_2^2$  | 0.002  | 1   | 0.002  | 0.005  | 0.943    |      |
| $X_3^2$  | 1.052  | 1   | 1.052  | 3.308  | 0.112    |      |
| 残差       | 2.226  | 7   | 0.318  |        |          |      |
| 失拟项      | 1.835  | 3   | 0.612  | 6.270  | 0.054    | 不显著  |
| 净误差      | 0.390  | 4   | 0.098  |        |          |      |
| 总离差      | 23.193 | 16  |        |        |          |      |

Note:  $R=0.951$ ;  $R^2=0.904$ ;  $R^2_{adj}=0.781$ ; CV=14.61%

由表 5 的方差分析可见,整体模型的  $F = 7.33$ ,  $\text{Prob} > F$  值小于 0.05,表明该模型显著。模型失拟项 (lack of fit) 表示模型预测值与实际值不拟合的概率。表 5 中模型失拟项  $F$  值为 6.27,  $\text{Prob} > F$  值 = 0.054 > 0.05,失拟项不显著,因此模型选择正确。同时模型中的参数  $X_2$  和  $X_1^2$  达到显著水平 ( $\text{Prob} > F$  值小于 0.05),表明葡萄糖浓度对小球藻浓度的线性效应显著,而  $\text{KNO}_3$  浓度对小球藻浓度的曲面效应显著。模型的相关系数  $R^2 = 0.904$ ,说明模型可以解释试验所得小球藻浓

度 90.4 % 的变化,表明方程拟合较好。综上所述,回归方程为小球藻混合营养培养的细胞浓度的预测提供了一个合适的模型。

2.2.2 响应面交互作用分析及最佳培养成分确定为进一步考察  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ )、葡萄糖 ( $X_2$ ) 和  $\text{NaCl}$  ( $X_3$ ) 3 个因素的交互作用以及确定最优点,通过 Design-Expert 7.0 软件由方程(2)绘制出响应曲面图(图 1)。每个响应面分别代表两个独立变量之间的相互作用,此时第 3 个变量保持在中心水平。

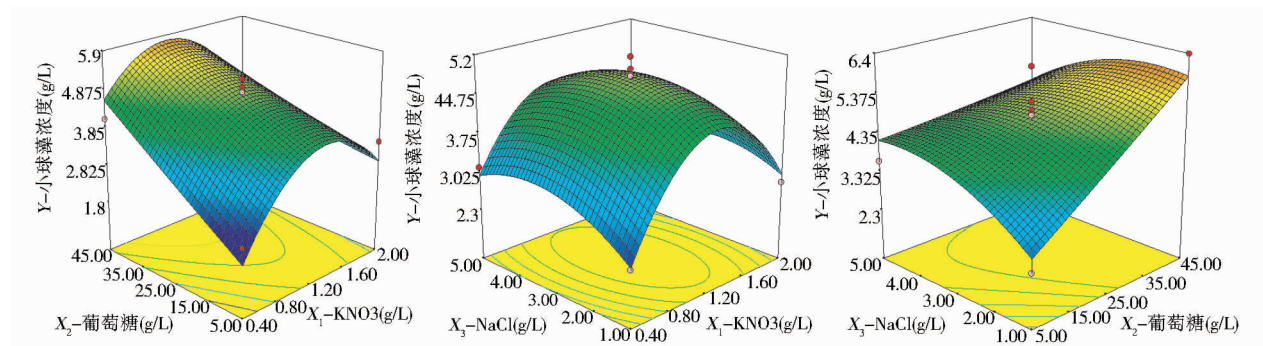


图 1 响应面分析立体图

Fig.1 The three-dimensional image of response surface analysis

从图 1 中可得知,当  $\text{NaCl}$  浓度含量不变时,小球藻浓度随  $\text{KNO}_3$  浓度增大先增加后减小,随葡萄糖含量增加而增加,且增加速度较快;当葡萄糖含量不变时,过高或过低的  $\text{KNO}_3$  和  $\text{NaCl}$  浓度对小球藻生长均不利;当  $\text{KNO}_3$  含量不变时,小球藻浓度随葡萄糖浓度增大而增加,随  $\text{NaCl}$  浓度的增大而呈先升后降的趋势。

在响应面优化试验设计中,当选择的两个独立变量水平合适时可获得椭圆形的等高线图。本试验中,以  $\text{KNO}_3$  和  $\text{NaCl}$  为独立变量时,可观测到椭圆形的等高线图。但是,当葡萄糖作为独立变量时没有观测到椭圆形等高线图,生物量响应值  $Y$  的最大值也没有落在中心点附近 (25g/L),反而优化的最大值为 45g/L。这说明葡萄糖浓度为 45g/L 时小球藻的生长没有受到抑制,由此反映出该藻株具有较强的混合营养能力。通过优化顶点分析,得到模型的 3 个优化参数分别为  $\text{KNO}_3$  1.64g/L、葡萄糖 45g/L、 $\text{NaCl}$  1.57g/L,预测的最大细胞浓度为 5.28g/L。

### 2.3 模型验证

为验证模型的可靠性,以 B-B 试验优化的结果,并结合 P-B 试验结果,配制优化的小球藻混合营养培养基组成为:葡萄糖 45g/L、 $\text{NaHCO}_3$  0.2g/L、 $\text{KNO}_3$  1.64g/L、

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L、 $\text{NaCl}$  1.57g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  50mg/L、 $\text{EDTA-Na}_2$  20mg/L 和  $\text{A}_5$  溶液 1ml/L。在上述培养基中参照 1.2.1 和 1.3 的方法,获得小球藻浓度为  $(5.68 \pm 0.30)$  g/L ( $n = 3$ ),验证值比预测值高 7.58%。验证结果表明该模型能很好地预测小球藻生物质的合成。

### 2.4 混养小球藻细胞生化组成分析

表 6 为优化培养条件下小球藻的生化组成。在优化培养条件下,藻细胞蛋白质含量、总色素含量,可溶性糖含量和油脂含量分别为 185.64mg/g、5.35mg/g、306.45mg/g 和 328.74mg/g。藻细胞蛋白质含量和色素含量较优化前降低,而可溶性糖含量和油脂含量显著增加,这与 Orús 等<sup>[13]</sup>的研究相一致。混合营养条件下(同时供应有机碳源和光能),藻细胞的生化代谢途径发生了变化,使细胞组分的生物合成量也发生了相应的变化。优化培养条件下小球藻细胞的蛋白质含量和色素含量较优化前减少,而可溶性糖含量和油脂含量增加。从微生物能源开发的角度分析,这种变化有利于微藻油脂和碳水化合物含量的提高。这为利用这些功能细胞组分生产生物柴油和生物乙醇提供了可能。而且,在此培养条件下小球藻油脂的脂肪酸以棕

桐酸和油酸为主,适合作为生物柴油的原料<sup>[14]</sup>。

表6 优化培养条件下 *C. vulgaris* 的生化组成

Table 6 Biochemical composition of *C. vulgaris* biomass cultured in optimized medium

| 细胞生化组成   | 浓度 (mg/g 细胞干重)     |
|--|--------------------|
| 蛋白质  | 185.64             |
| 叶绿素 a  | 3.08               |
| 叶绿素 b  | 1.25               |
| 类胡萝卜素  | 1.02               |
| 总色素含量  | 5.35               |
| 可溶性糖含量   | 306.45             |
| 油脂   | 328.74             |
| 棕榈酸 (C16:0)                                    | 38.06 <sup>a</sup> |
| 亚油酸 (C18:2 Δ <sup>9c</sup> , 12 <sup>c</sup> ) | 18.80 <sup>a</sup> |
| 油酸 (C18:1 Δ <sup>9c</sup> )                    | 37.19 <sup>a</sup> |
| 硬脂酸 (C18:0)                                    | 5.95 <sup>a</sup>  |

a 以相对峰面积的百分比计相对含量 (%)

### 3 结 论

采用响应面优化法中的 P-B 设计从 11 个营养因素中筛选出影响小球藻混合营养生长的主要营养因素依次为 KNO<sub>3</sub>、葡萄糖和 NaCl。在此基础上,进一步采用 B-B 设计建立了预测混养培养小球藻生产生物质的模型,优化了主要参数的水平。所得优化混养培养基的主要营养物浓度为 KNO<sub>3</sub> 1.64g/L、葡萄糖 45g/L、NaCl 1.57g/L。模型预测的最大细胞浓度为 5.28g/L,验证值为 5.68g/L,与预测值相差 7.58%。实测值和预测值之间较好的吻合性显示了所建模型的精确性和可靠性。

对优化混养培养的小球藻细胞组成的分析结果表明,混养培养所得藻细胞蛋白质、色素、可溶性糖和油脂含量分别为 185.64mg/g、5.35mg/g、306.45mg/g 和 328.74mg/g。混养小球藻细胞的蛋白质和色素含量比优化前的自养藻细胞的含量要低,而油脂和可溶性糖含量提高,脂肪酸组成以 C16 和 C18 为主。这些细胞组分方面的变化均有利于用小球藻生物质生产生物能源(如生物柴油和生物乙醇)。本文为采用混合营养培养策略高密度培养小球藻用以生产能源生物质、活性物质的生物合成和生物炼制提供了实验依据及基础数据。

### 参考文献

- [1] 夏金兰,万民熙,王润民,等. 微藻生物柴油的现状与进展. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (7): 118-126.

- Xia J L, Wan M X, Wang R M, et al. Current status and progress of microalgal biodiesel. China Biotechnology, 2009, 29 (7): 118-126.
- [2] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2010, 14 (2): 557-577.
- [3] Borowitzka M A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 1999, 70 (1-3): 313-321.
- [4] 郑洪立,张齐,马小琛,等. 产生生物柴油微藻培养研究进展. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (3): 110-116.
- Zheng H L, Zhang Q, Ma X C, et al. Research progress on bio-diesel-producing microalgal cultivation. China Biotechnology, 2009, 29 (3): 110-116.
- [5] Andrade M R, Costa J A V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture, 2007, 264 (1-4): 130-134.
- [6] 金传荫,宋立荣,黎尚豪. 鱼腥藻 1017 株的混合营养型生长. 水生生物学报, 1996, 20 (2): 134-137.
- Jin Z Y, Song L R, Li S H. The mixotrophic growth of *Anabaena* sp. HB1017. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20 (2): 134-137.
- [7] 张义明,陈峰,郭祀远. 光照度及葡萄糖浓度对螺旋藻生长的影响. 华南理工大学学报, 1996, 24 (2): 145-150.
- Zhang Y M, Chen F, Guo S Y. The effects of light intensity and glucose concentration on growth of *Spirulina platensis*. Journal of South China University of Technology, 1996, 24 (2): 145-150.
- [8] 刘娟妮,胡萍,姚领,等. 微藻培养中光生物反应器的研究进展. 食品科学, 2006, 27 (12): 772-777.
- Liu J N, Hu P, Yao L, et al. Research progress of photobioreactor on microalgal cultivation. Food Science, 2006, 27 (12): 772-777.
- [9] Heredia-Arroyo T, Wei W, Ruan R, et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. Biomass Bioenergy, 2011, 35 (5): 2245-2253.
- [10] 郑洪立,高振,黄和,等. 响应面法优化自养小球藻产生物柴油油脂. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (8): 106-111.
- Zheng H L, Gang Z, Huang H, et al. Optimization of autotrophic cultivation of lipids production for biodiesel by *Chlorella vulgaris* with response surface methodology. China Biotechnology, 2010, 30 (8): 106-111.
- [11] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 第2版, 北京: 高等教育出版社, 2006. 5.
- Wang X K. Experimental Principle and Technology on Physiology and Biochemistry of Plant. 2<sup>nd</sup> ed, Beijing: Higher Education

- Press, 2006. 5.
- [12] GB/T 17376-2008, 动植物油脂脂肪酸甲酯制备. 北京: 中国标准出版社, 2008, 1-22.
- GB/T 17376-2008, Animal and Vegetable Fats and Oils-Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids. Beijing: China Standards Press, 2008, 1-22.
- [13] Orús M I, Marco E, Martínez F. Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. *Bioresource Technology*, 1991, 38 (2-3): 179-184.
- [14] Meng X, Yang J, Xu X, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 2009, 34 (1): 1-5.

## Optimization of the Mixotrophic Culture Medium Composition for Biomass Production by *Chlorella vulgaris* Using Response Surface Methodology

YANG Qi WANG Ke-rong KONG Wei-bao YANG Hong CAO Hai ZHANG Xin-yun

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** Response surface methodology was adopted to optimize the mixotrophic culture medium composition for biomass production. In the first optimization step,  $\text{KNO}_3$ , glucose and NaCl were screened from eleven related nutrients as the major factors influence the mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* significantly using Plackett-Burman design. Subsequently, quadratic regression equation model was established based on the Box-Behnken design, and the optimized nutrients contents were that  $\text{KNO}_3$  was 1.64g/L, glucose was 45g/L and NaCl was 1.57g/L. The predicted maximum biomass content of 5.28g/L was obtained from the model, and the actual validation value was 5.68g/L. The validation results indicated that the model can be used to optimize the mixotrophic culture medium of *C. vulgaris* for its high prediction accuracy. Under the optimum conditions, the biochemical composition of mixotrophic *C. vulgaris* displayed that the protein and total pigments content were reduced and the soluble carbohydrate and lipid content were increased, compared with the un-optimized algal biomass. The major fatty acids of the alga lipid were oleic acid and palmitic acid. The results from biochemical composition analysis suggested that the mixotrophic biomass of *C. vulgaris* can be used as a potential feedstock for microalgae biofuel production.

**Key words** *Chlorella vulgaris* Response surface methodology Mixotrophism Culture medium composition Biomass