

均匀设计在后棘藻培养基中的应用*

徐年军¹ 张学成² 范晓¹

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 将均匀设计的方法应用于一种海洋微藻:后棘藻(*Ellipsoidion*)培养基的优化。设计了硝氮、氨氮、磷酸盐三因素各五个浓度水平的试验,根据均匀设计表设计了10种培养基,检测细胞浓度、脂肪酸含量和产量。结果表明:在硝氮、氨氮浓度均为1.92 mmol/L,磷酸盐浓度为0.082 mmol/L,细胞浓度达到最大值167.23 mg/L。在硝氮浓度为0.84 mmol/L,氨氮浓度为3.38 mmol/L,磷酸盐浓度为0.07 mmol/L时,EPA含量达到最大值7.748%。在硝氮浓度为0.915 mmol/L,氨氮浓度为1.92 mmol/L,磷酸盐浓度为0.072 mmol/L时,EPA产量达到最大值9.999 mg/L。

关键词 均匀设计,后棘藻,培养基

中图分类号 Q224 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)01-0038-04

均匀设计是我国著名数学家王元、方开泰创立的一种实验设计方法,它最大的特点就是用最少的试验次数获得科学结论;在军事科学、航空航天上应用极广,在生化、微生物工程方面也有较多的报道^[1-7]。作者将这种新型的设计方法用在海洋微藻培养基的筛选上,以较少的实验次数,借助计算机的统计回归软件,寻找到最优的培养基配方。本实验材料后棘藻(*Ellipsoidion* sp.) 70-01具有生长速度快、总脂和EPA含量高优点,具有潜在的推广应用价值。本实验为其培养基中 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} \text{P}$ 设计了一个三因素五水平的均匀设计实验,得到最佳培养基。

1 材料和方法

1.1 藻种

真刺藻门的后棘藻(*Ellipsoidion* sp.) 70-01为从美国加州大学引进的单克隆纯种。藻体椭圆球形,直径约2.5~3.5 μm 。正常培养下藻体为黄绿色,在460 nm下有最大吸收峰。

1.2 培养液、培养条件

用于藻类培养实验的海水和器皿均经高压灭菌后使用,培养在恒温室进行,室温为22 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$,光源:普通日光灯管,光周期L:D=12 h:12 h,照度(70 $\pm$ 3) $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,批量培养,Provasoli培养基。

1.3 测试方法

用比色法测定生物量,藻类的比生长速率(按下式计算:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_n - t_0)$$
 其中 t 为培养天数, N_t 、 N_0 、 t_n 、 t_0 分别表示终细胞浓度、起始细胞浓度、终培养时间、起始时间。

总脂测定用重量法,用氯仿:甲醇(2:1 V/V)混合溶液充分抽提,再加1/3体积的0.05%硫酸钠(质量分数)溶液,剧烈振荡,离心分层,取氯仿层在真空旋转蒸发仪蒸发,蒸干前后蒸发瓶重量差,为待测总脂量。

脂肪酸测定:10 mg样品放于有盖试管,加入19:0内标和1 mL的 $\text{KOH}-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液,在75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化10 min,冷却后加2 mL的1 mol/L的 $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液(使 $\text{pH} < 2$),混匀,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min,冷却,加0.2 mL石油醚和2 mL蒸馏水,振荡离心,取石油醚层,气相色谱分析。仪器:美国惠普公司产HP5890A型气相色谱仪,氢火焰离子化检测器。

1.4 培养基的均匀设计(3因素5水平)

参照方开泰1994年的《均匀设计与均匀设计表》,在温度、光强、pH相同的条件下,培养基设计3个因素。 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 为 N , $\text{NH}_4^+ \text{N}$ 为 n , $\text{PO}_4^{3-} \text{P}$,每个因素设计

* 国家“九五”科技攻关项目,96C020405,96C0201108号。

第一作者:徐年军,出生于1973年,博士,讲师,研究方向为海洋药理学,E-mail:Xunianjun@163.com

收稿日期:2001-06-13;修回日期:2001-09-30

5 个水平,则共有:

N_0	$N_{0.5}$	N_1	N_2	N_3
n_0	$n_{0.5}$	n_1	n_2	n_3
P_0	$P_{0.5}$	P_1	P_2	P_3

N_1 是以 Provasoli 培养基中 N 浓度为标准, $NaNO_3$ 为氮源, $[N_0] = 0, [N_1] = 0.64 \text{ mmol/L}, [N_2] = 1.28$

mmol/L ,如此类推。 n_1 即以 Provasoli 培养基中 N 浓度为标准, 以 NH_4Cl 代替 $NaNO_3, [n_0] = 0, [n_1] = 0.64 \text{ mmol/L}, [n_2] = 1.28 \text{ mmol/L}$,如此类推。 P 表示磷酸盐浓度, $P_1 = 0.070 \text{ mmol/L}, P_2 = 0.140 \text{ mmol/L}$,如此类推。

根据均匀设计表 $A_{8 \times 10} (10^8)$,设计见表 1。

表 1 均匀设计表 $A_{8 \times 10} (10^8)$

Tab.1 Table of Uniform design $A_{8 \times 10} (10^8)$

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
第1列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
第2列	5	10	4	9	3	8	2	7	1	6
第3列	7	3	10	6	2	9	5	1	8	4

2 结果与讨论

2.1 硝氮、氨氮、磷酸盐的均匀设计结果

从生长的结果可以看出:6 号、7 号、9 号培养基中生长较快,5 号、8 号培养基不佳。

从 EPA 含量的结果可以看出:3 号、4 号、6 号培养基中 EPA 含量较高,而 5 号、8 号、7 号、9 号培养基不佳。综合生长、总脂和 EPA 含量分析,得 6 号为最优培养基,其次为 4 号培养基,而 5 号、8 号培养基差。

表 2 硝氮、氨氮、磷酸盐均匀设计的 OD_{460} 、 μ 值、总脂及 EPA 含量

Tab.2 OD_{460} , μ value, total lipid and EPA content of uniform design of nitrate, ammonium and phosphorus

实验号	硝氮浓度 (mmol/L)	氨氮浓度 (mmol/L)	磷浓度 (mmol/L)	OD_{460}	μ 值	总脂 (%,干质量)	EPA (%,鲜质量)
1	0.00	0.64	0.070	1.087	0.370	15.54	27.79
2	0.00	1.92	0.180	1.258	0.393	12.50	28.78
3	0.32	0.32	0.105	1.090	0.360	14.04	30.33
4	0.32	1.92	0.035	1.205	0.386	20.76	32.12
5	0.64	0.32	0.000	0.618	0.270	4.70	5.99
6	0.64	1.28	0.105	1.265	0.413	17.28	29.44
7	1.28	0.00	0.035	1.210	0.409	11.94	23.21
8	1.28	1.28	0.000	0.650	0.280	5.92	9.36
9	1.92	0.00	0.070	1.233	0.408	15.48	15.94
10	1.92	0.64	0.180	1.078	0.380	11.64	27.19

2.2 回归分析

2.2.1 均匀设计培养基中的细胞浓度的回归分析
用 Statistics 软件逐步回归的结果,得出细胞浓度和营养盐关系的方程如下:

$$Y = 5.836x_1^2 - 5.141x_1 + 15.541x_2^2 - 18.675x_2 - 6170.20x_3^2 + 1017.907x_3 + 92.662$$

$$Y = 5.836(x_1 - 0.44)^2 + 15.541(x_2 - 0.601)^2 - 6170.20(x_3 - 0.082)^2 + 127.410$$

$$R = 0.924$$

公式中 Y 表示细胞浓度,单位为 mg/L , x_1, x_2, x_3 分别表示硝氮、氨氮、磷酸盐浓度。从回归公式可以看出,硝氮和氨氮浓度越高,细胞浓度越大;磷酸盐浓度为 0.082 mmol/L 时,细胞浓度最大。在实验浓度范围内,当硝氮浓度和氨氮浓度都为最大,即均为 1.92 mmol/L 时,细胞浓度达到最大,为 167.230 mg/L 。

2.2.2 均匀设计培养基中的细胞 EPA 含量的回归分析

用 Statistics 软件逐步回归的结果:

表 3 均匀设计培养基中的细胞浓度

Tab.3 Cell density in the uniform design media

实验号	硝氮 (x_1)	氨氮 (x_2)	磷酸盐 (x_3)	OD ₆₀₀	μ 值	细胞浓度(mg/ L)	
						实测值	预测值
1	0.00	0.64	0.070	1.087	0.370	124.179	128.096
2	0.00	1.92	0.180	1.258	0.393	138.278	130.422
3	0.32	0.32	0.105	1.090	0.360	124.426	126.084
4	0.32	1.92	0.035	1.205	0.386	133.908	141.119
5	0.64	0.32	0.000	0.618	0.270	85.510	87.377
6	0.64	1.28	0.105	1.265	0.413	138.855	132.175
7	1.28	0.00	0.035	1.210	0.409	133.496	123.711
8	1.28	1.28	0.000	0.650	0.280	88.149	97.202
9	1.92	0.00	0.070	1.233	0.408	136.217	145.324
10	1.92	0.64	0.180	1.078	0.380	123.535	115.041

注： x_1 ， x_2 ， x_3 的单位均为 mmol/ L,表 4 表 5 同

表 4 均匀设计培养基中的细胞 EPA 含量

Tab. 4 EPA content of the algal cell in the uniform design media

实验号	硝氮 (x_1)	氨氮 (x_2)	磷酸盐 (x_3)	总 脂 (%,干质量)	EPA (%,鲜质量)	EPA (EPA % × 总脂 %)	
						实测值	预测值
1	0.00	0.64	0.070	15.54	27.79	4.318	4.897
2	0.00	1.92	0.180	12.50	28.78	3.597	4.035
3	0.32	0.32	0.105	14.04	30.33	4.258	3.522
4	0.32	1.92	0.035	20.76	32.12	6.668	5.771
5	0.64	0.32	0.000	4.70	5.99	0.281	0.048
6	0.64	1.28	0.105	17.28	29.44	5.087	5.322
7	1.28	0.00	0.035	11.94	23.21	2.771	2.771
8	1.28	1.28	0.000	5.92	9.36	0.554	1.570
9	1.92	0.00	0.070	15.48	15.94	2.460	3.280
10	1.92	0.64	0.180	11.64	27.19	3.165	1.937

$$Y = -0.727x_1^2 + 1.225x_1 - 0.329x_2^2 + 2.225x_2 - 937.113x_3^2 + 133.09x_3 - 1.116$$

$$Y = -0.727(x_1 - 0.84)^2 - 0.329(x_2 - 3.381)^2 - 0.329(x_3 - 0.07)^2 + 7.748$$

$$R = 0.921$$

公式中 Y 表示 EPA 含量,单位为 mg/ L, x_1 、 x_2 、 x_3 分别表示硝氮、氨氮、磷酸盐浓度。当 $x_1 = 0.84$ mmol/ L, $x_2 = 3.381$ mmol/ L, $x_3 = 0.070$ mmol/ L 时, EPA 含量达到最大, EPA 含量 (EPA % × 总脂 %) 为 7.748 %。

2.2.3 均匀设计培养基的 EPA 产量的回归分析

综合考察细胞浓度和 EPA 含量,得出 EPA 产量结果如表 5。

用 Statistics 软件逐步回归的结果:

$$Y = -1.10228x_1^2 + 2.018061x_1 + 2.3258x_2 - 1216.43x_3^2 + 176.262x_3 - 1.7825$$

$$Y = -1.10228(x_1 - 0.915)^2 + 2.3258x_2 - 1216.43(x_3 - 0.0725)^2 + 5.5340$$

$$R = 0.9317$$

公式中 Y 表示 EPA 产量,单位为 mg/ L, x_1 、 x_2 、 x_3 分别表示硝氮、氨氮、磷酸盐浓度。当 $x_1 = 0.915$ mmol/ L, $x_2 = 1.92$ mmol/ L, $x_3 = 0.0725$ mmol/ L 时, EPA 产量达到最大,为 9.999 mg/ L。

通过对培养基均匀设计的回归分析可以看出:硝氮对 EPA 含量、产量的影响,在 0.840 ~ 0.915 mmol/ L 时最大。磷酸盐对后棘藻 70-01 的细胞浓度和 EPA 产量都有一个最适宜的浓度,当磷浓度在 0.070 ~ 0.082 mmol/ L 时,细胞浓度和 EPA 产量均达到最大值。氨氮

表 5 均匀设计培养基的 EPA 产量

Tab.5 EPA production of the uniform design media

实验号	硝氮	氨氮	磷酸盐	细胞浓度	EPA	EPA产量(mg/ L)	
	(x_1)	(x_2)	(x_3)	(mg/ L)	(% wt)	实测值	预测值
1	0.00	0.64	0.070	124.179	4.318	5.360	6.083
2	0.00	1.92	0.180	138.278	3.597	4.974	5.461
3	0.32	0.32	0.105	124.426	4.258	5.298	4.591
4	0.32	1.92	0.035	133.908	6.668	8.929	7.895
5	0.64	0.32	0.000	85.510	0.281	0.239	- 0.198
6	0.64	1.28	0.105	138.855	5.087	7.064	7.130
7	1.28	0.00	0.035	133.496	2.771	3.699	3.673
8	1.28	1.28	0.000	88.149	0.554	0.488	1.972
9	1.92	0.00	0.070	136.217	2.460	3.351	4.410
10	1.92	0.64	0.180	123.535	3.165	3.910	2.296

浓度为 3.381 mmol/ L 时 ,EPA 含量最大。这一结果与作者所作的单因子营养盐实验相符(另文发表) 。

参考文献

1 方开泰,王元.均匀设计与均匀设计表.北京:科学出版社,1994.21 - 23
2 罗定军,周兴挺,王惠青.洛伐他汀产生菌原体质体诱变育种及发酵配方优选的研究.中国抗生素杂志,2000,25(5) :339 - 340
3 魏凤玲,朱春波,朱立平,等.三七总皂苷提取工艺优

选.中国中药杂志,2000,25(12) :722 - 723
4 蒋丽君,夏新华.均匀设计优选抗痴呆胶囊(复方) 的提取工艺.中成药,2000,22(11) :758 - 760
5 王征,孙其荣,钟延强.卡巴克络止血气雾膜剂的制备研究.第二军医大学学报,2000,21(10) :975 - 976
6 王长虹,刘军,林伊梅,等.均匀设计法考察影响活性炭吸附替硝唑的因素.中国医院药学杂志,2000,20(11) :658 - 660
7 黄虹,唐琦文.均匀设计和模式识别法优化鱼腥草口服液制备工艺.中成药,2000,22(10) :684 - 687

THE APPLICATION OF UNIFORM DESIGN IN THE MEDIA OF *Ellipsoidion*

XU Nan-Jun¹ ZHANG Xue-Cheng² FAN Xiao¹
(¹ Institute of Oceanology, Chinese Academic of Sciences, Qingdao, 266071)
(² College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Received: Jun., 13, 2001
Key Words: Uniform design, *Ellipsoidion* sp., Medium

Abstract

The media of the marine microalgae *Ellipsoidion* sp. 70-01 are optimized by a uniform design experiment of three factors at five concentration levels. Three factors include nitrate-N, ammonium-N and phosphorus concentration. The bounds of the experimental media ingredient are as following: the nitrate and ammonium concentrations, range from 0 to 1.92

研究报告 *REPORTS*

mmol/L, and the phosphorus concentration ranges from 0 to 0.18 mmol/L. In accordance with the uniform design tables, we design 10 different media, inspect the cell density, and analyze the fatty acid composition of the algal cells by gas chromatography. It was found that the cell density of the microalga comes to the largest amount of 167.230 mg/L when both the nitrate and ammonium concentrations are 1.92 mmol/L, and phosphorus concentration is 0.082 mmol/L. While the concentration of nitrate is 0.84 mmol/L, that of ammonium 3.381 mmol/L, and that of phosphorus 0.070 mmol/L, EPA content reaches to the maximum: 7.748%. On the point of nitrate concentration 0.915 mmol/L, ammonium concentration 1.92 mmol/L and phosphorus concentration 0.0725 mmol/L, EPA production extends to the maximum quantity: 9.999 mg/L. All the results can accord with those of other single factor experiment.

(本文编辑 :张培新)