

响应面法优化*Chlamydomonas* sp. 212产胞内多糖发酵工艺及其抑菌活性

孙建瑞, 符丹丹, 赵君峰, 王大红*, 古绍彬

(河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳市微生物发酵工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

摘 要: 通过响应面法优化淡水微藻*Chlamydomonas* sp. 212产胞内多糖的发酵工艺, 并采用滤纸片法对其抑菌活性进行研究。经优化后, *Chlamydomonas* sp. 212产胞内多糖发酵工艺的最优参数为 NaNO_3 质量浓度305.01 mg/L、 NaCl 质量浓度93.66 mg/L、 NaHCO_3 质量浓度2.12 g/L; 在此条件下, 其胞内多糖产量为91.182 3 mg/L, 比优化前提高了1.6 倍。抑菌活性研究结果表明: *Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对细菌有一定程度的抑制作用, 其中对沙门氏菌的抑菌作用最强, 对大肠杆菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用较弱; 对真菌的抑制作用较弱, 仅对黑曲霉有较弱的抑制作用。本研究为筛选新的天然抗菌活性物质及产油微藻的综合开发利用提供了一定的理论依据。

关键词: 衣藻; 胞内多糖; 响应面法; 发酵工艺; 抑菌活性

Optimization of Fermentation Process for the Production of Intracellular Polysaccharide from *Chlamydomonas* sp. 212 and Its Antimicrobial Activity

SUN Jianrui, FU Dandan, ZHAO Junfeng, WANG Dahong*, GU Shaobin

(Luoyang Engineering and Technology Research Center of Microbial Fermentation,

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Response surface methodology was applied to optimize the fermentation process of intracellular polysaccharide production from *Chlamydomonas* sp. 212. Then, the antibacterial activity of intracellular polysaccharide was studied by filter paper disc method. The optimum fermentation medium was found to consist of NaNO_3 305.01 mg/L, NaCl 93.66 mg/L, and NaHCO_3 2.12 g/L. The bacterium grown in the optimized medium yielded 91.182 3 mg/L of intracellular polysaccharide, which was increased by 160% compared to that obtained using the unoptimized medium. The intracellular polysaccharide from *Chlamydomonas* sp. 212 had strong antibacterial activity against *Salmonella typhimurium* and weak antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*. This study may provide a theoretical basis for the screening of new natural antimicrobial substances and for the comprehensive utilization of oleaginous microalgae.

Key words: *Chlamydomonas* sp.; intracellular polysaccharide; response surface methodology; fermentation process; antibacterial activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718001

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 18-0001-07

引文格式:

孙建瑞, 符丹丹, 赵君峰, 等. 响应面法优化*Chlamydomonas* sp. 212产胞内多糖发酵工艺及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 1-7. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718001. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Jianrui, FU Dandan, ZHAO Junfeng, et al. Optimization of fermentation process for the production of intracellular polysaccharide from *Chlamydomonas* sp. 212 and its antimicrobial activity[J]. Food Science, 2017, 38(18): 1-7. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718001. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-08-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31401672); 河南省科技厅重点攻关项目 (162102110056);

河南省高等学校重点科研项目 (17B180003); 河南科技大学博士科研启动基金项目 (13480054)

作者简介: 孙建瑞 (1987—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为天然代谢产物、微生物发酵。E-mail: dasheng@haust.edu.cn

*通信作者: 王大红 (1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为天然代谢产物、微生物发酵。E-mail: wangdahong2003@163.com

微藻是单细胞藻类,具有光合效率高、生长速率快、容易实现大规模培养、生长不受季节和气候的限制、所需的营养来源丰富以及所产的油脂成分与植物油类似等优点,同时微藻资源丰富,而且油脂含量高。因此,利用微藻开发油脂资源已日益受到人们的青睐^[1]。微藻油脂可以用作保健品、医药和化妆品的添加剂,也可以作为食用油和可再生能源^[2-3]。近年来,微藻的大规模培养技术有了长足的发展,已经可以用于商业化生产。但在目前而言,微藻在规模化培养、采收和油脂提取技术方面的成本居高不下,使得微藻的商业化应用受到了限制^[4]。然而,微藻不仅可以作为生产油脂的原料,还是许多其他高附加值代谢产物的重要来源。微藻中的许多天然代谢产物通常具有多样性的生物活性,可以作为食品添加剂、营养保健品乃至医药产品,具有较高的经济价值^[5-6],如活性多糖^[7]、叶黄素^[8]、虾青素^[9]、胡萝卜素^[10]、凝集素^[11]、藻胆蛋白^[12]、甲藻毒素等。如果能够将这些高附加值代谢产物和微藻生物柴油一起开发利用,就可以在在一定程度上降低其生产成本。

微藻多糖种类丰富多样,研究发现从海洋微藻中获得的多糖具有多种生物活性,如增强机体免疫力、抗病毒活性、抗肿瘤活性、抗炎症、抗类风湿性关节炎^[13-14]。国外研究也表明,微藻多糖在医药保健和食品领域具有较大的发展潜力^[15]。螺旋藻多糖可促进ConA诱导的体外小鼠淋巴细胞转化,对肿瘤细胞有一定的抑制和杀伤作用^[16]。Guzman等^[17]研究发现,从绿藻中提取的多糖在体内外均具有免疫抑制剂的活性,同时还发现绿藻多糖具有一定的抗炎活性。陈晓清等^[18]研究发现,海水小球藻和紫球藻的多糖提取物显示出不同程度的抑制细菌和真菌的活性,其中海水小球藻的多糖提取物对中华根霉与稻瘟病菌有极强的抗菌活性。刘四光^[19]发现,自养小球藻的多糖提取物对大肠杆菌、溶壁微球菌有抑菌作用。杜玲^[20]研究表明,钝顶螺旋藻多糖提取物ESP对痢疾杆菌有较明显的抑制作用,FSP对痢疾杆菌、假单胞绿脓杆菌和变形杆菌有抑制作用。

实验室前期筛选到一株油脂含量较高的淡水微藻(212号),油脂质量分数可以达到25%,初步鉴定为衣藻属(*Chlamydomonas* sp.)。为进行后续研究,选取212号微藻(*Chlamydomonas* sp. 212)作为研究对象,利用响应面法优化其产胞内多糖的发酵工艺,并对其体外抗菌活性进行初步研究,以期筛选新的天然抗菌活性物质提及产油微藻的综合开发、扩大其应用领域提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Chlamydomonas sp. 212由四川省微生物与代谢工程重点实验室提供,受试菌种由河南科技大学食品与生物工程学院提供。

氢氧化钠、碳酸氢钠、三氯乙酸、蒽酮、乙醇等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Milli-QG超纯水制备仪 美国Millipore公司;
BS 124S型万分之一天平 赛多利斯科学仪器有限公司;
HH-S6数显电热恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;
TU-1800紫外-可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司;
Eppendorf 5417R台式高速冷冻离心机 德国艾本德股份公司。

1.3 方法

1.3.1 *Chlamydomonas* sp. 212的培养和收集^[21]

将培养至对数生长期的藻液作为种子培养液,按10% (V/V)的接种量接种于装有1 L SE培养基的2 L三角瓶中,置于恒温光照培养室中培养,培养温度25 °C、培养基初始pH 7.0、光暗比16 h:8 h、光强约100 μmol/(m²·s)条件下培养14 d。培养好的*Chlamydomonas* sp. 212培养液分装到离心管中,5 000 r/min离心20 min,收集藻体,干燥至质量恒定,记录藻体干质量。

1.3.2 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的提取

Chlamydomonas sp. 212胞内多糖的提取采用超声破碎协同热水浸提法^[22]:将收集的干藻体按料液比1:25 (g/mL)加入pH 14的NaOH提取液,混匀;超声波破碎,超声功率200 W,超声时间20 min;于70 °C水浴中加热180 min,8 000 r/min离心10 min,取上清液;上清液中加入3倍体积的无水乙醇进行沉淀,静置过夜,离心取沉淀;沉淀中加入3%的三氯乙酸,搅拌充分,至沉淀不再溶解为止,离心取上清液;上清液中再次加入3倍体积的无水乙醇进行沉淀,离心得沉淀,所得沉淀即为胞内多糖。

1.3.3 胞内多糖质量分数与产量的测定

本实验采用蒽酮-硫酸比色法^[19]测定胞内多糖质量浓度,以葡萄糖作标准曲线,得到糖质量浓度与吸光度关系的线性方程为: $Y=11.955X-0.0469$, $R^2=0.9973$ 。胞内多糖质量分数及产量的计算如式(1)、(2)所示:

$$\text{胞内多糖质量分数/\%} = \frac{\text{多糖质量浓度} \times \text{多糖溶液体积}}{\text{微藻藻体干质量}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{胞内多糖产量/(mg/L)} = \frac{\text{多糖质量浓度} \times \text{多糖溶液体积}}{\text{微藻培养基体积}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.4 单因素试验

以*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖质量分数和产量作为指标,分别考察NaCl质量浓度(25、50、75、100、150 mg/L)、NaNO₃质量浓度(100、200、300、400、500 mg/L)、MgSO₄质量浓度(50、75、100、125、150 mg/L)、NaHCO₃质量浓度(0、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 g/L)和培养基初始pH值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖质量分数和产量的影响。

1.3.5 响应面试验设计

在单因素试验结果的基础上,进行Plackett-Burman试验,快速有效地从多个考察因素中筛选出最重要的几个因素,最终选择NaCl、NaNO₃和NaHCO₃质量浓度作为关键工艺参数,进行响应面试验设计,试验的因素与水平如表1所示。

表1 响应面试验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
X ₁ NaNO ₃ 质量浓度/(mg/L)	215.91	250	300	350	384.09
X ₂ NaCl质量浓度/(mg/L)	66.36	80	100	120	133.64
X ₃ NaHCO ₃ 质量浓度/(g/L)	1.58	1.75	2.0	2.25	2.42

1.3.6 胞内多糖溶液的制备

将0.5 g胞内多糖加入到10 mL灭菌的蒸馏水中,充分溶解,配成质量浓度为50 mg/mL的多糖溶液,然后进行过滤除菌,用灭菌的EP管分装,低温冷冻保存备用。

1.3.7 菌悬液的制备

将各菌种分别接种在对应的固体培养基上,细菌37 ℃培养24 h,真菌28 ℃培养48 h,活化菌种。活化后,用接种环各挑取一环菌体于灭菌的生理盐水中,混合均匀,制成菌含量约为10⁷~10⁸ CFU/mL的菌悬液。

1.3.8 抑菌实验

采用圆形纸片法进行抑菌实验^[23]:将直径6 mm的滤纸片经121 ℃高压灭菌,干燥后置于多糖溶液中浸泡12 h备用;配制相应的培养基,灭菌后,在超净工作台中倒入灭菌的培养皿中,每个培养皿中20 mL;待培养基冷却凝固后,取制备好的各种菌悬液200 μL,置于相应的琼脂平板表面,用灭菌的涂布棒将菌液反复涂布均匀;待琼脂表面干燥后,将制备好的滤纸片贴于平板培养基表面,用无菌水作为空白对照;置于恒温培养箱中培养,细菌37 ℃培养18~24 h,真菌28 ℃培养48~72 h,观察结果,测量抑菌圈直径。以上步骤均在无菌条件下操作,重复3次,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 NaCl对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

在一定范围内,*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的质量分数和产量随NaCl质量浓度的升高而增加(图1)。当NaCl质量浓度为100 mg/L时,胞内多糖产量最高,为28.69 mg/L;继续增加NaCl的浓度,胞内多糖的产量会下降,而质量分数有小幅增加。这可能是因为在一一定的盐胁迫条件下,*Chlamydomonas* sp. 212会积累较多的胞内多糖以抵御外界环境的变化;但是当盐质量浓度超过

一定的范围时,*Chlamydomonas* sp. 212的生长会受到较大的抑制,生物量减少,从而导致其胞内多糖的产量下降。综合考虑,最佳NaCl质量浓度选择100 mg/L。

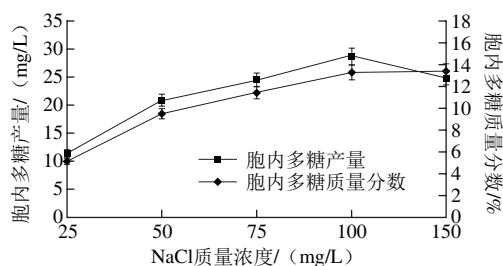


图1 NaCl对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

Fig. 1 Effect of NaCl concentration on the accumulation of intracellular polysaccharide

2.1.2 NaNO₃对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

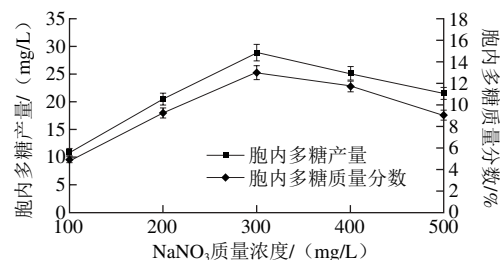


图2 NaNO₃对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

Fig. 2 Effect of NaNO₃ concentration on the accumulation of intracellular polysaccharide

当NaNO₃质量浓度从100 mg/L升高到300 mg/L时,*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖质量分数和产量分别提高到2.7倍和2.6倍;当NaNO₃质量浓度为300 mg/L时,*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖质量分数和产量分别为12.98%和28.76 mg/L;NaNO₃质量浓度进一步升高时,胞内多糖质量分数和产量呈下降趋势(图2)。因此,最佳NaNO₃质量浓度选择300 mg/L。

很多研究表明氮源是*Chlamydomonas* sp. 212多糖的产量与质量的主要影响因素,一般认为硝酸盐是较为合适的氮源^[24]。马美萍等^[25]研究表明,螺旋藻在NO₃⁻质量浓度为876 mg/L时多糖含量最高;Hiroaki^[26]研究表明,隐杆藻的多糖含量在NaNO₃质量浓度为200 mg/L时达到最高。这些结果表明,NO₃⁻质量浓度对*Chlamydomonas* sp. 212多糖含量和产量的影响程度会因藻种而异。研究结果表明,NaNO₃质量浓度对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的积累有较大影响,并且较高的氮源质量浓度有利于其胞内多糖的积累。

2.1.3 $MgSO_4$ 对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

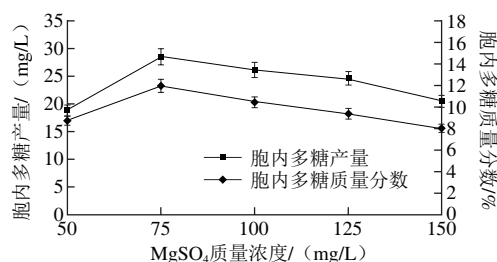


图3 $MgSO_4$ 对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响
Fig. 3 Effect of $MgSO_4$ concentration on the accumulation of intracellular polysaccharide

当 $MgSO_4$ 质量浓度从50 mg/L升高到75 mg/L时,*Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖质量分数和产量都迅速增加,分别达到11.94%和28.49 mg/L;之后进一步增加 $MgSO_4$ 的质量浓度,胞内多糖质量分数和产量则呈下降趋势(图3)。 Mg^{2+} 对藻类的生长发育有一定的促进作用,它参与藻类体内的糖、脂肪和蛋白质等物质的代谢过程;同时它也是许多酶的活化剂,能加快酶学反应,促进植物体内的新陈代谢。有研究表明, Mg^{2+} 对生物多糖合成的促进作用,主要是因为 Mg^{2+} 能够促进多糖合成酶的活化^[27];马美萍等^[25]研究表明,螺旋藻的多糖含量在 Mg^{2+} 质量浓度为10 mg/L时最高。本研究结果表明,在一定质量浓度范围内, Mg^{2+} 能够促进*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的积累。因此,选择75 mg/L作为最佳 $MgSO_4$ 质量浓度。

2.1.4 培养基初始pH值对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

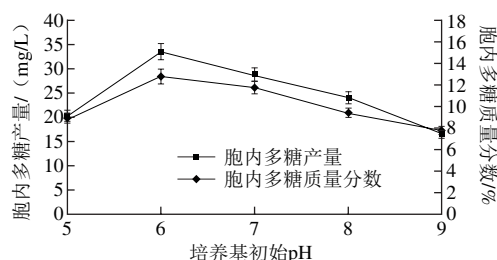


图4 培养基初始pH值对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响
Fig. 4 Effect of initial medium pH on the accumulation of intracellular polysaccharide

Chlamydomonas sp. 212胞内多糖的积累随着培养基初始pH值的升高,呈下降趋势;当培养基初始pH 6.0时,*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的产量和质量分数最高(图4)。这可能是因为弱酸性环境有利于*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的合成,而碱性环境不利于它们的积累。同时,实验发现当培养基的初始

pH 5.0~8.0范围内时,*Chlamydomonas* sp. 212的生物量基本没有变化,*Chlamydomonas* sp. 212可以正常生长;当pH 9.0时,*Chlamydomonas* sp. 212的生长受到一定程度的抑制,生物量下降。因此,选择6.0作为最佳培养基初始pH值。

2.1.5 $NaHCO_3$ 对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响

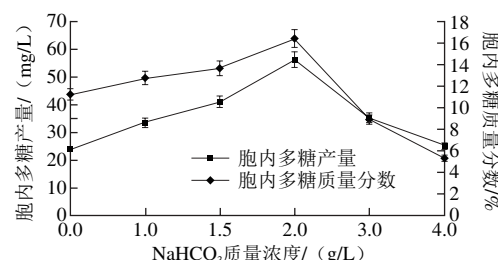


图5 $NaHCO_3$ 对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖积累的影响
Fig. 5 Effect of $NaHCO_3$ concentration on the accumulation of intracellular polysaccharide

Chlamydomonas sp. 212胞内多糖质量分数和产量在 $NaHCO_3$ 质量浓度为2 g/L时达到最大,分别为16.42%和56.21 mg/L;之后随着 $NaHCO_3$ 质量浓度的进一步增加,胞内多糖质量分数和产量会有很大幅度的下降(图5)。 $NaHCO_3$ 能够为*Chlamydomonas* sp. 212的生长发育提供了光合作用所需的碳源,适量添加 $NaHCO_3$ 能够促进*Chlamydomonas* sp. 212的生长繁殖。刘艳如等^[28]研究表明,螺旋藻胞内多糖的含量随着 $NaHCO_3$ 质量浓度的降低而减少。马美萍等^[25]研究发现,降低 HCO_3^- 质量浓度对螺旋藻的生长影响不大,但对其多糖合成有较大影响。对于本实验, $NaHCO_3$ 的加入虽然能够促进*Chlamydomonas* sp. 212的生长繁殖,但会改变培养基的pH值,过多的 $NaHCO_3$ 会使培养基的pH值偏碱性,而碱性条件不利于*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的积累。因此,最佳 $NaHCO_3$ 质量浓度选择2 g/L。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计与结果

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X_1 $NaNO_3$ 质量浓度	X_2 $NaCl$ 质量浓度	X_3 $NaHCO_3$ 质量浓度	胞内多糖产量 / (mg/L)
1	1.00	-1.00	1.00	82.90±2.07
2	-1.00	1.00	1.00	60.85±1.52
3	0.00	0.00	0.00	92.64±2.31
4	1.68	0.00	0.00	73.99±1.84
5	0.00	0.00	0.00	90.16±2.24
6	-1.00	1.00	-1.00	68.20±1.70
7	1.00	1.00	-1.00	60.97±1.52
8	-1.00	-1.00	1.00	78.20±1.96
9	0.00	-1.68	0.00	70.70±1.77

续表2

试验号	X_1 NaNO ₃ 质量浓度	X_2 NaCl 质量浓度	X_3 NaHCO ₃ 质量浓度	胞内多糖产量/(mg/L)
10	-1.68	0.00	0.00	72.26±1.81
11	1.00	-1.00	-1.00	65.72±1.64
12	0.00	0.00	0.00	89.13±2.23
13	0.00	0.00	-1.68	71.10±1.77
14	0.00	1.68	0.00	64.15±1.61
15	0.00	0.00	1.68	84.51±2.11
16	1.00	1.00	1.00	64.61±1.62
17	-1.00	-1.00	-1.00	68.50±1.72

以NaCl、NaNO₃和NaHCO₃质量浓度作为自变量,以*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量为响应值,进行三因素三水平响应面优化试验。在17个试验组合条件下,试验设计方案及数据处理结果如表2所示。

2.2.2 模型的建立及显著性分析

运用Design-Expert 8.0软件对试验结果进行回归拟合,得到的回归方程如下:

$$Y=90.83+0.10X_1-3.79X_2+3.35X_3-0.67X_1X_2+2.31X_1X_3-3.82X_2X_3-6.85X_1^2-8.87X_2^2-5.20X_3^2$$

为检验方程有效性,利用分析软件进一步对其进行分析,回归方程的方差分析见表3。

表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of regression equation

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1 653.28	9	183.70	17.33	0.000 5**
X_1 NaNO ₃ 质量浓度	0.14	1	0.14	0.013	0.913 2
X_2 NaCl质量浓度	195.76	1	195.76	18.47	0.003 6**
X_3 NaHCO ₃ 质量浓度	153.08	1	153.08	14.44	0.006 7**
X_1X_2	3.63	1	3.63	0.34	0.576 7
X_1X_3	42.64	1	42.64	4.02	0.084 9
X_2X_3	116.97	1	116.97	11.04	0.012 7*
X_1^2	529.03	1	529.03	49.91	0.000 2**
X_2^2	886.08	1	886.08	83.60	<0.000 1**
X_3^2	304.33	1	304.33	28.71	0.001 1**
残差	74.19	7	10.60		
失拟项	67.68	5	13.54	4.16	0.205 2
纯误差	6.51	2	3.26		

注: *,差异显著, $P<0.05$; **,差异极显著, $P<0.01$ 。

由表3可以看出,该模型的F值为17.33,该模型是高度显著的。同时,该模型中的 X_2 、 X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 都是显著的,它们对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量都有显著的影响。模型失拟项的F值为4.16, $P>0.05$,说明模型失拟项不显著,该模型选择合适。

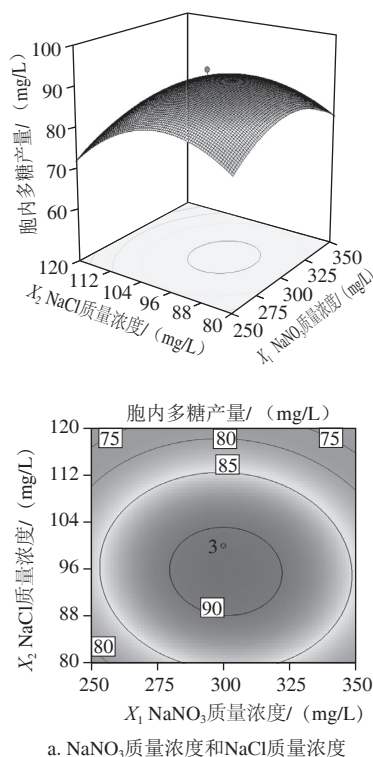
同时,模型可信度分析的模型相关系数 $R^2=0.957 1$,很接近于1,说明该模型可以解释95.71%的试验所得值,模型相关度很好。变异系数反映模型的置信系数,越低的变异系数说明模型的置信度越好。本试验中变异系数为4.40%,说明该模型可以很好地反映试验真实值,操作可信。综上所述,该回归模型

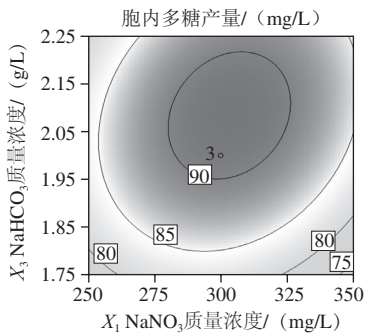
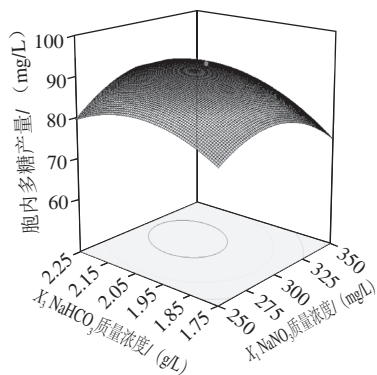
拟合程度良好,试验误差小,能够准确地分析和预测*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量,可以用该回归方程来分析响应值的变化。

各个因素的F值可以反映出每个因素对胞内多糖产量的重要性,F值越大,说明对胞内多糖产量的影响越显著。从方差分析可知,各因素对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量的影响程度大小顺序为:NaCl质量浓度>NaHCO₃质量浓度>NaNO₃质量浓度,其中NaCl和NaHCO₃质量浓度对试验结果的影响极显著。

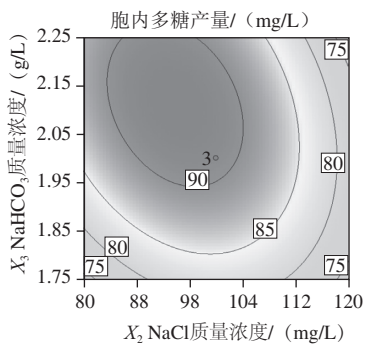
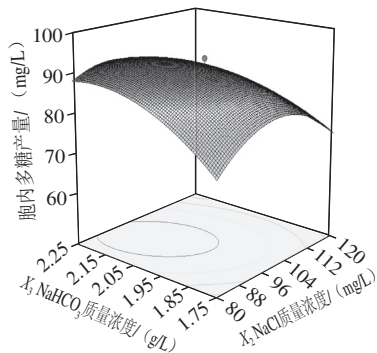
2.2.3 响应面分析

通过Design-Expert软件绘制响应面图对试验结果进行可视化分析,以进一步研究各个变量之间的交互作用以及确定最优点,结果见图6。响应面图形是响应值对各试验因素所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用^[29]。当特征值均为正值时,响应面分析图为山谷形曲面,有极小值存在;当特征值为负值时,为山丘曲面,有极大值存在;当特征值有正有负时,为马鞍形曲面,无极值存在^[30]。各个因素交互作用的响应面3D图和等高线分析图有直观的显示。两个因素之间相互作用的强弱可以用等高线形状来显示,如果等高线为椭圆形,表明这两个因素之间有较显著的交互作用;如果等高线为圆形,则表明这两个因素之间的交互作用不显著^[31]。

a. NaNO₃质量浓度和NaCl质量浓度



b. NaNO₃质量浓度和NaHCO₃质量浓度



c. NaCl质量浓度和NaHCO₃质量浓度

图6 各因素交互作用对*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量的影响
Fig. 6 Response surface and corresponding contour plots showing the interactive effect of various factors on the yield of intracellular polysaccharide

当NaHCO₃质量浓度为2.0 g/L时, *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量随着NaCl和NaNO₃质量浓度的升高先增加后降低, 但变化范围有限; 等高线偏圆形, 表明NaCl和NaNO₃质量浓度之间的交互作用相对较弱(图6a)。当

NaCl质量浓度为100 mg/L时, *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量随着NaHCO₃和NaNO₃质量浓度的升高先增加, 之后呈下降趋势; 等高线偏呈椭圆形, 表明NaHCO₃和NaNO₃质量浓度之间有一定的交互作用(图6b)。当NaNO₃质量浓度为300 mg/L时, *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量随着NaHCO₃和NaCl质量浓度的升高先增加后降低。等高线呈椭圆形, 表明NaHCO₃和NaCl质量浓度之间的交互作用显著(图6c)。

从等高线和响应面的最高点可以看出, 在所选的范围内存在极大值点, 它既是响应面的最高点, 同时也是等高线的圆心处。通过软件的进一步分析计算, 得到最大响应值所对应的各因素的编码值分别为: $X_1=0.1$, $X_2=-0.317$, $X_3=0.462$ 。变换为对应的真实值即为NaNO₃质量浓度305.01 mg/L、NaCl质量浓度93.66 mg/L、NaHCO₃质量浓度2.12 g/L, 在此条件下, *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量的理论值为92.210 5 mg/L。

2.2.4 验证性实验

为验证响应面法所得结果的可靠性, 按照响应面法确定的各因素的最优质量浓度配制*Chlamydomonas* sp. 212培养基, 进行3次实验, 最终的实验结果取这3次实验的平均值。在实际实验条件下, 所得*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量为91.182 3 mg/L, 与理论预测值相比其相对误差为1.12%, 与理论值非常接近, 而且比优化前提高了1.6倍, 说明了该回归模型的准确性。

2.3 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖抑菌实验结果

2.3.1 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖抑制细菌作用

表4 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖抑制细菌效果
Table 4 Antibacterial effects of intracellular polysaccharide from *Chlamydomonas* sp. 212

菌种	大肠杆菌	白色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌	枯草芽孢杆菌	沙门氏菌	空白对照
抑菌圈直径/mm	9.56±0.3	8.26±0.4	8.32±0.3	—	—	15.73±0.5	—

注: —, 无抑菌活性, 下同。

如表4所示, 表明*Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对沙门氏菌的抑制作用较强, 抑菌圈直径可以达到15.73 mm; 对白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌也有抑菌作用, 但抑菌圈较小, 抑菌作用较弱; 对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌没有抑菌效果。

2.3.2 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖抑制真菌作用

表5 *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖抑制真菌效果
Table 5 Antifungal effects of intracellular polysaccharide from *Chlamydomonas* sp. 212

菌种	啤酒酵母	中华根霉	黑曲霉	空白对照
抑菌圈直径/mm	—	—	8.48±0.3	—

如表5所示, *Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对黑曲霉有抑菌作用, 但抑菌圈直径较小, 抑菌作用较弱; 对中华根霉和啤酒酵母没有抑菌作用。

综上所述, *Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对沙门氏菌的抑菌作用最强, 对大肠杆菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉有较弱的抑菌作用。因此, *Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对细菌有一定程度的抑菌作用, 而对真菌的抑菌作用较弱, 即*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的抗细菌活性要强于抗真菌活性; 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制作用, 但对革兰氏阴性菌的抑制作用要强于革兰氏阳性菌。

3 结 论

本研究选取一株油脂含量较高的淡水微藻*Chlamydomonas* sp. 212, 利用响应面法优化其产胞内多糖的发酵工艺, 并对其抑菌活性进行研究。在单因素试验的基础上, 通过响应面试验设计得到*Chlamydomonas* sp. 212产胞内多糖发酵工艺的最优工艺参数为 NaNO_3 质量浓度305.01 mg/L、 NaCl 质量浓度93.66 mg/L、 NaHCO_3 质量浓度2.12 g/L, 在此条件下, *Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖产量为91.182 3 mg/L, 比优化前提高了1.6倍。抑菌活性研究结果表明, *Chlamydomonas* sp. 212的胞内多糖对细菌有一定程度的抑制作用, 其中对沙门氏菌的抑菌作用最强, 对大肠杆菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用较弱; 对真菌的抑制作用较弱, 仅对黑曲霉有较弱的抑制作用, 即*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的抗细菌活性要强于抗真菌活性。有关*Chlamydomonas* sp. 212胞内多糖的抑菌机制有待进一步的研究。本研究为筛选新的天然抗菌活性物质及产油微藻的综合开发、扩大其应用领域提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] MENETREZ M Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(13): 7073-7085. DOI:10.1021/es300917r.
- [2] 翟映雪, 梁成伟, 张伟, 等. 微藻油脂的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 370-375. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.17.075.
- [3] LIANG Y, MAI K, SUN S. Differences in growth, total lipid content and fatty acid composition among 60 clones of *Cylindrotheca fusiformis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(1): 61-65. DOI:10.1007/s10811-005-5525-4.
- [4] FISCHER J. Biodiesel in Europe 1998-biodiesel processing technologies[M]. Brazil: The International Liquid Biofuels, 1998: 8-13.
- [5] MARIANA B, PATRICIA V, ANDRADE P B. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases[J]. Marine Drugs, 2014, 12(9): 4934-4972. DOI:10.3390/md12094934.
- [6] MORAIS M G, VAZ B S, MORAIS E G, et al. Biologically active metabolites synthesized by microalgae[J]. Biomed Research International, 2015, 4: 1-15. DOI:10.1155/2015/835761.
- [7] HELLIO C, MARECHAL J P, VÉRON B, et al. Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany coast (France)[J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(1): 67-82. DOI:10.1007/s10126-003-0020-x.
- [8] SHI X M, JIANG Y, CHEN F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture[J]. Biotechnology Progress, 2002, 18(4): 723-727. DOI:10.1021/bp0101987.
- [9] MENDES-PINTO M M, RAPOSO M F J, BOWEN J, et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(1): 19-24. DOI:10.1023/A:1008183429747.
- [10] HEJAZI M A, HOLWERDA E, WIJFFELS R H. Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in two-phase bioreactors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 85(5): 475-481. DOI:10.1002/bit.10914.
- [11] 郑怡, 余萍, 刘艳如. 蛋白核小球藻凝集素的分离纯化及部分性质研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 36-40. DOI:10.3321/j.issn:1000-3207.2003.01.008.
- [12] SONI B, TRIVEDI U, MADAMWAR D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(1): 188-194. DOI:10.1016/j.biortech.2006.11.010.
- [13] DE PHILIPPIS R, VINCENZINI M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22: 151-175. DOI:10.1016/S0168-6445(98)00012-6.
- [14] DE PHILIPPIS R, SILI C, PAPERI R, et al. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13: 293-299. DOI:10.1023/A:1017590425924.
- [15] ROESELERS G, VAN LOOSDRECHT M C M, MUYZER G. Phototrophic biofilms and their potential applications[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 227-235. DOI:10.1007/s10811-007-9223-2.
- [16] 王晓杨, 于红. 螺旋藻多糖体外对小鼠免疫功能的影响[J]. 食用中医药杂志, 2004, 20(9): 282-283. DOI:10.3969/j.issn.1004-2814.2004.09.003.
- [17] GUZMAN S, GATO A, LAMELA M, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Phytotherapy Research, 2003, 17: 665-670. DOI:10.1002/ptr.1227.
- [18] 陈晓清, 郑怡, 林雄平. 二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, 21(2): 76-79. DOI:10.3969/j.issn.1000-5277.2005.02.019.
- [19] 刘四光. 自养小球藻(*Chlorella autotrophica*)多糖提取、纯化、化学结构及抗菌活性研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [20] 杜玲. 钝顶螺旋藻两个生态种多糖的抗菌、抗肿瘤活性及其机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [21] 刘义. 产油脂微藻筛选分离及其多样性研究[D]. 成都: 四川大学, 2012.
- [22] 孙建瑞, 宋涛, 孙显, 等. 富油小球藻*Chlorella protothecoides*胞内多糖和油脂提取工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 615-620. DOI:10.3724/SP.J.1145.2013.12039.
- [23] SALEM W M, GALAL H, NASR EL-DEEN F. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt)[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(15): 2160-2167.
- [24] 朱凤英, 李环. 嗜盐隐杆藻生长及其产糖规律[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2002, 24(4): 57-60. DOI:10.3969/j.issn.1671-7627.2002.04.013.
- [25] 马美萍, 汪志平, 唐世荣. 营养因子对钝顶螺旋藻Sp-S(9701)生长与多糖合成的影响[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(2): 95-98. DOI:10.3969/j.issn.1004-1524.2003.02.009.
- [26] HIROAKI S. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytio*[J]. Current Microbiology, 1995, 30: 219. DOI:10.1007/BF00293636.
- [27] CAO J, XU Z, QIU G, et al. Effects of Mg^{2+} on the growth and DNase activity of *Spirulina platensis*, a cyanobacterium[J]. Bioresource Technology, 1999, 67(3): 287-290. DOI:10.1016/S0960-8524(98)00116-3.
- [28] 郑怡, 刘艳如. 培养条件对极大螺旋藻胞内和胞外多糖含量的影响[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(6): 29-31. DOI:10.3969/j.issn.1002-3461.2001.06.009.
- [29] 鞠兴荣, 税丹, 何荣, 等. 响应面分析法优化莱籽多糖酸法提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(3): 89-93. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2012.03.020.
- [30] GUPTA S, MANOHAR C S. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures[J]. Structural Safety, 2004, 26: 123-132. DOI:10.1016/S0167-4730(03)00021-3.
- [31] JIA J Q, MA H, ZHAO W R, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 336-342. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.06.036.