



应用响应曲面法优化萱藻丝状体扩增条件

王玉萌, 刘德举, 张玉敏, 张敏, 官相忠*

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为优化萱藻丝状体扩增条件, 提高萱藻丝状体的扩增速率, 以实验室萱藻种质库保存的丝状体为实验材料, 在单因素实验的基础上, 应用 Box-Behnken 设计对萱藻丝状体扩增条件进行了响应曲面优化探索。结果显示, 以增重倍比为指标, 确定了扩增萱藻丝状体的最佳条件为温度 20.45 °C, 光照强度 78.13 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 外加氮磷比 16.19。在该条件下扩增 10 d, 萱藻丝状体增重倍比为 (299.21%±13.58%), 显著高于单因素实验和 Box-Behnken 设计实验条件下获得的萱藻丝状体增重倍比。实验结果与理论预测值的相对误差小于 5%, 模型可靠。为评价优化培养后萱藻丝状体的发育情况, 对丝状体进行了 20 d 的诱导, 结果显示, 优化培养后的萱藻丝状体呈深褐色, 细胞质充盈, 孢子囊比例 (26.37%±5.22%) 比对照组的孢子囊比例 (18.10%±3.51%) 提高了 45.69%; 优化条件下的孢子囊直径平均为 (19.75±0.21) μm , 显著高于对照组的孢子囊直径 (16.91±0.36) μm 。研究表明, 在萱藻丝状体扩增过程中, 对扩增环境条件进行调控, 设置合适的营养盐浓度配比, 可以实现较高的扩增速率, 并促进丝状体的孢子囊发育。

关键词: 萱藻; 丝状体; 孢子囊; 响应曲面法; 扩增

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 隶属褐藻纲 (Phaeophyceae) 网管藻目 (Dictyosiphonales) 萱藻科 (Scytosiphonaceae) 萱藻属 (*Scytosiphon*), 为 1 年生的广温性海藻, 具有极高的营养价值、药用价值和生态价值^[1-7]。萱藻生活史为异形世代交替, 包括配子体世代和孢子体世代。配子体是由丝状体放散的游孢子萌发形成, 成熟时呈中空管状结构; 孢子体有垫状体、类垫状体和丝状体 3 种存在形式, 其中丝状体是产生单室孢子囊释放游孢子的主要形式。因此, 如何获得大量优质的萱藻丝状体, 产生足量的单室孢子囊并释放游孢子, 是实现萱藻工厂化育苗和规模化养殖的关键。目前, 国内外学者对萱藻繁殖生物学特性进行了广泛而深入的研究, 已初步掌握了萱藻的全人工育苗技

术。在萱藻的生理生态学研究, 重点主要集中在温度、光照强度和营养盐等因子对萱藻丝状体生长发育影响^[8-12], 其中氮、磷的作用往往是相互的, 不同氮磷比对藻类生长的影响不同。例如, Lenton 等^[13]研究表明, 氮磷比 16 : 1 是藻类吸收海水中营养盐浓度的最适比值, 过高或过低的氮磷比都不利于藻类的生长繁殖。目前, 这些研究大部分是以单因素实验方法为主。单因素实验方法虽然具有简单、实验次数少的优点, 但该方法并未考虑因子间的交互作用, 所获得的结论并不一定是最优方案。因此, 为确定萱藻丝状体扩增的最优条件, 进一步提高萱藻丝状体扩增速率, 不仅需要选择合适的因素, 还要考虑多个因素间的交互作用。

收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2021-06-10

资助项目: 山东省重点研发计划 (2016GSF115042)

第一作者: 王玉萌 (照片), 从事海藻繁殖生物学与实验生态学研究, E-mail: wangym20210327@163.com

通信作者: 官相忠, 从事海藻繁殖生物学与实验生态学研究, E-mail: gxzhw@163.com



响应曲面法 (RSM) 是一种优化实验条件的方法, 运用多元二次回归数学模型拟合影响因子和响应值之间的函数关系, 通过实验设计、数学建模和模型检验对各因素及其交互作用进行评价, 最终得出预测的响应最优值及相应实验条件。相比于传统的数理统计方法, RSM 具有精确度高、预测结果可靠、分析维度多等优点, 适用于各领域受多因素影响的工艺条件优化^[14]。目前, 由于统计学在各个领域中的发展和应用, RSM 的应用领域不再仅仅局限于化学工业, 在生物学、医学以及制药领域也获得了广泛应用^[15-24]。例如, 吴海一等^[25]应用响应曲面法优化确定了鼠尾藻幼苗生长的最佳生态因子组合条件, 其优化条件下的特定生长率相比于单因子实验条件下的特定生长率最大提高了 16.26%。赵鹏等^[26]应用响应曲面法对小球藻 (*Chlorella* sp. U4341) 的培养条件进行了优化研究, 使 *Chlorella* sp. U4341 的油脂产率提高了 54%。谢丽丹等^[27]应用 Box-Behnken 中心组合原理建立数学模型, 确定了螺旋藻培养基的最佳配方, 与室外养殖采用的半合成培养基相比, 藻蓝蛋白含量提高了 23%。

丝状体扩增是萱藻全人工育苗的关键步骤之一, 但有关萱藻丝状体扩增条件的优化国内外尚未见报道。因此, 本实验以萱藻丝状体为对象, 在单因素实验的基础上, 选取了影响萱藻丝状体扩增的关键因素, 即温度、光照强度和外加氮磷比, 应用 Box-Behnken 设计对萱藻丝状体扩增条件进行了响应曲面优化探索, 并研究了该条件下萱藻丝状体的孢子囊发育情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用萱藻丝状体取自本实验室萱藻种质库。用加有 F1 培养液 (表 1) 的天然灭菌海水在充气扩增培养条件下获取足量的萱藻丝状体, 扩增条件为温度 (22±0.5) °C, 光周期 L : D = 14 (光) : 10 (暗), 光照强度 (57.6±3.6) μmol/(m²·s), 充气流量 3 L/min, 天然灭菌海水盐度 32^[28]。

1.2 单因素实验

确定最佳温度 取生长状态良好的萱藻丝状体, 用组织匀浆机 JYL-350 (18 000 r/min) 打碎 10 s、镜检, 获得平均长度为 250~300 μm 的丝状体藻段, 加入灭菌海水和 F1 培养液配成密度为 (1.00±0.05) mg/mL 的萱藻丝状体藻液, 取 200 mL

表 1 F1 培养液母液成分

Tab. 1 Composition of F1 medium

培养基成分 medium component	含量 content
VB ₁ /mg	0.25
VB ₂ /mg	0.5
KI/g	0.42
H ₃ BO ₃ /g	15.46
FeC ₆ H ₅ O ₇ /g	0.13
Tris/g	30.28
NaNO ₃ /g	21.25
NaH ₂ PO ₄ /g	3.00

注: 将上述成分用蒸馏水定容至 500 mL, 按 1 : 1 000 比例加入培养体系

Notes: add the above components to 500 mL with distilled water at a ratio of 1 : 1 000 into the culture system

藻液放入 250 mL 锥形瓶。

温度梯度设置为 16、19、22、25、28 °C。其他培养条件为光周期 14L : 10D, 光照强度为 57.6 μmol/(m²·s), 静置培养。每天定时摇瓶 6 次, 每 4 天更换 1 次加有 F1 培养液的灭菌海水, 实验周期为 10 d^[28]。

确定最佳光照强度 光照强度梯度设置为 14.4、43.2、72.0、100.8、129.6 (±3.6) μmol/(m²·s)。其他培养条件为温度为 22 °C, 光周期为 14L : 10D, 静置培养。每天定时摇瓶 6 次, 每 4 天更换 1 次加有 F1 培养液的灭菌海水, 实验周期为 10 d。

确定最佳外加氮浓度 设置外加氮浓度梯度为 6、21、36、51、66 mg/L。其他培养条件: 温度为 22 °C, 光照强度为 57.6 μmol/(m²·s), 光周期为 14L : 10D, 以去氮 F1 培养液为基础, 分别配置氮浓度梯度为 6、21、36、51 和 66 mg/L 的培养液, 静置培养。每天定时摇瓶 6 次, 每 4 天更换 1 次培养液, 实验周期为 10 d。

确定最佳外加磷浓度 设置外加磷浓度梯度为 1、2、3、4 和 5 mg/L。其他培养条件: 温度为 22 °C, 光照强度为 57.6 μmol/(m²·s), 光周期为 14L : 10D, 以去磷 F1 培养液为基础, 分别配置磷浓度梯度为 1、2、3、4 和 5 mg/L 的培养液, 静置培养。每天定时摇瓶 6 次, 每 4 天更换 1 次培养液, 实验周期为 10 d。

以萱藻丝状体增重倍比作为丝状体生长速率的评价指标。增重倍比 P 的计算公式:

$$P(\%) = [(N_t - N_0) / N_0] \times 100\%^{[29]}$$

式中, P 代表增重倍比, N_t 代表第 t 天的萱藻丝

状态干重 (mg); N_0 代表第 0 天的萱藻丝状体干重 (mg), 即初始干重; t 代表实验天数 (d)。

1.3 响应曲面优化实验

在单因素实验的基础上, 应用以 RSM 为依据的 Box-Behnken 设计, 进行三因素三水平实验, 以温度、光照强度和外加氮磷比为自变量, 分别用 X_1 、 X_2 和 X_3 表示, 并以 -1、0、1 代表自变量的低、中、高水平, 以增重倍比 P 为响应量, 实验因素及水平见表 2。

表 2 响应曲面因素水平

Tab. 2 Response surface factor level

因素 factor	变量 variable	水平 level		
		-1	0	1
温度/°C temperature	X_1	17	20	23
光照强度/ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ light intensity	X_2	43.2	71.6	100
外加氮磷比 ratio of added N : P	X_3	7	12	17

注: 以去氮去磷 F1 培养液为基础, 固定磷质量浓度为 3 mg/L
Notes: based on the F1 culture medium of nitrogen and phosphorus removal, the mass concentration of fixed phosphorus was 3 mg/L

1.4 优化培养前后萱藻丝状体发育质量评价

将萱藻丝状体置于 RSM 模型预测的优化条件下进行扩增培养, 并与对照条件下萱藻丝状体生长发育状况进行比较。优化培养条件为温度 20.45 °C, 光照强度 78.13 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 14 L : 10 D, 并以去氮去磷培养液为基础, 设置外加氮磷比为 16.19, 其中外加磷浓度为 3 mg/L; 对照条件为温度 22 °C, 光照强度 72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 14 L : 10 D, 同样以去氮去磷培养液为基础, 设置外加氮磷比为 12, 其中外加磷浓度为 3 mg/L。当萱藻丝状体生物量达到实验要求时, 分别对其进行单室孢子囊的诱导实验。用组织匀浆机打碎、镜检, 获得平均长度为 250~300 μm 的丝状体藻段, 加入 F1 培养液配成密度为 (0.5±0.05) mg/mL 的萱藻丝状体藻液, 取 200 mL 藻液放入 250 mL 锥形瓶。诱导条件为温度 17 °C, 光照强度 28 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为=10 L : 14 D。诱导 20 d, 观察两组萱藻丝状体孢子囊发育情况。在 10×40 倍镜下, 随机观察 10 个视野的计数^[11]。

以萱藻丝状体孢子囊比例与孢子囊直径作为其发育质量的评价指标。孢子囊比例的计算公式:

孢子囊比例 (%) = 孢子囊细胞数/丝状体细胞总数 × 100%^[30]

1.5 数据分析

采用数据统计软件 Excel 2019 和 Sigmaplot 14.0 对实验结果进行分析和制图。实验设计使用 Design Expert 10.0.7 软件进行 Box-Behnken 方法的响应曲面优化实验设计, 并对数据进行相关线性拟合, 通过拟合后线性关系制作预测结果等高线和响应曲面图^[31]。

2 结果

2.1 单因素实验

以 F1 培养液为基础, 在光照强度为 56.8 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 随着温度的升高, 丝状体增重倍比呈现先增加后下降的趋势 (图 1-a), 温度大于 22 °C 时, 丝状体生长发育受到限制; 当温度为 22 °C 时, 其增重倍比达到最大值 (183.37%±4.24%)。因此选择最佳温度为 22 °C。以 F1 培养液为基础, 在温度 20 °C 时, 随着光照强度的增大, 丝状体增重倍比呈现先上升后下降的趋势 (图 1-b), 在光照强度 72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 其增重倍比达到最大值 (168.92%±2.67%), 因此选择最佳光照强度为 72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。以去氮 F1 培养液为基础, 在温度为 20 °C、光照强度为 56.8 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下, 随着外加氮浓度的增大, 丝状体增重倍比先上升后下降。在外加氮浓度为 36 mg/L 时, 其增重倍比达到最大值 (198.38%±3.18%) (图 1-c)。因此选择外加氮浓度 36 mg/L 为最佳。以去磷 F1 培养液为基础, 在温度为 20 °C、光照强度为 56.8 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下, 随着外加磷浓度的增大, 丝状体增重倍比先上升后下降, 在外加磷浓度为 3 mg/L 时, 其增重倍比达到最大值 (201.36%±2.74%) (图 1-d), 因此选择外加磷浓度 3 mg/L 为最佳。

2.2 响应曲面优化实验

依据单因素实验结果, 以去氮去磷 F1 培养液为基础, 固定磷质量浓度为 3 mg/L, 选择温度 (X_1)、光照强度 (X_2) 和外加氮磷比 (X_3) 为自变量, 丝状体增重倍比 P 为响应值, 应用 Box-Behnken 实验设计优化萱藻丝状体扩增条件 (表 3)。

利用响应曲面软件 Design Expert 10.0.7 对表 3 实验结果进行多元回归拟合, 获得响应值增重倍比 P 的回归模型方程:

$$P = 275.88 - 0.75X_1 + 20.99X_2 + 23.98X_3 - 12.98X_1X_2 + 21.27X_1X_3 + 0.51X_2X_3 - 35.96X_1^2 - 86.95X_2^2 - 1.79X_3^2$$

对该模型进行回归与方差分析, 模型极显著

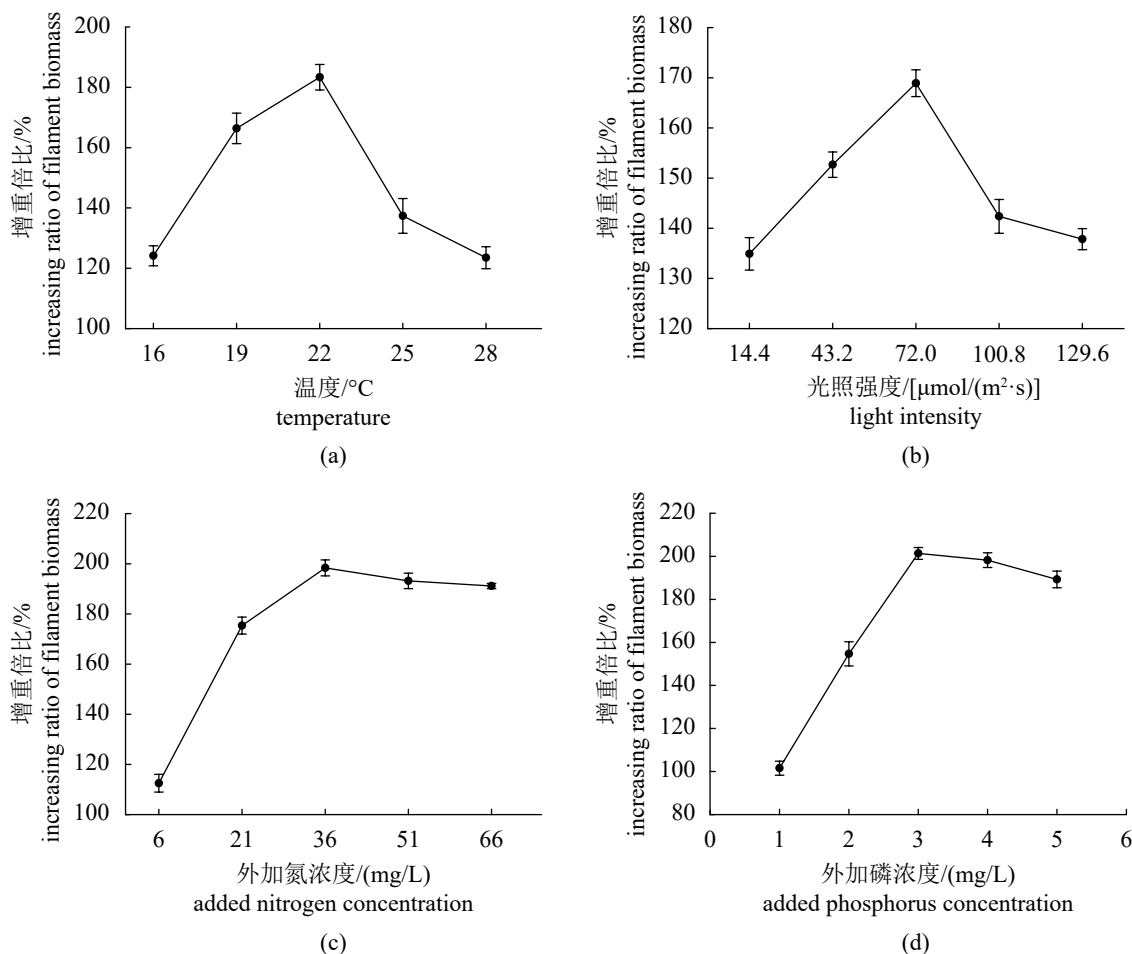


图 1 温度 (a)、光照强度 (b)、外加氮浓度 (c) 和外加磷浓度 (d) 对萱藻丝状体增重倍比的影响

Fig. 1 Effects of temperature (a), light intensity (b), added nitrogen concentration (c) and added phosphorus concentration (d) on the increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

($P < 0.01$), 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 相关系数 R^2 为 0.97, 校正相关系数 $Adj R^2$ 为 0.94, 说明模型拟合度较高 (表 4)。由 P 值可知, 各因素对丝状体增重倍比的影响程度从强到弱依次为外加氮磷比 > 光照强度 > 温度, 且结合表中 F 值可知, 温度的二次项 (X_1^2)、光照强度的二次项 (X_2^2) 为极显著影响因素 ($P < 0.01$), 温度和外加氮磷比的交互作用 (X_1X_3) 为显著影响因素 ($P < 0.05$), 其他因素影响较小 (表 5)。

根据回归方程作出各因素对丝状体增重倍比影响的响应曲面图, 为进一步分析温度、光照强度、外加氮磷比对丝状体增重倍比的影响, 将其中任一因素固定为 0 水平, 可得到另外两个因素交互作用的响应曲面图和等高线图 (图 2)。从响应曲面图和等高线图直观地看出温度、光照强度、外加氮磷比交互作用, 并反映出各因素对其丝状体扩增的影响。等高线形状和响应曲面坡度可以

反映自变量交互效应的强度^[31]。等高线形状若趋向于椭圆形, 则两自变量之间交互作用明显; 等高线密度大, 表明因素间交互作用较强; 响应曲面图曲率越大, 即坡度越陡, 说明因素间交互作用越显著^[14]。由以上分析可知, 温度与外加氮磷比交互作用对丝状体增重倍比的影响显著, 其余交互作用不显著; 外加氮磷比对丝状体增重倍比影响最大, 其次为光照强度, 而温度对丝状体增重倍比的影响相对较小, 该结果与表 4 回归方程方差分析结果一致。

2.3 模型验证

通过模型预测分析, 丝状体扩增最佳条件为温度 20.45 °C, 光照强度 78.13 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 外加氮磷比 16.19, 此时模型预测丝状体增重倍比为 296.34%。为检验模型预测的可靠性, 采用上述条件进行丝状体扩增实验。通过 3 组平行实验得到

表3 RSM 实验设计与结果

Tab. 3 Experimental design and results of RSM

实验编号 test no.	X_1	X_2	X_3	增重倍比/% increasing ratio of filament biomass
1	-1	0	-1	245.49
2	0	-1	-1	137.26
3	0	1	-1	183.67
4	0	0	0	267.20
5	1	0	-1	188.24
6	1	0	1	273.33
7	-1	-1	0	115.88
8	-1	0	1	245.49
9	0	0	0	284.13
10	0	0	0	295.29
11	1	1	0	164.12
12	0	0	0	277.98
13	0	1	1	238.04
14	-1	1	0	178.38
15	0	0	0	254.81
16	1	-1	0	153.53
17	0	-1	1	189.61

丝状体增重倍比为 (299.21%±13.58%)，与理论预测值的相对误差小于 5%，表明本实验优化得到的最佳条件准确可靠，具有实用价值。该实验结果显著高于单因子实验中萱藻丝状体增重倍比，分别提高了 59.40%、74.97%、48.33% 和 48.59%，同

时均高于 Box-Behnken 中心组合方法测定 17 种组合方式的增重倍比。

2.4 优化培养前后丝状体生长发育情况

实验结果显示，优化培养后的萱藻丝状体增重倍比 (299.21%±13.58%) 比对照组增重倍比 (259.38%±16.13%) 提高了 15.35% (图 3)。为评价优化培养后萱藻丝状体的发育情况，在相同条件下对丝状体进行 20 d 的诱导，结果表明，优化培养后的萱藻丝状体呈深褐色，细胞质充盈，孢子囊比例 (26.37%±5.22%)，比对照组的孢子囊比例 (18.10%±3.51%) 提高了 45.69% ($P<0.05$)；优化条件下的孢子囊直径 [(19.7±0.21) μm] 显著高于对照组的孢子囊直径 [(16.91±0.36) μm] ($P<0.05$) (表 6)。

3 讨论

实验条件的优化设计成为现代化技术的一个重要方面，常用方法主要包括正交设计、均匀设计及响应曲面设计，其中响应曲面设计因其独特的优势受到越来越多的关注^[32]。相比于正交设计和均匀设计，响应曲面法不仅能建立精确的数学模型，连续地对实验各个水平进行分析，还能实现对各因素之间相互作用的考察，解决多变量优化问题，快速而准确地确定多因素优化的最佳条件。由于响应曲面法要求自变量必须是连续的，而且能被实验者自由控制，因此应用响应曲面法

表4 回归模型方差分析

Tab. 4 Analysis of variance of regression model

方差来源 source	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 significance
X_1	4.530 05	1	4.530 05	0.022 104	0.886 003	
X_2	3 525.061	1	3 525.061	17.200 18	0.004 31	**
X_3	4 598.885	1	4 598.885	22.439 79	0.002 115	**
X_1X_2	673.662	1	673.662	3.287 066	0.112 714	
X_1X_3	1 810.077	1	1 810.077	8.832 089	0.020 752	*
X_2X_3	1.020 1	1	1.020 1	0.004 977	0.945 728	
X_1^2	5 443.511	1	5 443.511	26.561 07	0.001 319	**
X_2^2	3 1831.75	1	3 1831.75	155.319 8	4.93E-06	**
X_3^2	13.468 35	1	13.468 35	0.065 717	0.805 048	
模型 model	49 695.97	9	5 521.774	26.942 94	0.000 128	**
残差 residual	1 434.603	7	204.943 3			
失拟项 lack of fit	466.094 9	3	155.365	0.90	0.627 279	不显著 not significant
纯误差 pure error	968.507 9	4	242.127			
总计 total	51 130.57	16				

注: ** 差异极显著($P<0.01$), * 差异显著($P<0.05$)
Notes: ** the difference is very significant ($P<0.01$), * significant difference ($P<0.05$)

表 5 回归分析结果

Tab. 5 Regression results

相关系数 R^2	校正相关系数 Adj R^2	信噪比 Adeq precision	变异系数 C.V %
0.97	0.94	14.83	6.59

解决问题时常常需要与传统方法结合, 然后在较小的范围内进行响应曲面优化, 两种方法的结合将大大提高多因素优化条件的准确性。

温度、光照强度和氮磷比常被作为影响藻类

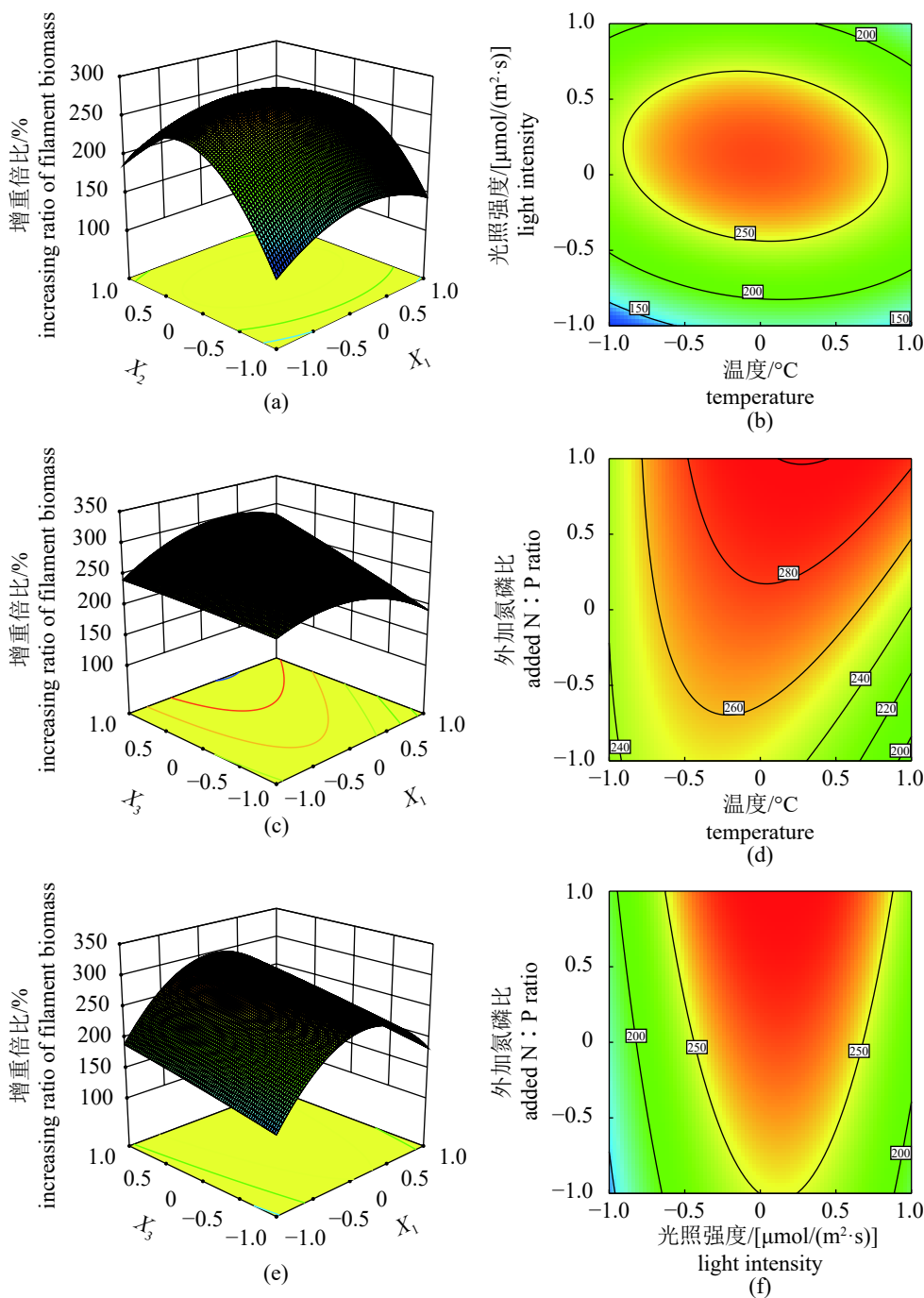


图 2 各因素两两交互作用对萱藻丝状体增重倍比影响的响应曲面

等高线图为响应曲面底部放大图

Fig. 2 Response surface of pair-to-pair interaction of various factors on the increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

Contour plots for the bottom of the response surface zoom

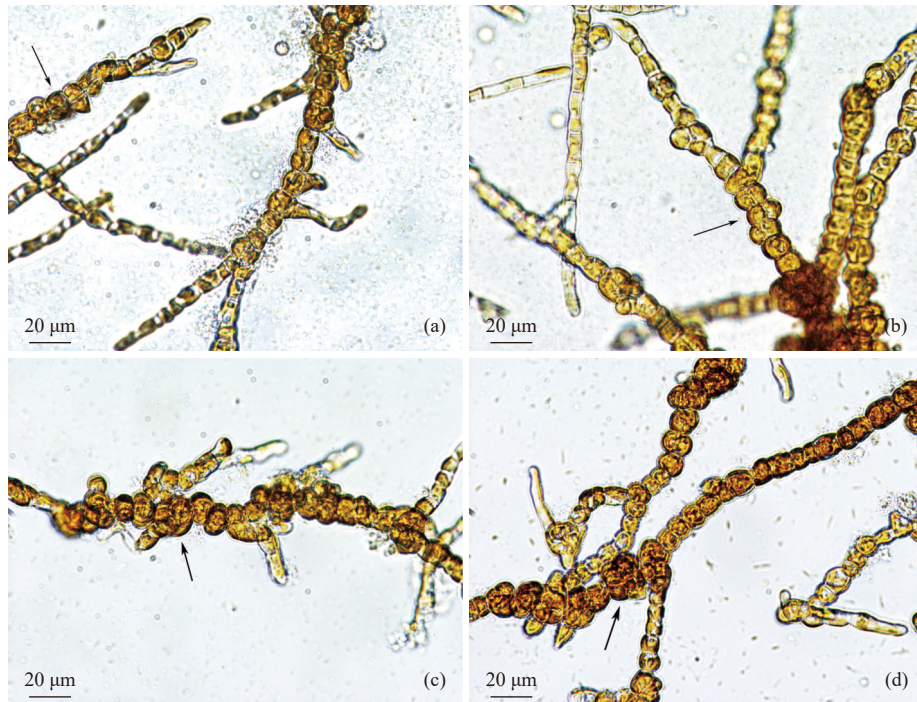


图3 优化培养前后萱藻丝状体生长发育的比较

箭头指示成熟孢子囊。(a) 优化培养前萱藻丝状体, (b) 优化培养后萱藻丝状体, (c) 优化培养前萱藻丝状体形成的孢子囊, (d) 优化培养后萱藻丝状体形成的孢子囊

Fig. 3 Comparison of growth and development between filaments of *S. lomentaria* before and after optimal culture

Arrows indicate mature sporangia. (a) filaments of *S. lomentaria* before amplification optimization, (b) filaments of *S. lomentaria* after amplification optimization, (c) sporangium produced by filaments of *S. lomentaria* before amplification optimization, (d) sporangium produced by filaments of *S. lomentaria* after amplification optimization

表6 优化培养前后萱藻丝状体生长发育比较

Tab. 6 Comparison of growth and development between filaments of *S. lomentaria* before and after optimal culture

组别 groups	增重倍比/% increasing ratio of filament biomass	孢子囊比例/% sporangium ratio	孢子囊直径/ μm sporangium diameter
对照组 unoptimized	259.38 \pm 16.13	18.10 \pm 3.51	17.91 \pm 0.36
优化组 optimized	299.21 \pm 13.58	26.37 \pm 5.22	19.75 \pm 0.21

生长的关键因素,不同海藻由于分布区域不同,适宜其生长发育的环境条件也有差异。付阳阳等^[33]通过单因素实验研究发现,在温度 23 °C、光照强度 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、氮磷比 16 的条件下,不仅能够促进坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)叶状体的成熟,还能促进单性生殖的发生。王丽梅等^[34]发现,在温度 23 °C、光照强度 198 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、氮磷比 8 的条件下更有利于铜藻幼苗的生长。在本研究中,通过单因素实验发现,在温度 22 °C、光照强度 72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、外加氮磷比 12 的条件下萱藻丝状体扩增速率最大,该结果与高伟^[35]在

环境因子对萱藻丝状体扩增影响的研究结果一致。

通过单因素实验获得的最优水平组合,并不一定是最优方案,还需要结合响应曲面法进一步优化。吴海一等^[25]应用响应曲面法优化鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)幼苗生长条件,优化条件下的鼠尾藻幼苗特定生长率较单因素实验结果最大提高了 16.26%。譙顺彬等^[36]应用响应曲面法优化螺旋藻混合培养基,优化条件下的螺旋藻产率(1.822 g/L)不仅高于单因素实验结果,还显著高于室外开放式跑道培养获得的螺旋藻产率(0.5 g/L)。本研究同样以单因素实验为基础,应用响应曲面法优化萱藻丝状体扩增条件,确定了适用于扩增萱藻丝状体的最佳条件:温度 20.45 °C,光照强度 78.13 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,外加氮磷比 16.19。优化条件下的萱藻丝状体增重倍比较单因素实验结果最大提高了 74.97%。此外,本研究还发现,对优化条件下扩增的丝状体进行诱导,不仅孢子囊比例(26.37% \pm 5.22%)比对照组的孢子囊比例(18.10% \pm 3.51%)提高了 45.69%,而且优化条件下的孢子囊直径[(19.75 \pm 0.21) μm]也显著高于对照

组 $[(16.91 \pm 0.36) \mu\text{m}]$ 。该结果证明, 在萱藻丝状体扩增过程中, 应用响应曲面法得到的扩增条件不仅可以实现较高的扩增速率, 还可以促进丝状体的孢子囊发育。

本研究首次应用响应曲面法优化萱藻丝状体扩增条件, 研究结果证明, 模型与实验结果拟合度良好, 优化后的扩增条件可以显著提高丝状体扩增效率。因此, 响应曲面法是优化萱藻丝状体扩增条件的一种较为理想的方法, 在后续萱藻人工育苗的关键环节中有望得到进一步应用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity *in vitro* from marine algae from Japan coasts[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1997, 20(5): 541-546.
- [2] Kim S C, Park S Y, Hyoun J H, *et al.* The cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* against HL-60 promyelocytic leukemia cells[J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2004, 19(5): 641-648.
- [3] Kim Y A, Kong C S, Um Y R, *et al.* Antioxidant efficacy of extracts from a variety of seaweeds in a cellular system[J]. *Ocean Science Journal*, 2008, 43(1): 31-37.
- [4] Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, *et al.* Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18(7): 625-633.
- [5] Noda H, Amano H, Arashima K, *et al.* Antitumor activity of marine algae[J]. *Hydrobiologia*, 1990, 204(1): 577-584.
- [6] 许小娟. 萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 的化学成分及其生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Xu X J. Studies on chemical constituents and bioactivities of *Scytosiphon lomentaria*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [7] 张宇, 付晓婷, 林洪, 等. 萱藻营养品质的分析和评价[J]. *营养学报*, 2011, 33(6): 619-620,623.
Zhang Y, Fu X T, Lin H, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional quality of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2011, 33(6): 619-620,623 (in Chinese).
- [8] 高伟, 宫相忠, 张必达. 环境因子对萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 丝状体孢子放散的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2): 244-248.
- [9] 洪丽珍, 宫相忠, 张文健, 等. 五种培养液对萱藻丝状体生长发育的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 193-202.
Hong L Z, Gong X Z, Zhang W J, *et al.* Effects of five culture media on the growth and development of the filaments of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 193-202 (in Chinese).
- [10] 罗伟, 宫相忠, 高伟, 等. 光强对萱藻孢子萌发、幼苗早期发育及附生藻类动态变化的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2018-2028.
Luo W, Gong X Z, Gao W, *et al.* Effects of light intensity on spore germination, early development of the sporelings of *Scytosiphon lomentaria* and the dynamic change of epiphytic algae[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2018-2028 (in Chinese).
- [11] 夏云捷, 宫相忠, 高伟, 等. 光照对中国南北方萱藻丝状体生长发育影响的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(7): 1039-1049.
Xia Y J, Gong X Z, Gao W, *et al.* A comparative study on effects of light intensity and photoperiod on the growth and development of filaments of the northern and the southern *Scytosiphon lomentaria* in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(7): 1039-1049 (in Chinese).
- [12] 邢永泽, 宫相忠, 尹宝树. 萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, 40(8): 98-102.
Xing Y Z, Gong X Z, Yin B S. The Morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(8): 98-102 (in Chinese).
- [13] Lenton T M, Watson A J. Redfield revisited: 1. regulation of nitrate, phosphate, and oxygen in the ocean[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2000, 14(1): 225-248.
- [14] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. *实验室研究与探索*, 2015, 34(8): 41-45.
Li L, Zhang S, He Q, *et al.* Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2015, 34(8): 41-45 (in Chinese).
- [15] Reddy L V A, Wee Y J, Yun J S, *et al.* Optimization of

- alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 2242-2249.
- [16] Arokiadass R, Palaniradja K, Alagumoorthi N. Prediction and optimization of end milling process parameters of cast aluminium based MMC[J]. *Transactions of Non-ferrous Metals Society of China*, 2012, 22(7): 1568-1574.
- [17] Avila-Peltroche J, Won B Y, Cho T O. Optimization of protoplast isolation from the gametophytes of brown alga *Undaria pinnatifida* using response surface methodology[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(4): 2233-2244.
- [18] Aydin S. A ternary optimisation of mineral additives of alkali activated cement mortars[J]. *Construction and Building Materials*, 2013, 43: 131-138.
- [19] Chelladurai S J S, Murugan K, Ray A P, *et al.* Optimization of process parameters using response surface methodology: a review[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 37: 1301-1304.
- [20] Cho T. Prediction of cyclic freeze-thaw damage in concrete structures based on response surface method[J]. *Construction and Building Materials*, 2007, 21(12): 2031-2040.
- [21] Gopalakannan S, Senthilvelan T. Application of response surface method on machining of Al-SiC nanocomposites[J]. *Measurement*, 2013, 46(8): 2705-2715.
- [22] Joardar H, Das N S, Sutradhar G, *et al.* Application of response surface methodology for determining cutting force model in turning of LM6/SiC_p metal matrix composite[J]. *Measurement*, 2014, 47: 452-464.
- [23] Li X, Ouyang J, Xu Y, *et al.* Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14): 3613-3617.
- [24] Bezerra M A, Santelli R E, Oliveira E P, *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. *Talanta*, 2008, 76(5): 965-977.
- [25] 吴海一, 丁刚, 张绍春, 等. 利用响应面法优化鼠尾藻幼苗生长条件的研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2015, 45(7): 34-38,90.
- Wu H Y, Ding G, Zhang S C, *et al.* Optimization of the growth condition of *Sargassum thunbergii* seedlings with response surface method[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(7): 34-38,90 (in Chinese).
- [26] 赵鹏, 徐军伟, 余旭亚. 响应面法优化混合培养微藻 *Chlorella* sp. U4341油脂产率的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(19): 207-212.
- Zhao P, Xu J W, Yu X Y. Research of the optimization of mixotrophic cultivation of lipid productivity by *Chlorella* sp. U4341 with response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(19): 207-212 (in Chinese).
- [27] 谢丽丹, 王素英. 响应面法优化螺旋藻培养基[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(2): 307-314.
- Xie L D, Wang S Y. Optimization of *Spirulina* media by response surface methodology[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(2): 307-314 (in Chinese).
- [28] 陈立彪, 朱凤妹, 李军. 响应面法优化黑参中类黑精的提取工艺[J]. *食品工业*, 2020, 41(10): 66-70.
- Chen L B, Zhu F M, Li J. Optimization of extraction process of melanoidin in black ginseng by response surface methodology[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(10): 66-70 (in Chinese).
- [29] Andersen R A. *Algal culturing techniques*[M]. Amsterdam: Academic Press, 2005.
- [30] 曾呈奎, 吴超元, 任国忠. 温度对海带配子体生长发育的影响[J]. *海洋与湖沼*, 1962(S1): 22-28.
- Zeng C K, Wu C Y, Ren G Z. The influence of temperature on the growth and development of the Haidai (*Laminaria japonica*) gametophytes[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1962(S1): 22-28 (in Chinese).
- [31] 孙双, 张婷, 方琰, 等. 雨生红球藻高产虾青素的培养条件优化[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 98-107.
- Sun S, Zhang T, Fang Y, *et al.* Optimization of culture medium for high-yield astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(6): 98-107 (in Chinese).
- [32] 程敬丽, 郑敏, 楼建晴. 常见的试验优化设计方法对比[J]. *实验室研究与探索*, 2012, 31(7): 7-11.
- Cheng J L, Zheng M, Lou J Q. Comparison of several common optimal experimental design methods[J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2012, 31(7): 7-11 (in Chinese).
- [33] 付阳阳, 丁洪昌, 林琪, 等. 光强、温度和N/P比对坛紫菜叶状体单性生殖发生的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(3): 650-660.
- Fu Y Y, Ding H C, Lin Q, *et al.* Effects of light intensity, temperature, and N/P ratio on parthenogenesis of

- Pyropia haitanensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(3): 650-660 (in Chinese).
- [34] 王丽梅, 王舒扬, 许伟定, 等. 温度、光强及氮磷比对断枝铜藻幼苗生长的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(3): 376-381.
- Wang L M, Wang S Y, Xu W D, et al. Effects of temperature, light intensity and ratio of nitrogen to phosphorus on growth of seedlings in sea weed *Sargassum horneri*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(3): 376-381 (in Chinese).
- [35] 高伟. 环境因子对萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 丝状体扩增及孢子囊发育的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Gao W. Effect of environmental factors on filaments amplification and sporangia development of *Scytotiphon lomentaria*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [36] 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.
- Qiao S B, Chi H Y, Zhang Y T, et al. Optimization of mixotrophic medium for *Spirulina* culture by response surface methodology[J]. Food Science, 2009, 30(7): 109-113 (in Chinese).

Optimization of amplification conditions of filaments of *Scytosiphon lomentaria* by response surface methodology (RSM)

WANG Yumeng, LIU Deju, ZHANG Yumin, ZHANG Min, GONG Xiangzhong*
(College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Filament amplification is a key step in artificial seedling cultivation of *Scytosiphon lomentaria*. In order to optimize the growth conditions of the filament of *S. lomentaria*, a Box-Behnken design (BBD) was employed for experimental design and analysis of the results to obtain the best possible combination of temperature (X_1 : 17–23 °C), light intensity [X_2 : 43.2–100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$], and added nitrogen: phosphorus (N : P) ratio (X_3 : 7–17). The results show that the mathematical model has a good fitting degree and good regression property. The model predicted and optimized reaction parameters as follows: temperature 20.45 °C, light intensity 78.13 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, added N : P ratios 16.19. Under the condition of the amplification for 10 d, the increasing ratio of filament biomass was 299.21%±13.58%, which was significantly higher than that measured in the single factor experiment and Box-Behnken design experimental conditions. In order to evaluate the development of filaments of *S. lomentaria* after optimized culture, the filaments were induced for 20 days. The results showed that the sporangium ratio after optimized culture (26.37%±5.22%) was higher than that of unoptimized culture (18.10%±3.51%). Meanwhile, the average sporangium diameter under optimized conditions was (19.75±0.21) μm , which was also higher than that before optimized culture [(16.91±0.36) μm]. The results showed that the high amplification rate and the development of sporangia of filaments could be achieved by purposeful regulation of environmental conditions and appropriate nutrient concentration.

Key words: *Scytosiphon lomentaria*; filament; sporangium; response surface methodology; amplification

Corresponding author: GONG Xiangzhong. E-mail: gxzhw@163.com

Funding projects: Key Research and Development Program of Shandong Province (2016GSF115042)