

植物激素及维生素对微藻 GN6 生长及油脂产量的影响研究

李汉广¹, 周秋香², 杨治友¹, 黎秋玲¹, 张庆华¹

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西农业微生物资源开发与利用工程实验室, 江西省菌物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330045; 2. 江西农业大学医院, 南昌 330045)

摘要:以自行筛选的微藻 GN6 为试验菌种, 首先研究海藻素、复硝酚钠、吲哚乙酸 3 种植物激素及维生素 B₁ 和维生素 B₁₂ 两种维生素对微藻生长及油脂产量的影响, 然后在上述单因素试验研究结果基础上进行了四因素三水平的正交试验优化。结果表明: 微藻 GN6 以 BG11 为基础培养基的最佳培养条件为 1.5 mL/L 海藻素、15 μg/L 维生素 B₁₂、0.60 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖; 将优化后的培养条件和未优化的培养条件进行比较, 结果发现在最优条件下微藻 GN6 的生物量及油脂产量分别为 16.4 g/L 和 1.62 g/L, 与未优化相比分别提高了 100.3% 和 52.2%。试验为通过添加植物激素或维生素提高产油脂微藻的生长及产油脂能力提供了有益的探索。

关键词:微藻 GN6; 生物量; 油脂产量; 植物激素; 维生素

中图分类号: S216.2; Q949.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)06-0115-05

Effect of phytohormones and vitamins on growth and oil production of microalgae GN6

LI Hanguang¹, ZHOU Qiuxiang², YANG Zhiyou¹, LI Qiuling¹, ZHANG Qinghua¹

(1. Jiangxi Key Laboratory for Conservation and Utilization of Fungal Resources, Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agricultural Microbial Resources, College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Affiliated Hospital of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: With self-screened microalgae GN6 as experimental strain, the effects of phytohormones such as seaweed liquid fertilizer, sodium nitrophenolate, and indol-3-acetic acid and vitamins such as vitamin B₁ and vitamin B₁₂ on the growth and oil production of microalgae GN6 were researched. Based on single factor experiment, four factors and three levels orthogonal experiment was used to optimize the culture conditions. The results showed that with BG11 as the basic culture medium, the optimal culture conditions of microalgae GN6 were obtained as follows: 1.5 mL/L seaweed liquid fertilizer, 15 μg/L vitamin B₁₂, 0.60 g/L peptone and 20 g/L glucose. Under the optimal conditions, the biomass and oil productivity were 16.4 g/L and 1.62 g/L, respectively, which were 100.3% and 52.2% higher than those before optimization. Therefore, these results could provide a beneficial exploration for the further improvement of growth and oil production of oil-rich microalgae by adding phytohormones and vitamins.

Key words: microalgae GN6; biomass; oil productivity; phytohormone; vitamin

收稿日期: 2017-09-25; 修回日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(21466014); 江西省教育厅科学研究项目(GJJ160388)

作者简介: 李汉广(1978), 男, 副教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为微生物资源开发利用(E-mail)lhg7886@sohu.com。

通信作者: 张庆华, 副教授, 博士(E-mail)zqh_net@163.com。

随着不可再生资源的日益枯竭, 开发清洁、高效的可再生能源迫在眉睫。除了以往的风能、核能、太阳能等, 生物质能已越来越受到人们的重视。而作为重要生物质能源之一的微藻具有繁殖快、环境适应力强、产生的油脂类物质和植物类似, 再加上清

洁、可再生的诸多优势,现已受到各国科研工作者的
高度关注,被认为是未来极具发展前景的生物柴油
原料^[1-2]。

微藻属于绿藻门的一种,呈球形或椭圆形,单生
或几个细胞聚成一团,目前发现的微藻总共有 15 种
之多^[3]。与高等植物相比,微藻除了具有利用光能
和 CO₂ 进行光合自养生长能力外,还具有可以利用
有机碳进行异养生长的能力,同时还能合成大量的
脂质、蛋白质和碳水化合物。这些产物可以被加工
成生物燃料、饲料、食品和一些高价值的生物活性物
质。许多种类的微藻具有含油量高和生长周期快等
优点,在生长过程中能够在短期内生成大量的油脂,
这些油脂大部分都可以作为替代化石能源的生物质
能源(即生物柴油)^[4]。

微藻能利用光合作用进行自养生长,多数微
藻还可以利用葡萄糖作为唯一碳源进行异养生
长。在培养微藻的过程中,油脂的积累容易受到
外界条件的影响,包括温度、CO₂、pH、光照强度、
光照时间、培养基中的营养成分(碳源、氮源、无机
盐等)^[5]。植物激素及维生素对植物细胞的生长
起到非常重要的调节作用,而微藻很多的生物学
性质与植物细胞非常接近,因此可望通过植物激
素及维生素调控微藻细胞生长及油脂的累积,从
而为实现微藻油脂制备生物柴油提供新的可能,
然而目前利用植物激素及维生素调控微藻的生
长及油脂的累积的研究仍处于起步阶段。为此本
试验通过考察不同种类及浓度的植物激素和维
生素对微藻生长及产油脂能力的影响,以期提高
微藻的生物量及油脂产量,为进一步工业化培养
微藻提供有益的前期探索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验藻种

本试验的藻种(微藻 GN6)由江西农业微生物
资源开发与利用工程实验室提供。

1.1.2 BG11 培养基

本试验采用培养微藻常用的培养基 BG11 作为
微藻培养的基础培养基^[3],除了 BG11 培养基中本
身含有的碳酸钠外,加入适量的葡萄糖作为藻种异
养培养基的碳源。添加 2% 的琼脂即可获得对应的
固体培养基,用 5% 的 NaOH 或 5% 的 HCl 溶液将培
养基的起始 pH 调至 6.5,然后在 121 °C 条件下热压
灭菌 30 min。

1.2 试验方法

1.2.1 培养方式

(1)自养培养:在 BG11 培养基中添加 2% 的
琼脂即可获得固体培养基,将甘油管中保藏的微
藻经适当稀释后涂布于固体平板,长出单藻落后
接种至液体培养基进行培养,然后将对数生长期的
藻液作为种子培养液进行接种培养,培养条件
为温度 25 °C、光照强度 4 000 lx、光暗周期比
14L:10D^[6]。

(2)异养培养:在 BG11 培养基中添加适量的
葡萄糖即可获得异养液体培养基,将对数生长期的
藻液作为种子培养液按 10% 的接种量进行接种
培养。培养条件为温度 25 °C、无光照、摇床转
速 180 r/min。

1.2.2 影响因素试验

1.2.2.1 植物激素对微藻生物量及油脂产量的影响

将不同含量的海绿素(0.1、0.25、0.50、1.0、
2.5、5.0 mL/L)、复硝酚钠(0.13、0.17、0.25、0.5、
1.0、2.0 mL/L)、吲哚乙酸(0.01、0.05、0.1、0.5、
1.0、5.0 mg/L)分别加入到 BG11 培养基中,每一含
量做 3 个平行。培养条件为温度 25 °C、光照强度
4 000 lx、光暗周期比 14L:10D。

1.2.2.2 维生素 B₁ 和维生素 B₁₂ 对微藻生物量及油脂产量的影响

将不同含量的维生素 B₁(0.1、1、5、10、50、100
mg/L)、B₁₂(0.1、1、5、10、50、100 μg/L)分别加入
到 BG11 培养基中,每一含量做 3 个平行。培养条件
为温度 25 °C、光照强度 4 000 lx、光暗周期比
14L:10D。

1.2.3 生物量及油脂产量的测定

生长曲线的绘制:取对数期藻液,使用紫外分光
光度仪在 680 nm 处测定其吸光值(OD₆₈₀),根据
OD₆₈₀ 值绘制生长曲线^[7]。

生物量的测定:取 5 mL 培养液于已称重的 10
mL 离心管中,在 6 000 r/min 条件下离心 10 min,
离心结束后去除上清液,用去离子水洗涤两次,将
所得藻体置于 70 ~ 80 °C 的烘箱中烘干至恒重,
称其质量即可得出微藻的干重,计算微藻的生物
量^[8]。

微藻产油脂的测定:采用氯仿-甲醇法提取微
藻中的油脂。精确称取 300 mg 干燥藻体细胞于干
燥、洁净且已称重的离心管中,加入 6 mL 浓度为
4 mol/L 的盐酸,旋涡振荡 30 min,100 °C 沸水浴
处理 8 min,然后立刻置于 -20 °C 冰箱中冷却静
置 10 min,

向其中加入 16 mL 氯仿-甲醇(体积比 1:1)混合溶液,旋涡振荡器充分振荡混匀,萃取 15 min 后,5 000 r/min 离心 10 min,将下层氯仿层转移至另一个洁净离心管中,加入 8 mL 0.25% 的氯化钠溶液,充分振荡摇匀,在相同条件下离心,最后将所得的底层氯仿层转移至已称重的干净锥形瓶中,置于 0.09 ~ 0.1 MPa 的真空干燥箱中,在 60 ~ 70 °C 条件下烘至恒重并计算微藻油脂的产量^[9]。

2 结果与分析

2.1 植物激素对微藻 GN6 的生物量及油脂产量影响

2.1.1 不同种类植物激素对微藻 GN6 的生物量及油脂产量影响

植物激素是植物在自身生长代谢过程中产生的,且能够控制或影响其生长的天然化学物质。植物激素可分为生长素、乙烯、赤霉素、细胞分裂素、油菜甾醇和脱落酸六大类,影响着植物细胞的分裂、分化、生长以及植物开花结果等生物过程,因此在植物细胞和组织培养中被广泛使用^[10]。藻类与植物有许多共同之处,有研究表明植物激素能促进微藻细胞的分裂从而加快藻类的生长^[11]。为此本试验也尝试探究植物激素对微藻 GN6 生长的影响,将不同含量的海绿素、复硝酚钠及吲哚乙酸 3 种植物激素分别添加到 BG11 培养基中,其他自养培养条件不变,考察其对微藻 GN6 生物量及油脂产量的影响,结果如图 1 ~ 图 3 所示。

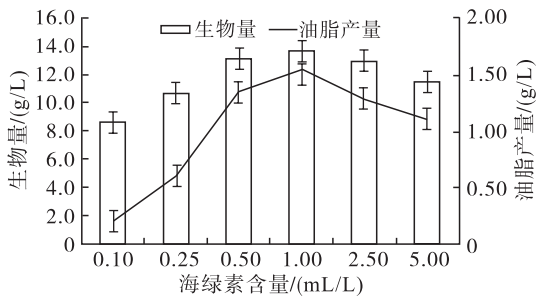


图 1 不同含量海绿素对微藻 GN6 生物量和油脂产量的影响

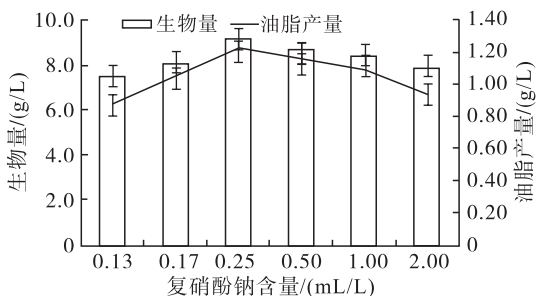


图 2 不同含量复硝酚钠对微藻 GN6 生物量和油脂产量的影响

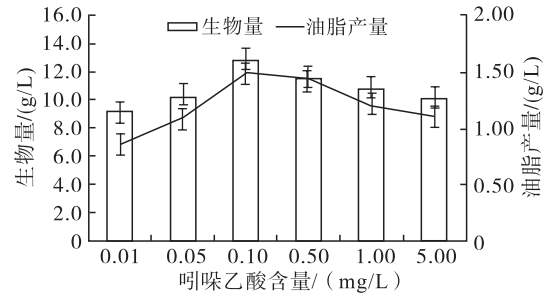


图 3 不同含量吲哚乙酸对微藻 GN6 生物量和油脂产量的影响

由图 1 可知,当海绿素含量在 0.1 ~ 1.0 mL/L 范围内,生物量及油脂产量随海绿素含量升高而逐步升高;当海绿素含量超过 1.0 mL/L 时,生物量及油脂产量呈下降趋势;而当海绿素含量为 1.0 mL/L 时,生物量和油脂产量值为最大值,分别为 13.7 g/L 和 1.51 g/L。由图 2 可知,当复硝酚钠含量在 0.13 ~ 0.25 mL/L 范围时,生物量及油脂产量与复硝酚钠含量呈正相关;当复硝酚钠含量大于 0.25 mL/L 时,呈负相关。在复硝酚钠含量为 0.25 mL/L 时的生物量和油脂产量最大,分别为 9.2 g/L 和 1.23 g/L。由图 3 可知,吲哚乙酸含量在 0.01 ~ 0.10 mg/L 范围时,生物量及油脂产量与吲哚乙酸含量呈正相关;吲哚乙醇含量大于 0.10 mL/L 时,呈负相关。当吲哚乙酸含量为 0.10 mL/L 时,生物量和油脂产量达到最大值,分别为 12.9 g/L 和 1.51 g/L。综上可得 3 种植物激素(海绿素、复硝酚钠、吲哚乙酸)的最适含量分别为 1.0 mL/L、0.25 mL/L、0.10 mg/L。

2.1.2 最适植物激素的选择

为得到最适微藻 GN6 生长的植物激素类别,分别将 3 种植物激素调至最适含量条件下进行微藻培养。试验条件分别为海绿素 1.0 mL/L、复硝酚钠 0.25 mL/L、吲哚乙酸 0.10 mg/L 和空白对照(未添加植物激素),其他自养培养条件不变,在 25 °C 条件下培养 7 d,试验结果如图 4 所示。

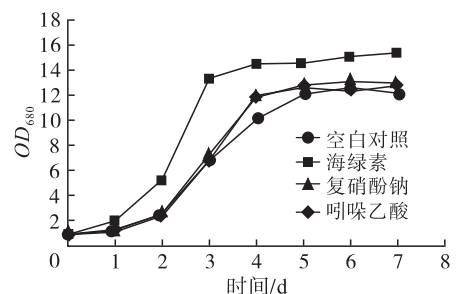


图 4 不同植物激素下微藻 GN6 的生长曲线

由图 4 可知,复硝酚钠及吲哚乙酸对微藻 GN6 的生长影响相对较低。而以海绿素为激素时的微藻

GN6 生长效果最明显, OD_{680} 值达到最大, 为 15.3。通过分析生长曲线走势不难发现, 空白对照组、吡啶乙酸组及复硝酚钠组三者的走势基本相同, 前两天走势平缓, 3~4 d 进入快速发展期, 5~7 d 慢慢趋于稳定, 此阶段的 OD_{680} 值为 12.5 左右。而海绿素组生长周期相对较快, 1~2 d OD_{680} 值增长显著, 3 d 时快速增长到接近最大值, 之后生长相对稳定, OD_{680} 值在 15 左右。从上述试验结果可得, 对于本试验来说含量 1.0 mL/L 的海绿素是最适微藻 GN6 生长的植物激素。

2.2 维生素 B₁ 及 B₁₂ 对微藻 GN6 的生物量及油脂产量影响

维生素 B₁ 一般作为辅基形式参与微生物一些酶的构成, 如常见的丙酮酸脱氢酶 (PHD), 有研究表明维生素 B₁ 是一种较优的藻类生长促进剂^[12]。王珺等^[13] 研究发现发酵培养基中维生素 B₁ 质量浓度为 0.1 mg/L 可以促进球等鞭金藻的生长。维生素 B₁₂ 又称钴胺素, 是唯一含金属元素的维生素, 常用作为甲基及其他一碳单位转移反应的酶的辅基^[12]。为研究维生素 B₁ 及 B₁₂ 对微藻 GN6 的生长及油脂产量的影响, 将不同含量维生素 B₁ 及维生素 B₁₂ 添加到 BG11 培养基中, 其他自养培养条件不变, 以考察其对微藻 GN6 生物量及油脂产量的影响, 结果如图 5~图 6 所示。

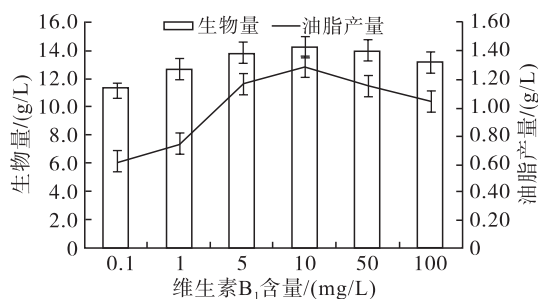


图 5 不同含量维生素 B₁ 对微藻 GN6 生物量和油脂产量的影响

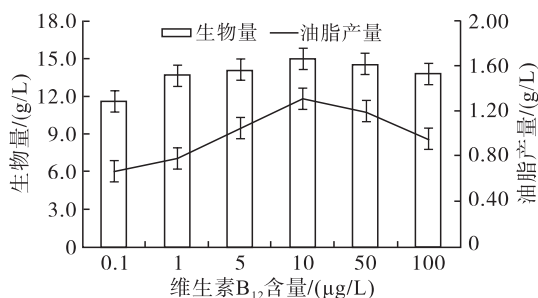


图 6 不同含量维生素 B₁₂ 对微藻 GN6 生物量和油脂产量的影响

由图 5 可知, 当维生素 B₁ 含量为 0.1~10 mg/L 范围时, 生物量及油脂产量随维生素 B₁ 含量

增加而升高; 当含量大于 10 mg/L 时, 呈下降趋势。在维生素 B₁ 含量为 10 mg/L 时的生物量及油脂产量达到最大, 分别为 14.2 g/L 和 1.28 g/L。由图 6 可知, 在维生素 B₁₂ 含量为 0.1~10 μg/L 范围时, 生物量及油脂产量与维生素 B₁₂ 含量呈正相关, 当含量大于 10 μg/L 时, 呈负相关。当维生素 B₁₂ 含量为 10 μg/L 时, 生物量及油脂产量达到最大值, 分别为 14.9 g/L 和 1.32 g/L。综合比较, 本试验选择维生素 B₁₂ 作为外源维生素添加物。本试验结果与汪本凡等^[14] 的研究结果一致。

2.3 正交优化试验

根据本试验室前期关于碳源、氮源对微藻 GN6 生长及产油能力的影响试验 (结果未列出) 以及本试验结果, 选取对微藻 GN6 生长及油脂量影响较大的因素进行正交试验, 具体为: 海绿素含量 (A)、维生素 B₁₂ 含量 (B)、蛋白胨含量 (C)、葡萄糖含量 (D) 作为正交试验中的 4 个影响因素, 各因素选取 3 个水平进行正交试验设计^[15], 因素水平见表 1, 正交试验结果及分析见表 2。

表 1 因素水平

| 水平 | A 海绿素 含量/(mL/L) | B 维生素 B ₁₂ 含量/(μg/L) | C 蛋白胨 含量/(g/L) | D 葡萄 糖/(g/L) |
|----|--------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------|
| 1 | 0.50 | 5.00 | 0.60 | 15.00 |
| 2 | 1.00 | 10.00 | 0.80 | 20.00 |
| 3 | 1.50 | 15.00 | 1.00 | 25.00 |

表 2 正交试验结果及分析

| 试验号 | A | B | C | D | 油脂产量/(g/L) |
|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.142 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1.187 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.346 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1.298 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.160 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1.500 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1.545 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1.526 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.312 |
| k_1 | 1.225 | 1.328 | 1.389 | 1.205 | |
| k_2 | 1.319 | 1.291 | 1.266 | 1.411 | |
| k_3 | 1.461 | 1.386 | 1.350 | 1.390 | |
| R | 0.236 | 0.095 | 0.123 | 0.206 | |

从表 2 可知, 4 个因素中海绿素含量对微藻 GN6 的油脂产量影响最大, 葡萄糖含量次之, 蛋白胨含量第三, 影响最小的是维生素 B₁₂ 含量; 具体对微藻 GN6 油脂产量影响的大小顺序为 A > D > C > B。分析 k 值, 可得出最佳组合为 A₃B₃C₁D₂, 即最适

培养基的外源添加物为 1.5 mL/L 海绿素、15 $\mu\text{g/L}$ 维生素 B_{12} 、0.60 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖。

用正交优化后的培养基对微藻 GN6 进行培养,与未优化的 BG11 培养基进行对比,其他试验条件一致,试验结果如图 7 所示。

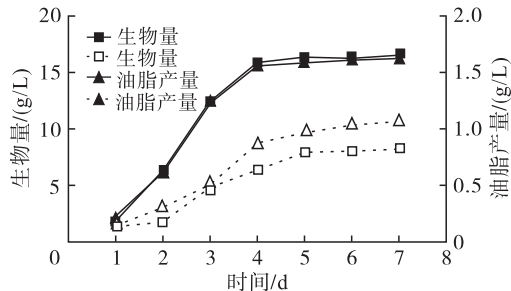


图 7 优化前(虚线)与优化后(实线)微藻 GN6 的生长情况

由图 7 可知,微藻 GN6 在优化后的培养条件下,生物量和油脂产量都有了相应的提高;然而两者的生长周期没有明显的变化,优化条件下微藻在 5 d 后趋于稳定,而未优化时微藻 GN6 生物量在 4 d 后就趋于稳定。因此,在优化条件下微藻 GN6 的培养时间未能缩短。然而优化后的微藻 GN6 生物量和油脂产量分别为 16.4 g/L 和 1.62 g/L,与未经优化相比,生物量和油脂产量分别提高了 100.3% 和 52.2%,由此证明优化后的培养基对微藻 GN6 的生物量和油脂产量都有一定程度的提高。

3 结论

本试验以 BG11 培养基为基础培养基,通过研究海绿素、复硝酚钠、吲哚乙酸 3 种植物激素及维生素 B_1 和维生素 B_{12} 两种维生素对微藻 GN6 生长及产油能力的影响,结果表明最适合微藻 GN6 生长的植物激素以及维生素分别为:海绿素(1.0 mL/L)和维生素 B_{12} (10 $\mu\text{g/L}$)。

然后再根据以上各种最适物质的单因素试验结果以及结合前期的研究结论,进行了正交优化,最终得出最优的外源添加物的种类及含量为:葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 0.60 g/L、维生素 B_{12} 15 $\mu\text{g/L}$ 、海绿素 1.5 mL/L;且在最优条件下,微藻 GN6 的生物量和油脂产量分别达到 16.4 g/L 和 1.62 g/L,与未优化相比分别提高了 100.3% 和 52.2%。本试验的研究结果为进一步通过工艺优化方法提高微藻 GN6 的生物量及油脂产量提供了较为合理的工艺路线,同时可为提高其他微藻产油脂性能提供有益的探索。

参考文献:

- [1] 张英伟,刘炜. 微藻能源的研究进展[J]. 海洋科学, 2012, 36(1): 132-138.
- [2] JIANG D, ZHUANG D F, LIU L, et al. Assessment of bioenergy potential on marginal land in China[J]. Renew Sustain Energy Rev, 2011, 15: 1050-1056.
- [3] 葛珍珍. 小球藻的筛选、培养和产油脂研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2012.
- [4] 黄英明,王伟良,李元广. 微藻能源技术开发与产业化发展思路与策略[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 907-913.
- [5] 胡文军. 产油微藻的筛选、鉴定及其培养条件的研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2012.
- [6] 李荷芳,周汉秋. 光照强度对海洋微藻脂肪酸含量及脂肪酸组成影响的研究[J]. 海洋科学集刊, 2001, 43: 178-183.
- [7] 吕旭阳,张雯,杨阳,等. 分光光度法测定小球藻数量的方法研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23): 11104-11105.
- [8] ZENG X H, DANQUAH M K, ZHENG C, et al. NaCS-PDMAAC immobilized autotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for wastewater nitrogen and phosphate removal[J]. Chem Eng J, 2012, 187: 185-192.
- [9] 王俊彩,赵阳国,师振华,等. 小球藻培养条件优化及油脂积累特征[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(1): 1-14.
- [10] 黄冠华,陈峰. 环境因子对异养小球藻脂肪酸组分含量和脂肪总酸产量的影响[J]. 可再生能源, 2009, 27(3): 65-69.
- [11] YAN D, LU Y, CHEN Y F, et al. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production[J]. Biore-sour Technol, 2011, 102: 6487-6493.
- [12] CROFT M T, WARREN M J, SMITH A G. Algae need their vitamins[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5(8): 1175-1183.
- [13] 王珺,李红,王嫣. 球等鞭金藻 3011 的生长与其营养盐关系的研究[J]. 海南大学学报自然科学版, 2002, 20(4): 319-322.
- [14] 汪本凡,唐欣昀,赵良侠,等. 四种维生素对杜氏盐藻生长的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 400-402.
- [15] 李汉广,周秋香,涂国全,等. 抗真菌链霉菌中新农抗 702 浸提工艺的优选[J]. 生产与科研经验, 2013, 39(11): 171-173.