

不同浓度 IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 生长及脂肪酸含量的影响

杨 凯, 史全良^①

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 研究了在 BG11 液体培养基中添加 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 生长和脂肪酸含量的影响。结果表明, 随培养时间的延长, 微藻 TH6 的生长量逐渐增加; 与对照相比, 添加不同浓度 IAA 对微藻 TH6 的生长均有不同程度的促进作用, 其中添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对微藻 TH6 生长的促进效果最佳, 至培养第 33 天, 微藻 TH6 的生长量比对照提高了 44.34%。在培养基中添加 IAA 均能不同程度提高微藻 TH6 的总脂肪酸含量, 当 IAA 浓度为 0.1 、 0.5 、 1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 总脂肪酸含量分别是对照的 2.09、2.13、2.41 和 1.73 倍。IAA 对微藻 TH6 中软脂酸、硬脂酸、亚油酸和油酸含量的影响作用不同。添加不同浓度 IAA 均能不同程度提高软脂酸的含量, 当 IAA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 软脂酸的相对含量最高, 达到了 28.62%; 较高浓度的 IAA (1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能促进硬脂酸含量的提高, 低浓度 IAA (0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 使硬脂酸含量降低; 当 IAA 浓度为 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 亚油酸含量较对照有不同程度提高; IAA 对油酸含量的影响作用不明显。研究结果显示, 含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 BG11 液体培养基为微藻 TH6 的最佳液体培养基。在这一培养基中, 微藻 TH6 的总脂肪酸含量最高, 饱和及不饱和脂肪酸含量也较高, 且微藻 TH6 生长量最大, 可作为生物柴油资源进一步研究和开发。

关键词: 微藻 TH6; IAA; 生长; 脂肪酸含量; 生物柴油

中图分类号: Q945.3; Q547 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)02-0080-04

Effects of different concentrations of IAA on growth and fatty acid content of microalgae TH6 (*Oedocladium* sp.) YANG Kai, SHI Quan-liang^① (School of Medicine and Life Sciences, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215123, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(2): 80–83, 96

Abstract: Effects of $0.1 - 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA added in BG11 liquid medium on growth and fatty acid content of microalgae TH6 (*Oedocladium* sp.) were studied. The results show that the growth increment of microalgae TH6 increases as the cultivation continues. Compared to the control group, different concentrations of IAA all promote the growth of microalgae TH6 in various degrees, and the promotion effect of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA is the best, and the growth increment of microalgae TH6 is 44.34% more than that of the control on the thirty-third day of cultivation. Adding IAA in BG11 liquid medium also can increase the content of total fatty acids in various degrees. When IAA concentration is 0.1 , 0.5 , 1.0 and $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the content of total fatty acids in microalgae TH6 is 2.09 times, 2.13 times, 2.41 times and 1.73 times as much as that of the control. IAA has different effects on the contents of palmitic acid, stearic acid, linoleic acid and oleic acid in microalgae TH6. Different concentrations of IAA can enhance palmitic acid content in different degrees, and the relative content of palmitic acid reaches its peak of 28.62% when IAA concentration is $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Higher concentration of IAA (1.0 or $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) promotes stearic acid content increasing, while lower concentration of IAA (0.1 or $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) induces stearic acid content decreasing. When IAA concentration is $0.1 - 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the linoleic acid content is higher than that of the control in different degrees. IAA has no obvious effect on oleic acid

收稿日期: 2008-12-26

基金项目: 江西省生物技术重点实验室经费资助(S8134801)

作者简介: 杨 凯(1983—), 男, 安徽明光人, 硕士研究生, 主要从事能源藻类的筛选与开发。

^①通讯作者 E-mail: shiquanliang@suda.edu.cn

content. It is suggested that BG11 liquid medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA is the best liquid medium for microalgae TH6. In this medium, the content of total fatty acids of microalgae TH6 is the highest, the content of saturated and unsaturated fatty acids higher and the growth increment the largest. So further research and development may be made on microalgae TH6 as a biodiesel resources.

Key words: microalgae TH6 (*Oedocladium* sp.); IAA; growth; fatty acid content; biodiesel

生物柴油来源于可再生生物资源,作为石油燃料的替代物,具有良好的应用前景,因此引起了世界各国的广泛关注。但是生物柴油的生产成本过高,一直是限制生物柴油广泛应用的最主要问题,只有降低生产成本,生物柴油才具有商业应用前景。据统计,生物柴油制备成本的 70% ~ 85% 来自原料成本^[1],因而,开发含油量高、成本低廉的生物资源是降低生物柴油成本的主要途径。

微藻具有生长快、生物量大、含油量高等特点,倍受研究者的关注。缪晓玲等^[2]用微藻热解获得的生物质燃油的热值高达 $33 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$,是木材或农作物秸秆的 1.6 倍;通过调节小球藻(*Chlorella protothecoides* Krüger)的培养条件(异氧培养),可获得 57.9% 高品质、高热值的生物质燃油,是自养培养细胞产生生物柴油的 3.4 倍^[3]。

作者以微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 为材料,研究了培养过程中 IAA 对其生长及特定脂肪酸含量的影响,为生物柴油开发过程中微藻的进一步利用及降低生物柴油的生产成本提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用微藻 TH6 为采自苏州太湖的第 6 号样本。植物体呈丝状,有分枝,以假根状枝着生于其他植物体上或漂浮于水面,不具刺毛,据此判定该微藻属于鞘藻科(*Oedogoniaceae*)枝鞘藻属(*Oedocladium* Stahl),由苏州大学医学部史全良副教授鉴定。实验前用 BG11 液体培养基进行扩大培养。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将微藻 TH6 分别接种于添加了 0.0、0.1、0.5、1.0 和 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 BG11 液体培养基中,置于白色日光灯下,于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 条件下培养,每天定时摇瓶 3 次。每处理 3 个重复。培养过程中每 3 天于超净工作台上称量 1 次,去除

培养基,称量微藻及培养瓶的总质量,然后扣除培养瓶质量,即为微藻的生长量,每一样品重复测量 3 次,结果取平均值。

1.2.2 脂肪酸的提取方法 由于微藻生长处于稳定期时是抽提脂肪酸的最佳时期,因而在培养 30 d 后,取出藻体,于 40°C 条件下烘干 48 h,干燥藻体研磨成粉末,取 0.5 g,用索氏抽提法^[4]抽提脂肪酸。

将抽提出的粗脂肪放入具塞试管中,加入 5 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾-甲醇溶液,静止 30 min 后,向混合物中加入 5 mL 正己烷,再静置 2 min。上清液贮存于 -20°C 条件下,用于气相色谱分析^[5]。

1.2.3 气相色谱分析 采用美国 Varian 公司生产的 CP-3800 型气相色谱仪测定脂肪酸含量。色谱条件:CPSIL-5CB 色谱柱 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$),FID 检测器;进样口温度为 250°C ,检测器温度为 250°C ;程序升温:于 190°C 保留 15 min 后,以 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 230°C ,保持 230°C 至分析完成;载气为氮气,压力 500 kPa,空气压力 50 kPa,氢气压力 50 kPa,尾吹气压力 200 kPa;分流进样,分流比 40:1,进样量 1 μL 。

1.3 数据处理

按以下公式计算总脂肪酸含量和各脂肪酸成分的相对含量:总脂肪酸含量 = (总脂肪酸质量/样品干质量) $\times 100\%$;各脂肪酸相对含量 = [各脂肪酸峰值/(总峰值 - 溶剂峰值)] $\times 100\%$ 。

采用 SPSS 13.0 统计分析软件中的 ANNOVA 分析法对各组数据进行 *t* 检验。

2 结果和分析

2.1 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 生长的影响

在 BG11 液体培养基中添加不同浓度 IAA 对微藻 TH6 生长的影响见表 1。由表 1 可看出,随培养时间的延长,微藻 TH6 的鲜质量逐渐增加;与对照相比,添加 0.1 ~ 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 均能使微藻 TH6 的鲜质量提高,表明在 0.1 ~ 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围

内,IAA 可促进微藻 TH6 的生长。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组微藻 TH6 的生长量比对照略有增加; 0.5 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组微藻 TH6 的生长量明显高于对照,其中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组的生长量最大; $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组微藻 TH6 的生长量也高于对照,但低于 0.5 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组。至培养第 33 天, 0.1 、 0.5 、 1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组微藻 TH6 的生长量比对照分别提高了 4.98%、

34.39%、44.34% 和 22.17%。实验结果显示,在 BG11 液体培养基中添加 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对微藻 TH6 的生长均有不同程度的促进作用,其中添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对微藻 TH6 生长的促进效果最佳。在 BG11 液体培养基中添加高浓度的 IAA ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 反而使微藻 TH6 的生长量降低,这可能与藻类本身含有微量的植物激素^[6-10]有关。

表1 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 生长的影响¹⁾

Table 1 Effect of different concentrations of IAA on growth of microalgae TH6 (*Oedocladium* sp.)¹⁾

IAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of IAA	不同培养时间微藻的鲜质量/g Fresh weight of microalgae at different culture times											
	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d	33 d
0.0(CK)	0.25	1.15	1.05	0.86	1.16	1.43	1.63	1.72	1.79	1.88	2.02	2.21
0.1	0.25	0.97	0.90	0.93	1.01	1.43	1.78	1.84	1.88	1.94	2.09	2.32
0.5	0.25	1.30	1.15	1.34	1.85	2.20	2.53	2.64	2.74	2.85	2.88	2.97
1.0	0.25	0.81	1.30	1.65	2.30	2.56	2.85	2.97	2.99	3.01	3.12	3.19
1.5	0.25	0.94	0.86	1.14	1.46	1.98	2.43	2.50	2.57	2.53	2.67	2.70

¹⁾ 基本培养基为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

2.2 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 脂肪酸含量的影响

2.2.1 对总脂肪酸含量的影响 在 BG11 液体培养基中添加不同浓度 IAA 对微藻 TH6 总脂肪酸含量的影响见表 2。由表 2 可知,与对照组相比,添加 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 均能在不同程度上提高微藻 TH6 的总脂肪酸含量, 0.1 、 0.5 、 1.0 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

IAA 处理组的总脂肪酸含量分别是对照的 2.09、2.13、2.41 和 1.73 倍,可见,添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对微藻 TH6 总脂肪酸含量的促进效果最佳,说明添加适量的 IAA 可以显著提高微藻 TH6 的总脂肪酸含量。

表2 不同浓度 IAA 对微藻 TH6 (*Oedocladium* sp.) 脂肪酸含量的影响¹⁾

Table 2 Effect of different concentrations of IAA on content of fatty acids in microalgae TH6 (*Oedocladium* sp.)¹⁾

IAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of IAA	总脂肪酸含量/% Content of total fatty acids	各脂肪酸的相对含量/% Relative content of different fatty acids			
		软脂酸 Palmitic acid	硬脂酸 Stearic acid	亚油酸 Linoleic acid	油酸 Oleic acid
0.0(CK)	8.20	15.22	5.40	8.50	7.47
0.1	17.13	21.35	5.16	10.39	4.21
0.5	17.45	16.19	4.99	12.01	4.05
1.0	19.75	28.62	10.25	9.19	8.48
1.5	14.20	20.16	10.53	7.19	7.48

¹⁾ 基本培养基为 BG11 液体培养基 The basic medium is BG11 liquid medium.

2.2.2 对各脂肪酸成分含量的影响 在 BG11 液体培养基中添加不同浓度 IAA 对微藻 TH6 不同脂肪酸相对含量的影响见表 2。由表 2 可见,在 BG11 液体培养基中添加 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 对不同脂肪酸成分相对含量的影响效应不同。

与对照相比,在 BG11 液体培养基中添加 $0.1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 均能在不同程度上提高软脂酸的

相对含量,其中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组软脂酸的相对含量最高,达到 28.62%,比对照提高了 88.04%; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组软脂酸的相对含量最低,仅为 16.19%,仅比对照提高 6.37%。

添加不同浓度 IAA 对硬脂酸相对含量的影响效应不同,其中 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组硬脂酸的相对含量最高,达到 10.53%,比对照增加了 95.00%;其

次为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组,硬脂酸的相对含量比对照提高了 81.02%;而 0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组硬脂酸的相对含量则分别比对照降低了 7.59% 和 4.65%。

随着 IAA 浓度的增加,亚油酸的相对含量呈先升高后降低的变化趋势,0.1、0.5 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组亚油酸的相对含量分别比对照提高了 22.20%、41.29% 和 8.12%,而 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组亚油酸的相对含量则比对照降低了 15.41%。

添加不同浓度 IAA 对油酸相对含量的促进作用不明显,0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组油酸的相对含量仅为 4.21% 和 4.05%,比对照降低了 43.64% 和 45.78%;而 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组油酸的相对含量与对照相近;仅有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组油酸的相对含量高于对照,但仅比对照提高了 13.52%。

t 检验分析结果表明,在添加了不同浓度 IAA 的 BG11 液体培养基中,微藻 TH6 的软脂酸和硬脂酸相对含量与对照差异极显著 ($P < 0.01$),且各处理组间的差异也达到了显著水平;而油酸和亚油酸相对含量的差异则不显著。

在添加了不同浓度 IAA 的 BG11 液体培养基中, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 处理组的总脂肪酸含量最高;饱和脂肪酸(包括软脂酸和硬脂酸)相对含量也最高,达到 38.87%;不饱和脂肪酸(包括油酸和亚油酸)相对含量也较高,达到 17.67%。从制备生物柴油的角度看,在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 BG11 液体培养基中,微藻 TH6 含有较高含量的制备生物柴油所需要的主要脂肪酸成分(C_{16} 和 C_{18} 脂肪酸),结合总脂肪酸含量的高低,最终确定含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 BG11 液体培养基为微藻 TH6 的最佳液体培养基。据此也可以认为,添加适宜浓度的 IAA 是促进微藻 TH6 生长及脂肪酸合成的重要手段之一。

3 讨 论

作为植物生长素之一,IAA 不仅能够在高等植物体内合成,也能在低等藻类细胞中合成^[11-12]。IAA 能够活化质膜上的 ATP 酶,促进细胞壁酸化,增加其可塑性,从而增加细胞渗透吸收的能力,使液泡不断增大,细胞体积也增大;IAA 还能促进 RNA 和蛋白质的合成,为原生质体和细胞壁的合成提供原料,保持细胞的持久性生长^[13]。有实验证实,IAA 能

促进和刺激单细胞藻类的生长,如果缺乏 IAA,藻类的形态将发生较大变异^[14]。庄岩等^[15]的研究结果显示,浓度低于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,IAA 对海带(*Laminaria japonica* Aresch.) 细胞增殖无明显作用;当浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,IAA 对细胞增殖的作用最佳;而浓度高于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖受到抑制。本文的研究结果则表明,适宜浓度的 IAA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够显著促进微藻 TH6 的生长,同时较高浓度的 IAA ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 并没有对微藻 TH6 的生长产生抑制作用,且与对照组相比,还具有一定的促进作用。总之,在藻类培养过程中不同藻类适宜的 IAA 浓度不同,与藻类的种类差异有关。

微藻脂肪酸的合成主要通过乙酰辅酶 A 羧化酶和脂肪酸合成酶 2 个酶系的反应进行。在脂肪酸的合成过程中,乙酰辅酶 A 是脂肪酸合成的引物,在碳链的延长过程中,需要丙二酸单酰辅酶 A 参与,酶的作用底物是乙酰 - ACP 和丙二酸单酰 - ACP,经过多步反应形成 $\text{C}_{16} \sim \text{C}_{18}$ 脂肪酸硫脂。由于短链脂肪酸的形成步骤在高等植物、动物、真菌、细菌及藻细胞内相近^[16-17],因此,在添加 IAA 的 BG11 液体培养基中对微藻 TH6 进行培养,可能促进了 EMP 途径中产生的丙酮酸向乙酰辅酶 A 转化,再在乙酰辅酶 A 羧化酶作用下进行碳链延长进入脂肪酸合成途径,首先由软脂酸延长形成硬脂酸,再由硬脂酸去饱和形成油酸,进一步去饱和形成亚油酸^[18]。本文研究表明,IAA 对微藻 TH6 脂肪酸合成有一定的促进作用,但是 IAA 在微藻 TH6 脂肪酸合成途径中所起到的具体作用及其如何促进脂肪酸合成,目前还没有相关文献报道,有待进一步的研究。

综合本文的研究结果可见,用含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 BG11 液体培养基进行培养,微藻 TH6 的生长量显著提高,脂肪酸含量也有较大幅度提高,具有成为生物柴油资源的潜力,但总脂肪酸含量及适宜作为生物柴油的脂肪酸成分的含量还有待进一步提高。在下一步的研究中将通过改变不同培养条件和运用转基因技术以促进目的脂肪酸的合成,使微藻 TH6 更加符合制备生物柴油的要求,为生物柴油产业的发展开辟新的原料来源。

参考文献:

- [1] 韩秀丽,黄晓敏. 生物柴油生产技术现状[J]. 现代化工, 2007 (S1): 129 - 133.