

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2016.20280

吴琼芳, 张莹, 罗舒怀, 李爱芬, 张成武. 氮限制对普通小球藻积累油脂过程中生化组成与光合生理的影响[J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 280-288

Wu QF, Zhang Y, Luo SH, Li AF, Zhang CW. Effects of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic physiology during lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* Beijerinck[J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(2): 280-288

氮限制对普通小球藻积累油脂过程中 生化组成与光合生理的影响

吴琼芳, 张莹, 罗舒怀, 李爱芬*, 张成武

(暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632)

摘要:以产油普通小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) 为材料, 通过设置不同的初始硝酸钠浓度, 研究不同程度的氮素限制对普通小球藻生长、生化组成及光合生理的影响。结果显示, 在实验设置的 4 个氮素浓度下 (18.0、9.0、4.5、3.6 mmol/L), 普通小球藻生物量无显著差异, 但较低的初始氮浓度明显促进了其油脂积累, 其中 4.5 mmol/L 组藻细胞的总脂含量和总脂产率最高, 分别达到干重的 48.32% 及 $0.0931 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 显著高于 18.0 mmol/L 的正常氮组 ($P < 0.05$)。4 个氮浓度组藻细胞内碳水化合物及可溶性蛋白的含量均有下降, 油脂积累量逐渐升高, 2 个低氮组 (4.5 mmol/L 和 3.6 mmol/L) 在培养初期藻细胞内可溶性蛋白大量降解, 油脂及碳水化合物有所积累, 但碳水化合物随后逐渐转化为油脂。PS II 最大光能转化效率 (F_v/F_m)、实际光能转化效率 (Yield) 以及相对电子传递效率 (ETR) 在培养过程中均呈下降趋势, 77 K 低温荧光结果显示, 培养初期, 2 个光系统之间存在光能调配和状态转化。代表固碳能力的 Rubisco 活性表现为在较高氮浓度组先上升后下降, 而在 2 个低氮组呈下降趋势; 4 个氮浓度组 Rubisco 的活化程度均呈先下降后上升的趋势。该研究表明适宜氮素限制促进普通小球藻油脂积累的过程中碳素分配和光合生理存在协同调控。

关键词: 产油微藻; 氮限制; 生化组成; 光合作用

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2016)02-0280-09

Effects of Nitrogen Limitation on Biochemical Composition and Photosynthetic Physiology during Lipid Accumulation in *Chlorella vulgaris* Beijerinck

WU Qiong-Fang, ZHANG Ying, LUO Shu-Huai, LI Ai-Fen*, ZHANG Cheng-Wu

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Microalgae of the genus *Chlorella* are capable of accumulating lipids when exposed to nutrient limitation (especially nitrogen) and are therefore considered promising organisms for biodiesel production. This study explored the effects of nitrogen limitation on biomass, biochemical components and photosynthetic physiological parameters of *C. vulgaris* Beijerinck, an oleaginous microalga. Growth experiments were carried out in modified BG-11 medium with four different initial concentrations of sodium nitrate (18.0, 9.0, 4.5 and 3.6 mmol/L). These four nitrogen concentrations had no remarkable influence on growth, but exerted considerable influence on lipid accumulation in *C. vulgaris*. Maximum lipid content and

收稿日期: 2015-08-21, 退修日期: 2015-10-15。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41176105); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (21614101)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (41176105) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (21614101).

作者简介: 吴琼芳 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为应用藻类生物技术 (E-mail: Qiongfangfang@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: tiger@jnu.edu.cn)。

productivity were obtained in the 4.5 mmol/L group (48.32% of dry weight and $0.0931 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively), which increased significantly ($P < 0.05$) compared with those of the 18.0 mmol/L group. The content of carbohydrate and soluble protein in the four groups decreased with increased lipid accumulation; however, in the low nitrogen groups (4.5 mmol/L and 3.6 mmol/L), the soluble protein degraded rapidly for carbohydrate synthesis at the initial stage, but the accumulated carbohydrate at the initial stage eventually converted to lipid at the later stage of cultivation. The maximum efficiency of light energy conversion of PS II (F_v/F_m), actual energy conversion efficiency (Yield), and relative electron transfer efficiency (ETR) all decreased significantly, and the change in F683/F718 suggested optical energy distribution and state transition between PS I and PS II. In addition, the initial and total Rubisco activity of *C. vulgaris* in the 18.0 mmol/L and 9.0 mmol/L groups both peaked on the third day and then declined, while the Rubisco activity in the low nitrogen groups declined constantly. The ratio of initial and total Rubisco activity tended to decline at first and then increase. In conclusion, nitrogen limitation promoted lipid accumulation in *C. vulgaris*, and carbon distribution and photosynthetic physiology changed markedly.

Key words: Oleaginous microalgae; Nitrogen concentration; Biochemical compounds; Photosynthesis

随着化石燃料的日趋耗竭,生物能源作为一种潜力极大的新型可替代能源开始崭露头角^[1]。利用微藻生产生物燃料及高附加值产品是目前生物能源研究的热点之一^[2-4]。

提高藻种的油脂产量是规模化生产生物柴油的前提。大量研究表明,通过改变培养方式^[5]、营养供给^[6]、光照强度^[7]、温度^[8]及离子浓度^[9]等可显著提高微藻的油脂含量。其中,利用氮限制提高微藻油脂积累最为常见,不仅是因为氮限制对多种藻类的脂质积累有促进作用,而且与其他影响因子相比,控制氮浓度更易操纵且所需成本更低^[5]。氮限制改变藻细胞内物质的组成,通常表现为蛋白含量下降、油脂或碳水化合物含量增加, Berges 等^[10]报道威氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle) 在氮胁迫条件下诱导产生一种特殊的蛋白酶,且细胞内大部分蛋白酶的活性增加,造成藻细胞蛋白含量显著下降。Dean 等^[11]用傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 对莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* Dang) 及栅藻 (*Scenedesmus subspicatus* Chodat) 的测定结果显示,在氮限制条件下油脂和碳水化合物含量均有增加。另外,氮限制对藻细胞生长速率及光合生理影响也较大,如小新月菱形藻 (*Nitzschia closterium* f. *minutissima* Allen & Nelson)^[12]在低氮供应时叶绿素 *a* 及光合效率均有所下降,进而阻碍藻

细胞生长;尖状栅藻 (*Scenedesmus acuminatus* Lagerheim Chodat)^[13]在低氮条件下光合速率显著低于全氮组,但适当的氮限制却对其生长有明显促进作用。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 作为催化光合作用固定 CO_2 的第一步关键酶,其活性制约着光合效率,是决定光合作用的关键酶。有研究认为 Rubisco 的含量与叶片中的氮素含量有关^[14]。可见,在应对氮胁迫时,微藻生化组分及光合生理均存在响应机制,且这种机制具有物种特异性^[15]。

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) 分布广泛,细胞直径平均约为 $5 \sim 10 \mu\text{m}$,油脂或淀粉含量较高^[16],研究证实氮限制能明显提高其油脂含量^[6],被认为是生产生物柴油非常有潜力的原料。目前国内外对小球藻的研究主要集中于通过改善培养方法和生物反应器以提高油脂产量、以及微藻生物质的收获和后续加工^[17],而关于其油脂合成过程中碳流分配与光系统协同调控的研究却鲜有报道。本研究以一株产油的普通小球藻为对象,通过测定其在不同初始硝酸钠浓度下生物量的积累及油脂、碳水化合物和可溶性蛋白的含量,分析叶绿素荧光参数及固碳酶 Rubisco 活性的时相变化规律,旨在揭示不同浓度氮素限制下微藻碳流分配及光合特性的协同变化,为进一步利用微藻开

发生物燃料提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) 由暨南大学水生生物研究中心微藻生物技术与生物能源实验室保藏。

将保藏的藻种活化培养至指数期, 分别接入 4 种不同初始硝酸钠浓度 (18.0、9.0、4.5、3.6 mmol/L) 的改良 BG-11 培养基中, 接种密度为 $OD_{750} = 0.6 \pm 0.01$, 采用 $\Phi 3.0 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 的柱状光生物反应器培养, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度约为 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 通气 (含 1% CO_2 的压缩空气) 搅拌, 每组设置 3 个平行, 培养周期为 18 d。

1.2 实验方法

1.2.1 生物量测定

每天取 5 mL 藻液, 用预烘干至恒重的 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜抽滤, 再置于 105°C 烘箱烘至恒重后称重, 计算单位体积藻液的干重 (DW)。

1.2.2 总脂含量测定及产率的计算

总脂测定采用 Khozin-Goldberg 等的方法^[18] 并加以改良。取 80 ~ 100 mg 冻干藻粉并加入 2 mL 二甲基亚砜-甲醇 ($V:V = 1:9$) 溶液, 于 50°C 水浴、冰浴各抽提 1.5 h 后, 离心收集上清液放入干燥洁净的玻璃小瓶中; 取藻渣加入乙醚-正己烷 ($V:V = 1:1$) 溶液 4 mL, 再次冰浴抽提 1.5 h, 离心收集上清液至上述玻璃小瓶中, 重复上述步骤直至藻渣变白。于合并的上清液中加入蒸馏水 4 mL 静置分相, 移取有机相至另一小玻璃瓶, 在通风橱中用氮气吹扫浓缩, 再用乙醚洗涤并转移至预先称重的 2 mL 塑料离心管 (管重记为 M_1) 中, 再用氮气吹干至恒重 (记为 M_2), 即得总脂含量 (冻干藻粉的百分比) = $[(M_2 - M_1) / \text{冻干藻粉的重量}] \times 100\%$ 。

单位体积总脂产率 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) = 生物量 (g/L) \times 总脂含量 (%) / 培养天数 (d)。

1.2.3 碳水化合物含量测定

参照 Dubios 等^[19] 的苯酚-硫酸法, 取 10 mg 干燥的脱脂藻渣, 加入 5 mL $0.5 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$, 于 100°C 恒温水浴 4 h。离心, 将上清液移至 50 mL 容量瓶中, 用去离子水洗涤沉淀并离心转移上清液至容量瓶 (重复 2 次), 定容至 50 mL。吸取 $500 \mu\text{L}$

提取液, 补水至 2 mL, 迅速加入 1 mL 6% 苯酚及 5 mL 浓 H_2SO_4 摇匀, 冷却后于 490 nm 下测定吸光值。以葡萄糖为标准品制作标准曲线, 利用标准方程计算总碳水化合物含量。

1.2.4 可溶性蛋白含量测定

用 0.5 mol/L NaOH 于 80°C 反复抽提脱脂藻渣, 直至抽提完全。提取液中可溶性蛋白含量采用 Lowry 法蛋白含量测定试剂盒 (上海荔达生物科技有限公司) 进行测定。

1.2.5 叶绿素荧光参数和低温荧光光谱测定

参考梁英等^[20] 的测定方法并对其进行改进, 测定仪器为 XE-PAM 脉冲调制式叶绿素荧光仪 (Walz, 德国)。将样品调为同一吸光度 ($OD_{750} = 0.5$) 并暗适应 30 min, 加入四面透光比色皿置于荧光仪中, 打开测量光 (光合有效辐射约为 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 对初始荧光 F_0 进行测量。然后打开光化光 (光合有效辐射为 $368 \mu\text{mol} \cdot \text{photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 照射 5 min, 再打开饱和脉冲光激发, 测定藻细胞不同生长时期光系统 II (PS II) 的 Yield、ETR、 F_v/F_m 等光合参数。

采用日立 F-4500 型荧光分光光度计测定藻细胞在 77 K 的荧光发射光谱, 激发波长为 436 nm, 扫描范围为 640 ~ 750 nm, 扫描速度为 240 nm/min, 狭缝宽度为 2 nm。

1.2.6 Rubisco 活性的测定

用于 Rubisco 活性测定的普通小球藻的初始硝酸钠浓度分别为 18.0、9.0、6.0、3.6 mmol/L。Rubisco 的提取与活性测定根据 Gerard 等^[21] 的方法并稍加改进。

Rubisco 粗提取液的制备: 取液氮研磨 -80°C 保存的藻细胞, 每 100 mg 藻细胞中分别加入 1 mL 初始酶活性提取液与总酶活性提取液, 于 4°C 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为酶粗提取液。

Rubisco 活性的测定: 使用紫外分光光度计在室温条件或 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 测定 340 nm 处的吸光值变化。分别取初始酶活性和总酶活性提取液 0.1 mL 加入反应液中, 前者室温孵育 1 min, 后者 25°C 孵育 10 min, 然后移至比色皿并加入 0.1 mL 9.0 mmol/L 1,5-二磷酸核酮糖 (RuBP), 整个反应体系为 3 mL, 开始测定并计时, 紫外分光光度计每 4 s 读数 1 次, 记录 7 min。同时测定酶粗提取液可溶性蛋白含量。

酶活力 = $(\Delta OD_1 - \Delta OD_2) \times \text{反应总体积} / (6.22 \times 2 \times d \times \Delta t \times \text{蛋白含量} \times \text{酶液体积})$ 。

其中， ΔOD_1 是在7 min内所选取时间段的吸光值变化量， ΔOD_2 是不加RuBP的吸光值变化量，6.22是NADH的消光系数，2表示Rubisco每固定1分子的CO₂就有2分子的NADH被氧化，d是比色皿的光程（cm）， Δt 是所选取的时间。

1.2.7 数据处理

采用Origin 8.6软件对数据进行处理分析，并用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析及相关性分析， $P < 0.05$ 表示差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 不同氮浓度下普通小球藻的生长

不同初始氮浓度下普通小球藻在18 d培养周期内的生长曲线显示(图1)，在4个氮浓度下小球藻生物量的变化趋势均为0~6 d快速上升，第6~9 d平稳上升，到第16 d生物量达到最大值。其中，4.5 mmol/L组获得的生物量最高，达到3.8 g/L；3.6 mmol/L组由于氮素很快被消耗殆尽，藻细胞生长受到一定限制，生物量最低，为3.04 g/L。统计数据显示，18.0、9.0、3.6 mmol/L 3个组之间在培养后期生物量差异不显著，4.5 mmol/L组与18.0、9.0 mmol/L组的生物量差异也不显著，说明本研究设置的氮素限制浓度总体偏高，所有实验组均未达到生长限制阈值，从而未观察到不同氮限制组间生物量的显著差异。

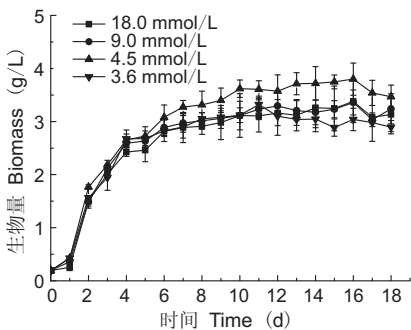


图1 不同氮浓度下普通小球藻生物量的时相变化
Fig. 1 Changes in biomass of *Chlorella vulgaris* at different nitrogen concentrations during cultivation

2.2 不同氮浓度下普通小球藻的生化组分及单位体积总脂产率

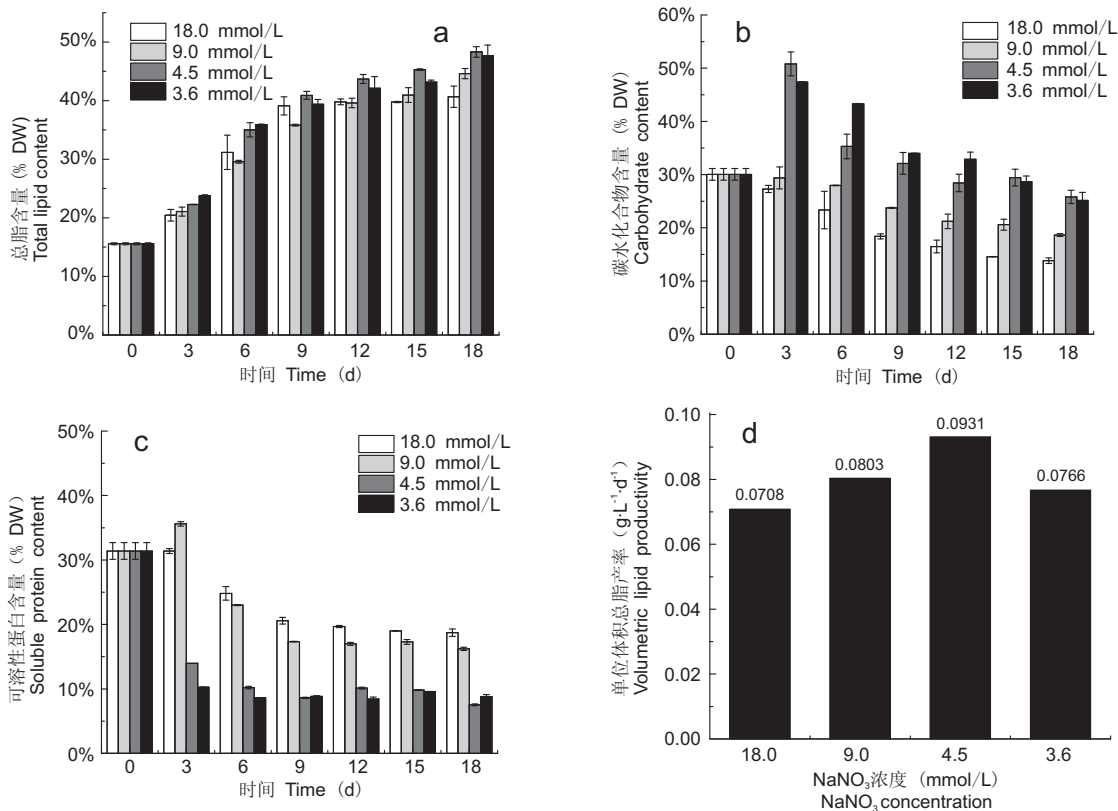
不同初始氮浓度的普通小球藻在18 d内的脂质、碳水化合物及可溶性蛋白含量的变化及单位体

积总脂产率的实验结果显示(图2)，在培养早期，细胞内总脂含量较低，为15.57% DW，而碳水化合物和可溶性蛋白含量分别为30.04% DW和31.40% DW。在整个培养周期内，不同初始氮浓度下藻细胞这3大物质总量稳定在75%~80% DW左右，且均表现为油脂含量增加，碳水化合物和可溶性蛋白含量减少。

从图2：a可看出，4个氮浓度下普通小球藻在培养周期内油脂持续累积，其总脂含量在0~9 d内迅速增加，9~18 d时增加缓慢，至培养结束时各氮浓度组的总脂含量分别达到40.67% DW（18.0 mmol/L）、44.63% DW（9.0 mmol/L）、48.32% DW（4.5 mmol/L）和47.67% DW（3.6 mmol/L）。普通小球藻油脂含量与氮素浓度呈负相关（ $r = -0.935$ ），4.5 mmol/L和3.6 mmol/L 2个低氮组与18.0 mmol/L全氮组之间存在显著差异（ $P < 0.05$ ）。图2：d显示，4.5 mmol/L组获得最高单位体积总脂产率，且显著高于其他各组（ $P < 0.05$ ），说明适宜的氮素限制有利于普通小球藻积累油脂。由图2：b和图2：c可见，4个不同氮浓度组碳水化合物及可溶性蛋白含量的变化情况有2种模式：18.0 mmol/L和9.0 mmol/L组在整个培养周期内碳水化合物含量持续下降，可溶性蛋白含量在培养0~3 d略微增加后也下降；而4.5 mmol/L和3.6 mmol/L组在培养0~3 d可溶性蛋白含量急剧下降了17.43%和21.14% DW，碳水化合物则迅速累积了20.77%和17.33% DW，然后两者均呈下降趋势。由此可见，4个氮浓度组碳水化合物及可溶性蛋白均有所降解以合成油脂，2个低氮组（4.5 mmol/L和3.6 mmol/L）在培养初期细胞内可溶性蛋白含量显著下降，碳水化合物积累迅速，说明普通小球藻在低氮胁迫下优先合成碳水化合物，之后随着培养时间的延长碳水化合物转化为油脂。

2.3 不同氮浓度下普通小球藻的叶绿素荧光参数

叶绿素荧光参数可用于描述藻细胞的光合作用机理和光合生理状况，普通小球藻在积累油脂过程中叶绿素荧光参数均发生了变化(图3)。从图3：a可见，4个氮浓度下普通小球藻最大光能转化效率 F_v/F_m 在培养的0~1(2) d迅速上升，然后均呈下降趋势，直至培养结束时 F_v/F_m 值下降到0.1左右。在培养的第2~11 d，不同氮浓度组



a: 总脂含量; b: 碳水化合物含量; c: 可溶性蛋白质含量; d: 单位体积总脂产率。
a: Total lipids; b: Content of carbohydrates; c: Content of soluble proteins; d: Volumetric lipid productivity.

图 2 不同氮浓度下普通小球藻主要生化组分的时相变化及总脂产率
Fig. 2 Changes in biochemical components of *C. vulgaris* during cultivation and lipid productivity under different nitrogen concentrations

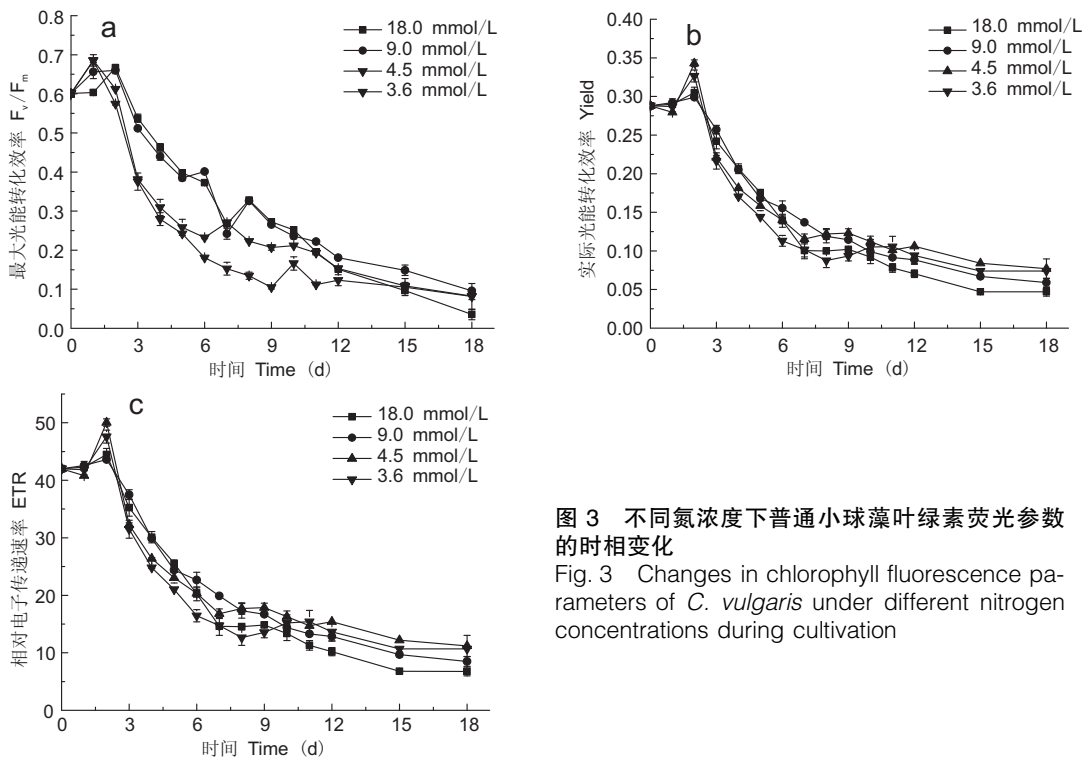


图 3 不同氮浓度下普通小球藻叶绿素荧光参数的时相变化
Fig. 3 Changes in chlorophyll fluorescence parameters of *C. vulgaris* under different nitrogen concentrations during cultivation

之间 F_v/F_m 值差异显著 ($P < 0.05$), 18.0 mmol/L 及 9.0 mmol/L 组的 F_v/F_m 值大于 4.5 mmol/L 和 3.6 mmol/L 组, 可见, 初始硝酸钠浓度对最大光能转化效率影响较大。Yield 作为 PS II 光化学反应中心实际光能转化效率的表征参数, 代表其实际量子产量, 从图 3: b 可见, 4 个氮浓度下普通小球藻 Yield 的变化均呈先上升后下降、最后逐渐稳定的趋势。其中, 培养 0 ~ 2 d 迅速上升, 第 2 ~ 12 d 明显下降, 第 12 d 后趋于稳定; 在培养的 0 ~ 9 d, 4.5 mmol/L 及 3.6 mmol/L 组的 Yield 值较小, 从第 9 d 后, 这 2 组的 Yield 值均大于 18.0 mmol/L 和 9.0 mmol/L 组。电子传递速率 ETR 的变化趋势与 Yield 基本一致(图 3: c), 呈前期先上升、然后迅速下降、后期趋于平缓的趋势。4 个氮浓度下叶绿素荧光参数的时相变化表明, 随着培养时间的延长藻细胞 PS II 活性逐渐降低, 其原因可能是氮素不断消耗导致 PS II 反应中心受损。

2.4 不同氮浓度下普通小球藻 77 K 低温荧光发射峰的变化

从 4 个氮浓度下普通小球藻 77 K 低温荧光发射峰 F683 与 F718 的比值变化可见(图 4), 普通小球藻的 77 K 低温荧光发射光谱出现了 3 个明显的发射峰, 分别位于 683 nm、718 nm 和 693 nm 处, 其中 F718 来自 PS I、F683 来自 PS II 核心天线, F683、F718 和它们的比值 F683/F718 是光合机构状态转换的指征。由图 4 可见, 4 个氮浓度下藻细胞第 0 d 的 F683/F718 为 1.29, 18.0、9.0、4.5 mmol/L 组 F683/F718 的值均在培养 0 ~ 3 d 降低, 随后 18.0 mmol/L 和 9.0 mmol/L 两组持续升高至培养结束, 4.5 mmol/L 组则在升高至第 12 d

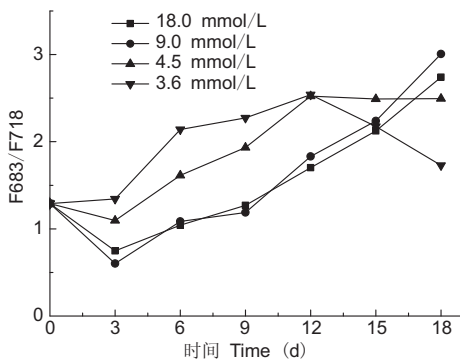


图 4 不同氮浓度下普通小球藻 77 K 低温荧光发射峰 F683 与 F718 的比值

Fig. 4 Ratio of F683 and F718 at 77 K in *C. vulgaris* under different nitrogen concentrations

后保持平稳, 而 3.6 mmol/L 组的 F683/F718 值在 0 ~ 12 d 呈上升趋势, 12 d 后开始下降。F683/F718 值的降低与 PS II 主要外周天线 LHC II 与 PS II 核心复合物解离转而与 PS I 反应中心复合体结合有关^[22]。说明 18.0、9.0、4.5 mmol/L 3 个组藻细胞在培养初期, 2 个光系统之间存在光能调配和状态转化。而氮素最低的 3.6 mmol/L 组的 F683/F718 值在 12 d 后开始下降, 可能与此时光系统已经完全损坏、吸收及转化光能的功能已丧失有关。

2.5 不同氮浓度下普通小球藻的 Rubisco 活性

培养周期 18 d 内, 普通小球藻在不同初始氮浓度下 Rubisco 初始活性和总活性均发生了动态变化(图 5)。初始酶活性代表着体内活化的 Rubisco, 由图 5: a 可以看出, 初始氮浓度为 18.0 mmol/L 和 9.0 mmol/L 组初始活性呈先上升后下降的趋势, 在培养的第 3 d 分别达到最高值, 为 $0.0132 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $0.00734 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$, 随后逐渐降低, 分别在培养 12 d 和 9 d 后趋于稳定, 至第 18 d 降至最低值。初始氮浓度为 6.0 mmol/L 和 3.6 mmol/L 组初始活性则一直呈逐渐下降趋势, 第 0 ~ 9 d 下降较快, 9 d 后趋于同一水平。图 5: b 显示普通小球藻 Rubisco 总活性变化趋势与初始活性变化趋势相似, 由此可知 18.0 mmol/L 和 9.0 mmol/L 实验组 Rubisco 初始活性与总活性都在第 3 d 达到最高, 随后开始下降, 而低氮浓度实验组 (6.0 mmol/L 和 3.6 mmol/L) Rubisco 初始活性与总活性一直呈下降趋势, 直到培养后期才趋于稳定。

Rubisco 初始活性与总活性的比值代表其在藻细胞内的活化程度。从普通小球藻整个培养周期内 Rubisco 初始活性与总活性比值的变化情况来看(图 6), 初始氮浓度为 18.0、9.0、6.0 mmol/L 组的 Rubisco 在培养前期活化程度都较高, 之后呈下降趋势, 在培养后期又有所上升, 而最低氮素 3.6 mmol/L 组的 Rubisco 活化程度在第 0 ~ 3 d 小幅下降, 进入培养中期时较高, 保持在 90% 以上, 但在 12 d 后又开始下降。说明初始氮素浓度对藻细胞内 Rubisco 活化程度有很大影响。

3 讨论

光照、温度、营养元素和盐度等环境因子不仅

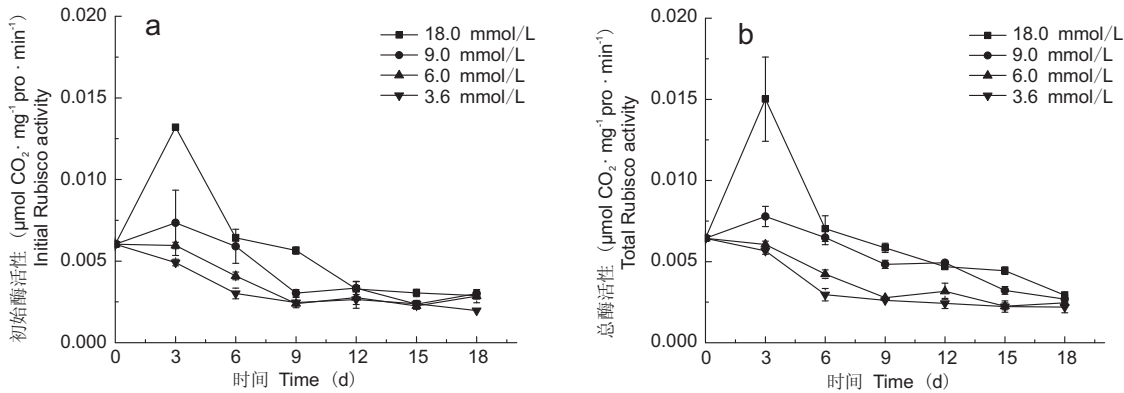


图 5 不同氮浓度下普通小球藻 Rubisco 活性的时相变化
Fig. 5 Changes in Rubisco activity of *C. vulgaris* under different nitrogen concentrations during cultivation

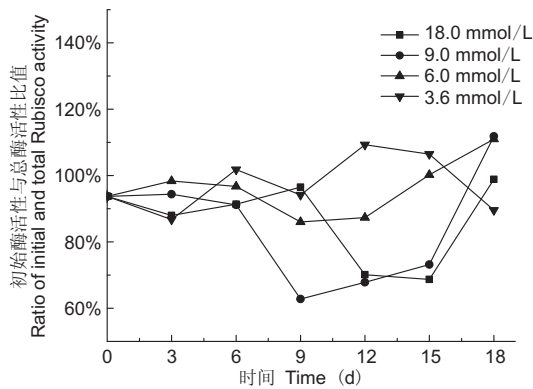


图 6 不同氮浓度下普通小球藻的 Rubisco 初始活性与总活性的比值
Fig. 6 Ratio of initial and total Rubisco activity of *C. vulgaris* under different nitrogen concentrations

影响藻细胞的生长和光合作用，还会影响藻细胞的合成代谢进而影响其细胞组分^[23]。本研究中设置的不同氮素浓度虽然对普通小球藻的生物量无显著影响，但低氮限制明显促进了其油脂积累，这与 Illman 等^[6]报道的氮限制对普通小球藻 (*C. vulgaris*) 的影响结果一致。蛋白质、核酸、油脂及多糖组成了细胞的物质基础，氮素是蛋白质及核酸的重要组成成分^[24]，在氮充足的情况下，藻细胞中碳流的主要方向是合成蛋白质，但当氮限制时，细胞会减少蛋白质及核酸的合成，或者不合成非必需的蛋白质，此时，碳流的主要流向由合成蛋白质转为合成油脂或多糖^[23]，本实验结果显示碳流流向油脂。在普通小球藻积累油脂的过程中，18.0 mmol/L 及 9.0 mmol/L 组在 0 ~ 3 d Rubisco 活性一直增加， F_v/F_m 在此阶段也有一个迅速上升的过程，说明此阶段藻类的生长代谢比较旺盛，光合效率较高，导致蛋白及油脂含量有所增加。在第 3 ~ 6 d Rubisco 活性及 F_v/F_m

F_m 急剧下降，蛋白质含量也大幅下降，说明此时培养基中氮素已被大量消耗，细胞开始消耗自身储存的氮源用以合成能量更高的油脂^[25,26]。而 4.5 mmol/L 及 3.6 mmol/L 组在 0 ~ 3 d 就出现蛋白质大量降解，碳水化合物及油脂大量增加的现象，可能是因为这 2 个实验组初始氮素含量较低，故在 0 ~ 3 d 就进入了氮限制状态，使细胞分裂基本停止导致光能过剩^[27]， F_v/F_m 短暂升高且在第 2 ~ 3 d 降幅最大也说明了这一点。此时，Rubisco 活性还保持较高，细胞通过降解储存的蛋白质和利用过剩的光能合成储藏性物质^[17]，尤其是碳水化合物，随着氮限制的持续这些碳水化合物最终转化为油脂。这与 Li 等^[28]报道的拟绿球藻 (*Pseudochlorococcum* sp.) 在氮限制时积累的中性脂是经由培养初期大量合成的淀粉转化而来的结果一致，其原因可能是脂质能量储存密度较碳水化合物高，更适宜作为能量储存物质应对营养胁迫^[29]。

另外，4.5 mmol/L 及 3.6 mmol/L 组的油脂积累量较高氮组多也可从以下 2 个方面解释：一方面低氮组较早进入氮限制导致其细胞数量较少，因此细胞间的相互遮挡较轻微，接收到的光能较平均，每个细胞能获得较高的光子通量密度，故而合成油脂的速率较高^[27]；另一方面，3.6 mmol/L 组在 0 ~ 15 d Rubisco 活化程度较高，导致油脂含量不断增加，这可能与 3.6 mmol/L 组 Yield 及 ETR 在第 9 d 后有所上升有关。Rubisco 作用于光反应之后的固碳反应，其活性受到 ATP 含量的影响^[30,31]，电子传递速率增强时，ATP 产量升高，导致 Rubisco 初始活性上升，活化程度较高。而 18.0 mmol/L 及

9.0 mmol/L 组则分别在第 9 ~ 15 d 和第 6 ~ 15 d 活化程度较低,说明此时氮限制迫使细胞将一部分 Rubisco 去活化,做为储存性蛋白^[32]。

如上所述,细胞为应对氮限制会降解一些非必需的蛋白质来提供一个暂时的氮库以维持细胞生存,这些被降解的蛋白质包括类囊体蛋白。有研究表明^[33,34],伴随着类囊体蛋白的减少、叶绿素 *a* 降解,类囊体膜脂将转化为中性脂,这些必然导致由色素、脂类及蛋白质组成的超分子蛋白复合体光系统的损伤。 F_v/F_m 反映 PS II 最大光能转化效率,是 PS II 完整性的重要指征,在胁迫条件下 F_v/F_m 会显著下降^[35]。普通小球藻在培养的 1 ~ 12 d, 4.5 mmol/L 及 3.6 mmol/L 组的 F_v/F_m 值均低于 18.0 mmol/L 及 9.0 mmol/L 组,可能是由于低氮组较早进入氮限制导致捕光色素较少,进而影响微藻的捕光能力,使光能转化效率较低^[27]。Simionato 等^[34] 报道拟微球藻 (*Nannochloropsis gaditana* L. M. Lubián) 在转入缺氮培养条件后 F_v/F_m 值由 0.60 下降到 0.49。但本研究中 4 个氮浓度组的 F_v/F_m 值至培养结束时下降到 0.1 左右,与初始值相比下降了 83%,而尖状栅藻^[13] 至培养结束时其 F_v/F_m 值仍高于 0.65,这可能与微藻不同属种之间 PS II 活性存在差异有关。低水平的 PS II 最大光能转化效率是如何提供足够的能量及还原力以保证油脂积累,是否存在可变电子传递链等代偿途径,与 F683/F718 比值变化暗示的 2 个光系统之间存在光能调配和状态转化是否相关,这些光合生理的内在调控机制还有待进一步研究。

氮限制条件下油脂合成代谢与光合作用活性密切相关,本研究结合光能转化效率和固碳酶活性的变化与微藻在氮限制时的碳流分配进行了深入研究。同时引发了对于 PS II 活性及光合固碳能力下降导致光合作用受限制、油脂累积及其他代谢活动所需的能量和还原力从何而来的深思,关于这一问题的研究对深入认识产油微藻油脂积累过程中的物质代谢及光合代谢的协同响应机制具有重要的理论意义和实际参考价值。

参考文献:

[1] Hankamer B, Lehr F, Rupprecht J. Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up [J]. *Physiol Plantarum*, 2007, 131(1): 10–21.

[2] Demirbas A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems [J]. *Appl Energy*, 2011, 88(10): 3541–3547.

[3] Tüccar G, Özgür T, Aydın K. Effect of diesel-microalgae biodiesel-butanul blends on performance and emissions of diesel engine [J]. *Fuel*, 2014, 132: 47–52.

[4] 张虎, 温小斌, 王中杰, 李夜光, 耿亚洪. 一株富含碳水化合物微藻的筛选和分子鉴定 [J]. *植物科学学报*, 2014, 32(6): 645–654.

Zhang H, Wen XB, Wang ZJ, Li YG, Geng YH. Selection of a carbohydrate-rich microalgae and its molecular identification [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(6): 645–654.

[5] Hsieh CH, Wu WT. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation [J]. *Biore-sour Technol*, 2009, 100(17): 2921–2926.

[6] Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2000, 27(8): 631–645.

[7] Khotimchenko SV, Yakovleva IM. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(1): 73–79.

[8] Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures [J]. *Aquaculture*, 2002, 211(1–4): 195–214.

[9] Takagi M, Karseno, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(3): 223–226.

[10] Berges JA, Falkowski PG. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation [J]. *Limnol Oceanogr*, 1998, 43(1): 129–135.

[11] Dean AP, David CS, Estrada B, Pittman JK. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae [J]. *Biore-sour Technol*, 2010, 101(12): 4499–4507.

[12] Liu WH, Huang ZW, Li P, Xia JF, Chen B. Formation of triacylglycerol in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under nitrogen limitation and possible physiological and biochemical mechanisms [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2012, 3418–419(3): 24–29.

[13] 汪亚俊, 孙明哲, 李爱芬, 张成武. 不同氮素水平对产油尖状栅藻生长及光合生理的影响 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(12): 51–58.

Wang YJ, Sun MZ, Li AF, Zhang CW. Effects of nitrogen concentration on the growth and photosynthetic physiology of *Scenedesmus acuminatus* [J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(12): 51–58.

- [14] Makino A. Rubisco and nitrogen relationships in rice: leaf photosynthesis and plant growth[J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 2003, 49(3): 319–327.
- [15] Jiang Y, Yoshida T, Quigg A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2012, 54: 70–77.
- [16] Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae[J]. *Appl Energy*, 2011, 88(10): 3331–3335.
- [17] Pavel Příbyl, Vladislav Cepák, Vilém Zachleder. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*[J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(2): 545–553.
- [18] Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*[J]. *BBA-Mol Cell Bio L*, 2005, 1738(1): 63–71.
- [19] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Fred S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350–356.
- [20] 梁英, 冯力霞, 田传远, 王帅. 高温胁迫对盐藻和塔胞藻叶绿素荧光动力学的影响[J]. *中国水产科学*, 2007(6): 961–968.
- Liang Y, Feng LX, Tian CY, Wang S. Effects of high temperature stress on chlorophyll fluorescence kinetics of *Dunaliella salina* and *Pyramimonas* sp. [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007(6): 961–968.
- [21] Gerard VA, Driscoll T. A spectrophotometric assay for Rubisco activity: Application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assays[J]. *J Phycol*, 1996, 32(5): 880–884.
- [22] Chen Y, Xu DQ. Two patterns of leaf photosynthetic response to irradiance transition from saturating to limiting one in some plant species[J]. *New Phytol*, 2006, 169(4): 789–798.
- [23] Hu Q. Handbook of Microalgal Culture. Environmental Effects on Cell Composition[M]. Richmond: Wiley-Blackwell, 2007: 83–94.
- [24] Scheible WL, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Urdavari MK, Stitt M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen[J]. *Plant Physiol*, 2004, 136(1): 2483–2499.
- [25] Jiang CZ, Ishihara K, Satoh K, Katoh S. Loss of the photosynthetic capacity and proteins in senescing leaves at top positions of two cultivars of rice in relation to the source capacities of the leaves for carbon and nitrogen[J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40(5): 496–503.
- [26] Ördög V, Stirk WA, Bálint P, Staden J, Lovász C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures[J]. *J Appl Phycol*, 2012, 24(4): 907–914.
- [27] Dillschneider R, Steinweg C, Rosello-Sastre R, Posten C. Biofuels from microalgae: photoconversion efficiency during lipid accumulation[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 142: 647–654.
- [28] Li YT, Han DX, Sommerfeld M, Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 123–129.
- [29] Siau M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphylides C, Li-Beisson YH. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves[J]. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 7.
- [30] 李卫芳, 王忠, 韩鹰, 顾蕴洁. 小麦 Rubisco 活化酶的纯化及其活性特性[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(8): 929–933.
- Li WF, Wang Z, Han Y, Gu YJ. Purification and activity characteristics of Rubisco activase from wheat leaves[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(8): 929–933.
- [31] 常阿丽, 毛晓芳, 韩榕. He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼叶叶绿素荧光和 Rubisco 活化酶的影响[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(9): 1823–1829.
- Chang AL, Mao XF, Han R. Effects of He-Ne laser and UV-B radiation on chlorophyll fluorescence and Rubisco activase of wheat leaves[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(9): 1823–1829.
- [32] Makino A, Nakano H, Mae T, Shimada T, Yamamoto N. Photosynthesis, plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased rubisco under CO₂ enrichment[J]. *J Exp Bot*, 2000, 51(1): 383–389.
- [33] Hortensteiner S, Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(370): 927–937.
- [34] Simionato D, Block MA, La Rocca N, Jouhet J, Marechal E, Finazzi G, Morosinotto T. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus[J]. *Eukaryot Cell*, 2013, 12(5): 665–676.
- [35] Geider RJ, Roche JL, Greene RM, Olaizola M. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation[J]. *J Phycol*, 1993, 29(6): 755–766.