

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.30420

陈爱玲, 高保燕, 黄罗冬, 王飞飞, 张成武. 营养盐初始组合浓度对类波氏真眼点藻生长和油脂积累的影响[J]. 植物科学学报, 2018, 36(3): 420-430

Chen AL, Gao BY, Huang LD, Wang FF, Zhang CW. Effects of initial combined concentrations of nutrients on the growth and lipid accumulation of *Eustigmatos cf. polyphem*[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(3): 420-430

## 营养盐初始组合浓度对类波氏真眼点藻生长和油脂积累的影响

陈爱玲, 高保燕, 黄罗冬, 王飞飞, 张成武\*

(暨南大学生态学系, 水生生物研究中心, 广州 510632)

**摘要:** 为了研究培养基中主要营养元素氮、磷、硫初始组合浓度对类波氏真眼点藻(*Eustigmatos cf. polyphem* D. J. Hibberd)生长、油脂积累和脂肪酸组成的影响, 分别以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  为氮、磷、硫源, 设置不同的营养盐初始组合浓度对其进行培养, 采用干重法、重量法、气相色谱分析法、元素分析仪等依次对生物量、总脂、脂肪酸组成和细胞内元素含量进行测定。结果显示, 氮、磷、硫三者的初始组合浓度变化对类波氏真眼点藻的生长和油脂积累具有明显的影响, 9 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 、0.92 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  营养条件下其生物量达到最大值, 为 9.19 g/L; 低氮、低磷胁迫或二者共同胁迫均促进其油脂积累, 但低硫胁迫对油脂的积累影响不大, 最大油脂含量出现在 3 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 、0.029 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  条件下, 为 68.7%(DW)。此外, 类波氏真眼点藻富含棕榈油酸, 占总脂肪酸含量的最大值达 60.88%。选择合理的氮、磷、硫初始组合浓度能够有效促进其生长或油脂及棕榈油酸的积累。

**关键词:** 类波氏真眼点藻; 氮; 磷; 硫; 总脂; 脂肪酸

中图分类号: Q949.25<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)03-0420-11

### Effects of initial combined concentrations of nutrients on the growth and lipid accumulation of *Eustigmatos cf. polyphem*

Chen Ai-Ling, Gao Bao-Yan, Huang Luo-Dong, Wang Fei-Fei, Zhang Cheng-Wu\*

(Research Centre for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** To determine the effects of different initial combined concentrations of N, P and S on the growth, lipid accumulation, and fatty acid compositions of *Eustigmatos cf. polyphem* D. J. Hibberd, we cultivated the algae in modified BG-11 medium containing different combined concentrations of nutrients (sodium nitrate, dipotassium phosphate, and magnesium sulfate used as nitrogen (N), phosphorus (P), and sulfur (S) sources, respectively). Biomass concentration, total lipid content, fatty acid composition, and primary intracellular nutrient element content were measured by dry weight, gravimetrics, gas chromatography, and elemental analyzer, respectively. Results showed that different initial combinations of N, P, and S significantly affected the growth, lipid accumulation, and fatty acid composition of *E. cf.*

收稿日期: 2017-12-11, 退修日期: 2018-01-04。

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2013AA065805); 国家自然科学基金(31170337); 广东省低碳专项(2011-051); 珠海市科技重大项目(PB20041018); 珠海市科技攻关项目(PC20081008)。

This work was supported by grants from the National High-Tech R &amp; D Program (863 Program) (2013AA065805), National Natural Science Foundation of China (31170337), Guangdong Low-Carbon Program (2011-051), Zhuhai Major Program of Science and Technology (PB20041018), and Key Project of Science and Technology of Zhuhai (PC20081008).

作者简介: 陈爱玲(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻生物技术(E-mail: 994861146@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence): 张成武(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微藻生物资源技术方面的研究(E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn)。

*polyphem*. The highest biomass concentration reached 9.19 g/L under 9 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ , 0.92 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ . Low N or P stress or combined low N and P stress promoted lipid accumulation, though there was no obvious influence on lipid accumulation under low S stress. The highest total lipid content reached 68.7% of dry weight under 3 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ , 0.029 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ . The *E. cf. polyphem* fatty acids were rich in palmitoleic acid, with relative amounts reaching 60.88% of total fatty acid. Thus, reasonable combined concentrations of N, P, and S effectively promoted growth and lipid and palmitoleic acid accumulation of *E. cf. polyphem*.

**Key words:** *Eustigmatos cf. polyphem*; Nitrogen; Phosphorus; Sulfur; Total lipid; Fatty acids

微藻在许多方面都具有开发利用价值, 如生物柴油、营养活性成分产品(蛋白质、碳水化合物、色素、多不饱和脂肪酸)、生物乙醇、食品添加剂、动物饲料、化工原料等。但是, 在这些领域中只有少部分产品具备成熟技术, 而优化培养基组成是其中一项重要的基础性研究。与基因工程相比, 营养供应途径的改变并不会产生基因重组, 因此更具有可行性<sup>[1]</sup>。微藻在生长过程中需要 30 多种营养元素, 其中, 氮(N)、磷(P)、硫(S)属于必须的大量营养元素, 分别占藻细胞干重的 1%~14%、0.05%~3.3%和 0.15%~1.6%<sup>[2]</sup>。培养基中 N、P、S 的浓度对藻细胞的生长和生化组分具有重要影响, 一般而言, N、P、S 缺乏会使藻细胞的分裂能力、光合作用能力以及呼吸作用能力下降, 但同时细胞内积累储能物质(如碳水化合物、油脂等)和次生代谢物(如次生类胡萝卜素)的能力会上升<sup>[3-6]</sup>。目前, 在微藻培养的一些基础性研究中, 多数考虑的是单因素 N、单因素 P 或者是 N:P 对其生理化的影响, 而在同一株微藻中对 N、P、S 三者的单一浓度和组合浓度进行综合研究还鲜有报道。

真眼点藻纲(Eustigmatophyceae, 因其游动孢子的叶绿体外有明显的眼点而得名)的藻类环境适应能力强, 生长速率高, 油脂含量高, 并且含有多种重要的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸(尤其是棕榈油酸(PA)和二十碳五烯酸(EPA)), 这使其在生产生物柴油和重要脂肪酸方面具有极大潜力<sup>[7]</sup>。目前发现的属于真眼点藻纲的藻类只有 30 多种, 分为 13 个属, 其中研究最多的是拟微绿球藻属(*Nannochloropsis*), 已被确定为生产油脂的模式藻类。对该纲其他属的研究虽没有拟微绿球藻属深入, 但也越来越受关注, 在真眼点藻属(*Eu-*

*stigmatos*)、魏氏藻属(*Vischeria*)和拟单胞藻属(*Monodopsis*)中发现多种富油微藻<sup>[8]</sup>。近期研究还发现, 粗盘藻属(*Trachydiscus*)中的小粗盘藻(*Trachydiscus minutus* (P. Bourrelly) H. Ettl)能够产生大量的不饱和脂肪酸<sup>[9]</sup>。关于真眼点藻纲的藻类, 仍需更多的研究来揭示其独具特色的生理生化规律。

类波氏真眼点藻(*Eustigmatos cf. polyphem* D. J. Hibberd)隶属于真眼点藻纲真眼点藻属, 本实验室在前期研究中发现, 该藻是一株高产油微藻, 其油脂含量占细胞干重 60%以上, 富含棕榈油酸, 占总脂肪酸含量的 55%以上, 并且含有一定量的二十碳五烯酸(EPA), 占细胞干重的 3%左右<sup>[10,11]</sup>。因此, 这是一株极具发展潜力的微藻。目前仅见 N 对类波氏真眼点藻影响的研究, 而 P 或 S 在其培养过程中所起的作用尚不清楚。因此, 本实验首次将 N、P、S 三者相结合, 研究其初始组合浓度对类波氏真眼点藻的生长、油脂积累和脂肪酸组成及含量变化以及细胞内主要元素含量变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

藻种: 类波氏真眼点藻(*Eustigmatos cf. polyphem*)藻株, 保存于暨南大学水生生物研究中心微藻生物能源与生物技术实验室。

仪器: LS-100HD 立式压力蒸汽灭菌锅、DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱、TU-1810 紫外可见分光光度计、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵、KY0461-F000 高速冷冻离心机、LT-5.0 W 台式离心机、ALPHA 2-4 LSC 冷冻干燥机、DF-101S 集热式磁力加热搅拌器、ANPEL DC-12 氮吹仪、

Agilent 6890N 气相色谱仪、CHNS/O 2400 元素分析仪等。

试剂：二甲基亚砷、甲醇、无水乙醚、正己烷(色谱纯)、硫酸等。

1.2 实验设计

以改良的 BG-11 为基础培养基，具体营养盐成分见文献[12]，分别以硝酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁为 N、P、S 源，设置不同营养盐初始组合浓度，各组设置见表 1(在 1/8S、1/4S 和 1/2S 实验组中加入一定量的与原镁离子浓度一样的  $MgCl_2$

表 1 各组实验设计

Table 1 Experimental design of each group

实验设计 Experimental design	N 浓度 (mmol/L) N concentration	P 浓度 (mmol/L) P concentration	S 浓度 (mmol/L) S concentration
1/6N	3	0.230	0.300
1/3N	6	0.230	0.300
1/2N	9	0.230	0.300
2/3N	12	0.230	0.300
5/6N	15	0.230	0.300
1N	18	0.230	0.300
1N-1/8P	18	0.029	0.300
1N-1/4P	18	0.058	0.300
1N-1/2P	18	0.115	0.300
1N-1P	18	0.230	0.300
1N-2P	18	0.460	0.300
1N-4P	18	0.920	0.300
1/2N-1/8P	9	0.029	0.300
1/2N-1/4P	9	0.058	0.300
1/2N-1/2P	9	0.115	0.300
1/2N-1P	9	0.230	0.300
1/2N-2P	9	0.460	0.300
1/2N-4P	9	0.920	0.300
1N-1/8S	18	0.230	0.038
1N-1/4S	18	0.230	0.075
1N-1/2S	18	0.230	0.150
1N-1S	18	0.230	0.300
1N-2S	18	0.230	0.600
1/2N-1/8S	9	0.230	0.038
1/2N-1/4S	9	0.230	0.075
1/2N-1/2S	9	0.230	0.150
1/2N-1S	9	0.230	0.300
1/2N-2S	9	0.230	0.600
1/6N-1P-1S	3	0.230	0.300
1N-1/8P-1S	18	0.038	0.300
1N-1P-1/8S	18	0.230	0.029
1/6N-1/8P-1S	3	0.038	0.300
1/6N-1P-1/8S	3	0.230	0.029
1N-1/8P-1/8S	18	0.038	0.029
1/6N-1/8P-1/8S	3	0.038	0.029

溶液，以保证充足的镁离子)。

培养条件：取处于对数生长期的藻细胞作为藻种进行培养，以相同浓度( $OD_{750} = 0.62$ )接种于直径 3 cm、容量 400 mL 的玻璃柱状光生物反应器中。持续通入含 1%  $CO_2$  的压缩空气，并在一侧用光强为  $300\ \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  的白炽灯持续光照，温度为  $(25 \pm 1)^\circ C$ ，培养周期为 15 d，每天测定其生物量，收集第 15 d 的藻粉。

1.3 实验方法

生物量测定：真空抽滤法。取一定体积藻液 ( $V$ )，用预先在  $105^\circ C$  烘箱中烘至恒重 ( $W_0$ ) 的孔径为  $0.45\ \mu m$  的混合纤维滤膜进行真空抽滤，再将过滤后带有藻细胞的滤膜放入  $105^\circ C$  烘箱烘至恒重 ( $W_1$ )，计算生物量。生物量 ( $g/L$ ) =  $(W_1 - W_0) / V$ 。

冷冻干燥藻粉制备：收集不同培养条件下的湿藻泥，放入  $-20^\circ C$  冰箱中冷冻至结冰，然后用冷冻干燥机进行冻干。冻干的藻粉保存于  $4^\circ C$  冰箱，备用。

总脂测定和脂肪酸分析：分别采用 Khozin-Goldberg<sup>[13]</sup> 和 Bigogno<sup>[14]</sup> 的方法，再稍作改进，具体步骤参考文献[12]。

细胞内主要营养元素分析：将冷冻干燥藻粉送往暨南大学分析测试中心，采用元素分析仪 (CHNS/O 2400) 对藻细胞内的 C、N、S 进行测定。测定藻细胞内 P 含量时，先将其转化为正磷酸盐，然后采用钼锑比色法进行测定，具体方法参考文献[15]。

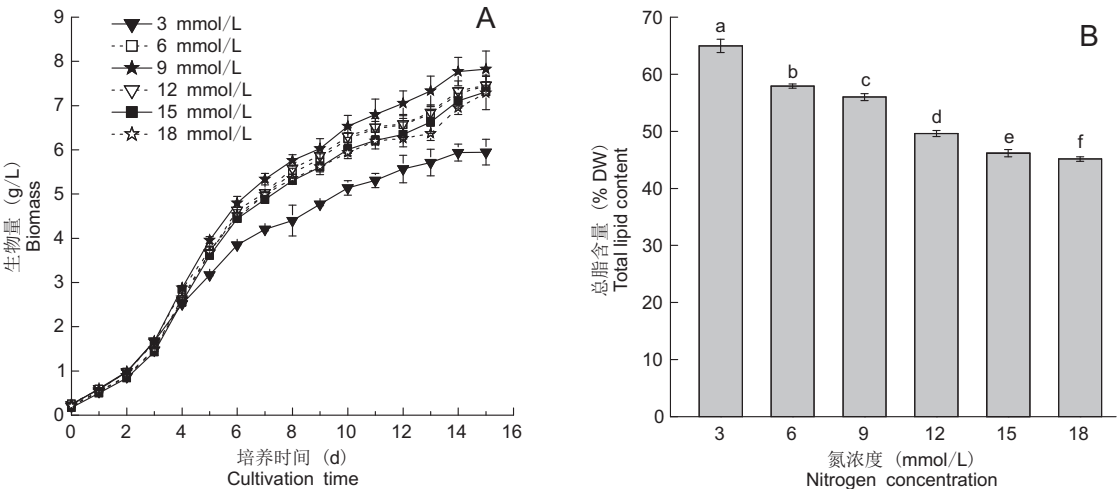
数据统计分析：使用 Origin 软件和 SPSS 软件对实验数据进行分析并作图。

2 结果与分析

2.1 初始 N、P、S 组合浓度对类波氏真眼点藻生长、油脂积累的影响

2.1.1 当初始 P、S 浓度充足时，不同初始 N 浓度对类波氏真眼点藻生长、油脂积累的影响

从整个培养周期可看出，从第 3 d 到第 6 d，藻细胞处于对数生长期，之后进入缓慢增长期，到第 15 d 培养周期结束时，生物量最高值出现在 9 mmol/L N 浓度条件下，为 7.83 g/L (图 1: A)，此时油脂含量为 56.01% (图 1: B)，相应的油脂产率为  $0.28\ g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$  (图 5: A)。当 N 浓度小于 9 mmol/L 时，生物量随着 N 浓度的升高而



a、b、c、d、e、f 为差异显著性标志，相同字母表示差异不显著。下同。  
a, b, c, d, e, and f are symbols of significant differences. There is no significant difference between the same letters. Same below.

图1 不同初始 N 浓度对类波氏真眼点藻生长 (A) 和油脂积累 (B) 的影响  
Fig. 1 Effects of different initial nitrogen concentrations on the growth (A) and total lipids (B) of *Eustigmatos* cf. *polyphem*

升高，当 N 浓度大于 9 mmol/L 时，生物量则随着 N 浓度的升高而降低。从不同 N 浓度下类波氏真眼点藻油脂积累情况来看(图 1: B)，随 N 浓度的升高其油脂含量降低，当 N 浓度为 3 mmol/L 时，油脂含量最高(为 64.97%)，但此时生物量为 5.95 g/L，相应的油脂产率为 0.25 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。本组实验中油脂产率的最大值出现在 9 mmol/L 的 N 浓度下。

2.1.2 当初始 N、S 浓度充足时，不同初始 P 浓度对类波氏真眼点藻生长、油脂积累的影响

在 1N 和 1/2N 条件下，藻细胞生物量均随着初始 P 浓度的降低而下降(图 2: A)，而油脂含量则随着 P 浓度的降低而升高(图 2: B)。若将 P 浓度均降至 1/8P(0.029 mmol/L)，其生物量显著下降( $P < 0.01$ )，分别从 7.65 g/L(1N)、8.69 g/L(1/2N)降为 4.65 g/L、5.06 g/L，但此时油脂含量显著升高( $P < 0.01$ )，分别从 42.84%(1N)、54.38%(1/2N)上升到 60.23%、62.41%。若将 P 浓度提高至 2P(0.460 mmol/L)、4P(0.920 mmol/L)，在其他条件相同下两者的生物量差异较小，分别为 8.39 g/L(1N-2P)、8.28 g/L(1N-4P)和 8.87 g/L(1/2N-2P)、9.19 g/L(1/2N-4P)，相比同等条件下 1P 的生物量有所增加，但增加幅度不大；在 1/2N 和 1N 条件下，1P 与 2P 之间的油脂含量无显著差异( $P > 0.05$ )。本组实验中，1/2-

1P、1/2N-2P 和 1/2N-3P 三者的油脂产率最大，均为 0.31 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(图 5: B)。

2.1.3 当初始 N、P 浓度充足时，不同初始 S 浓度对类波氏真眼点藻生长、油脂积累的影响

在 1N 和 1/2N 条件下，藻细胞生物量均随着 S 浓度的降低而下降(图 3: A)，但油脂含量受 S 浓度的影响不大(图 3: B)。将 S 浓度降为 1/8S(0.038 mmol/L)，其生物量分别只为 3.12 g/L(1N)和 4.26 g/L(1/2N)；此时油脂含量分别为 46.0%(1N)和 58.61%(1/2N)。1S(0.300 mmol/L)时油脂含量为 47.92%(1N)和 58.10%(1/2N)，同等条件下，1/8S 的油脂含量与 1S 的油脂含量之间差异不大(1/2N 下， $P > 0.05$ )。若将 S 浓度升至 2S(0.066 mmol/L)，不管在 1N 还是 1/2N 时，其生物量和油脂含量均与 1S 无显著差异( $P > 0.05$ )。本组实验中，1/2N-1S 和 1/2N-2S 条件下的油脂产率最大，均为 0.32 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(图 5: C)。

2.1.4 不同单一营养盐胁迫或营养盐交叉胁迫对类波氏真眼点藻生长、油脂积累的影响

在单一低 N 胁迫下(1/6N-1P-1S)，藻细胞生物量最高(图 4: A)，为 5.95 g/L；在单一低 S 胁迫下(1N-1P-1/8S)，生物量最低，为 4.10 g/L；其他条件下的生物量处于上述两者之间。图 4: B 中的油脂含量可分为 3 个层次：(1)单一低 N 胁迫(1/6N-1P-1S)、N-P 共同胁迫(1/6N-1/8P-1S)、

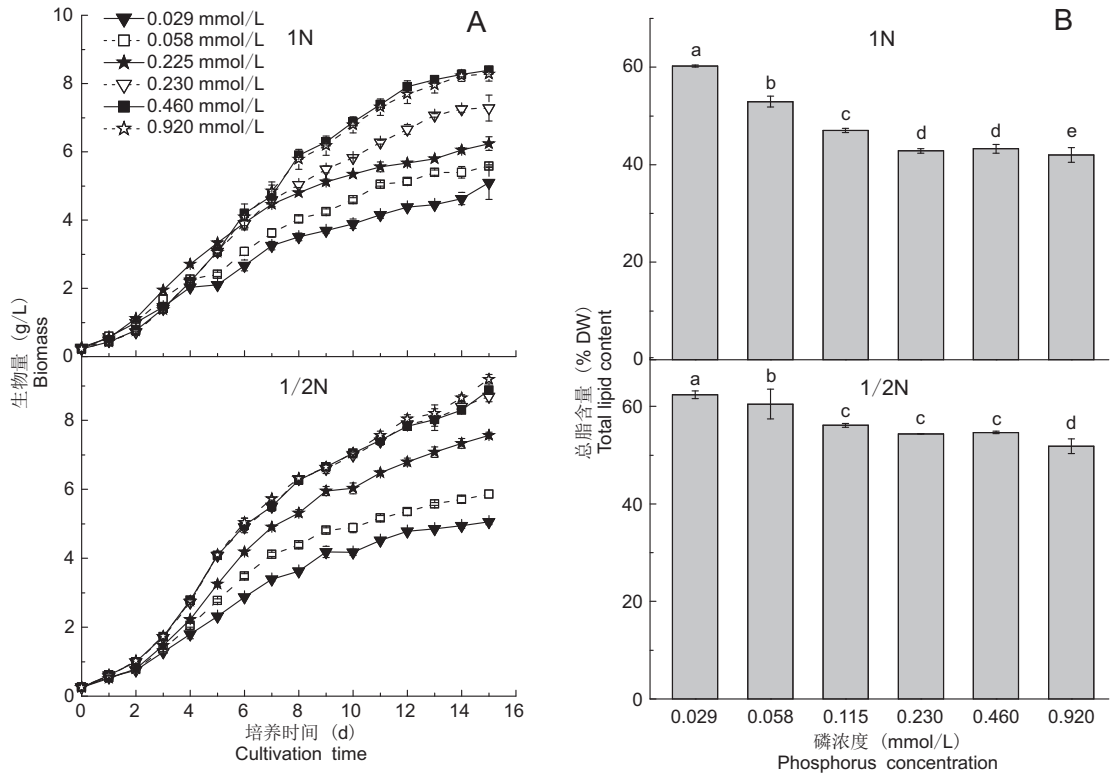


图 2 不同初始 P 浓度对类波氏真眼点藻生长 (A) 和油脂积累 (B) 的影响  
Fig. 2 Effects of different initial phosphorus concentrations on the growth (A) and total lipids (B) of *E. cf. polyphem*

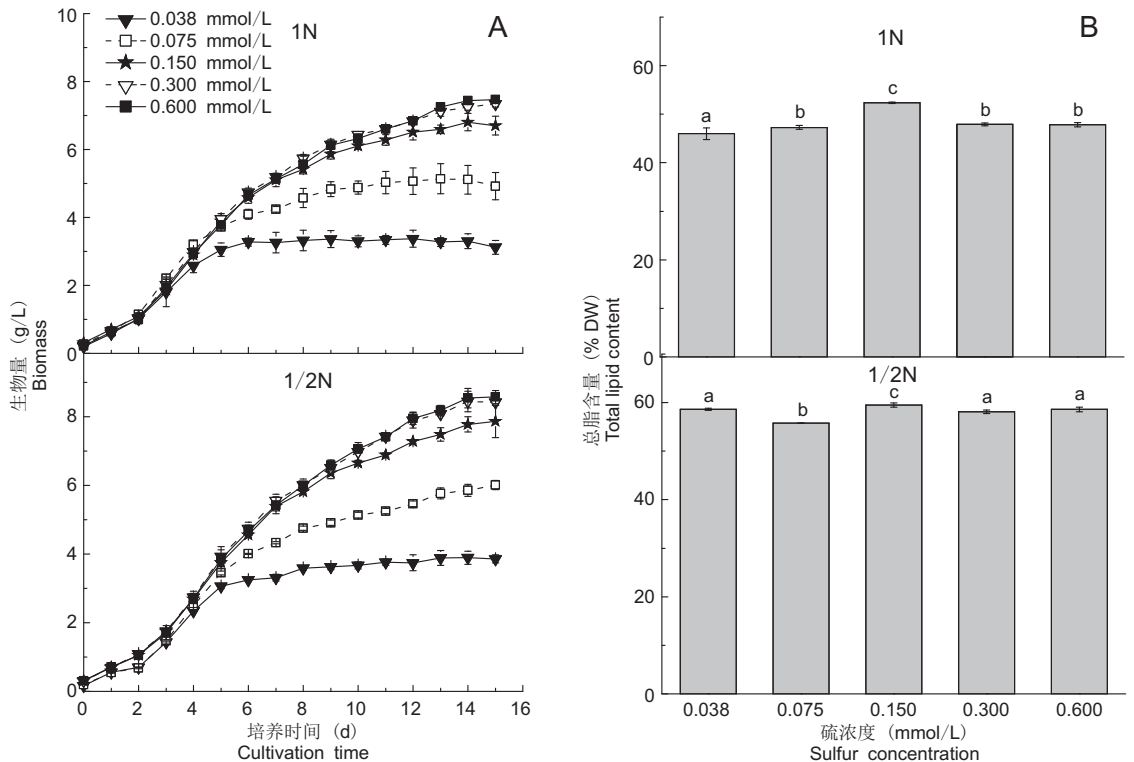


图 3 不同初始 S 浓度对类波氏真眼点藻生长 (A) 和油脂积累 (B) 的影响  
Fig. 3 Effects of different initial sulfur concentrations on the growth (A) and total lipids (B) of *E. cf. polyphem*



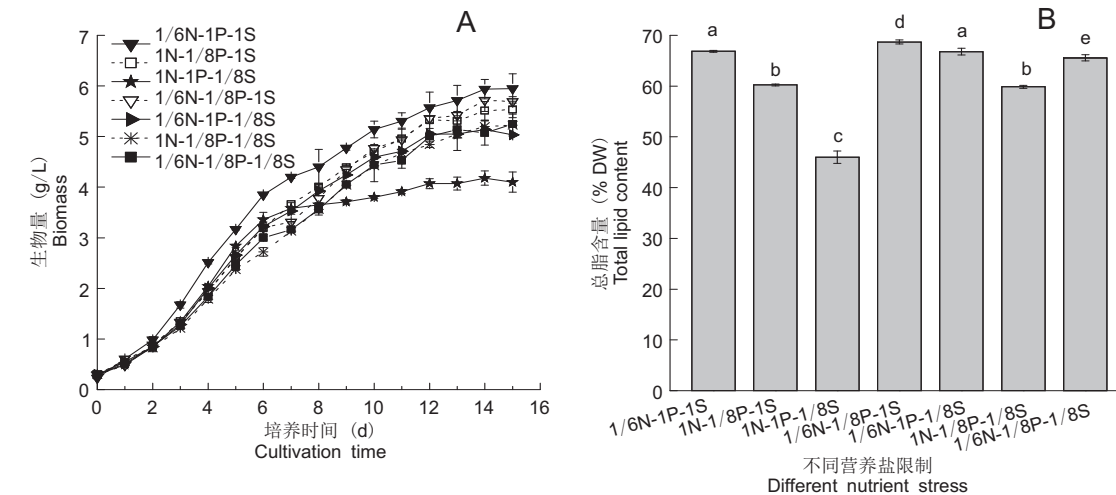
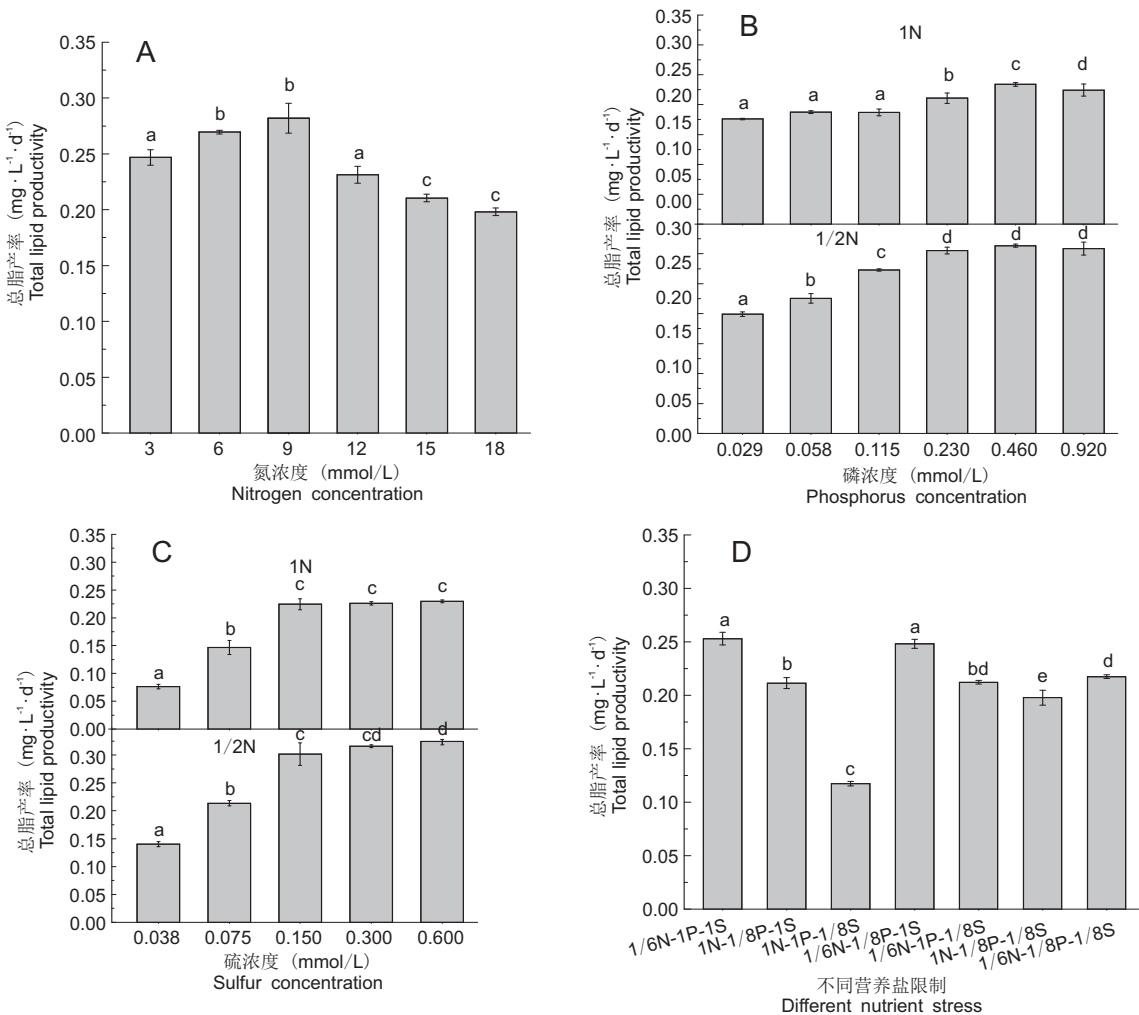


图4 不同营养盐胁迫对类波氏真眼点藻生长(A)和油脂积累(B)的影响  
Fig. 4 Effects of different nutrient stress on the growth (A) and total lipids (B) of *E. cf. polyphem*



A、B、C 和 D 分别为不同 N、P、S 浓度和不同营养盐胁迫对类波氏真眼点藻总脂产率的影响。  
A, B, C, and D show the total lipid productivity of *E. cf. polyphem* under different nitrogen, phosphorus, and sulfur concentrations and different nutrient stress, respectively.

图5 不同 N、P、S 初始组合浓度对类波氏真眼点藻总脂产率的影响  
Fig. 5 Effects of different initial combinations of nitrogen, phosphorus, and sulfur on the productivity of total lipids of *E. cf. polyphem*

N-S 共同胁迫 (1/6N-1P-1/8S) 和 N-P-S 共同胁迫 (1/6N-1/8P-1/8S) 下, 四者的油脂积累量较高, 分别为 66.85%、68.70%、66.79%、65.57%, 差异较小; (2) 单一低 P 胁迫 (1N-1/8P-1S) 和 P-S 共同胁迫 (1N-1/8P-1/8S) 下, 两者的油脂含量分别为 60.23%和 59.87%, 差异不显著 ( $P > 0.05$ ); (3) 单一低 S 胁迫 (1N-1P-1/8S) 时的油脂含量最低, 为 46%。本组实验中, 1/6N-1P-1S 和 1/6N-1/8P-1S 的油脂产率最大, 均为  $0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (图 5: D)。

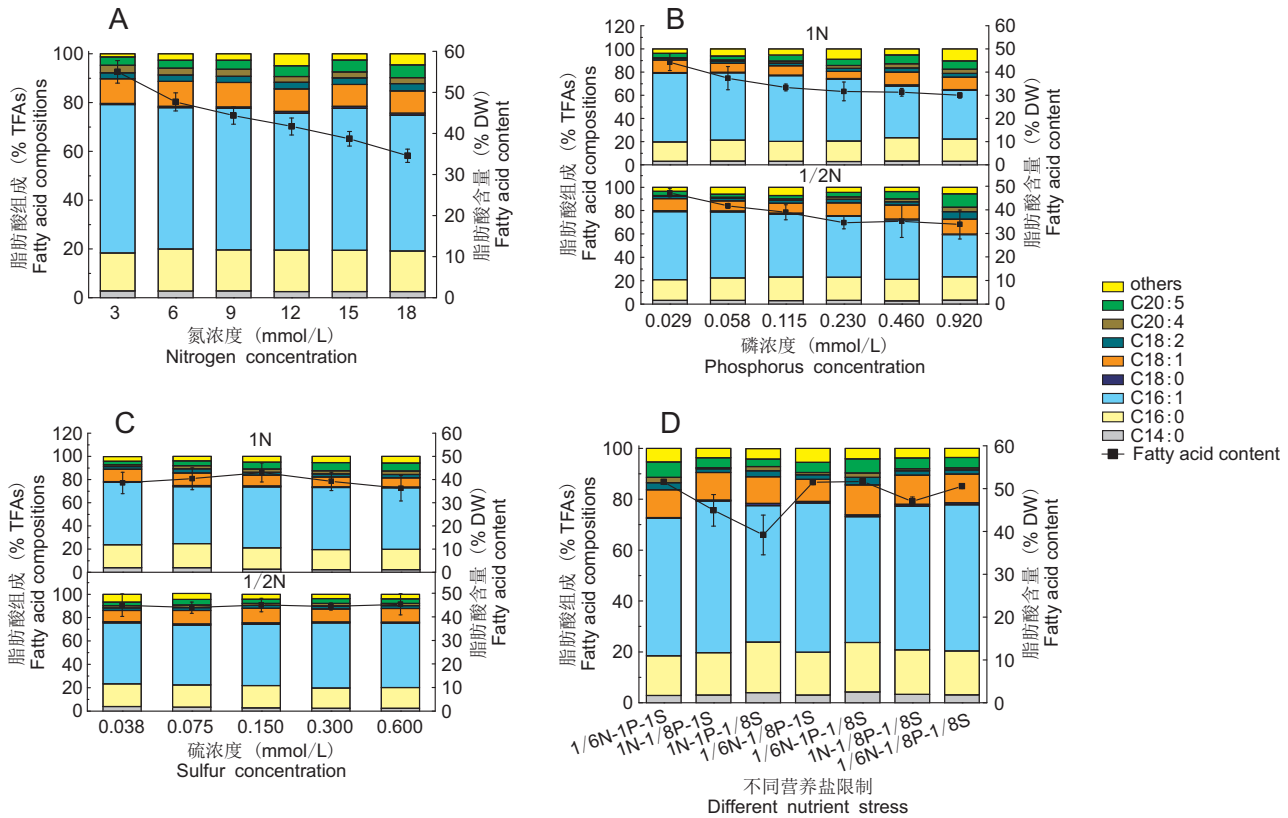
2.2 初始 N、P、S 组合浓度对类波氏真眼点藻脂肪酸组成的影响

藻细胞内总脂肪酸的绝对含量 (占生物质干重) 和每种脂肪酸占总脂肪酸的相对含量均受到培养基中 N、P、S 浓度的影响 (图 6)。结合图 1: B、图 2: B、图 3: B、图 4: B 可以看出, 总脂肪酸的绝对含量与其相对应的总脂含量的增减趋势一

致。类波氏真眼点藻主要脂肪酸组分是: 肉豆蔻酸 (C14:0)、棕榈酸 (C16:0)、棕榈油酸 (C16:1)、油酸 (C18:1)、二十碳五烯酸 (C20:5, EPA) 等, 其中, C16:1 含量最高, 占总脂肪酸含量的 36.06%~60.88%, 并且其含量随着 N、P 浓度的降低而升高; 其次是 C16:0 和 C18:1, 分别占总脂肪酸含量的 15.48% ~ 20.90% 和 5.97% ~ 12.80%, 两者的相对含量变化不大; 此外, C20:5 的相对含量也较高, 占总脂肪酸含量的 2.67% ~ 11.56%, 并且随 N、P 浓度的降低而降低。

2.3 细胞内主要营养元素分析

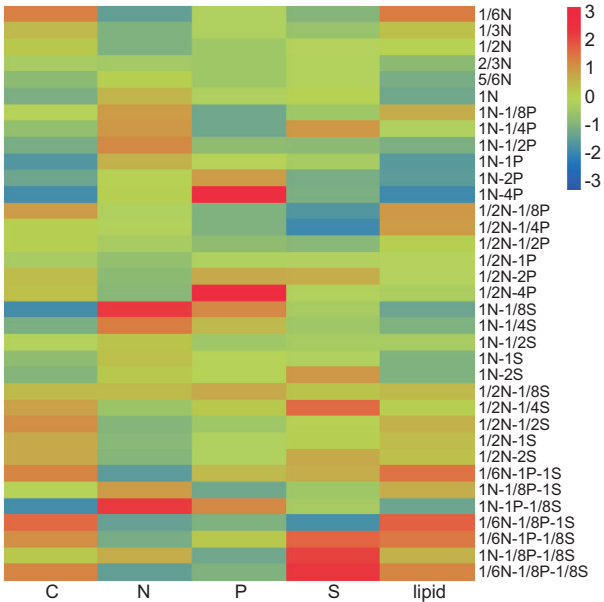
采用元素分析仪和钼锑比色法分别对冷冻干燥藻粉细胞内主要元素 C、N、P 和 S 含量变化进行分析测定, 结果显示 (图 7): (1) 从 N、P、S 三者



A、B、C 和 D 分别为不同 N、P、S 浓度和不同营养盐胁迫对类波氏真眼点藻脂肪酸组成的影响。图中折线表示藻细胞内总脂肪酸的绝对含量, 柱子表示藻细胞内主要脂肪酸占总脂肪酸的相对含量。  
A, B, C, and D show the composition of fatty acids of *E. cf. polyphem* under different nitrogen, phosphorus, and sulfur concentrations, and different nutrient stress, respectively. The broken line indicates the absolute content of total fatty acids in the algal cells, and the column indicates the relative content of the main fatty acids in the algal cells.

图 6 不同 N、P、S 初始组合浓度对类波氏真眼点藻脂肪酸组成的影响

Fig. 6 Effects of different initial combinations of nitrogen, phosphorus, and sulfur on the composition of fatty acids of *E. cf. polyphem*



图中从红色到蓝色的变化表示藻细胞内主要营养元素含量从高的变化。  
The change from red to blue shows the change from high to low content of primary nutrient elements of *E. cf. polyphem*.

图7 藻细胞内主要营养元素的含量变化  
Fig. 7 Change in content of primary nutrient elements of *E. cf. polyphem*

响不明显。当细胞内 N 含量逐渐降低时，细胞内 P、S 的含量并无明显变化；当细胞内 P 含量降低时，细胞内 N 含量明显增加，S 则无明显变化规律；当培养基中的 S 含量逐渐降低时，虽然藻细胞内 S 含量无明显变化规律，但其中的 N、P 含量都明显增加。(2)从细胞内各营养元素与油脂含量的关系来看，C 含量的高低与油脂含量高低一致，在油脂含量高的情况下，C 含量相应较高；反之，C 含量相应较低。油脂含量较高的区域中(图7)，要么 N 或 P 含量偏低、要么 N 和 P 含量都偏低；反之，在油脂含量较低的区域，要么 N 或 P 含量偏高，要么 N 和 P 含量均偏高。但细胞内 S 含量与油脂含量之间并无明显相关关系。

3 讨论

3.1 N、P、S 对类波氏真眼点藻生长的影响

微藻需要足够的 N 以保证其生长，但在硝酸盐浓度过高的情况下，可能会使硝酸还原酶的活性增强，进而导致藻细胞内亚硝酸盐含量过高，这对微藻生长有毒害作用<sup>[2]</sup>。本研究中，当 N 浓度为 9 mmol/L 时，类波氏真眼点藻生物量最高，而在 9~18 mmol/L 浓度范围内，生物量则随着 N 浓度

的升高而降低。不管在 N 富余或最适生长 N 浓度下，低 P 胁迫都会明显抑制类波氏真眼点藻的生长，这说明 P 是维持其细胞内正常新陈代谢必不可少的营养元素。本实验结果与多数研究相似，Mayers 等<sup>[16]</sup>研究发现，拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)的生物量和细胞数在低 P 浓度下明显下降，这说明较低的 P 浓度影响藻细胞的生长和细胞分裂。在低 P 胁迫下，藻细胞新陈代谢所需要的能量会减少，这对生长尤其是细胞分裂极为不利。但也有研究认为，当培养过程中持续加入 P，使其一直处于高浓度状态，会出现 P 富积现象，不仅不利于藻细胞生长，反而会抑制其生长<sup>[17]</sup>。本实验中将 P 浓度提升至原来的 2 倍和 4 倍，其生物量并没有减少，但增幅很小，而此时藻细胞内 P 含量明显上升。因此推测，当培养基中的 P 浓度过高时，类波氏真眼点藻也存在 P 富积现象，其细胞内吸收的 P 已经超过其生长所需的量，并且以 P 库的形式储存在细胞内，以便应对 P 浓度过低的环境，这似乎是微藻应对极端环境的一种策略。本实验中，低 S 胁迫下的生物量严重下降，并且藻细胞较快进入稳定期，说明低 S 胁迫严重危害到类波氏真眼点藻的生长。而 Takeshita 等<sup>[18]</sup>研究发现，根腐小球藻(*Chlorella sorokiniana* Shihira & R. W. Krauss)在 S 缺乏条件下，光合能力明显下降。微藻类囊体膜上许多辅酶或辅基蛋白的组成都离不开 S，当藻细胞处于低 S 胁迫下，PS II 活性会迅速下降，同时会降低 CO<sub>2</sub>固定效率，还可能会导致光抑制，并且 D1 蛋白的从头合成也会受到影响，从而损害光反应中心防御光损伤的长期机制<sup>[19-21]</sup>，这些都给藻细胞的生长带来不利影响。同样是低 S 胁迫，类波氏真眼点藻在 1N 条件下的生物量反而比同条件下 1/6 N 时的生物量还低，这可能是由于 1N 条件下所吸收的 N 已经远远超过生长的需求，因此其体内积累了大量亚硝酸盐，对藻细胞产生了一定的毒害作用<sup>[2]</sup>。

3.2 N、P、S 对类波氏真眼点藻油脂积累和脂肪酸组成的影响

大量研究表明，微藻中的油脂含量随着培养环境中 N 浓度的降低而升高，例如胶球藻(*Coccomyxa* sp.)的油脂积累在 N 缺乏下比 N 充足下高 80%<sup>[4]</sup>。真眼点藻纲中的多数藻株均是生产生物柴油的潜在优势藻种，本实验室前期对该纲中真眼



点藻属和魏氏藻属中的几个藻株进行研究的结果表明,在低 N 胁迫条件下它们的油脂含量均比 N 充足条件下显著提高<sup>[22,23]</sup>。本研究结果与前期研究一致,进一步说明真眼点藻纲中的多数藻株与其他多数富油微藻一样,其油脂积累能力随着 N 浓度的降低而升高。在低 N 胁迫下,由于藻细胞叶绿素和酶减少,碳固定能力被削弱,于是碳流便向油脂合成途径转移。低 N 胁迫下所积累的油脂也可能是从非脂类化合物转化而来,例如蛋白质或多肽等,光合固碳产生的淀粉也可能转化为非极性脂或中性脂<sup>[4]</sup>。Chu 等对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 的研究表明,藻细胞在低 N 胁迫下,前期积累的主要是淀粉,在淀粉含量增长缓慢时,油脂便开始快速积累<sup>[5]</sup>,可见,与淀粉相比,油脂更适合藻细胞应对低 N 胁迫下的环境。低 N 胁迫下,藻细胞会积累大量的中性脂(主要是三酰甘油, TAGs),即使在总脂含量没有升高的情况下, TAGs 占总脂的比例也会增加<sup>[24]</sup>。低 N 胁迫会使藻细胞的类囊体膜部分降解、酰基水解酶活性降低、磷脂水解作用减弱,这些变化会导致脂肪酸酰基辅酶 A 的积累,而此时二酰甘油酰基转化酶活性增强,所以,大量的酰基辅酶 A 便形成三酰甘油,促使细胞内油脂尤其是 TAGs 含量的增加<sup>[25-27]</sup>。

低 P 胁迫与低 N 胁迫相似,也能促进藻细胞内油脂的积累。Mandal 等<sup>[28]</sup>对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 的研究发现,其油脂含量在 P 缺乏下明显增加,由 12.7% 增长到 30%。但也有研究认为,藻细胞在不同 P 浓度下的油脂含量并无显著差异<sup>[5]</sup>。就类波氏真眼点藻而言,低 P 胁迫并不是促进藻细胞油脂积累的最佳条件,因为其油脂含量在低 P 胁迫下比低 N 胁迫下小。多数实验在研究 P 对微藻油脂积累的影响时,通常与 N 相结合,并且认为 N 和 P 同时胁迫更有利于油脂的积累。如 Li 等<sup>[29]</sup>对原鞘小球藻嗜乳糖变种 (*Chlorella protothecoides* var. *galactophila* Shihira & R. W. Krauss) 的研究发现,其油脂含量在 N、P 同时缺乏条件下比单一 N 缺乏条件下显著升高。在本研究中,类波氏真眼点藻只有在 N 充足的情况下,不同 P 浓度对油脂积累才有明显影响,这进一步说明 P 对其油脂积累的影响要小于 N 的影响。N、P 共同胁迫下的油脂含量虽然比单一低 N 胁迫下

的油脂含量高,但两者间差异很小,说明藻中 N 胁迫和 P 胁迫之间的交互作用很小。

一般认为,与 N、P 相比, S 对藻细胞生长和油脂积累的影响较小,但 Cakmak 等对 2 株莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* Dang) (CC-124、CC-125) 的研究发现,其油脂含量在 S 缺乏条件下比 N 缺乏时更高<sup>[30]</sup>。本实验结果与上述研究不同,在低 S 胁迫条件下,类波氏真眼点藻的生长受到严重抑制,可能是多数藻细胞已经不能维持基本生理功能,因此不能达到提高油脂含量的效果。

可见,单一营养元素低浓度胁迫对类波氏真眼点藻油脂积累的促进作用大小为:  $N > P > S$ 。在低 N 胁迫下,无论 P、S 浓度如何组合,其油脂含量都较高,且彼此之间差异较小。低 P 胁迫也能促进油脂积累,其促进作用与 P-S 共同胁迫下的促进作用相似,两者间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。S 对油脂含量的影响很小,本研究中并未发现有明显规律。

此外,培养基中营养盐浓度的变化会影响藻细胞中脂肪酸的组成和含量。一般情况下,低 N 胁迫会提高总脂肪酸的含量和脂肪酸的饱和度,饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的含量会增加;低 P 胁迫下脂肪酸的组成与低 N 胁迫相似,总脂肪酸含量会有所增加,其中单不饱和脂肪酸的含量会增加,多不饱和脂肪酸含量减少<sup>[24]</sup>。本实验结果与上述研究基本相同,类波氏真眼点藻的总脂肪酸含量以及各脂肪酸占总脂肪酸的相对含量受培养基中 N、P、S 浓度的影响,其中 N、P 的影响比 S 更显著。虽然 C16:0 和 C18:0 占总脂肪酸的相对含量在低 N 胁迫和低 P 胁迫下无明显升高趋势,但是 C16:1 的相对含量明显升高, C20:5 的相对含量则明显下降。S 浓度对类波氏真眼点藻的脂肪酸组成则影响不大。

### 3.3 各元素在细胞内的含量变化

与 N、P 不同,类波氏真眼点藻细胞内 S 的含量受培养基中 S 浓度的影响并不明显,始终维持在一定的水平。可能是因为 S 在细胞内的作用以维持细胞结构为主,藻细胞并不具备储存 S 的功能,即使在 S 浓度很高的条件下,藻细胞也不会吸收多余的 S,而当培养基中 S 浓度较低时,细胞为了保证体内的 S 维持正常生长,便不再分裂,

因此每个细胞中 S 含量便维持在同一水平。培养基中的 N、P、S 浓度也会影响彼此在细胞内的含量, 例如: 随着培养基中 P 浓度的降低, 细胞内的 P 含量也在降低, 但是其 N 含量升高; 随着培养基中 S 浓度降低, 细胞内的 S 含量虽然无明显变化, 但其 N 和 P 含量也在升高, 这可能是因为培养基 P 或 S 浓度较低情况下, 其生物量偏低, 而所给予的 N 或 N、P 的量是一样的, 所以每个细胞分配到 N 或 P 的量也会多一些。有研究表明, 当培养基中 P 浓度降低时, 藻细胞对 N 的吸收会降低<sup>[5,31,32]</sup>, 结合本实验结果, 进一步说明藻细胞中某种营养元素的含量不仅与该元素在培养基中的浓度以及藻细胞对其吸收的量有关, 也与其他营养元素在培养基中的浓度以及生物量有密切联系。类波氏真眼点藻中 N、P、S 的含量与油脂之间的关系进一步验证了 N、P 胁迫能够有效促进其油脂积累, 而 S 胁迫则无此作用。

## 4 结论

(1) 最有利于类波氏真眼点藻生长的 N、P、S 条件为: 9 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 、0.92 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 生物量可达 9.19 g/L; (2) 最适合其油脂积累的条件为: 3 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 、0.029 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 总脂含量可达细胞干重的 68.7%; (3) 综合生物量及总脂含量得出油脂产率的最佳培养条件为: 9 mmol/L  $\text{NaNO}_3$ 、0.23 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 油脂产率达  $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

## 参考文献:

- [1] Procházková G, Brányiková I, Zachleder V, Brányik T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae [J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26 (3): 1359–1377.
- [2] Markou G, Vandamme D, Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients [J]. *Water Res*, 2014, 65(15): 186–202.
- [3] Ghosh A, Khanra S, Mondal M, Halder G, Tiwari ON, Bhowmick TK, Gayen K. Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034) [J]. *Energy Convers Manage*, 2017, 149: 39–51.
- [4] Msanne J, Xu D, Konda AR, Casas-Mollano JA, Awada T, Cahoon EB, Cerutti H. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169 [J]. *Phytochemistry*, 2012, 75: 50–59.
- [5] Chu FF, Chu PN, Shen XF, Lam P, Zeng RJ. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 152(1): 241–246.
- [6] Chekanov K, Lobakova E, Selyakh I, Semenova L, Sidorov R, Solovchenko A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia) [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12 (8): 4504–4520.
- [7] Pilátová J. The potential use of the Eustigmatophyceae in the production of biofuels [D]. Praha: Faculty of Science Charles University in Prague Department of Botany, 2013: 1–3.
- [8] 苏怡, 高保燕, 黄罗冬, 吴曼曼, 李爱芬, 张成武. 不同氮源及氮浓度对真眼点藻纲微藻生长及油脂积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2017, 41(3): 677–691.  
Su Y, Gao BY, Huang LD, Wu MM, Li AF, Zhang CW. Effects of different nitrogen source and concentration supplies on the growth and lipid accumulation of Eustigmatophycean microalgae [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, 2017, 41(3): 677–691.
- [9] Fawley KP, Eliáš M, Fawley MW. The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade *Goniochloridales* [J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26(4): 1773–1782.
- [10] Zhang JJ, Wan LL, Xia S, Li AF, Zhang CW. Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae) [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36 (8): 1125–1130.
- [11] Gao BY, Xia S, Lei XQ, Zhang CW. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos* cf. *polyphem* [J]. *J Appl Phycol*, 2017: 1–15.
- [12] Gao BY, Lei XQ, Xia S, Li AF, Zhang CW. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies [J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28 (2): 821–830.
- [13] 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]. *Biochim Biophys Acta*,

- 2005, 1738(1-3): 63-71.
- [14] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(5): 497-503.
- [15] Strickland JDH, Parsons TR. Determination of Reactive Phosphorus[M]. Ottawa: Fishers Research Board of Canada, 1968: 49-56.
- [16] Mayers JJ, Flynn KJ, Shields RJ. Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp.[J]. *Bioresource Technol*, 2014, 169(5): 588-595.
- [17] Wu YH, Yu Y, Li X, Hu HY, Su ZF. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition[J]. *Bioresource Technol*, 2012, 112(5): 193-198.
- [18] Takeshita T, Ota S, Yamazaki T, Hirata A, Zachleder V, Kawano S. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions[J]. *Bioresource Technol*, 2014, 158(2): 127-134.
- [19] 许大全. 光合作用学[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 118-119.
- [20] Antal TK, Krendeleve TE, Rubin AB. Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 3-15.
- [21] Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117(1): 129-139.
- [22] 何思思, 高保燕, 雷学青, 万凌琳, 李爱芬, 张成武. 初始硝酸钠浓度对魏氏真眼点藻的生长、形态和油脂积累的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(3): 574-582.
- He SS, Gao BY, Lei XQ, Wan LL, Li AF, Zhang CW. Effects of initial nitrogen supply on the growth, morphology and lipid accumulation of oleaginous microalga *Eustigmatos vischeri* (Eustigmatophyceae)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 574-582.
- [23] 周芷薇, 高保燕, 雷学青, 吴桂秀, 张文源, 李爱芬, 张成武. 低氮胁迫对两种魏氏藻生长和油脂积累的影响[J]. 可再生能源, 2015, 33(5): 777-783.
- Zhou ZW, Gao BY, Lei XQ, Wu GX, Zhang WY, Li AF, Zhang CW. The effects of low-nitrogen stress on the growth and lipid accumulation of *Vischeria helvetica* and *Vischeria punctata*[J]. *Renewable Energy Resources*, 2015, 33(5): 777-783.
- [24] Lari Z, Moradi-Khebari N, Ahmadzadeh H, Abrishamchi P, Moheimani NR, Murry MA. Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management[J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(6): 3235-3250.
- [25] Song DH, Xi B, Sun J. Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios[J]. *J Ocean Univ China*, 2016, 15(1): 124-130.
- [26] Li X, Hu HY, Gan K, Sun YX. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. [J]. *Bioresource Technol*, 2010, 101(14): 5494-5500.
- [27] Ramanna L, Guldhe A, Rawat I, Bux F. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources[J]. *Bioresource Technol*, 2014, 168(3): 127-135.
- [28] Mandal S, Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(2): 281-291.
- [29] Li YQ, Han FX, Xu H, Mu JX, Chen D, Feng B, Zeng HY. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P)[J]. *Bioresource Technol*, 2014, 174: 24-32.
- [30] Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z, Tekinay T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(8): 1947-1957.
- [31] Roopnarain A, Gray VM, Sym SD. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production[J]. *Bioresource Technol*, 2014, 156(2): 408-411.
- [32] Shen XF, Liu JJ, Chauhan AS, Hu H, Ma LL, Lam PKS, Zeng RJ. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate[J]. *Algal Res*, 2016, 17: 261-267.

(责任编辑: 张平)