

高碳低氮条件下培养基中磷水平对 莱茵衣藻生长及油脂合成的影响

冯天¹, 孙守瑞¹, 宋佳美¹, 华兰¹, 郑世燕^{1,2}, 王强³

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222005; 3. 河南大学 作物逆境适应与改良国家重点实验室, 河南开封 475004)

摘要:为进一步提高莱茵衣藻的生物量和油脂含量,在前期已明确最佳碳氮水平的基础上,通过分析不同磷水平下莱茵衣藻生物量、油脂含量、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量、油脂脂肪酸组成及含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量等指标的变化,探究高碳低氮条件下培养基中磷水平(0P、1/8P、1/4P、2/4P、4/4P、5/4P)对该藻生长及油脂积累的影响。结果表明:随着培养基中磷水平的增加,莱茵衣藻生物量、油脂含量和油脂产率呈先增加后降低的趋势,培养 5 d,磷水平 1/8P 时的生物量、油脂含量和油脂产率最高,分别为 2.27 g/L、43.35% 和 191.31 mg/(L·d),分别比 0P 时提高 91.55%、13.09% 和 1.23 倍;培养 5 d,磷水平 5/4P 时叶绿素 a 和叶绿素 b 含量最高,分别达到 5.15 mg/L 和 3.46 mg/L,分别比 0P 时高 2.30 倍和 0.65 倍;当磷水平为 1/8P~5/4P 时,莱茵衣藻油中各脂肪酸含量总体差异不显著,但其多不饱和脂肪酸含量均显著低于 0P 时的,饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量则显著高于 0P 时的;随培养基中磷水平的增加,可溶性糖含量呈上升趋势,而可溶性蛋白含量呈降低趋势。综上,在高碳低氮条件下,与常规磷水平培养基培养相比,适当降低培养基中磷水平可进一步提高莱茵衣藻的生物量和油脂含量,同时获得较高的可溶性糖和可溶性蛋白含量。

关键词:莱茵衣藻;磷水平;微藻生物量;油脂;脂肪酸组成

中图分类号:TS221;Q949.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)09-0101-08

Effect of phosphorus level in culture medium on the growth and oil synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* under high carbon and low nitrogen conditions

FENG Tian¹, SUN Shourui¹, SONG Jiamei¹, HUA Lan¹,
ZHENG Shiyan^{1,2}, WANG Qiang³

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China; 3. State Key Laboratory of Crop Stress Adaptation and Improvement, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China)

收稿日期:2023-12-23;修回日期:2024-05-06

基金项目:国家自然科学基金项目(32300321);江苏省自然科学基金项目(BK20191006);江苏省优势学科建设工程资助项目(PAPD);江苏省政府留学奖学金项目(JS-2019-310);江苏海洋大学研究生科研与实践创新计划项目(KYCX2022-21)

作者简介:冯天(1997),女,硕士研究生,研究方向为微藻生物技术(E-mail)2021221213@jou.edu.cn。

通信作者:郑世燕,副教授,硕士生导师,博士(E-mail)syzheng@jou.edu.cn。

Abstract: To further increase the biomass and oil content of *Chlamydomonas reinhardtii*, based on the optimized carbon and nitrogen levels in previous research, the effects of various phosphorus (P) levels (0P, 1/8P, 1/4P, 2/4P, 4/4P, 5/4P) on the growth and oil accumulation were investigated under high carbon and low nitrogen conditions by analyzing the changes of biomass, oil content, fatty acid composition and content of oil, chlorophyll a and chlorophyll b

contents, as well as soluble sugar and soluble protein contents. The results showed that the biomass, oil content and oil productivity of *C. reinhardtii* tended to increase and then decrease with the increase of P levels. The algal cells cultured for 5 d under 1/8P treatment displayed the highest biomass, oil content, and oil productivity of 2.27 g/L, 43.35%, and 191.31 mg/(L·d), which improved by 91.55%, 13.09%, and 1.23 times in contrast with the 0P treatment, respectively. The maximal contents of chlorophyll a and chlorophyll b were achieved at 5/4P, with values of 5.15 mg/L and 3.46 mg/L, respectively. These values were 2.30 times and 0.65 times higher than those of 0P, respectively. When P levels ranged from 1/8P to 5/4P, the differences in the percentage of each fatty acid in the oil of *C. reinhardtii* were non-significant, but polyunsaturated fatty acid content were remarkably lower than those of the cultures grown in the 0P substrate. Meanwhile, the content of saturated and monounsaturated fatty acids were obviously higher than those in the 0P treatment. In addition, the increase in P levels was accompanied by a marked enhancement in soluble sugar content, while soluble protein levels declined. In conclusion, under high carbon and low nitrogen conditions, the biomass and oil content of *C. reinhardtii* can be further increased by reasonably lowering the P level in the medium compared with the cultured cells in the conventional P levels, simultaneously obtaining higher soluble sugar and soluble protein contents.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; phosphorus level; microalgal biomass; oil; fatty acid composition

油脂不仅是可再生能源的重要原料,也是人类饮食的重要营养素。随着世界人口的不断增长以及传统化石燃料的枯竭,人们对可再生能源和油脂生物资源的需求也在不断增加。微藻作为第三代和第四代生物燃料的原料,其光合效率高、生长速度快、可塑性强,在一定条件下可合成大量的油脂,但当前微藻油脂的产量远不能满足巨大的市场需求^[1-2]。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)生长迅速,生命周期短,被广泛作为探索微藻脂质代谢机制的模式微藻^[3],在保健食品^[4]、生物燃料^[5]和医药^[6]的生产上展现出了巨大潜力。

已有研究表明,极端温度、光照等环境因子以及氮磷等营养胁迫可有效促进微藻油脂的高效合成和积累^[7-8]。其中营养因素(如碳、氮、磷等)对微藻的生长、油脂合成等具有重要影响^[9-10]。合适的碳氮比可显著提高微藻的生长速率,缩短其生长周期,并调控油脂的合成^[11]。磷源是细胞核酸和磷脂的主要成分,也是调节微藻细胞生长和代谢的必需营养元素之一,其参与信号转导、能量传递、呼吸和光合作用等细胞代谢过程^[12]。调节培养基中的磷水平可以显著提高微藻的脂质生产能力和碳水化合物代谢过程^[13]。Arora等^[14]研究发现,在磷胁迫下,小球藻生物量降低约15%,但油脂含量增加约50%。Fu等^[15]研究发现,氮磷同时胁迫条件下,普通小球藻的生物量增加了

10.2%,油脂产率增加了39.3%。另有研究^[16-17]指出,微藻在低磷条件下通过上调编码磷酸盐转运蛋白基因的表达来增加自身对磷酸盐的吸收能力。在磷胁迫下相关的能量代谢、呼吸作用、光合作用、脂质代谢等生理生化反应都会发生改变。但截至目前关于碳源补充耦合氮磷限制条件对微藻油脂积累的影响鲜见报道。

为实现微藻生物量和油脂的大量积累,课题组前期对莱茵衣藻培养基碳氮水平进行优化^[18],在此基础上,本研究进一步探究培养基中不同磷水平对莱茵衣藻生长、产油特性和油脂脂肪酸组成的影响,旨在从营养调控的角度明确莱茵衣藻生物合成油脂的潜力,为莱茵衣藻的进一步产业化应用提供数据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125),中国科学院藻类生物学重点实验室提供;TAP培养基^[19],配方如表1所示;37种混合脂肪酸甲酯标准品;正己烷(色谱级);牛血清白蛋白(生物技术级);无水葡萄糖等其余试剂均为分析纯。

JXN-26型高速冷冻离心机,Scientz-10N型真空冷冻干燥机,J192-IIIN型超声波细胞破碎仪,P7型双光束紫外可见分光光度计,Synergy HT型酶标仪,7890A型气相色谱仪。

表1 TAP培养基成分

组成	含量
Tris powder	2.42 g/L
NH ₄ Cl	0.38 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.10 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	57.00 mg/L
K ₂ HPO ₄	108.00 mg/L
KH ₂ PO ₄	54.00 mg/L
EDTANa ₂	50.00 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.00 mg/L
H ₃ BO ₃	11.40 mg/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.06 mg/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.61 mg/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57 mg/L
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1.10 mg/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.99 mg/L
乙酸	1.00 mL/L

1.2 实验方法

1.2.1 藻种培养

将藻种种子液按5% (体积分数) 接种到含有200 mL TAP培养基的250 mL锥形瓶中,在温度25℃、光照强度4 000 lx、光暗比14 h/10 h、摇床转速150 r/min下培养至对数期(~3 d)用于实验。

1.2.2 实验设计

在前期已明确最佳碳氮水平^[18]的基础上,首先将NH₄Cl的添加量降低至0.20 g/L,同时外源添加4.12 g/L CH₃COONa对常规TAP培养基进行改良;然后通过控制K₂HPO₄和KH₂PO₄的添加量调节改良后TAP培养基的磷水平,共设置6个磷水平梯度,分别为0P、1/8P、1/4P、2/4P、4/4P和5/4P,各梯度对应的培养基中总磷含量如表2所示。每个梯度各设3次重复,按10%比例接种生长至对数期的微藻(~0.06 g/L),然后在温度30℃、光照强度12 000 lx、光暗比24 h/0 h条件下进行培养。藻细胞培养5 d后,在4℃、3 500 r/min条件下离心5 min,弃上清后于冷冻干燥机中干燥至恒重用于测定微藻油脂、可溶性糖和可溶性蛋白等指标。

表2 磷水平梯度设置及培养基中总磷含量

磷水平	总磷含量/(mg/L)
0P	0
1/8P	3.94
1/4P	7.88
2/4P	15.76
4/4P	31.52
5/4P	39.40

1.2.3 生物量、生物量产率和比生长速率的测定

参照文献[20]采用重量法测定藻细胞干质量。精准移取2 mL藻液于已知质量的离心管中,以3 500 r/min离心5 min后弃上清,置于鼓风干燥箱中烘干至恒重后,用万分之一分析天平称其质量,按下式计算生物量、生物量产率和比生长速率。

$$C = m/V \quad (1)$$

$$P = C/t \quad (2)$$

$$\mu = (\ln C_2 - \ln C_1)/(t_2 - t_1) \quad (3)$$

式中:C为生物量,g/L;m为藻细胞干质量,g;V为藻液体积,L;P为生物量产率,g/(L·d);t为培养时间,d; μ 为比生长速率,d⁻¹;C₁和C₂分别为培养时间t₁和t₂时的藻细胞干质量,g。

1.2.4 叶绿素含量测定

采用甲醇浸提-分光光度法^[21]测定藻细胞叶绿素含量。精准移取1 mL藻液于2 mL离心管中,于4℃、3 500 r/min下离心5 min,弃上清并加入与藻液等体积的甲醇,振荡摇匀后置于4℃冰箱避光浸提过夜,然后在4℃、6 000 r/min下离心10 min,收集上清液,分别在653 nm和666 nm处测定其吸光度,按下式计算叶绿素a和叶绿素b的含量。

$$c_a = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \quad (4)$$

$$c_b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \quad (5)$$

式中:c_a和c_b分别为叶绿素a和叶绿素b的含量,mg/L;A₆₅₃和A₆₆₆分别为在653 nm和666 nm处的吸光度。

1.2.5 油脂含量测定

采用氯仿-甲醇法^[22]测定油脂含量。精准称取50 mg冷冻干燥后的藻粉于15 mL离心管中,加入3 mL氯仿-甲醇(体积比2:1)溶液,振荡混匀,冰水浴超声破碎10 min后,在4℃、6 000 r/min下离心5 min,收集上清液,残渣重复上述操作,合并上清液,在鼓风干燥箱中干燥至恒重,称其(油脂)质量,计算油脂含量(油脂质量与原料干藻粉质量的比值),同时以生物量产率与油脂含量的乘积计算油脂产率。

1.2.6 脂肪酸组成分析

采用气相色谱法^[23-24]对脂肪酸组成进行分析。向1.2.5提取的油脂中加入1 mL 1.0 g/100 mL的NaOH-CH₃OH溶液,充1 min氮气,于75℃水浴皂化15 min。待样品冷却至室温后加入2 mL体积分数5.0%的HCl-CH₃OH溶液,再次通入氮气,振荡混匀,于75℃水浴15 min,样品冷却至室温后加入1 mL正己烷,混匀样液,于3 500 r/min下离心

5 min, 将上清液收集于气相进样瓶中待测。

气相色谱条件: CP7489 CP-Sil 88 for FAME 色谱柱 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm); 火焰离子化检测器 (FID); 载气为高纯氢气, 流速 25 mL/min; 不分流进样; 进样量 1 μL; 进样口温度 250 °C; 检测器温度 240 °C; 柱温箱升温程序为初始温度 190 °C, 以 4 °C/min 升温至 220 °C, 保持 35 min。

以标准品的保留时间定性, 采用面积归一化法^[25] 计算各脂肪酸含量。

1.2.7 可溶性糖和可溶性蛋白含量测定

采用碱提法^[26] 处理样品。精准称取 20 mg 研磨后的藻粉于离心管中, 加入 5 mL 0.175 mol/L NaOH, 超声 10 min 以混匀样液, 置于 80 °C 水浴 30 min, 冷却至室温后, 将样液用蒸馏水定容至 25 mL, 在 8 000 r/min 下离心 5 min, 收集上清液待测。

采用苯酚-硫酸法^[27] 测定可溶性糖含量。取 1 mL 待测液, 加入 0.5 mL 体积分数 6.0% 苯酚溶液、2.5 mL 浓硫酸, 混匀样液, 置于 45 °C 水浴 30 min, 冷却至室温后, 用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 再根据以葡萄糖为标准品制作的标准曲线计算

微藻中可溶性糖含量。

采用考马斯亮蓝法^[28] 测定可溶性蛋白含量。取 1 mL 待测液, 与 5 mL 0.1 g/L 的考马斯亮蓝 G-250 溶液混合, 室温下静置 5 min, 用酶标仪测定 595 nm 处的吸光度, 再根据以牛血清白蛋白为标准品制作的标准曲线计算微藻中可溶性蛋白含量。

分别以可溶性糖含量或可溶性蛋白含量与生物量产率乘积计算各自产率。

1.2.8 数据分析

实验结果采用“平均值 ± 标准偏差”的形式表示, 使用 Excel 2021、IBM SPSS 27.0 和 Origin 2021 等软件进行数据处理、显著性差异分析和图表绘制。

2 结果与分析

2.1 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻生长的影响

按 1.2.2 方法对莱茵衣藻进行培养, 每隔 1 d 取样测定莱茵衣藻的生物量、生物量产率和比生长速率, 结果如图 1 所示。

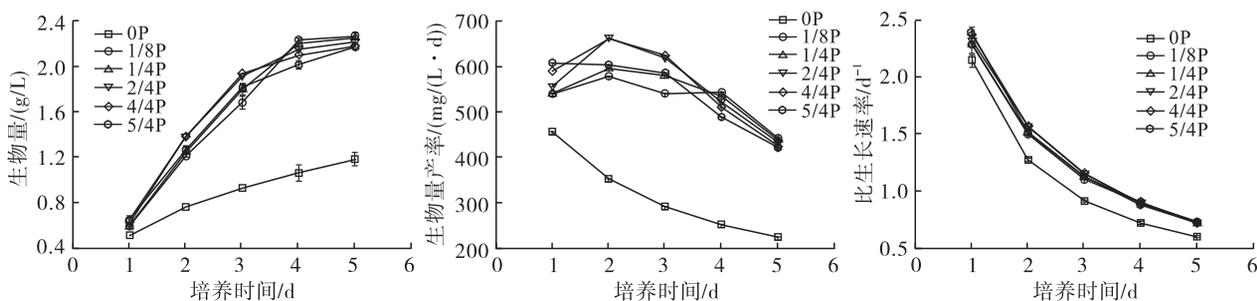


图 1 不同磷水平下莱茵衣藻的生物量、生物量产率和比生长速率

由图 1 可知, 不同磷水平下莱茵衣藻的生物量随培养时间的延长均呈显著增加的趋势, 生物量产率总体呈降低的趋势, 比生长速率呈明显降低的趋势, 但随磷水平的增加三者均呈先增加后降低的趋势 (培养 5 d)。培养 5 d 时, 1/8P 水平下的生物量、生物量产率和比生长速率最高, 分别为 2.27 g/L、441.33 mg/(L·d) 和 0.73 d⁻¹, 分别比 0P 下的高 91.55%、96.44% 和 21.83%, 比正常磷水平 4/4P 下的高 3.82%、3.92% 和 1.04%。1/4P 水平下的生物量、生物量产率和比生长速率略低于 1/8P 下的, 分别为 2.25 g/L、438.00 mg/(L·d) 和 0.72 d⁻¹, 与磷存在下的差异不明显, 与 0P 时差异明显。结果表明, 在高碳低氮条件下适当减少磷营养供给可进一步促进莱茵衣藻生长, 积累更高的生物量, 但完全不添加磷营养对莱茵衣藻的生长具有一定的抑制作用, 不利于生物量的大量积累, 该结

果与王晓昌等^[29] 研究的低磷营养下普通小球藻的生长情况一致。

2.2 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻叶绿素含量的影响

不同磷水平下莱茵衣藻叶绿素含量的变化如图 2 所示。

由图 2 可知: 随着培养时间的延长, 叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 (a+b) 含量和叶绿素 a 与叶绿素 b 含量比值均呈先增加后降低的趋势; 不同磷水平下叶绿素 a 含量均在 2~3 d 时达到最大值, 且为 1 d 时的 1.0~3.8 倍; 叶绿素 b 含量除 0P 条件下外均在 2 d 时达到最大值, 且为 1 d 时的 1.8~2.2 倍; 1/8P~5/4P 水平下的叶绿素含量显著高于 0P 下的, 培养 5 d 时叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素 (a+b) 的含量比 0P 下的高 0.65~2.30 倍, 叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的比值比 0P 下的高约 1 倍; 培养结束

时,5/4P水平下的叶绿素a、叶绿素b和叶绿素(a+b)含量最高,分别为5.15、3.46 mg/L和8.61 mg/L,分别比0P水平下的高2.30、0.65倍和1.36倍,比正常磷水平4/4P下的高0.66%、4.00%和1.98%;培养5d时,正常磷水平4/4P下叶绿素a与叶绿素

b含量比值最高,为1.54,比0P下的高1.06倍。综上,在高碳低氮条件下适当增加磷营养供给可促进莱茵衣藻叶绿素的积累,不添加磷营养则对莱茵衣藻的光合作用具有较大的抑制作用,该结果与宋丽娜等^[30]研究报道一致。

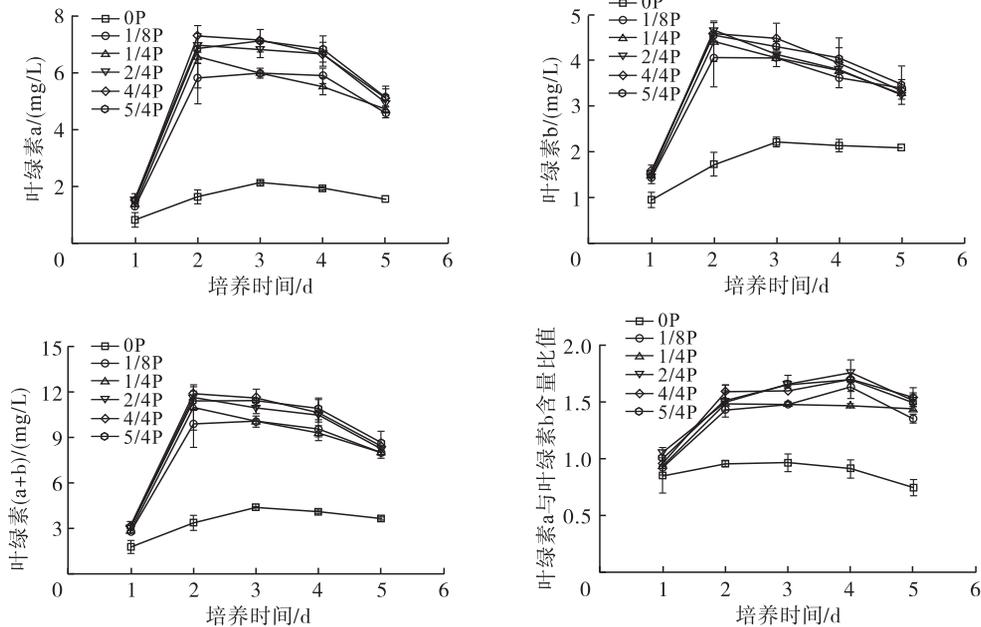
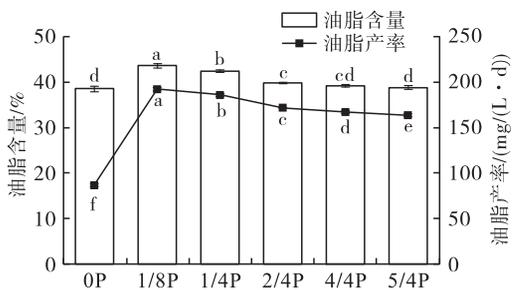


图2 不同磷水平下莱茵衣藻的叶绿素a、叶绿素b、叶绿素(a+b)含量以及叶绿素a与叶绿素b含量比值

2.3 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻油脂积累的影响

不同磷水平下莱茵衣藻的油脂积累情况如图3所示。



注:同一指标不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

图3 不同磷水平下莱茵衣藻的油脂积累情况

由图3可知,随着磷水平的增加,莱茵衣藻油脂含量和油脂产率均呈先增加后下降的趋势。培养5d,1/8P水平下的油脂含量和油脂产率最高,分别达到43.35%和191.31 mg/(L·d),分别比0P水平下的高13.09%和1.23倍,比正常磷水平4/4P下的高11.00%和15.35%。1/4P水平下的油脂含量和油脂产率仅次于1/8P下的,分别为42.21%和184.87 mg/(L·d)。另外,0P下的油脂产率[85.95mg/(L·d)]显著低于其他磷水平下的。上述结果表明,在高碳低氮条件下适当减少培养基中

磷营养对莱茵衣藻的油脂积累有显著促进作用。Iwai等^[31]研究指出,莱茵衣藻CC-408在磷胁迫条件下,三酰甘油(TAG)含量比对照组提高了约20倍;Li等^[32]研究发现,氮磷同时胁迫下,斜生栅藻LX1的油脂含量在磷含量为0.1 mg/L时达到最大值,为53%,比磷含量为2 mg/L时提高了约1.5倍;Wu等^[33]研究发现,磷胁迫可促进栅藻、普通小球藻、蛋白核小球藻和雨生红球藻等多种藻类油脂的积累;均与本研究结果一致。

2.4 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻油脂脂肪酸组成的影响

不同磷水平下莱茵衣藻油的脂肪酸组成如表3所示。

由表3可知,不同磷水平下莱茵衣藻油的脂肪酸主要由C16:0、C16:1、C18:1、C18:2和C18:3组成。总体而言,培养基中添加磷营养的条件下,莱茵衣藻油的各脂肪酸含量总体差异不显著,但与培养基中无磷营养时存在显著差异。莱茵衣藻油中的C16:0、C18:1含量在0P时最低,分别比其他磷水平下降了20.10%~22.84%和13.46%~15.58%,但0P时C16:1、C18:2和C18:3的含量最高,分别比其他磷水平下提高了10.80%~20.15%、18.83%~26.62%和48.72%~55.47%。这说明高碳低氮条件

下培养基中不添加磷营养可显著促进 C18:2 和 C18:3 的合成,但不利于 C16:0 和 C18:1 的积累。

由表 3 还可知,在培养基中无磷营养时,莱茵衣藻油中的 PUFA 的含量最高,达到 39.62%,比其他

磷水平下提高了 34.15% ~ 40.37%,而 SFA 和 MUFA 含量最低,分别为 28.09% 和 32.29%,分别比其他磷水平下降了 19.61% ~ 21.62% 和 7.70% ~ 10.34%。

表 3 不同磷水平下莱茵衣藻油的脂肪酸组成及含量

脂肪酸	0P	1/8P	1/4P	2/4P	4/4P	5/4P
C14:0	0.50 ± 0.03a	0.26 ± 0.01b	0.27 ± 0.00b	0.27 ± 0.00b	0.29 ± 0.01b	0.29 ± 0.01b
C14:1	0.50 ± 0.05a	0.28 ± 0.01b	0.31 ± 0.01b	0.27 ± 0.00b	0.30 ± 0.03b	0.33 ± 0.01b
C16:0	23.85 ± 1.76b	30.34 ± 1.24a	29.85 ± 0.00a	29.91 ± 0.05a	30.00 ± 0.37a	30.91 ± 0.39a
C16:1	6.26 ± 0.01a	5.21 ± 0.02d	5.47 ± 0.01c	5.57 ± 0.00bc	5.61 ± 0.06b	5.65 ± 0.06b
C18:0	3.74 ± 0.10c	5.06 ± 0.03a	4.98 ± 0.00a	4.76 ± 0.01b	4.66 ± 0.03b	4.64 ± 0.02b
C18:1	25.53 ± 0.60b	29.50 ± 0.13a	30.24 ± 0.15a	29.94 ± 0.06a	29.61 ± 0.22a	29.95 ± 0.33a
C18:2	18.74 ± 0.45a	15.77 ± 0.63b	15.42 ± 0.00b	15.56 ± 0.07b	15.50 ± 0.30b	14.80 ± 0.38b
C18:3	20.88 ± 0.73a	13.58 ± 0.44b	13.47 ± 0.00b	13.72 ± 0.04b	14.04 ± 0.28b	13.43 ± 0.43b
SFA	28.09 ± 1.84b	35.66 ± 1.22a	35.09 ± 0.00a	34.94 ± 0.06a	34.95 ± 0.39a	35.84 ± 0.43a
MUFA	32.29 ± 0.66b	34.99 ± 0.15a	36.02 ± 0.15a	35.78 ± 0.05a	35.52 ± 0.19a	35.93 ± 0.39a
PUFA	39.62 ± 1.18a	29.35 ± 1.06b	28.89 ± 0.00b	29.28 ± 0.12b	29.53 ± 0.58b	28.23 ± 0.81b

注:SFA. 饱和脂肪酸;MUFA. 单不饱和脂肪酸;PUFA. 多不饱和脂肪酸;同行不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

上述结果表明,培养基中无磷营养时会显著促进莱茵衣藻 PUFA 的积累,这可能是因为藻细胞在缺少磷源的情况下产生的应激反应,导致 PUFA 的合成,这在其他研究中也得到了证实,如:Su 等^[34]研究发现,磷限制条件下可提高紫球藻 $\Delta 6$ 脱氢酶的活性,促进 C16:0 转化为 C18:2,从而积累更多的 PUFA;Suzuki 等^[35]研究表明,磷胁迫可显著促进微藻 *Koliella antarctica* PUFA 的积累,氮磷同时胁迫 5 d 后,PUFA 含量显著增加。

2.5 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻中可溶性糖含量的影响

不同磷水平下莱茵衣藻中可溶性糖含量和产率如图 4 所示。

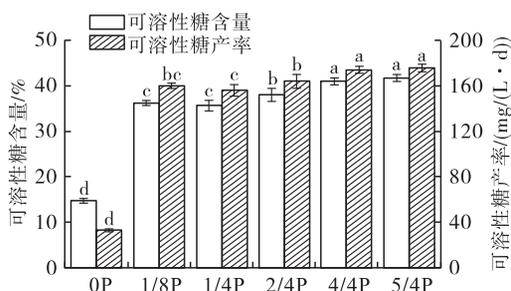


图 4 不同磷水平下莱茵衣藻中可溶性糖含量和产率

由图 4 可知,随着培养基中磷水平的增加,莱茵衣藻中可溶性糖含量和产率呈上升趋势。培养 5 d 时,5/4P 水平下莱茵衣藻中的可溶性糖含量和产率最高,分别达到 41.66% 和 175.52 mg/(L·d),与 0P 水平下相比分别提高 1.82 倍和 4.29 倍,与正常磷水平 4/4P 时相比分别提高 1.71% 和 0.92%。说

明在高碳低氮条件下降低培养基磷水平不利于莱茵衣藻可溶性糖的积累,这可能是由于磷胁迫会使莱茵衣藻将更多的碳源和营养盐用于合成油脂以抵御胁迫环境,导致藻细胞内部碳源不足以合成更多的可溶性糖,或是磷胁迫下会导致碳水化合物的分解代谢来促进脂质的合成^[36-37]。但也有研究指出,营养盐的匮乏致使藻细胞处于饥饿状态,会导致多糖的累积^[38],如螺旋藻在氮磷限制条件下会积累大量糖类^[39],并且磷源限制程度越严重,多糖含量越高,这可能是不同藻株的差异性导致的。

2.6 高碳低氮条件下培养基中磷水平对莱茵衣藻中可溶性蛋白含量的影响

不同磷水平下莱茵衣藻中可溶性蛋白含量和产率如图 5 所示。

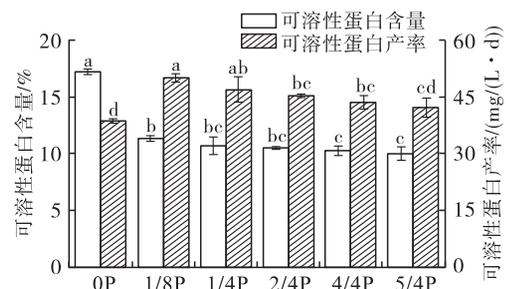


图 5 不同磷水平下莱茵衣藻中可溶性蛋白含量和产率

由图 5 可知,与可溶性糖含量变化趋势相反,随着培养基中磷水平的增加,莱茵衣藻中可溶性蛋白含量呈下降趋势。在 0P 时莱茵衣藻的可溶性蛋白含量最高,达到了 17.14%,分别比正常磷水平 4/4P 和 5/4P 时提高 67.56% 和 71.90%,但由于 0P 时较

低的生物量,可溶性蛋白产率趋势与生物量和油脂产率情况相同,均呈先增加后降低的趋势,0P时可溶性蛋白产率最低,1/8P时可溶性蛋白产率最高,达到49.84 mg/(L·d),比0P时提高了29.41%。上述结果表明,在高碳低氮条件下,适当降低培养基中磷水平可促进莱茵衣藻可溶性蛋白的积累,当培养基完全不添加磷源时,可显著促进可溶性蛋白的积累。这可能是由于磷胁迫可诱导戊糖磷酸途径同时抑制卡尔文循环,从而促进藻细胞中蛋白质的合成与积累^[40]。Akgül^[41]、Hamouda^[42]等研究表明,磷胁迫可促进栅藻蛋白质的积累,最高可达34.68%~49.59%,同时获得较高的生物量,与本研究结果一致。

3 结论

在高碳低氮条件下,适当降低培养基中磷水平可进一步促进莱茵衣藻生长和油脂合成,同步提高其生物量和油脂含量,同时积累较高的可溶性糖和可溶性蛋白。另外,在高碳低氮条件下培养基中添加磷营养与不添加磷营养对莱茵衣藻油中各脂肪酸组分含量的影响显著,但是不同磷水平对莱茵衣藻油中脂肪酸各组分含量的影响不明显。

参考文献:

- [1] UDAYAN A, PANDEY A K, SIROHI R, et al. Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals[J]. *Phytochem Rev*, 2023, 22(4): 833–860.
- [2] MAT ARON N S, KHOO K S, CHEW K W, et al. Sustainability of the four generations of biofuels: A review [J]. *Int J Energ Res*, 2020, 44(12): 9266–9282.
- [3] MOELLER E R, MILLER R, BENNING C. Molecular genetics of lipid metabolism in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[M]//WADA H, MURATA N. Lipids in photosynthesis: Essential and regulatory functions. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009: 139–155.
- [4] MASI A, LEONELLI F, SCOGNAMIGLIO V, et al. *Chlamydomonas reinhardtii*: A factory of nutraceutical and food supplements for human health [J/OL]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1185 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.3390/molecules28031185>.
- [5] LI P, WANG X, LUO Y, et al. Sustainability evaluation of microalgae biodiesel production process integrated with nutrient close-loop pathway based on emergy analysis method[J/OL]. *Bioresour Technol*, 2022, 346: 126611 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126611>.
- [6] DAI N, WANG Q, XU B, et al. Remarkable natural biological resource of algae for medical applications [J/OL]. *Front Mar Sci*, 2022, 9: 912924 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.912924>.
- [7] KHOO K S, AHMAD I, CHEW K W, et al. Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review [J/OL]. *Prog Energy Combust Sci*, 2023, 96: 101071 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2023.101071>.
- [8] KIM E J, JUNG W, LIM S, et al. Lipid production by Arctic microalga *Chlamydomonas* sp. KNF0008 at low temperatures [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 188(2): 326–337.
- [9] YAAKOB M A, MOHAMED R M S R, AL-GHEETHI A, et al. Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview [J/OL]. *Cells*, 2021, 10(2): 393 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>.
- [10] CHU W L. Strategies to enhance production of microalgal biomass and lipids for biofuel feedstock [J]. *Eur J Phycol*, 2017, 52(4): 419–437.
- [11] LI S, JI L, CHEN C, et al. Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum* [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2020, 309: 123362 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123362>.
- [12] 王梦梦, 龚正文, 陈成, 等. 湖泊蓝藻多聚磷酸盐代谢机制及功能[J]. *湖泊科学*, 2023, 35(3): 780–794.
- [13] VAN MOOY B A, FREDRICKS H F, PEDLER B E, et al. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity [J]. *Nature*, 2009, 458(7234): 69–72.
- [14] ARORA N, PATEL A, PRUTHI P A, et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorus influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 213: 79–87.
- [15] FU L, LI Q, YAN G, et al. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 121 [2023–12–23]. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1458-z>.
- [16] YUAN R, LI J, LI Y, et al. Formation mechanism of the *Microcystis aeruginosa* bloom in the water with low dissolved phosphorus [J]. *Mar Pollut Bull*, 2019, 148: 194–201.
- [17] MÜHLROTH A, WINGE P, ASSIMI A E, et al. Mechanisms of phosphorus acquisition and lipid class remodeling under P limitation in a marine microalga [J]. *Plant Physiol*, 2017, 175(4): 1543–1559.
- [18] ZHENG S, ZOU S, WANG H, et al. Reducing culture medium nitrogen supply coupled with replenishing carbon

- nutrient simultaneously enhances the biomass and lipid production of *Chlamydomonas reinhardtii* [J/OL]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1019806 [2023 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1019806>.
- [19] GORMAN D S, LEVINE R P. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965, 54(6): 1665 - 1669.
- [20] ZHENG S, HE M, JIANG J, et al. Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 201: 80 - 88.
- [21] LICHTENTHALER H K, WELLBURN A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents [J]. *Biochem Soc Trans*, 1983, 11(5): 591 - 592.
- [22] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911 - 917.
- [23] LIU K S. Preparation of fatty acid methyl esters for gas - chromatographic analysis of lipids in biological materials [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1994, 71(11): 1179 - 1187.
- [24] ZHENG S, CHEN S, ZOU S, et al. Bioremediation of *Pyropia* - processing wastewater coupled with lipid production using *Chlorella* sp. [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2021, 321: 124428 [2023 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124428>.
- [25] ZHENG S, ZOU S, FENG T, et al. Low temperature combined with high inoculum density improves α - linolenic acid production and biochemical characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2022, 348: 126746 [2023 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126746>.
- [26] 贺莹莹, 徐小琳, 王思雨, 等. 响应面法优化碱提斜生栅藻多糖的提取工艺 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2013, 31(3): 371 - 376.
- [27] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28(3): 350 - 356.
- [28] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [29] 王晓昌, 许可, 黄悦, 等. 低磷浓度下普通小球藻的生长及其叶绿素荧光特性研究 [J]. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2019, 51(1): 7 - 13.
- [30] 宋丽娜, 郑晓宇, 顾詠洁, 等. 磷浓度对海洋小球藻叶绿素荧光及生长的影响 [J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(8): 20 - 24, 50.
- [31] IWAI M, IKEDA K, SHIMOJIMA M, et al. Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type - 2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation - inducible promoter [J]. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 808 - 819.
- [32] LI X, HU H Y, GAN K, et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(14): 5494 - 5500.
- [33] WU Y H, YU Y, HU H Y. Potential biomass yield per phosphorus and lipid accumulation property of seven microalgal species [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 130: 599 - 602.
- [34] SU G, JIAO K, LI Z, et al. Phosphate limitation promotes unsaturated fatty acids and arachidonic acid biosynthesis by microalgae *Porphyridium purpureum* [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016, 39(7): 1129 - 1136.
- [35] SUZUKI H, HULATT C J, WIJFFELS R H, et al. Growth and LC - PUFA production of the cold - adapted microalga *Koliella antarctica* in photobioreactors [J]. *J Appl Phycol*, 2019, 31(2): 981 - 997.
- [36] WANG Y, YU J, WANG P, et al. Response of energy microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen and phosphorus stress [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(6): 5762 - 5770.
- [37] XING D, LI X, WANG Y, et al. The comprehensive impact of phosphorus sources on microalgae biochemical metabolism and phosphorus transformation [J/OL]. *J Water Process Eng*, 2023, 51: 103477 [2023 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103477>.
- [38] MARKOU G, NERANTZIS E. Microalgae for high - value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1532 - 1542.
- [39] 崔岩, 刘海燕, 李武阳, 等. 固定化培养中氮磷浓度对钝顶螺旋藻生长及其代谢产物和叶绿素荧光参数的影响 [J]. *西北植物学报*, 2023, 43(1): 136 - 146.
- [40] MIAO K, LI X, GUO L, et al. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with different phosphorus forms under photoautotrophic and mixotrophic modes: Biochemical component synthesis and phosphorus bioavailability appraisalment [J/OL]. *J Clean Prod*, 2022, 359: 132058 [2023 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132058>.
- [41] AKGÜL R, AKGÜL F, TÜNEY KIZILKAYA İ. Effects of different phosphorus concentrations on growth and biochemical composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2021, 51(7): 705 - 713.
- [42] HAMOUDA R A E, ABOU - EL - SOUOD G W. Influence of various concentrations of phosphorus on the antibacterial, antioxidant and bioactive components of green microalgae *Scenedesmus obliquus* [J]. *Int J Pharmacol*, 2018, 14(1): 99 - 107.