

研究报告

淀粉合成受限的莱茵衣藻的甘油酯酰基的变化

申培丽^{1,2} 王海涛^{1,2} 薛松^{1*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物工程研究组 辽宁 大连 116023)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【目的】基于突变藻株本身属性和意义出发,考察在两种常用培养方式下莱茵衣藻淀粉突变株(CC-4326)与野生型藻株(CC-137)在甘油酯中酰基随生长的变化差异,为进一步认识莱茵衣藻突变株提供参考信息。【方法】分别在柱状鼓泡式反应器和摇瓶中培养 CC-4326 和 CC-137,比较两株藻在正常培养和氮胁迫培养状态下甘油酯中酰基相对含量和其在甘油三酯(TAG)含量的差异。【结果】正常培养状态下,CC-4326 和 CC-137 中多不饱和酰基 C16:4 和 C18:3 相对含量占总酰基 45%左右,CC-4326 在两种培养方式下这两个酰基含量及变化无差别,而 CC-137 在摇瓶中培养二者相对含量增加幅度和含量均高于反应器。缺氮条件下两种藻株积累 TAG,但程度不同,CC-4326 在反应器中培养 TAG 含量达到 CC-137 的 1.5 倍,在摇瓶中培养含量与 CC-137 无显著差异,两株藻的甘油酯和 TAG 中 C18:1 含量显著增加,CC-4326 在反应器中培养 C18:1 增加幅度大于摇瓶,比摇瓶培养更快速积累 TAG。而 CC-137 在摇瓶中培养 TAG 含量与反应器接近,单不饱和酰基增加幅度却高于反应器,表明 CC-137 在摇瓶中培养比反应器更利于积累 TAG。最终,CC-4326 在光生物反应器中缺氮培养实现了 TAG 12 倍的增加。【结论】通过对淀粉合成抑制,与 CC-137 相比,缺氮光生物反应器培养条件下,CC-4326 能够实现 TAG 的高效积累。

关键词: 莱茵衣藻淀粉突变株, 反应器, 摇瓶, 酰基, 甘油三酯

Effects of starch synthesis defection on the acyl profiling of glycerides in *Chlamydomonas reinhardtii*

SHEN Pei-Li^{1,2} WANG Hai-Tao^{1,2} XUE Song^{1*}

(1. Marine Bioengineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] With the defection in starch synthesis in mutated *Chlamydomonas reinhardtii* CC-4326, the effects on the acyl profiling variation of glycerides were inspected with or without

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21576253)

***Corresponding author:** Tel: 86-411-84379069; E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

Received: November 20, 2015; **Accepted:** March 09, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 10, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21576253)

***通讯作者:** Tel: 86-411-84379069; E-mail: xuesong@dicp.ac.cn

收稿日期: 2015-11-20; 接受日期: 2016-03-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-10

nitrogen deficiency stress. It provided basic information to understand glyceride metabolism. Wild type strain CC-137 was chosen as the control. **[Methods]** Cultivations were carried out in both shake flasks and 500 mL cylindrical bubbling photobioreactors under nitrogen rich or deficient conditions. Triacylglycerols were purified by thin-layer chromatography. After transesterified with methanol, acyls were quantified by gas chromatography with an internal standard and the abundance of acyls in glycerides and triacylglycerols were compared. **[Results]** The amount of C16:4 and C18:3 in each strain accounted for about 45% of total acyls under nitrogen rich condition in both shake flask and photobioreactor cultivation. With nitrogen supply, CC-4326 showed no difference in the abundance and changing pattern of the above two major acyls in glycerides, whereas the wild type showed higher increase and higher abundance of these two acyls in shake flasks than in photobioreactors. However, without nitrogen supply, the difference in the accumulation of triacylglycerols was observed between strains. In photobioreactors, CC-4326 accumulated 0.5 fold more triacylglycerols than CC-137, whereas in shake flasks, the difference was not significant. As an indicator, C18:1 was increased significantly in glycerides and triacylglycerols of both strains. And the same as triacylglycerol accumulation, C18:1 increased faster in photobioreactors than in shake flasks. As contrast, CC-137 showed similar triacylglycerol level in the matter of weight percentage of biomass, however, with higher monounsaturated fatty acids in shake flasks than in photobioreactors. It suggested that triacylglycerols can be more effectively induced in the shake flasks than in photobioreactors. But the highest triacylglycerol accumulation achieved in CC-4326 with 12.8% in dry weight, which were cultured in the photobioreactors under nitrogen depletion. **[Conclusion]** By inhibiting the starch synthesis, comparing to CC-137, CC-4326 obtains the high efficient triacylglycerol accumulation in photobioreactors with nitrogen depletion regulation.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant, Photobioreactors, Shake flasks, Acyl chains, Triacylglycerols

甘油三酯(TAG)是生产生物柴油的原料,在胁迫环境下,微藻细胞大量积累 TAG^[1-3]。微藻具有生长速率快、光合效率高、储能物质含量高和不占耕地等独特优势,已成为第三代生产生物质能源的原料,是近年来研究的热点^[4-6]。微藻生长过程中甘油酯组成以及酰基含量都受环境因素的影响,因此不同的培养方式下藻细胞内 TAG 含量和酰基组成是不同的^[7-8]。James 等^[9]发现莱茵衣藻淀粉突变株 BAF-J5 在 25–32 °C 培养时总酰基产量达到干重的 76%,而低于 25 °C 培养,总酰基产量降低,且增加酰基去饱和度;徐继林等^[10]在静态和充气两种培养方式下对 19 株海洋微藻进行培养,发现充气培养的微藻酰基种类比静态培养的微藻多,且只改变充气条件不会影响酰基积累的趋势;Lohman^[11]和 Gardner^[12]等团队都研究了无机碳源对微藻 TAG 积累的影响,发现通入合适比例的 CO₂ 有助于增加 TAG 产量^[13]。采用摇瓶培养具有

操作简单、培养条件稳定、成本低等优点,是实验室常用的培养方式,可用于研究微藻生理生化性质以及分子机制^[10,14]。然而在大规模生产中,需要在光生物反应器中培养微藻,光生物反应器中的温度、光照和培养液成分等培养条件与摇瓶培养不同,这必然会影响到微藻甘油酯中酰基种类的相对含量,不同培养规模对细胞酰基代谢的影响也是微藻生物能源领域研究的重点。

莱茵衣藻具有全基因组序列已知、易于分子操作等优势,成为研究微藻甘油酯代谢机制的模式藻种^[15-16]。淀粉是莱茵衣藻在胁迫条件下的一个重要的储能物质,氮胁迫下莱茵衣藻 CC-137 (*mt⁻ nit1 nit2*)能积累干重 40%–80%的淀粉量^[17-18],CC-4326 是淀粉突变株,其合成淀粉的能力减弱,在高光强或氮胁迫下使得细胞内本来用于合成淀粉的碳源用于酰基合成,导致其甘油酯代谢发生了变化,如在氮胁迫条件下,淀粉突变株中 TAG

含量较野生型增加^[19-25]。莱茵衣藻不同甘油酯的酰基组成不同,在 TAG 中主要包含饱和和单不饱和酰基,例如 C16:0、C16:1 和 C18:1^[26],其中 C16:0 和 C18:1 含量可占 50%,而多不饱和酰基主要存在极性甘油酯中^[27]。甘油酯代谢的变化必然引起酰基相对含量的变化,为了详细考察这一过程,本文分别在两种常用培养方式下各自适宜生长条件中系统地比较了 CC-137 和 CC-4326 酰基相对含量的变化以及积累 TAG 的差异,为进一步认识莱茵衣藻突变株和其本身的特点提供新信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种: 实验藻种为野生型莱茵衣藻 CC-137,购于 Invitrogen GeneArt TOPO Engineering Kits;无细胞壁淀粉突变株 CC-4326,购于 Chlamydomonas Resource Center。

1.1.2 培养基及培养条件: 2 株藻均采用 Tris-Acetate-Phosphate 标准培养液^[28](TAP+N)和不加氮盐(TAP-N)直接缺氮培养。摇瓶培养:取 100 mL 培养液于 250 mL 锥形瓶中,光强 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,每天定时摇瓶 3 次;600 mL 鼓泡式玻璃反应器培养:取 500 mL 培养液于反应器中,与摇瓶相同初始接种密度加入藻种,鼓泡混匀,空气通过 0.22 μm 膜过滤,通气速率 160 mL/min,光照时通入 4% CO_2 ,初始光强 56 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,培养到 2 d 时增加到 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,3 d 时增加到 100–120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,3 d 后收获。两种培养方式下培养温度 $25\pm 2^\circ\text{C}$,光暗周期为 14 h:10 h。

1.1.3 主要试剂和仪器: C17:0-TAG 标准品,美国 Sigma-Aldrich 公司;薄层层析板(silica gel 60 F254)、色谱纯正己烷,德国 Merk KGaA 公司;其它试剂均为国产分析纯。紫外可见分光光度计 V-530,日本分光株式会社;叶绿素荧光仪,德国 Heinz Walz 有限公司;光合辐照计 P9710,德国 Gigahertz-Optik 有限公司;气相色谱仪 6803、DB-23 毛细管色谱柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm),美国安捷伦科技公司。

1.2 方法

1.2.1 酰基组分测定: 参照 Liu 等^[29]和 Wang 等^[30],取 5–10 mg 冻干藻粉,加入 5 mL 2%硫酸-甲醇,70 $^\circ\text{C}$ 反应 1 h,酰基甲酯用正己烷萃取后通过气相色谱分析。

1.2.2 TAG 含量测定: 参照 Wang 等^[31],取 10 mg 冻干藻粉,分别加入甲醇:三氯甲烷:甲酸=2:1:0.1 (体积比)和 1 mol/L KCl 和 0.2 mol/L H_3PO_4 ,振荡萃取,甘油酯溶于下层有机相中。TAG 通过薄层层析分离,展开剂为正己烷:乙酸乙酯:乙酸=70:30:1(体积比)。分离得到的 TAG 转酯化后测定其酰基成分,通过加入 C17:0-TAG 内标测定其含量。

1.2.3 数据处理: 每一株藻平行培养 3 次,每一样品平行测定 3 次取均值。SPSS 差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 淀粉合成受阻的藻株与野生型藻株相比酰基变化

2.1.1 正常培养条件下淀粉合成受阻对酰基相对含量的影响: 正常条件下(TAP+N)培养,多不饱和酰基含量增加,单不饱和酰基含量下降,此时主要是积累极性甘油酯,两株藻从 0 d 生长到 3 d 细胞密度变化如图 1 所示,2 d 从对数生长期进入稳定初期。两株藻 F_v/F_m 均维持在 0.7 以上,CC-137 在两种培养方式下培养到第 3 天时 F_v/F_m 仍在 0.75 (图 2)。两株藻 C16:0、C16:4 和 C18:3 在总酰基中所占比例较高,其中 C16:4 和 C18:3 含量随生长增大,3 d 时共占总酰基 45%左右,如表 1 所示,CC-137 在摇瓶中培养 C16:4 相对含量从 10%增加到 14%,C18:3(9,12,15)相对含量从 24%增加到 29%,分别增加 36%和 18%,而在反应器中培养两个酰基 3 d 相对含量分别增加到 12%和 24%,幅度和含量均低于摇瓶培养,且比 CC-4326 变化明显:两种培养方式下 CC-4326 中 C16:4 相对含量维持在 13%左右,C18:3(9,12,15)相对含量从 22%增加到 24%。两种培养方式下 C18:1(9)含量显著下降

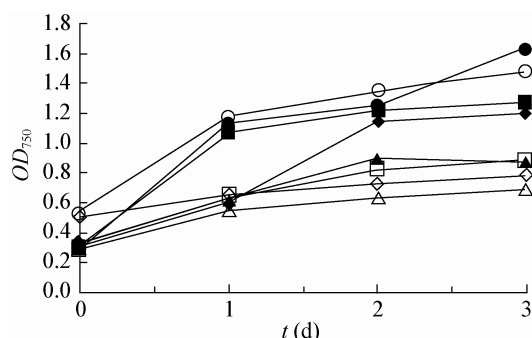


图 1 两种培养方式下 CC-4326 和 CC-137 细胞密度 (OD_{750}) 变化曲线

Figure 1 Cell density (OD_{750}) curve of the CC-4326 and CC-137 strains in two kinds of cultivation modes at the indicated culturing times

注：◆和◇：在反应器中培养 CC-4326；▲和△：在摇瓶中培养 CC-4326；●和○：在反应器中培养 CC-137；■和□：在摇瓶中培养 CC-137；◆、▲、●和■：TAP+N；◇、△、○和□：TAP-N。
Note: ◆, ◇: CC-4326 was cultured in the photobioreactors; ▲, △: CC-4326 was cultured in the shake flasks; ●, ○: CC-137 was cultured in the photobioreactors; ■, □: CC-137 was cultured in the shake flasks; ◆, ▲, ● and ■: TAP+N; ◇, △, ○ and □: TAP-N.

($P < 0.05$)，在 CC-4326 总酰基中所占比例小于 CC-137，且在反应器中培养到 3 d 相对含量下降了 2 倍，比摇瓶中培养变化明显。而 CC-137 情况相反，摇瓶培养含量下降一半，在反应器中培养含量下降 27%，幅度低于摇瓶培养。

2.1.2 缺氮条件下淀粉合成受阻的藻株与野生型藻株相比甘油酯和 TAG 中酰基变化：与 TAP+N 相

反，TAP-N 培养第 2 天 F_v/F_m 开始下降(图 2)，多不饱和酰基含量下降，TAG 积累。C16:0 和 C18:1 是 TAG 中主要酰基，因此 TAP-N 条件下二者在甘油酯中比例高于 TAP+N 培养，C18:1 含量变化尤其明显，在甘油酯和 TAG 中显著增加。CC-4326 在反应器中培养 C16:0 和 C18:1 共占总酰基 50%，在摇瓶中只有 45%，而 CC-137 与 CC-4326 恰恰相反，在摇瓶中培养占到 50%。两种培养方式下 CC-4326 的 TAG 中这两个酰基共占 60%，CC-137 在摇瓶中培养二者共占到 50%，如表 2 所示。相应的甘油酯中 C16:4 和 C18:3 含量比正常培养明显下降，CC-4326 和 CC-137 在反应器中培养到第 3 天时二者比例均共占 26%，摇瓶中培养时在 CC-4326 中占 28%，在 CC-137 中只占 22%。

比较两种培养方式下两株藻中这 4 个酰基在甘油酯中具体变化，CC-4326 在反应器中培养，C16:0 从 19% 增加到 30%，增加了 53%；C18:1(9) 从 5% 增加到 14%，增加 2.8 倍，两种酰基增加幅度均大于摇瓶培养；TAG 中 C16:0 和 C18:1(9) 所占比例明显高于甘油酯中，反应器培养 C18:1(9) 增加 2 倍，幅度大于摇瓶培养，而 C16:0 变化不明显。相应的 C16:4 和 C18:3 在总酰基中比例下降幅度也大于摇瓶培养：C16:4 从 14% 下降到 6%，下降一半多，C18:3(9,12,15) 从 25% 下降到 15%，下降

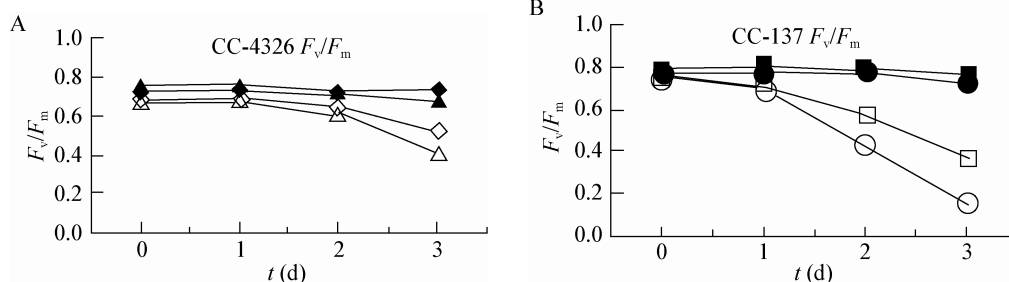


图 2 两种培养方式下 CC-4326 (A) 和 CC-137 (B) 叶绿素荧光 (F_v/F_m) 变化曲线

Figure 2 Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) curve of the CC-4326 (A) and CC-137 (B) strains in two kinds of cultivation modes at the indicated culturing times

注：◆和◇：在反应器中培养 CC-4326；▲和△：在摇瓶中培养 CC-4326；●和○：在反应器中培养 CC-137；■和□：在摇瓶中培养 CC-137；◆、▲、●和■：TAP+N；◇、△、○和□：TAP-N。

Note: ◆, ◇: CC-4326 was cultured in the photobioreactors; ▲, △: CC-4326 was cultured in the shake flasks; ●, ○: CC-137 was cultured in the photobioreactors; ■, □: CC-137 was cultured in the shake flasks; ◆, ▲, ● and ■: TAP+N; ◇, △, ○ and □: TAP-N.

表 1 CC-4326 和 CC-137 分别在反应器和摇瓶中 TAP+N 培养 0 d 和 3 d 甘油酯中酰基相对含量
 Table 1 The total acyl profiles of the CC-4326 and CC-137 strains in the photobioreactor and shake flask cultivation respectively under TAP+N at 0 d and 3 d ($\bar{x} \pm s$, %)

组分名 Composition	藻株 Strains	0 d	3 d	
			反应器 Photobioreactors	摇瓶 Shake flasks
C16:0	4326	20.95±2.98	18.24±0.86	18.78±0.15
	137	15.80±0.33	15.75±0.85	17.19±0.67
C16:1(7)	4326	6.82±0.60	8.34±1.11	7.89±0.26
	137	4.10±1.33	7.19±1.34	6.28±0.89
C16:1(9)	4326	1.55±0.18	0.85±0.00	1.51±0.11
	137	0.00	0.00	0.00
C16:1(3t)	4326	2.35±0.09	6.55±1.42	2.11±0.12
	137	2.97±1.87	2.33±0.06	3.56±0.57
C16:2(7,10)	4326	1.24±0.18	1.02±0.10	1.55±0.14
	137	1.05±0.11	1.71±0.07	1.19±0.11
C16:3(7,10,13)	4326	1.76±0.27	1.67±0.06	1.67±0.23
	137	0.68±0.95	1.24±0.42	1.33±0.07
C16:4(4,7,10,13)	4326	12.62±2.11	13.79±1.20	13.07±0.10
	137	10.45±1.42	12.98±0.08	14.19±0.25
C18:0	4326	2.37±0.12	3.16±0.69	2.77±0.35
	137	3.63±1.72	2.56±0.44	2.45±0.98
C18:1(9)	4326	7.51±1.34	2.77±0.66	4.56±1.10
	137	14.91±3.19	10.81±2.52	7.08±1.43
C18:1(11)	4326	3.93±0.59	7.17±1.41	3.74±0.06
	137	2.70±0.20	3.38±0.04	3.30±0.21
C18:2(9,12)	4326	8.81±0.09	4.28±0.26	8.56±0.85
	137	15.32±2.23	11.87±1.91	8.61±0.72
C18:3(5,9,12)	4326	5.30±0.21	4.38±0.22	6.62±1.03
	137	3.31±0.69	3.63±0.07	4.16±0.25
C18:3(9,12,15)	4326	22.48±2.42	25.25±1.72	24.77±0.28
	137	24.18±2.72	24.48±0.00	28.55±1.29
C18:4(5,9,12,15)	4326	2.36±0.21	3.09±0.23	2.45±0.02
	137	0.87±1.23	2.07±0.28	2.63±0.15

表2 CC-4326 和 CC-137 分别在反应器和摇瓶中 TAP-N 培养 0 d 和 3 d 甘油酯以及 TAG 中酰基相对含量
Table 2 The acyl profiles of glycerides and TAGs of the CC-4326 and CC-137 strains in the photobioreactor and shake flask cultivation respectively under TAP-N at 0 d and 3 d ($\bar{x} \pm s$, %)

组分名 Composition	藻株 Strains	甘油酯 Glycerides			TAG Triacylglycerols		
		0 d	3 d 反应器	3 d 摇瓶	0 d	3 d 反应器	3 d 摇瓶
			Photobioreactors at 3 d	Shake flasks at 3 d		Photobioreactors at 3 d	Shake flasks at 3 d
C16:0	4326	19.10±0.36	29.61±0.22	27.46±1.03	30.48±0.28	33.15±0.14	34.69±0.12
	137	23.18±0.67	25.05±0.16	31.26±0.94	32.95±0.25	30.31±2.23	33.69±1.71
C16:1(7)	4326	7.93±2.17	1.52±0.13	3.79±1.80	2.13±0.12	2.47±0.03	1.99±0.03
	137	6.40±0.89	1.39±0.64	1.55±0.26	0.64±0.22	1.52±0.33	1.66±0.63
C16:1(9)	4326	1.38±0.05	2.00±0.33	1.76±0.08		0.43±0.01	
	137	0.59±0.00	2.64±0.04	1.40±0.31		2.54±0.24	1.89±0.38
C16:1(3t)	4326	2.24±0.24	1.21±0.17	2.00±1.14	1.22±0.16	0.83±0.01	0.98±0.02
	137	1.25±0.57	1.61±1.46	0.61±0.06	0.62±0.10	0.52±0.03	0.35±0.13
C16:2(7,10)	4326	1.40±0.04	0.40±0.07	0.75±0.06		0.34±0.01	0.44±0.03
	137	3.36±0.11	0.53±0.04	1.39±0.38	0.90±0.46	1.47±0.07	0.88±0.21
C16:3(7,10,13)	4326	1.90±0.08	2.28±0.01	2.19±0.28	1.24±0.09	1.38±0.06	1.40±0.05
	137	1.56±0.07	3.86±0.01	2.11±0.04	0.62±0.15	1.70±0.57	1.47±0.15
C16:4(4,7,10,13)	4326	13.65±0.65	5.61±0.56	7.46±0.47	4.72±0.38	3.32±0.14	3.04±0.21
	137	10.85±0.25	5.64±0.30	4.88±0.80	5.62±0.41	5.73±0.50	2.63±0.81
C18:0	4326	2.59±0.19	3.11±0.21	3.34±0.86	10.23±1.52	3.65±0.04	4.49±0.15
	137	3.75±0.98	2.77±0.22	3.50±0.18	8.84±0.66	4.37±1.16	5.18±0.13
C18:1(9)	4326	5.34±1.71	13.99±0.15	12.50±1.09	10.33±0.41	20.39±0.19	16.80±0.22
	137	1.95±1.43	14.59±0.66	13.35±2.70	1.81±0.25	10.50±0.03	19.43±2.10
C18:1(11)	4326	3.60±0.12	5.85±0.46	5.34±0.07	6.06±0.46	6.42±0.03	8.26±0.04
	137	3.20±0.21	6.70±1.17	4.98±0.21	2.25±0.20	7.93±0.26	6.17±0.28
C18:2(9,12)	4326	7.93±1.34	12.85±0.65	10.62±2.05	8.79±0.13	13.25±0.07	13.43±0.14
	137	18.26±0.72	13.86±0.15	15.79±0.22	13.09±0.41	14.54±0.23	14.21±0.70
C18:3(5,9,12)	4326	5.62±0.24	5.21±0.25	4.68±0.37	6.92±0.40	4.78±0.06	4.49±0.06
	137	6.40±0.25	4.71±0.04	5.60±0.14	4.35±0.18	5.89±0.56	4.96±0.73
C18:3(9,12,15)	4326	24.80±0.86	15.04±1.02	16.66±0.21	14.25±0.24	8.34±0.03	8.74±0.03
	137	17.56±1.29	15.34±1.11	11.47±0.83	10.14±0.32	11.72±1.64	6.53±1.31
C18:4(5,9,12,15)	4326	2.56±0.08	1.30±0.13	1.48±0.13	3.63±0.30	1.26±0.02	1.25±0.03
	137	1.72±0.15	1.37±0.06	0.90±0.07	0.77±0.37	1.26±0.27	0.95±0.38

41%; 而 TAG 中 C16:4 含量在 3%–5%, 变化不大, 但 C18:3 含量下降近一半, 两种培养方式下变化无差别。综上说明 CC-4326 在反应器中培养酰基比例变化幅度大于摇瓶, 更利于中性脂积累。

对于 CC-137, 主要储能物质是淀粉, 在胁迫条件下也会积累 TAG, 只是少量, 在用 CC-137 研究油脂积累时, C16:0 在摇瓶中培养增加幅度要大于反应器, 从 23% 增加到 31%, 增加 35%; C18:1(9) 含量在两种培养方式下变化幅度类似, 相对含量显著增加, 在甘油酯中均增加 7 倍; 在 TAG 中变化更明显, 摇瓶培养可增加 11 倍, 反应器培养却只有 6 倍, 只是摇瓶中变化一半。C18:1 作为 TAG 的特征脂肪酸, 其含量的增加可以代表 TAG 积累情况。CC-137 从 0 d 生长到 3 d, 在摇瓶中培养时 C18:1 变化比在反应器中更加显著。两种培养方式下甘油酯中的 C16:4 分别从 11% 下降到 6% 和 5%, 下降 2 倍左右, 摇瓶培养时在 TAG 中也下降 2 倍, 反应器变化不大; 而 C18:3(9,12,15) 在摇瓶中培养从 18% 下降到 11%, 下降 35%, 在 TAG 中也下降 35%, 幅度均大于反应器中培养。因此基于这 4 个酰基在甘油酯和 TAG 中比例变化可以看出 CC-137 在摇瓶中培养比在反应器中培养更利于中性脂积累, 与 CC-4326 情况截然不同, 而在反应器中培养可能更倾向于积累淀粉。

接下来对两株藻在两种培养方式下 TAP-N 培养 3 d 时在甘油酯中酰基相对含量与 TAP+N 时进行比较: CC-4326 在反应器中培养 C16:0 从 18% 增加到 30%, 增加 67%, 而摇瓶培养增量只有 42%; CC-137 在反应器中培养能从 16% 增加到 25%, 在摇瓶中培养则能从 17% 增加到 31%, 分别增加 56% 和 82%; 两株藻甘油酯中 C18:1(9) 比例在 TAP-N 培养时均能达到 13%–14%, 但 CC-4326 在 TAP+N 培养时含量显著低于 CC-137, CC-4326 在反应器中培养增加 5 倍, 而 CC-137 在摇瓶中培养只增加 2 倍, 因此 CC-4326 在缺氮条件下培养与正常情况相比较, C18:1(9) 相对含量增加幅度明显高过同样培养

条件下 CC-137 中的变化。

2 株藻缺氮 3 d 相比, CC-4326 在反应器中培养甘油酯中 C16:0 相对含量比 CC-137 高 20%, 但 CC-137 在摇瓶中培养含量接近 CC-4326 在反应器中培养; 两株藻中 C18:1 在甘油酯中所占比例相差不多。两种培养方式下 CC-4326 TAG 中 C16:0 含量均比 137 高, 而在反应器中培养, C18:1(9) 含量是 CC-137 两倍, 但 CC-137 在摇瓶中培养时的比例接近 CC-4326 在反应器中培养。再一次验证 TAP-N 条件下, CC-4326 在反应器中培养利于 TAG 积累, 而 CC-137 就酰基含量和变化来看, 在摇瓶中培养积累 TAG 能力优于反应器。

同时由甘油酯和 TAG 中酰基变化规律可以看出, 缺氮积累 TAG, 甘油酯中 C18:1 含量上升很大一部分得益于 TAG 中含量上升和所占比例增大; 而相应的多不饱和酰基含量也明显下降, TAG 中 C16:4 和 C18:3(9,12,15) 下降幅度大于甘油酯中。

2.2 淀粉合成受阻的藻株与野生型藻株 TAG 含量

缺氮培养与正常条件下培养相比, CC-4326 和 CC-137 在反应器条件下 TAG 含量由占细胞干重 0.9%、0.8% 分别增加到 12.8% 和 8.5%。摇瓶培养 2 株藻由 0.8%、1.3% 分别增加到 8.9% 和 7.5%。CC-4326 在两种条件下培养 TAG 含量均增加 12 倍, 且在反应器中培养含量是 CC-137 的 1.5 倍, CC-137 在两种培养方式下 TAG 占干重百分比无显著差异(图 3, * 表示差异显著, $P < 0.05$), CC-137 在反应器中培养含量能达到 CC-4326 在摇瓶中培养, 并且两株藻在摇瓶中缺氮培养 TAG 占干重百分比并无显著差异。Siaut 等^[24]研究表明在摇瓶中缺氮培养 CC-4326 与 CC-137 相比 TAG 含量(以干重计算)增加, 但差异不显著, 与本文结论相符。莱茵衣藻普遍采用高光强与缺氮双因素限制来增加淀粉突变株 TAG 含量^[19,21], 本文中只单因素氮限制下, 摇瓶培养无显著差异, 但在反应器中培养淀粉合成受阻的藻株中 TAG 含量与野生型藻株相比差异显著。

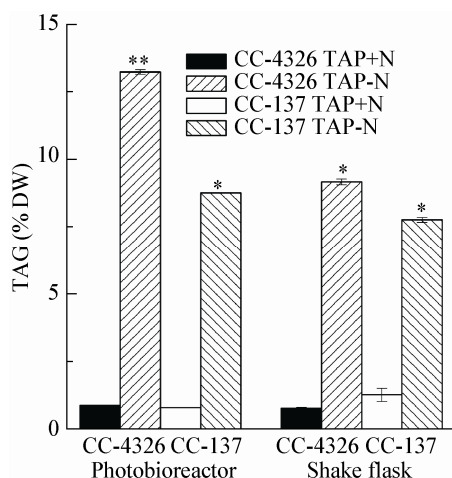


图3 CC-4326和CC-137分别在反应器和摇瓶中TAP+N和TAP-N培养时TAG含量

Figure 3 The TAG content under TAP+N and TAP-N in the photobioreactor and shake flask cultivation respectively in CC-4326 and CC-137

注：*：差异显著性。

Note: *: Statistical significance.

3 讨论

考察两株藻分别在两种常用培养方式下各自的酰基组分变化，前期实验结果表明在摇瓶中光强 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 培养藻细胞生长较好，而在反应器中通入 CO_2 ，随着细胞密度增加适当增加光强更有利于藻株生长。

CC-4326和CC-137分别在各自适宜光强下正常条件培养和缺氮培养酰基的相对百分含量发生变化，正常条件下培养 F_v/F_m 维持不变，多不饱和酰基 C16:4 和 C18:3 在总酰基中占比例较大，含量增加，CC-137 在摇瓶中培养二者相对含量及增加幅度均高于反应器培养且高于 CC-4326 中变化，CC-4326 在反应器与摇瓶中培养这两个酰基含量及变化无差别，表明淀粉合成受阻的藻株与野生型藻株不同。同时两株藻 C18:1 含量均下降 2 倍。表明正常条件下培养两株藻，淀粉合成受阻，影响糖脂积累。

氮胁迫下藻细胞基因转录很快就会有响应，对于莱茵衣藻而言，24 h 即可积累油脂，此后酰基变化比较明显，TAG 快速积累，而后速度放缓，

TAG 含量维持稳定^[24]。TAP-N 培养，2 d 藻细胞进入稳定期，3 d 胁迫增强，细胞状态受影响， F_v/F_m 下降。这个期间，两株藻油脂积累迅速，多不饱和和酰基比例明显下降，C16:0 和 C18:1 占 TAG 主要比例，因此 TAP-N 条件下二者在甘油酯中比例高于 TAP+N 培养，尤以 C18:1 含量变化明显，在甘油酯和 TAG 中比例显著增加，CC-4326 在反应器中培养比例增加 5 倍，在摇瓶中增加 3 倍，而 CC-137 在反应器和摇瓶中培养比例增加均不足 2 倍。CC-4326 在反应器中培养甘油酯和 TAG 中的 C18:1 无论是含量还是增加幅度均大于摇瓶培养，且 TAG 含量高于摇瓶培养，说明 CC-4326 在反应器中培养更利于积累 TAG。而 CC-137 在摇瓶中缺氮培养 C16:0 和 C18:1 相对含量以及随生长变化幅度比反应器高，说明 CC-137 在摇瓶中积累 TAG 能力优于反应器，CC-137 在反应器中培养碳源可能更多的流向淀粉合成。在反应器中培养 CC-4326 与 CC-137 中酰基含量变化相比，缺氮 C16:0 增加幅度略低于 CC-137，但 C18:1 增量却明显高于 CC-137，且 TAG 占干重百分比是后者 1.5 倍。而在摇瓶中只缺氮培养，CC-4326 中 TAG 含量与 CC-137 相比并无显著提高，因此需要高光强协同缺氮培养才能显著提高淀粉突变株中 TAG 含量。

4 结论

由于在研究微藻分子代谢机理时在摇瓶中培养比反应器简单、温和，而在反应器中培养受到胁迫较多，情况相对复杂，因此，在摇瓶中更容易控制；而且莱茵衣藻 CC-4326 是细胞壁缺陷株，其生长较为敏感、缓慢，因此本文基于突变藻株本身属性和意义出发，考察在两种常用培养方式下藻细胞的酰基组分变化，为进一步认识莱茵衣藻突变株提供新的参考信息。通过比较两株藻分别在两种常用培养方式下正常培养和缺氮培养时各自甘油酯中酰基相对含量变化规律和 TAG 积累，表明淀粉突变株 CC-4326 在反应器中缺氮培养酰基变化幅度和 TAG 含量均显著高于摇瓶培养，而在摇瓶中没有高光强的缺氮培养与野生型 CC-137 相比 TAG 含量没

有显著增加, CC-137 在摇瓶中培养比在反应器中培养更利于积累中性脂。

参 考 文 献

- [1] Wang ZT, Ullrich N, Joo S, et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(12): 1856-1868
- [2] Çakmak ZE, Ölmez TT, Çakmak T, et al. Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: comparative analysis of different element regimes[J]. Bioresource Technology, 2014, 155: 379-387
- [3] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(5): 405-416
- [4] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306
- [5] Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2011, 37(1): 52-68
- [6] Savaliya ML, Dhorajiya BD, Dholakiya BZ. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review[J]. Research on Chemical Intermediates, 2015, 41(2): 475-509
- [7] Basova MM. Fatty acid composition of lipids in microalgae[J]. International Journal on Algae, 2005, 7(1): 33-57
- [8] Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1989, 128(3): 219-240
- [9] James GO, Hocart CH, Hillier W, et al. Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 441-447
- [10] Xu JL, Yan XJ, Zhou CX, et al. The effects of air bubbling condition on fatty acid composition in 19 strains of marine microalgae[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2006, 19(2): 180-185 (in Chinese)
徐继林, 严小军, 周成旭, 等. 19种(株)海洋微藻脂肪酸组成及充气产生的影响[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2006, 19(2): 180-185
- [11] Lohman EJ, Gardner RD, Halverson LD, et al. Carbon partitioning in lipids synthesized by *Chlamydomonas reinhardtii* when cultured under three unique inorganic carbon regimes[J]. Algal Research, 2014, 5: 171-180
- [12] Gardner RD, Lohman E, Gerlach R, et al. Comparison of CO₂ and bicarbonate as inorganic carbon sources for triacylglycerol and starch accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(1): 87-96
- [13] Moon M, Kima CW, Park WK, et al. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2013, 2(4): 352-357
- [14] Chen GQ, Chen F. Growing phototrophic cells without light[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(9): 607-616
- [15] Nguyen HM, Baudet M, Cuiné S, et al. Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism[J]. Proteomics, 2011, 11(21): 4266-4273
- [16] Moellering ER, Benning C. RNA Interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(1): 97-106
- [17] van den Koornhuysen N, Libessart N, Delrue B, et al. Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(27): 16281-16287
- [18] Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 207-233
- [19] Li YT, Han DX, Hu GR, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 387-391
- [20] Work VH, Radakovits R, Jinkerson RE, et al. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta 7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(8): 1251-1261
- [21] Li YT, Han DX, Hu GR, et al. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(2): 258-268
- [22] Blaby IK, Glaesener AG, Mettler T, et al. Systems-level analysis of nitrogen starvation-induced modifications of carbon metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant[J]. Plant Cell, 2013, 25(11): 4305-4323
- [23] Ball S, Marianne T, Dirick L, et al. A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase[J]. Planta, 1991, 185(1): 17-26
- [24] Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(7). DOI: 10.1186/1472-6750-11-7
- [25] Zabawinski C, van Den Koornhuysen N, D'Hulst C, et al. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(3): 1069-1077
- [26] Giroud C, Gerber A, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis[J]. Plant and Cell Physiology, 1988, 29(4): 587-595
- [27] Zäuner S, Jochum W, Bigorowski T, et al. A cytochrome b₅-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(7): 856-863
- [28] Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965, 54(6): 1665-1669
- [29] Liu J, Liu YN, Wang HT, et al. Direct transesterification of fresh microalgal cells[J]. Bioresource Technology, 2015, 176: 284-287
- [30] Wang HT, Yao CH, Liu YN, et al. Identification of fatty acid biomarkers for quantification of neutral lipids in marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis*[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 27(1): 249-255
- [31] Wang Z, Benning C. *Arabidopsis thaliana* polar glycerolipid profiling by thin layer chromatography (TLC) coupled with gas-liquid chromatography (GLC)[J]. Journal of Visualized Experiments, 2011(49). DOI: 10.3791/2518