

文章编号:0254-0096(2016)08-2118-05

# 缺氮培养对小球藻碳水化合物和油脂积累的影响

朱顺妮, 王亚杰, 黄伟, 王忠铭, 许敬亮, 袁振宏

(中国科学院广州能源研究所, 可再生能源重点实验室, 广州 510640)

**摘要:** 以小球藻 *Chlorella* sp. 为研究对象, 对比其在缺氮培养和富氮培养条件下碳水化合物和油脂积累的代谢改变。结果表明, 缺氮后细胞生长受到抑制, 比生长速率从正常培养的  $1.02 \text{ d}^{-1}$  降至  $0.48 \text{ d}^{-1}$ 。细胞在缺氮第1天积累大量碳水化合物(66.9%干重), 且主要以淀粉的形式存在。同时, 缺氮诱导了油脂的积累, 但明显落后于淀粉。通过对油脂组分的分析, 发现在富氮条件下油脂的主要成分为糖脂, 占总脂的51%, 而缺氮后中性脂成为主要油脂组分, 占总脂的87%。从原料品质角度, 缺氮小球藻更适合生物乙醇和生物柴油的生产。

**关键词:** 小球藻; 缺氮; 碳水化合物; 淀粉; 油脂; 中性脂

**中图分类号:** Q93; TK6 **文献标识码:** A

## 0 引言

由于生长速度快、光合效率高、生物质产量大、富含高能物质(淀粉、油脂)等特点, 微藻作为生物燃料的潜在原料受到广泛关注<sup>[1,2]</sup>。通常, 在有利于生长的条件下, 微藻主要合成蛋白质、细胞壁碳水化合物和膜脂, 而在一定的环境压力下(如高光、缺氮), 许多微藻减慢甚至停止细胞分裂, 转而启动能量储存物的合成<sup>[3-5]</sup>。但在这个过程中能量储存物质的积累模式还知之甚少。

小球藻既能积累大量淀粉<sup>[6,7]</sup>, 又能积累大量油脂<sup>[8]</sup>, 可用来生产生物乙醇和生物柴油, 同时还能用于食品、保健品等生产领域, 具有广阔的应用前景。本文研究缺氮培养对小球藻碳水化合物和油脂积累的影响, 并以正常培养条件作为对照。研究结果有助于了解小球藻的光合碳分配以及评价其生产生物乙醇和生物柴油的适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养条件

小球藻(*Chlorella* sp.)保存在BG11培养基中。反应器采用柱状玻璃管(装液量为1L), 培养温度约25℃, 24h连续光照, 光照强度为  $150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,

在反应器底部持续通入富加  $\text{CO}_2$ (1%, v/v)的压缩空气。

### 1.2 实验设计

将种子液在BG11培养基中通气培养4d至对数生长期后, 分别接种至富氮培养基(BG11)和缺氮培养基(BG11-N)中, 初始  $\text{OD}_{750}$  约为0.6, 每组实验设3个平行, 连续培养10d, 在第0、1、2、4、6、10天取样。

### 1.3 生物量测定

取10~20 mL藻液抽滤, 于80℃烘箱烘至恒重, 冷却后称重。

比生长速率( $\mu$ )的计算公式如式(1)所示。

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

式中,  $X_2$ ——时间  $t_2$  时的干重浓度, g/L;  $X_1$ ——时间  $t_1$  时的干重浓度, g/L;  $t$ ——时间, d。

### 1.4 碳水化合物和淀粉的测定

冻干的藻粉加入玻璃珠振荡破碎, 总碳水化合物采用苯酚-硫酸法分析<sup>[9]</sup>。淀粉测定参照文献[6]。

### 1.5 总脂含量测定

总脂的提取参照文献[10], 提取出来的总脂用  $\text{N}_2$  吹干后称重。

收稿日期: 2014-07-23

基金项目: 国家自然科学基金(31100189); 国家科技支撑计划(2011BAD14B03); 国家高技术研究发展(863)计划(2013AA065803)

通信作者: 袁振宏(1953—), 男, 博士、研究员, 主要从事生物质能源方面的研究。yuanzh@ms.giec.ac.cn

## 1.6 脂肪组分的分级提取

总脂通过固相萃取进一步分成中性脂(NL)、糖脂(GL)和磷脂(PL),提取方法参照文献[11]。Sep-Pak 硅胶柱用氯仿活化后加入一定量的总脂,依次加入氯仿、丙酮和甲醇分别收获 NL、GL 和 PL。每个油脂组分用 N<sub>2</sub>吹干后称重。

## 1.7 脂肪酸的测定

藻粉中加入 2.5 mL 含 2% 硫酸的甲醇溶液, 80 °C 下搅拌加热 2.5 h 完成脂肪酸的甲酯化。样品冷却至室温后加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液和 1 mL 正己烷,振荡后静置分层,通过无水硫酸钠过滤,加入正十七烷酸甲酯作为内标,定容至 1 mL。脂肪酸甲酯利用岛津 GC2010 气相色谱进行定量分析,检测器为 FID。升温程序为: 195 °C 保持 12 min,以 10 °C/min 升温至 230 °C,再保持 15 min。色谱柱为: RTX WAX,厚度 0.25 μm,长度 30 m,内径 0.25 μm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 缺氮对细胞生长的影响

小球藻细胞在不同培养条件下的生长曲线如图 1 所示。小球藻初始浓度为 0.2 g/L,在富氮培养基中生长迅速,到第 4 天时生物量已达到 2.3 g/L,之后增长放缓,第 10 天生物量达到 3.1 g/L,生物量总共增长了 15.5 倍。细胞比生长速率为 1.02 d<sup>-1</sup>。而当细胞处于缺氮培养时,细胞只在前 2 天有适度增长,从 0.27 g/L 提高到 0.56 g/L,之后趋于平稳状态,到第 10 天生物量为 0.70 g/L,生物量总共增长 2.6 倍。细胞比生长速率为 0.48 d<sup>-1</sup>。结果显示,氮源

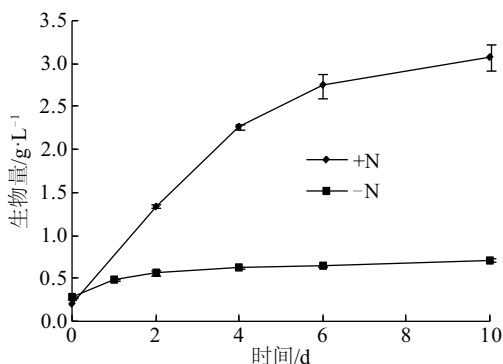


图1 小球藻在富氮培养条件(+N)和缺氮培养条件(-N)下的生长曲线

Fig. 1 Cell growth curves of *Chlorella* sp. under N-repletion (+N) and N-depletion (-N) conditions

是维持细胞生长和繁殖的重要营养元素,氮源的存在能强烈刺激细胞的生长和分裂,而缺氮几乎使细胞停止生长。

### 2.2 缺氮对碳水化合物和淀粉的影响

在富氮培养条件下,碳水化合物的含量在前 2 天内从占干重的 40.5%降至 24.1%,到第 4 天又升至 45.9%(图 2)。起初碳水化合物含量下降可能是由于细胞的快速分裂造成的。当缺氮后,碳水化合物含量在第 1 天快速升至 66.9%,第 2 天降至 54.0%,之后趋于平缓。淀粉对缺氮的响应与碳水化合物相似(图 2)。在正常培养条件下,淀粉在一定范围内波动(4.5%~9.7%),而在缺氮培养条件下,仅第 1 天内淀粉含量从 7.6%急剧升至峰值 43.4%,之后逐渐下降。与碳水化合物不同,在正常条件下细胞的淀粉含量极低,而缺氮后增长了 6 倍,增幅极大。值得注意的是:不论碳水化合物还是淀粉在缺氮时都有一个先上升再降低的过程,这与 Recht 等<sup>[12]</sup>和姚长洪等<sup>[13]</sup>的研究一致。汪 靓等<sup>[14]</sup>认为大多数藻在正常和轻微压力条件下富含碳水化合物作为光合作用的主要产物。但有些藻如 *Nannochloropsis* sp. 在缺氮条件下并不积累碳水化合物。有些藻如硅藻虽然积累碳水化合物,但并不积累淀粉。

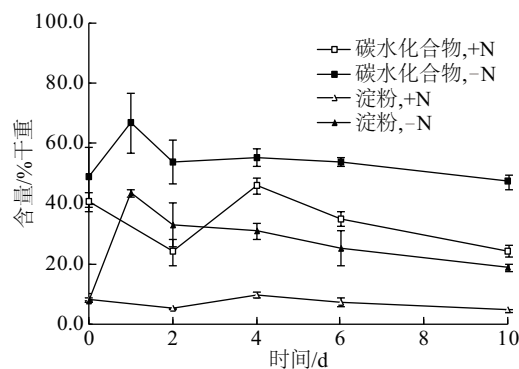


图2 小球藻在富氮(+N)和缺氮(-N)条件下积累碳水化合物和淀粉的变化曲线

Fig. 2 Variations of carbohydrate and starch in the cultures of *Chlorella* sp. under N-repletion(+N) and N-depletion(-N) conditions

图 3 是小球藻在不同条件下淀粉占碳水化合物的百分比。在富氮条件下淀粉占碳水化合物的百分比基本保持在约 20%,而缺氮 1 d 后快速升至 64.5%,第 2 天达到最高比例 66.7%,之后逐渐下降

至 39.4%。该结果表明,缺氮快速启动了淀粉的积累,使碳水化合物含量随之提高。也就是说,淀粉是小球藻主要储存的碳水化合物,这也是淀粉与碳水化合物的积累模式如此相似的原因。由于微藻不含木质素且只含少量半纤维素<sup>[15]</sup>,同时体内淀粉可通过相对廉价的淀粉酶水解,因此富含淀粉的微藻作为生物乙醇生产原料具有明显优势。

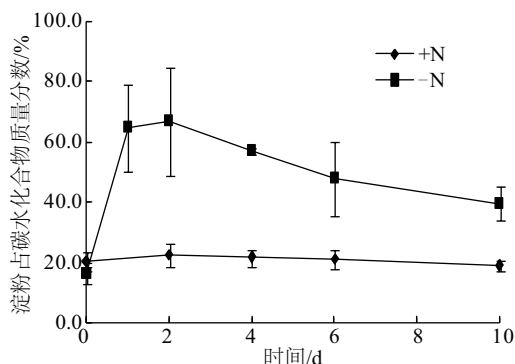


图3 小球藻在富氮(+N)和缺氮(-N)培养条件下淀粉占碳水化合物的百分比

Fig. 3 The ratio of starch to carbohydrate (expressed in percentage) of *Chlorella* sp. cultivated under N-repletion(+N) and N-depletion(-N) conditions

### 2.3 缺氮对油脂的影响

对油脂的追踪采用总脂肪酸定量法。小球藻在富氮条件下总脂肪酸含量较低,不超过干重的10%。但在缺氮条件下呈现出不同于碳水化合物和淀粉的积累模式,在整个实验期间呈持续上升趋势,从起初的6.2%升至10天后的24.5%(图4)。

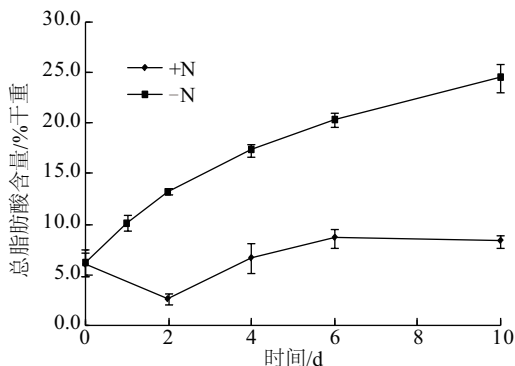


图4 小球藻在富氮(+N)和缺氮(-N)条件下积累总脂肪酸的变化曲线

Fig. 4 Variations of total fatty acids in the cultures of *Chlorella* sp. under N-repletion(+N) and N-depletion(-N) conditions

缺氮诱导了油脂的积累,但响应速度明显落后于淀粉(图2和图4),这与 Msanne 等<sup>[16]</sup>的报道相似,可能是由于淀粉合成所需的能量比油脂合成少<sup>[3]</sup>。此外,淀粉的降解可能为脂肪酸的合成提供了中间代谢物<sup>[17]</sup>。

总脂可进一步分为中性脂(NL)、糖脂(GL)和磷脂(PL)。其中糖脂和磷脂是细胞膜与细胞器膜的重要组成结构。中性脂作为能量储存物质,是生产生物柴油的理想原料。本研究发现,在富氮条件下糖脂是主要的油脂组分,约占总脂的51%(图5a)。糖脂是组成叶绿体膜以及类囊体膜的重要结构,说明此时的藻细胞光合活性较强。当细胞处于缺氮条件时,中性脂成为了主要油脂组分,约占总脂的87%,而糖脂和磷脂的比例分别降至总脂的约2%(图5b)。尤其是糖脂下降幅度非常大,说明光合作用受到抑制。

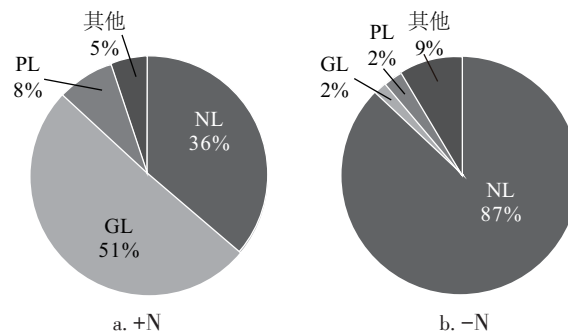


图5 小球藻在富氮(a)和缺氮(b)培养条件下中性脂(NL)、糖脂(GL)和磷脂(PL)在总脂中的分配

Fig. 5 Distribution of neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL) in total lipids extracted from N-rich (a) and N-stressed (b) *Chlorella* sp.

为了更全面地分析油脂组成,表1列出了总脂和各油脂组分的绝对含量。可看出,缺氮后虽然总脂含量增长幅度不大(约31%),但中性脂含量从占干重的9.29%增至30.75%,增幅超过2倍。此外,糖脂降解显著。Goncalves 等<sup>[18]</sup>发现 *Chlorella* UTEX29 在缺氮过程中,膜脂酰基可重新构建成三酰甘油(TAG)。Yoon 等<sup>[19]</sup>认为在压力下 PDAT 可介导膜脂的周转同时促进 TAG 的合成。本研究膜脂的降解与中性脂的增加可能存在一定联系,需进一步研究。

在生物柴油生产过程中,出于对生产工艺和油品品质的考虑,往往需要先把极性脂(糖脂和磷脂)去

除,只保留中性脂,再进行酯化和转酯化。富氮条件下,藻细胞含有大量糖脂,而中性脂含量非常少,不利于生物柴油生产。缺氮条件下中性脂占主导,极性脂含量非常少,故从油品质的角度出发,压力培养对于理想油脂的获得非常重要。但压力培养会导致生长受到抑制,因此还需更多的研究来优化培养条件,达到质与量的双重提高。

表1 小球藻总脂和各油脂组分在不同培养条件下的含量

Table 1 The contents of total lipids and lipid fractions of <i>Chlorella</i> sp. growing under different culture conditions		
油脂组分	富氮条件含量/ %干重	缺氮条件含量/ %干重
总脂	26.69±0.90	34.99±0.95
中性脂	9.29±0.67	30.75±0.50
糖脂	12.95±0.28	0.68±0.17
磷脂	1.92±0.39	0.73±0.04

### 3 结论

1)缺氮严重抑制了小球藻细胞的生长,同时启动了碳水化合物和油脂的积累,但碳水化合物的响应优先于油脂。

2)缺氮后积累的碳水化合物主要以淀粉的形式存在,油脂主要以中性脂为主,从原料品质和生产工艺来看,压力培养有利于生物乙醇和生物柴油的生产。

3)为了获得大量理想的碳水化合物和油脂,需对培养工艺进行优化。

#### [参考文献]

- [1] Hu Qiang, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 621—639.
- [2] Singh A, Nigam P S, Murphy J D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 26—34.
- [3] Li Yantao, Han Danxiang, Sommerfeld M, et al. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (*Chlorophyceae*) under nitrogen-limited conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 123—129.
- [4] 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*, DOI: 10.1186/1472-6750-11-7.
- [5] Cakmak T, Angun P, Demiray Y E, et al. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(8): 1947—1957.
- [6] Brányiková I, Maršálková B, Doucha J, et al. Microalgae—novel highly efficient starch producers[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(4): 766—776.
- [7] Dragone G, Fernandes B D, Abreu A P, et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae[J]. *Applied Energy*, 2011, 88(10): 3331—3335.
- [8] Mujtaba G, Choi Wookjin, Lee Choul-gyun, et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 279—283.
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350—356.
- [10] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, et al. 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.
- [11] Liu Jin, Huang Junchao, Sun Zheng, et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 106—110.
- [12] Recht L, Zarka A, Boussiba S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1495—1503.
- [13] Yao Changhong, Ai Jiangning, Cao Xupeng, et al. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 438—444.
- [14] Wang Liang, Li Yunguang, Sommerfeld M, et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid[J]. *Bioresource Technology*,



- 2013, 129: 289—295.
- [15] Chen Chun-Yen, Zhao Xin-Qing, Yen Hong-Wei, et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 78: 1—10.
- [16] Msanne J, Xu Di, Konda A R, et al. 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.
- [17] Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu B Z, Bibby K, et al. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels [J]. *BMC Genomics*, 2011, DOI: 10.1186/1471-2164-12-148.
- [18] Goncalves E C, Johnson J V, Rathinasabapathi B. Conversion of membrane lipid acyl groups to triacylglycerol and formation of lipid bodies upon nitrogen starvation in biofuel green algae *Chlorella* UTEX29 [J]. *Planta*, 2013, 238(5): 895—906.
- [19] Yoon Kangsup, Han Danxiang, Li Yantao, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708—3724.

## EFFECT OF NITROGEN STARVATION CULTIVATION ON CARBOHYDRATE AND LIPID ACCUMULATION IN *Chlorella* sp.

Zhu Shunni, Wang Yajie, Huang Wei, Wang Zhongming, Xu Jingliang, Yuan Zhenhong

(Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The metabolic changes of carbohydrate and oil accumulation under nitrogen starvation compared to nitrogen abundant cultivation in the *Chlorella* sp. was investigated. The results show that after nitrogen starvation, the cell growth is inhibited, and the specific growth rate is reduced from  $1.02\text{ d}^{-1}$  to  $0.48\text{ d}^{-1}$ . The cells accumulate numerous carbohydrates (66.9% of dry weight) within the first day, most of which is starch. Meanwhile nitrogen starvation triggers oil accumulation, which lags behind starch accumulation. Through lipid fraction analysis, it is found that the major lipid fraction under nitrogen repletion is glycolipids, which occupy 51% of total lipids, whereas neutral lipids become the main lipid fraction after nitrogen starvation, which occupy 87% of total lipids. From the perspective of feedstock quality, nitrogen starved *Chlorella* cells are more suitable for bioethanol and biodiesel production.

**Keywords:** *Chlorella* sp.; nitrogen starvation; carbohydrate; starch; lipid; neutral lipids