

氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻花生四烯酸含量增加的比较

童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 周志刚*

(上海海洋大学水产与生命学院,农业部水产种质资源与利用重点开放实验室,
上海高校水产养殖E-研究院,上海 201306)

摘要:以富含花生四烯酸(AA)的缺刻缘绿藻 H4301 为研究对象,探讨了不同光照强度条件下氮饥饿与磷饥饿对藻生物量、AA 及脂肪酸含量变化的影响。发现氮饥饿与磷饥饿均降低了藻类的生长速率与生物量,当在 $60 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的低光照强度下,磷饥饿时的藻类平均生长速率最低 [$0.025 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$],不足 BG-11 完全培养基中该藻生长速率的一半;氮饥饿与磷饥饿均能提高藻细胞总脂肪酸及 AA 的含量,但在低光照强度下磷饥饿的促进效果比较差;无论是完全培养基中还是饥饿处理时, $200 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的高光照强度都不利于藻细胞 AA 及多不饱和脂肪酸的合成与积累;随着饥饿时间的不断持续,AA 占总脂肪酸的百分含量逐渐增加,而亚油酸的百分含量逐渐降低,但在磷饥饿时,油酸的百分含量也增加,特别在高光照强度下,以油酸为主的单不饱和脂肪酸含量在第 27 天时占细胞干重的 5.28%,以致 AA 含量的增加没有氮饥饿时的显著。从脂肪酸成分的变化来分析,该藻在氮或磷饥饿过程中主要是从亚油酸到 γ -亚麻酸再到 20:3 ω 6 这个途径来合成并积累 AA,其中 Δ 6 去饱和酶是限速酶,而 ω 3 去饱和酶催化步骤受饥饿处理的负调控对确保 AA 的合成与积累有较大的积极作用。氮饥饿使藻细胞蛋白质合成受阻以及磷饥饿使核酸合成、糖类与能量代谢产生障碍,从而阻止藻类的生长并迫使细胞代谢流向不含氮和磷的脂肪酸合成代谢,以提高藻细胞总脂肪酸及 AA 含量。

关键词:缺刻缘绿藻;生物量;花生四烯酸(AA);氮饥饿;磷饥饿

中图分类号: S 968.41

文献标识码: A

微藻由于体积小、表面积大的特性使其比高等植物具备更高效的初级生产能力;同时又具备很强的表型可塑性、代谢灵活性,能较快地适应变化的环境,甚至是极端环境,从而造就了微藻代谢产物的多样性^[1]。早在 20 世纪 50 年代,人们就开始从微藻中获取蛋白质的研究,其典型代表有小球藻(*Chlorella*)、螺旋藻(*Spirulina*)。20 世纪 80 年代,随着对微藻种质资源的发掘、生理生化及遗传学等研究不断深入,人们试图从微藻中获得更加丰富的代谢产物。主要集中在高能源性物质如氢气^[2]、油脂^[3-4]、可发酵的糖类等^[5-6],以及营养性多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty

acids, PUFA)^[7-8],如花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、二十碳五烯酸(eicosapentemacnioc acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)等。

微藻 PUFA 的合成与积累受多种环境因素如光照强度、温度、pH、盐度、营养限制等的影响^[4,9],其中以营养盐限制如氮饥饿和磷饥饿的效果最为显著。

一般来说,氮饥饿可导致微藻蛋白质含量下降,而碳水化合物或油脂含量却上升。有些微藻如拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)^[10]、小环藻(*Cyclotella cryptica*)^[11]、*Ankistrodesmus* sp.^[12]、

收稿日期:2010-09-16 修回日期:2011-02-22

资助项目:国家自然科学基金项目(30972243);国家“八六三”高技术研究发展计划(2009AA064401);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目;上海市教育委员会科研创新项目(09ZZ167)及海洋生物学重点学科资助项目(J50701)

通讯作者:周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

缺刻缘绿藻 [*Parietochloris* (或 *Myrmecia*) *incisa*]^[13] 在氮饥饿条件下, 积累油脂; 也有些微藻选择了积累碳水化合物以代替油脂, 如杜氏藻 (*Dunaliella* spp.)^[12]。这主要是由于碳水化合物和油脂不含氮元素, 因此能在氮饥饿条件下继续合成, 从而储存光合作用产生的能量^[11], 以保护光合作用器官免受光抑制并适应氮饥饿的生长环境。

磷饥饿同样也能降低微藻蛋白质的含量、增加油脂的含量, 但效果没有氮饥饿那么显著^[14]。磷饥饿条件下, *Monodus subterraneus*^[15]、角毛藻 (*Cheatochloa* sp.)、巴夫藻 (*Pavlova lutheri*)^[16]、栅藻 (*Scenedesmus* sp.)^[17] 的脂肪酸等不含磷化合物的含量有所增加, 其中磷饥饿引起栅藻积累油脂的能力甚至超过了氮饥饿^[17]。但也有例外, 如在微绿球藻 (*Nannochloris atomus*) 和四片藻 (*Tetraselmis* sp.) 中, 磷饥饿反而导致油脂含量的降低^[16]。

氮、磷饥饿也会诱导藻细胞脂肪酸组成的变化。一般而言, 在氮饥饿条件下, 微藻能更多地积累饱和与单不饱和脂肪酸^[9,12,18], 但有的微藻如紫球藻 (*Porphyridium cruentum*)^[19] 能积累大量的长链 PUFA。磷饥饿条件下, 某些海洋微藻的 PUFA 含量往往下降^[16], 但对淡水微藻脂肪酸组成的影响较少报道。

本研究选择缺刻缘绿藻这种能合成 AA 的淡水绿藻^[20] 作为研究对象, 在氮、磷饥饿能提高该藻 AA 含量的研究^[21-22] 基础上, 考虑两种饥饿在影响物质代谢的同时皆与能量代谢存在着密切的关系, 并结合不同光照强度探讨缺刻缘绿藻在氮饥饿或磷饥饿过程中 AA 合成代谢的主要及分支途径及各脂肪酸组成的变化, 比较分析氮、磷饥饿影响 AA 合成代谢途径的关键步骤, 为缺刻缘绿藻合成 AA 的代谢调控、培养条件优化并最终实现工业化生产 AA 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

缺刻缘绿藻 H4301 购自 Culture collection of algae of Charles University of Prague (CAUP), 由暨南大学张成武教授馈赠。

将缺刻缘绿藻接种于 BG-11 培养基^[23]。采用内径为 3.5 cm 的圆柱体玻璃管 (容量约 500

mL) 作为光生物反应器, 培养温度为 25 °C, 利用 Philips 荧光灯单侧提供 24 h 连续光照并使用过滤空气充气培养。先在完全培养基及 120 μmol photons/(m² · s) 条件下培养 14 d^[21], 5 500 r/min 离心 5 min 收集藻体, 用灭菌蒸馏水洗涤 3 次以去除藻体上可能残存的营养盐并离心收集, 然后将藻细胞转入新鲜的或缺氮的 (培养基中不添加 NaNO₃, 并用柠檬酸铁代替其中的柠檬酸铁铵) 或缺磷的 (培养基中不添加 K₂HPO₄) BG-11 培养基中, 分别于 60、120、200 μmol photons/(m² · s) 光照强度下培养。分别设 3 个重复实验。

1.2 干重的测量

至实验设计的培养时间, 取 10 mL 藻液于预先干燥并称重的离心管, 离心去除培养基, 并用蒸馏水清洗 3 次, 在鼓风干燥器中于 95 °C 下烘干至恒重。称量干燥后含有藻体的离心管并减去空管的质量以得到藻体的干重。

1.3 脂肪酸组成分析

至实验设计的培养时间, 取藻液离心, 弃上清液, 然后用灭菌蒸馏水洗涤 3 次并离心收集藻泥。将藻泥先放置于 -80 °C 冰箱 (Sanyo) 中结冰, 再置于真空冷冻干燥机 (Labconco) 内干燥。

按照文献[22,24]报道的方法适当修改进行脂肪酸甲酯化反应并分析成分。取 10 mg 冷冻干燥的藻粉于酯化瓶中, 加 0.10 mg 的 17C 脂肪酸作为内标, 然后加 2 mL 含 2% 硫酸的甲醇溶液。充氮气后, 于 85 °C 水浴锅酯化反应 1 h, 便于将结合的脂肪酸分子充分解离并甲基化。酯化反应后, 向上述酯化瓶中分别加入 1 mL 去离子水和 1 mL 正己烷, 充分混匀, 然后在 5 500 r/min 下离心 10 min。收集上清液至样品瓶中, N₂ 浓缩。采用 Agilent 6890 plus 型气相色谱仪进行脂肪酸组成分析, 色谱柱为 HP-5 型毛细管柱 (30 m × 0.25 mm); 升温程序为 50 °C 保留 1 min, 25 °C/min 升温至 200 °C, 3 °C/min 升温至 230 °C, 最后保留 18 min; 分流比为 50:1; 氮气、空气、氢气的流速分别为 30、450、40 mL/min。进样量为 1 μL。

1.4 数据处理

生长速率的计算公式为 $(N_t - N_0)/t$, 其中 N_t 为培养结束后单位体积收获的藻体质量, N_0 为接种时单位体积的藻体质量, t 为培养时间。

脂肪酸质量分数的计算 (内标法): $p_i = \frac{A_{f_i}}{A_{f_s}}$

$$\times \frac{m_s}{m}$$

其中, A_i 代表被测组分的峰面积, A_s 代表内标(17C 脂肪酸)的峰面积, f_s 代表内标的相对定量校正因子, f_i 代表被测组分的相对定量校正因子, m 为样品的质量, m_s 为内标的质量。

运用 t 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 氮、磷饥饿分别对藻类生物量的影响

在 BG-11 完全培养基中, 低光照强度 [60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 下, 缺刻缘绿藻生物量的增幅小于高光照强度 [200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 与中等光照强度 [120 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 下的, 而后两者条件下藻类生物量之间几乎没有差异, 反映出在实验设计的藻类密度情况下, 120 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的中等光照强度已经不是藻类生长的限制因子; 无论在高、中等或低的光照强度下, 该藻在完全培养基中的生物量都大于同一培养时间氮饥饿与磷饥饿的, 说明氮饥饿或磷饥饿均不利于藻类生物量的增加(图 1)。

相对于完全培养基来说, 氮饥饿虽然不利于藻类生物量的增加, 但在高、中、低 3 种不同光照强度下, 藻类生物量的差异不太显著 ($P > 0.05$)。与氮饥饿相比, 磷饥饿更不利于藻类生物量的积累; 若同时再给予低光照强度, 磷饥饿时藻类生物量的增加会极显著地变慢 ($P < 0.01$) (图 1)。

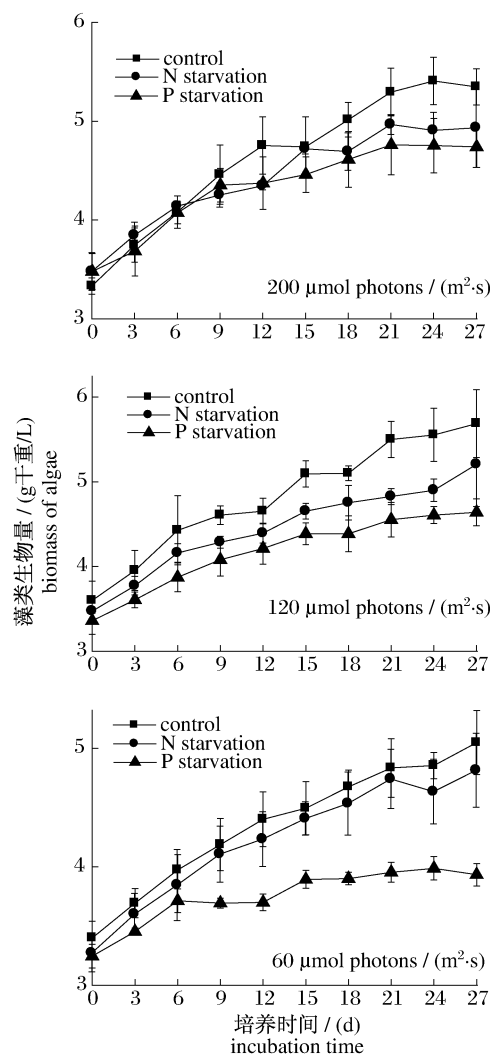


图 1 缺刻缘绿藻在氮或磷饥饿过程中生物量的变化
Fig. 1 The biomass changes of *M. incisa* cultured during the starvation of nitrogen or phosphorus

表 1 不同培养条件下, 缺刻缘绿藻生长速率及 TFA、AA、PUFA 与 MUFA 占细胞干重的比例
Tab. 1 Growth rate of *M. incisa* and its TFA, AA, PUFA and MUFA contents in dry weight under different culture conditions

	培养条件 culture condition								
	200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$			120 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$			60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$		
	C	-N	-P	C	-N	-P	C	-N	-P
生长速率/[$\text{g}/(\text{d} \cdot \text{L})$]	0.075 \pm 0.005	0.054 \pm 0.01	0.047 \pm 0.004	0.077 \pm 0.017	0.064 \pm 0.018	0.047 \pm 0.002	0.061 \pm 0.015	0.057 \pm 0.006	0.025 \pm 0.003
TFA/(% 干重)	7.60 \pm 0.772	16.86 \pm 1.335	16.94 \pm 1.431	8.18 \pm 0.356	15.94 \pm 0.041	14.23 \pm 1.110	7.393 \pm 0.196	14.39 \pm 0.514	9.78 \pm 0.273
AA/(% 干重)	1.46 \pm 0.346	5.50 \pm 0.800	3.30 \pm 0.681	1.88 \pm 0.112	7.03 \pm 0.349	4.40 \pm 0.357	1.96 \pm 0.128	6.94 \pm 0.444	3.24 \pm 0.111
PUFA/(% 干重)	4.87 \pm 0.784	10.07 \pm 0.776	9.38 \pm 1.287	5.84 \pm 0.219	11.29 \pm 0.197	9.53 \pm 0.648	5.48 \pm 0.143	10.58 \pm 0.422	7.03 \pm 0.173
MUFA/(% 干重)	1.50 \pm 0.131	4.47 \pm 0.780	5.28 \pm 0.165	1.01 \pm 0.076	2.30 \pm 0.163	2.75 \pm 0.398	0.68 \pm 0.024	1.65 \pm 0.551	1.17 \pm 0.072

注: 所有数据都是 3 次重复实验的平均值 \pm 标准差; C: 对照; -P: 磷饥饿; -N: 氮饥饿。

Notes: All the data are expressed as means \pm SE. C, control; -P, phosphate starvation; -N, nitrogen starvation.

这些结果从藻类的平均生长速率上也能得到充分的体现(表1)。在完全培养基中,低光照强度下藻类的平均生长速率是 $0.061 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$,明显低于高 [$0.075 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$]与中等 [$0.077 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$]光照强度下的;但它们都大于相应光照强度下氮或磷饥饿的藻类生长速率,致使后两者的生物量低(图1)。在相同的光照强度下,磷饥饿的藻类生长速率明显低于氮饥饿的;若在低光照强度下,磷饥饿时藻类的生长速率最低,只有 $0.025 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$,不到对照的 [$0.061 \text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$]一半(表1)。

2.2 氮、磷饥饿对藻类总脂肪酸含量的影响

氮饥饿条件下,随着培养时间的不断延长,无

论是在高、中等或低的光照强度下,缺刻缘绿藻的总脂肪酸(TFA)占细胞干重均在不断增加(图2左)。例如在中等光照强度下培养至27 d时,藻细胞TFA的量就增加了1.2倍,表明氮饥饿会引起藻类细胞积累脂肪酸,其中PUFA的量是完全培养基的1.93倍(表1)。在低光照强度下,藻类积累的TFA含量显著($P < 0.05$)低于高与中等光照强度下的(表1),表明了低光照强度不利于TFA的积累;高光照强度对PUFA的积累是不利的,却有利于单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)的积累,此种条件下MUFA的量是完全培养基的2.98倍(表1)。

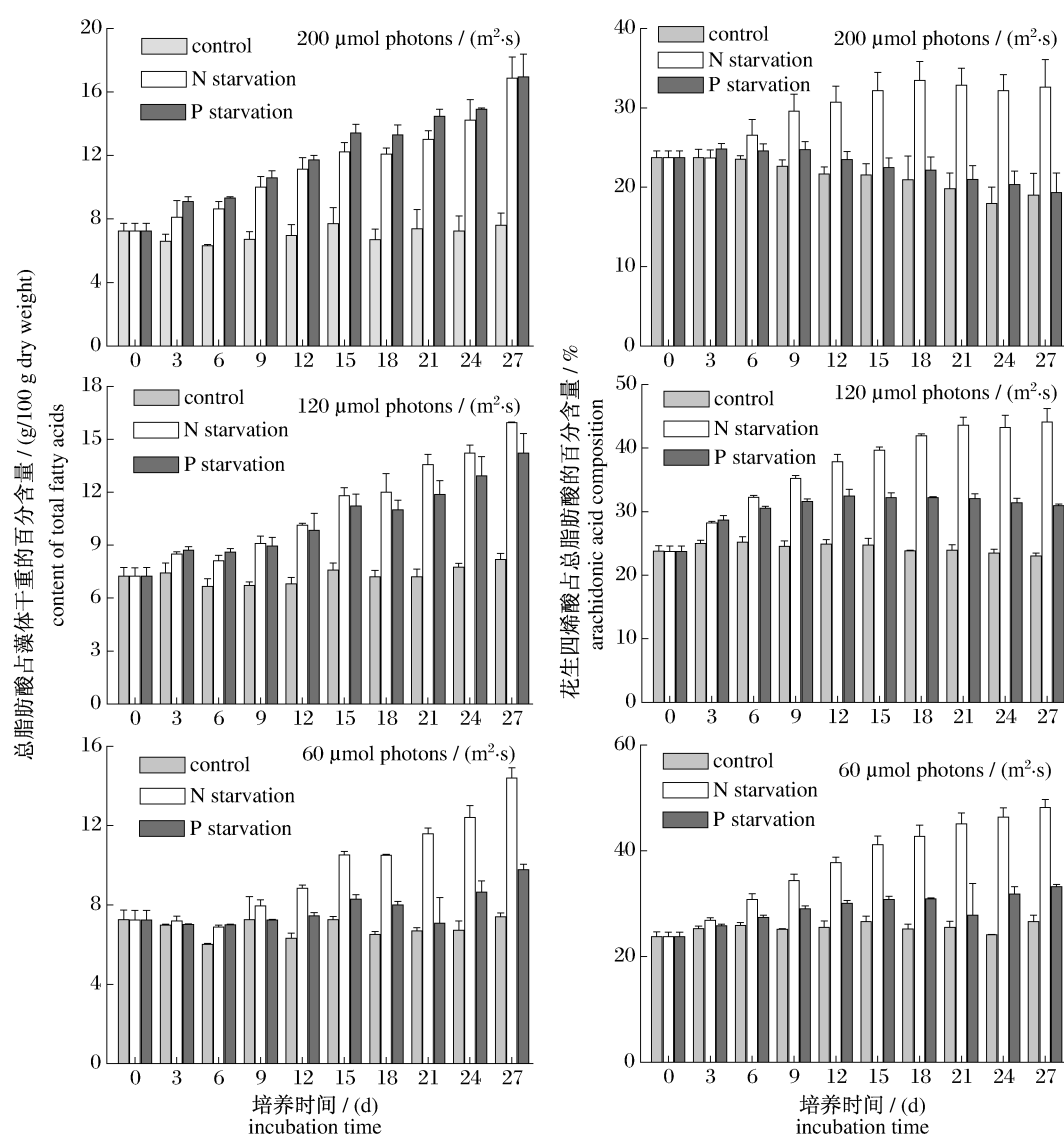


图2 缺刻缘绿藻在氮饥饿或磷饥饿过程中总脂肪酸(左)及花生四烯酸(右)含量的变化
Fig.2 Total fatty acid content(left) and arachidonic acid composition(right) in *M. incisa* during the starvation of nitrogen or phosphorus

磷饥饿时,藻类培养至 27 d,其 TFA 量在高、中等光照强度下分别提高了 1.34 倍与 97% (图 2 左),与氮饥饿的效果几乎一样;但在低光照强度下,磷饥饿对藻类 TFA 含量增加的促进效果则非常有限,只是完全培养基的 1.32 倍,远低于高与中等光照强度下(分别为 2.23 倍与 1.74 倍)。表明磷饥饿对藻类 TFA 含量增加的促进作用比氮饥饿更依赖光照强度;光照强度越强,促进的效果越明显;甚至在高光照强度时磷饥饿的促进作用还略高于氮饥饿的(表 1)。从表 1 中还可以发现,高光照强度下磷饥饿对 TFA 的促进作用得益于 MUFA 的积累,达到细胞干重的 5.28%,远大于中等及低光照强度下(分别为细胞干重的 2.75% 与 1.17%)。PUFA 的含量在高、中等光照强度下没有显著差异,不过它们(分别为细胞干重的 9.38% 与 9.53%)均显著($P < 0.05$)高于低光照强度下的 7.03% (表 1)。

2.3 氮、磷饥饿对藻类 AA 及其它脂肪酸含量的影响

氮饥饿可以诱导缺刻缘绿藻积累 AA(表 1),

其中中等与低光照强度的促进效果较好,此种情况下培养 27 d 时 AA 的含量均达到细胞干重的 7%,都高于高光照强度下的 5.5%。磷饥饿也可以引起藻细胞积累 AA(表 1),中等光照强度下培养 27 d 时,藻细胞 AA 含量占其干重的 4.4%,明显高于高、低光照强度下 3.3% 的含量。表明氮饥饿促进藻细胞合成并积累 AA 的能力比磷饥饿强;但无论是氮饥饿还是磷饥饿,高光照强度都不利于藻细胞积累 AA。

氮饥饿对于提高缺刻缘绿藻 AA 在 TFA 中百分含量的能力较强(图 2 右),预示着通过氮饥饿这种方法可以更有效地获得 AA。此促进作用随着光强的减弱而增加,且培养时间越长越有助于 AA 百分含量的提高。例如中等光照强度下,培养至第 9 天时 AA 占 TFA 的百分含量就极显著($P < 0.01$)地增加,27 d 内由 23.7% 增加到 45%;随着培养时间的延长,AA 百分含量仍呈现增加的趋势。这些结果意味着继续进行氮饥饿培养将能获得更多的 AA(图 2 右)。

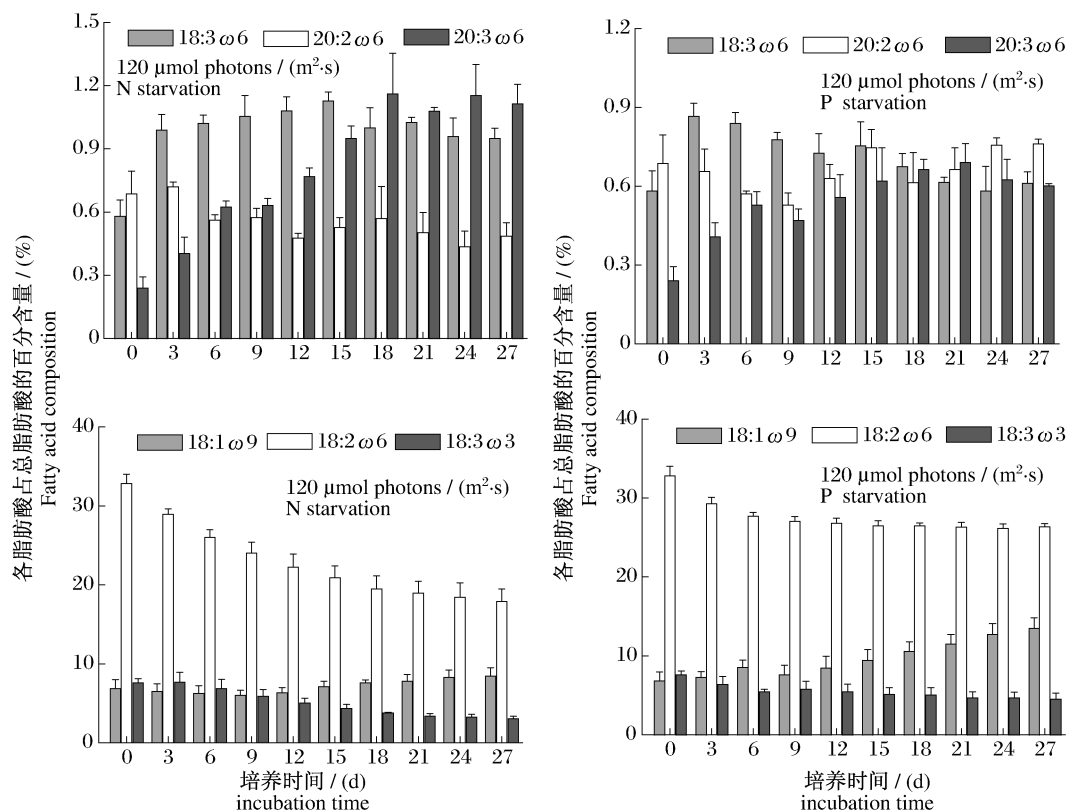


图 3 在中等光照强度下,氮饥饿(左)与磷饥饿(右)过程中,各类主要脂肪酸占总脂肪酸百分含量的变化
Fig. 3 The percentage of major fatty acid species in *M. incisa* while exposed to medium light intensity and during the course of nitrogen starvation (left) or phosphorus starvation (right)

磷饥饿对 AA 占 TFA 百分含量的促进作用就没有氮饥饿的强(图 2 右),且受光照强度的影响比较大。在中等、低光照强度下,磷饥饿能表现出一定促进作用(图 2 右);而在高光照强度下,不仅没有促进反而出现下降的趋势(图 2 右),这主要是由于 MUFA 含量(占细胞干重的 5.28%)的显著增加、而 AA 的含量(细胞干重的 3.30%)只相当于低光照强度下的一半(表 1)等原因共同引起的。

至于在藻细胞中检测到的其它各种脂肪酸,无论在高、低光照强度下,它们各自占 TFA 百分含量的变化趋势与中等光照强度下饥饿处理时的变化趋势(图 3)基本一致。依据百分含量大小,这些脂肪酸至少可以分成两大类:一类是百分含量低的,如 γ -亚麻酸(18:3 ω 6)、20:3 ω 6 和 20:2 ω 6,它们均低于总脂肪酸的 1.5%;另一类是百分含量较高的,如油酸(18:1 ω 9)、亚油酸(18:2 ω 6)和 α -亚麻酸(18:3 ω 3),均高于 3%。其中油酸与亚油酸这两个高百分含量的脂肪酸变化更引人注目。随着培养时间的延长,饥饿处理均能诱导亚油酸百分含量的逐渐降低,但氮饥饿的降低幅度更显著($P < 0.01$),从饥饿处理开始时的 34.19% 逐渐下降到第 27 天的 18.21%;油酸的百分含量在磷饥饿过程中,增加的趋势极为显著($P < 0.01$),从饥饿处理开始时的 6.8% 增加到第 27 天的 13.5%(图 3)。

3 讨论

3.1 氮或磷饥饿对缺刻缘绿藻生长的影响

氮、磷是藻类细胞生长必需的大量元素,一旦缺乏,蛋白质及核酸等物质的合成受阻,细胞分裂缓慢甚至停止^[25-26]。因此,与完全培养基的情况相比,氮饥饿或磷饥饿时,缺刻缘绿藻的平均生长速率低(表 1),从而导致低的生物量(图 1)。从微藻的培养进程来看,在培养后期,因藻类细胞的分裂与生长吸收了大量的氮与磷等元素,完全培养基的情况下也可能出现氮、磷等元素的缺乏而影响生长。不过在本实验过程中,对培养基采用国家标准的紫外分光光度法(HJ/T 346-2007)和钼酸铵分光光度法(BG 11893-89)分别跟踪测定硝酸盐氮和总磷的含量,结果表明,氮与磷等元素并非是生长的限制因子,这从图 1 的生长曲线也得到间接地反映。藻类细胞生物量的变化取

决于两个因素:其一是细胞数目,其二是藻细胞干物质。有报道^[27-28]提出在氮或磷饥饿时,藻细胞因分裂慢而体积增加;但它们能利用内源的氮和磷进行必需的生理、生化代谢,例如光合作用,以进行碳水化合物与能量的代谢及物质再分配^[29-31],本研究发现在饥饿条件下,缺刻缘绿藻细胞 AA 含量(表 1)的增加就间接说明了这一点。因此,细胞分裂缓慢及干物质的积累可能共同导致了缺刻缘绿藻生物量在饥饿过程中如图 1 的缓慢增加。

磷不仅参与碳水化合物在藻细胞不同细胞器之间的转运,更重要的是直接参与能量如 ATP 的代谢^[13,15]。因此,磷饥饿对藻类细胞生长的影响比氮饥饿更明显,从而出现了在相同处理情况下,磷饥饿时藻细胞的生物量比氮饥饿时低的现象(图 1)。磷饥饿时若给予低光照强度如本研究的 60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,可能因光合作用特别是光合磷酸化合成的 ATP 少,出现了如图 1 所示该条件下最低生物量的结果。

3.2 缺刻缘绿藻 AA 合成的代谢途径及关键步骤

利用气相色谱所知的缺刻缘绿藻在各种不同条件下的脂肪酸种类(图 3),与已报道的结果^[32]完全一致,据此,可推测该藻合成 AA 的主要代谢及各分支途径(图 4)。一般而言,藻类是以两条途径合成 AA^[33]:一条是通过图 4 中的 1 途径经 γ -亚麻酸合成 AA,另一条则是通过图 4 中的 2 途径经 20:2 ω 6 来合成 AA。根据脂肪酸的种类及已克隆到的可能在此代谢途径中起作用的各种酶基因^[34-36]来判断,在缺刻缘绿藻中这两条途径可能都存在,但 $\Delta 8$ 去饱和酶及其作用的步骤有待于进一步证实。无论在完全培养基、氮饥饿、磷饥饿的情况下,还是在高、中、低的光照强度下,该途径中 γ -亚麻酸、20:3 ω 6 和 20:2 ω 6 脂肪酸的百分含量(图 3)都比较低,说明这些种类的脂肪酸只可能作为 AA 合成代谢途径的中间产物,以确保代谢反应的顺利进行;并进一步推测与这些中间产物下游去向有关的脂肪酸延长酶、 $\Delta 5$ 及 $\Delta 8$ 去饱和酶不是 AA 合成代谢的限速酶。

氮饥饿时,AA 百分含量上升而亚油酸的百分含量下降(图 4),从 34.19% 下降到 18.21%, γ -亚麻酸在第 3 天的百分含量就迅速增加了 70%(图 3 左)(完全培养基中维持不变),说明亚

油酸被用于 γ -亚麻酸的合成,表明 $\Delta 6$ 去饱和酶是该合成途径的关键酶。之后, γ -亚麻酸的百分含量保持相对稳定(图 3 左),但由于脂肪酸延长酶的转录量增加^[35-36],使 20:3 $\omega 6$ 也逐渐从 0.24% 增加到 1.1%,从而引起 AA 百分含量的显著增加。

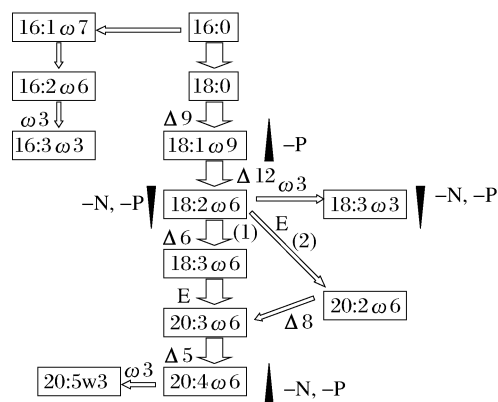


图 4 缺刻缘绿藻中 AA 的主要合成(粗箭号)及分支途径,示氮、磷饥饿的影响

实线表示已经证实的步骤,虚线表示尚未被证实的步骤。

Fig. 4 Suggested main (thick arrow) and subbranched (thin arrow) pathway of arachidonic acid synthesis in *M. incisa*, illustrating the effects of

nitrogen or phosphorus starvation on the synthesis

Full line represents the confirmed pathway, dash line represents the uncertain pathway.

在缺刻缘绿藻中,亚油酸还有另外两个流向:一是在脂肪酸延长酶作用下生成 20:2 $\omega 6$,另一个是在 $\omega 3$ 去饱和酶(也称 $\Delta 15$ 去饱和酶)作用下生成 α -亚麻酸(图 4)。

20:2 $\omega 6$ 在亚油酸百分含量下降的同时并没有上升(图 3 左),反而呈现下降的趋势,说明氮饥饿时,亚油酸没有加速流向 20:2 $\omega 6$;同时发现在完全培养基中,亚油酸含量在上升的同时,20:2 $\omega 6$ 也上升,两者成正相关;说明在氮饥饿条件下,催化亚油酸生成 20:2 $\omega 6$ 的延长酶的活力没有提高。不过,这里又衍生出另一个问题,即催化亚油酸生成 20:2 $\omega 6$ 的延长酶可能与催化 γ -亚麻酸产生 20:3 $\omega 6$ 的脂肪酸延长酶不是同一种,或即使是同一种,但对底物存在偏好性,这将有待进一步探索。总之氮饥饿时,从亚油酸经 20:2 $\omega 6$ 再合成并积累 AA 不是该藻生成 AA 的主要途径,或者,在 $\Delta 8$ 去饱和酶的存在没有被证实之前,推测 20:2 $\omega 6$ 有可能是支路上的代谢终产物。

至于亚油酸的另一个产物 α -亚麻酸,由于在脂肪酸组成分析时没有发现 α -亚麻酸的后续产物,可以推断 α -亚麻酸是亚油酸在该路径上的终产物;其百分含量在氮饥饿过程中逐渐降低,这与 $\omega 3$ 去饱和酶基因在该过程中相对转录量的下降有关^[37],从而阻止了亚油酸的分流,确保主要途径的顺利进行。因此,由亚油酸到 γ -亚麻酸再到 20:3 $\omega 6$ 是氮饥饿时缺刻缘绿藻合成并积累 AA 的主要途径。这与 BIGOGNO 等^[38]通过 ¹⁴C 标记示踪结果所推测的途径相吻合。 $\omega 3$ 去饱和酶催化步骤受氮饥饿处理的负调控反而有利于 AA 的合成与积累。

磷饥饿时,缺刻缘绿藻 AA 的百分含量快速上升并于第 12 天达到 32.5% 的峰值(图 2 右),亚油酸的百分含量在 6 d 内从 32.8% 下降到 27%(图 3 右),之后这两者均保持相对稳定,说明 $\Delta 6$ 去饱和酶也是磷饥饿引起的 AA 含量增加过程中的限速酶。作为亚油酸的一个产物, γ -亚麻酸的含量在第 3 天时增加了 50%,之后便呈现出下降的趋势,这与磷饥饿时 AA 百分含量一开始快速上升,之后逐渐平缓的趋势也一致。因此在磷饥饿时,合成 AA 的主要代谢路径与氮饥饿相同。

至于 $\Delta 6$ 去饱和酶等基因如何感受氮饥饿或磷饥饿的信号,来调控缺刻缘绿藻按照主要代谢途径以合成并积累 AA,有待进一步探讨。

3.3 氮或磷饥饿影响缺刻缘绿藻 AA 代谢途径的机理

氮饥饿与磷饥饿均能促进缺刻缘绿藻 TFA 及 AA 含量的提高(表 1 与图 2)。一般而言,细胞在矿质营养胁迫时会利用细胞内源的氮或磷等元素将代谢流转向不含这些元素化合物如中性脂的合成,以便能在环境条件好转的情况下,能快速将它们转化成膜脂这种以磷脂为主要成分的结构物质^[27,29-30]。氮饥饿时,蛋白质及酶的合成受到了抑制,这对细胞的代谢都是不利的。但有研究表明,在氮饥饿时,与脂类代谢相关酶系的活性得到了增强^[9],而且储存的中性脂和绝大部分膜脂都不含氮元素,因而有利于它们的合成与积累^[11]。磷元素在物质代谢过程中同样扮演着重要的角色,如 GTP 供给蛋白质肽链合成时所需要的能量,UDP 参与了单糖转变和多糖的合成,缺少磷将使蛋白质和糖类合成受到限制,迫使代谢

流转向脂类合成。

实际上,脂类合成不仅储存碳源而且还储存能量。多数研究^[9,39-40]证实,营养盐胁迫条件下,油脂积累的另一个重要作用便是储存光合作用过程中吸收并产生的过多能量,避免对光合器官产生光抑制的现象。本研究发现,磷饥饿时脂肪酸的积累受到光照强度的影响比较显著,表明这种饥饿处理与能量(光能)代谢的关联程度较高,而磷元素作为生物体能量通货 ATP 的重要组分可能很好地解释这个问题。因此建议在基于磷饥饿胁迫的油脂累积条件优化时应考虑光照强度这个因素。

就 AA 及 PUFA 百分含量的变化而言,氮或磷饥饿都表现出依赖光照强度的促进效应,就像拟微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)^[41]、紫球藻^[42]一样,高光照强度并不利于缺刻缘绿藻 AA 与 PUFA 的积累。高光照强度往往会导致光损伤现象,而饱和脂肪酸及 MUFA(特别是油酸)可能在减少光损伤以及保持细胞水分中起着一定的作用^[43],因而其百分含量得到了增加,但 PUFA 则相反(图 3 右,表 1)。中等、低光照强度均能提高缺刻缘绿藻 AA 的百分含量,与 SOLOVCHENKO 等^[44]报道的结果一致。这样的促进作用,磷饥饿要比氮饥饿逊色,但磷饥饿时油酸百分含量的增加比氮饥饿时的显著(图 3 右)。其中原因除上述的光照强度影响外,还可以从其他两方面来理解。首先从代谢途径来看,亚油酸的百分含量在 6 d 后的相对稳定,其反应物油酸的百分含量却较氮饥饿时增加得明显(图 3 右),而 AA 的百分含量则相反,因此可以归因于对去饱和酶的影响不同,比如磷饥饿可能促进了 $\Delta 9$ 去饱和酶活性,而对 $\Delta 6$ 去饱和酶的促进作用则可能弱于氮饥饿。另外,我们知道油酸是脂肪酸从头合成的终产物,它的去饱和作用需要如磷脂、半乳糖脂等载体^[18],而磷是它们的组分,缺少磷势必也限制了该去饱和作用的进行。因此,磷饥饿比氮饥饿更明显地促进了油酸的积累而影响 AA 百分含量的提高。

参考文献:

- [1] GEIDER R J, MACINTYRE H L, GRAZIANO L M. Responses of photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation [J]. *European Journal of*

Phycology, 1998, 33(4): 315-322.

- [2] MARIA L, GHIRARDI L Z, LEE J M, *et al.* Microalgae: a green source of renewable H₂ [J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(12): 506-511.
- [3] TSUKAHARA K, SAWAYAMA S. Liquid fuel production using microalgae [J]. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 2005, 48(5): 251-259.
- [4] HU Q, 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.
- [5] SCRAGG A H, ILLMAN A M, CARDEN A, *et al.* Growth of microalgae with increased calorific values in tubular bioreactor [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2002, 23(1): 67-73.
- [6] SPOLAORE P, JOANNIS-CASSAN C, DURAN E. Commercial applications of microalgae [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2): 87-96.
- [7] COBELAS M A, LECHADO J Z. Lipids in microalgae. A review. I. Biochemistry [J]. *Grasas y Aceites*, 1989, 40(2): 118-145.
- [8] GRIMA E M, PÉREZ J A S, CAMACHO F G, *et al.* The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification [J]. *Process Biochemistry*, 1995, 30(8): 711-719.
- [9] ROESSLER P G. Environmental control of glycerollipid metabolism in microalgae: Commercial implications and future research directions [J]. *Journal of Phycology*, 1990, 26(3): 393-399.
- [10] SUEN Y, HUBBARD J S, HOLZER G, *et al.* Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes [J]. *Journal of Phycology*, 1987, 23(2): 289-296.
- [11] SHIFRIN N S, CHISHOLM S W. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate, and light-dark cycles [J]. *Journal of Phycology*, 1981, 17(4): 374-384.
- [12] BEN-AMOTZ A, TORNABENE T G. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids [J]. *Journal of Phycology*, 1985, 21(1): 72-81.
- [13] MERZLYZAK M N, CHIVKUNOVA O B, GORELOVA O A, *et al.* Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. *Journal of*

- Phycology, 2007, 43(4):833–843.
- [14] GUERRINI F, CANGINI M, BONI L. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation [J]. Journal of Phycology, 2000, 36(5):882–890.
- [15] KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(7):696–701.
- [16] REITAN K I, RAINUZZO J R, OLSEN Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae [J]. Journal of Phycology, 1994, 30(6):972–979.
- [17] SHARKEY T D. Feedback limitation of photosynthesis and the physiological role of ribulose biphosphate carboxylase carbamylation [J]. Botanical Magazine (Tokyo) (Special Issue), 1990, 14(2):87–105.
- [18] ZHEKISHVA M, BOUSSIBA S, KHOZIN-GOLDBERG I, et al. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters [J]. Journal of Phycology, 2002, 38(2):325–331.
- [19] COHEN Z, VONSHAK A, RICHMOND A. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum* correlation to growth rate [J]. Journal of Phycology, 1998, 24(3):328–332.
- [20] WATANABE S, HIRABAYASHI S, BOUSSIBA S, et al. *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebuxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Phycological Research, 1996, 44(2):107–108.
- [21] ZHANG C W, COHEN Z, KHOZIN-GOLDBERG I, et al. Characterization of growth and arachidonic acid production of *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebuxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2002, 14(6):453–460.
- [22] 刘建国, 刘伟. 雪藻高密度连续培养中生物量和花生四烯酸的高产率 [J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5):499–508.
- [23] STANIER R Y, KUNISAWA M M, COHEN-BAZIR G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chlorococcales) [J]. The Bacteriological Review, 1971, 35(2):171–201.
- [24] COHEN Z, REUNGJICHACHAWALI M, SIANGDUNG W, et al. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis* [J]. Journal of Applied Phycology, 1993, 5(1):109–115.
- [25] BALLIN G, DOUCHA J, ZACHLEDER V. Macromolecular syntheses and the course of cell cycle events in the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under nutrient starvation; Effect of nitrogen starvation [J]. Biologia Plantarum, 1988, 20(2):81–91.
- [26] LATSON T R, REES T A V. Changes in cell composition and lipid metabolism mediated by sodium and nitrogen availability in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of Phycology, 1996, 32(3):388–393.
- [27] LATASA M, BERDALET E. Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. [J]. Journal of Plankton Research, 1994, 16(1):83–94.
- [28] MOHLIN M, WULFF A. Interaction effects of ambient UV radiation and nutrient limitation on the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* [J]. Microbial Ecology, 2009, 57(4):675–686.
- [29] HAFING I. Effect of tissue nitrogen and phosphorus quota on growth of *Porphyra yezoensis* blades in suspension cultures [J]. Hydrobiologia, 1999, 398/399(1):305–314.
- [30] SPILLER H, DIETSCH E, KESSLER E. Intracellular appearance of nitrite and nitrate in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii* [J]. Planta, 1976, 129(2):175–181.
- [31] LABRY C, DENN E EL, CHAPELLE A, et al. Competition for phosphorus between two dioflagellates: A toxic *Alexandrium minutum* and a non-toxic *Heterocapsa triquetra* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 358(2):124–135.
- [32] KHOZIN-GOLDBERG I, BIGOGNO C, SHRESTHA P, et al. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2002, 38(5):991–994.
- [33] NICHOLS B W, APPLEBY R S. The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae [J]. Phytochemistry, 1969, 8(3):1907–1915.
- [34] ISKANDAROV U, KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z. Identification and characterization of $\Delta 12$, $\Delta 6$, and $\Delta 5$ desaturases from the green microalga *Parietochloris incise* [J]. Lipids, 2010, 45

- (6):519-530.
- [35] YU S Y, LIU S C, LI C Y, *et al.* Submesoscale characteristics and transcription of a fatty acid elongase gene from a freshwater green microalga, *Myrmecia incisa* Reisingl [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(1):87-95.
- [36] ISKANDAROV U, KHOZIN-GOLDBERG I, OFIR R, *et al.* Cloning and characterization of the $\Delta 6$ polyunsaturated fatty acid elongase from the green microalga *Parietochloris incisa* [J]. Lipids, 2009, 44(6):545-554.
- [37] 李春阳, 杜道海, 于水燕, 等. 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的特性及在氮饥饿过程中相对转录量的分析 [J]. 水产学报, 2010, 34(9):1343-1353.
- [38] 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.
- [39] BÖLLING C, FIEH O. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation [J]. Plant Physiology, 2005, 139(4):1995-2005.
- [40] LU 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]. Bioresource Technology, 2010, 101(14):5494-5500.
- [41] FABREGAS J, MASEDA A, DOMINQUEZ A, *et al.* The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(1):31-35.
- [42] 温少红, 王长海. 光照和培养时间对紫球藻细胞脂肪酸含量的影响 [J]. 中国海洋药物, 2000(1):47-50.
- [43] PINCHETTI J L G, FERNANDEZ E C, DIEZ P M, *et al.* Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(4):383-389.
- [44] SOLOVCHENKO A E, KHOZIN-GOLDBERG I, DIDI-COHEN S, *et al.* Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa* [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20:245-251.

Comparison of increased arachidonic acid content in *Myrmeclia incisa* cultured during the course of nitrogen or phosphorus starvation

TONG Mu, YU Shui-yan, OUYANG Long-ling, ZHOU Zhi-gang*

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai University, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The growth rate and biomass, contents of arachidonic acid (AA) and other fatty acids in *Myrmeclia incisa* Reisigl H4301, a freshwater green microalga rich in AA, were comparatively studied while cultured between nitrogen and phosphorus starvation under different light intensities. It was found that either nitrogen or phosphorus starvation could cause a reduced growth rate of this microalga as well as a resultant biomass. If grown under a lower light intensity [$60 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], the lowest average growth rate [$0.025 \text{g}/(\text{d} \cdot \text{L})$] of this microalga resulted from phosphorus starvation, which was nearly half of the growth rate while grown in a complete BG-11 medium. Both of nitrogen and phosphorus starvation could increase the contents of total fatty acids and AA, however, when this alga was exposed to low light intensity the positive effect of phosphorus starvation was limited. High light intensity [$200 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] was not beneficial to the synthesis and accumulation of AA no matter how this microalga was cultured in the complete or nitrogen-free or phosphorus-free media. The AA content gradually increased accompanying with a decrease of linoleic acid content during the starvation. However, the oleic acid percentage also gradually increased which limited more significantly the accumulation of AA in this microalga grown under phosphorus starvation than nitrogen one. Based on the composition changes of every species of fatty acids, the main synthesis metabolic pathway of AA suggested that it proceeded from linoleic acid to γ -linolenic acid and then to $20:3\omega6$ under nitrogen or phosphate starvation, and that the $\Delta6$ desaturase was a rate-limiting enzyme. The step in which $\omega3$ desaturase played was down regulated by nitrogen or phosphorus starvation, thus ensuring the synthesis and accumulation of AA positively. Nitrogen starvation blocked the protein synthesis, and phosphorus starvation caused the disorders of nucleic acid, carbohydrate and energy metabolism, which resulted in the slow growth rate and the synthetic conversion of compounds into ones without nitrogen or phosphorus as components. In such a case of nutrient starvation, therefore, the increase of total fatty acids and AA contents in this microalga was enhanced. This research will lay a foundation for the further understanding of the promotion mechanism of fatty acid contents especially of AA in *M. incisa* by a nutrient stress, and for manipulation and optimization of AA commercial production on a large scale.

Key words: *Myrmeclia incisa*; biomass; arachidonic acid (AA); nitrogen starvation; phosphorus starvation

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn