

缺氮条件对栅藻油脂积累与光合作用的影响

刘金丽^{1,2}, 王俊峰², 刘天中², 高莉丽²

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 中国科学院 生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101)

摘要: 栅通过油脂分析、光合放氧、叶绿素荧光等手段, 研究了缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*) 油脂含量、油脂组分以及光合作用影响。结果显示, 总脂含量由 $22.4\% \pm 0.6\%$ 提高到 $36.3\% \pm 0.7\%$, 其中甘油三酯含量由 $4.6\% \pm 1.2\%$ 提高到 $68.3\% \pm 2.5\%$ 而磷脂含量由 $92.8\% \pm 1.6\%$ 降低到 $26.8\% \pm 2.0\%$ 。缺氮处理 1 d 后, 叶绿素含量明显下降, 呼吸速率明显升高。缺氮处理初始阶段, 栅藻光系统 II 最大光能转化效率(F_v/F_m)和非光化学猝灭系数(NPQ)维持稳定, 4 d 后 F_v/F_m 显著降低而 NPQ 显著升高。上述变化可能是光能过剩引起的防御反应, 也可能是自身代谢模式发生转变的结果而与光能耗散无关。

关键词: 栅藻(*Scenedesmus dimorphus*); 缺氮; 油脂积累; 光合作用

中图分类号: Q945.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)07-0013-07

近年来, 可再生能源的研发在全球范围形成持续热潮。利用微藻生产生物柴油具有不与人争粮、不与粮争地、不与粮争水、副产物价值高等优势, 是重要的液体燃料替代形式^[1-2]。在适宜条件下, 产油微藻通常处于营养生长状态, 细胞内脂质含量较低, 且多为极性脂(polar lipid), 如磷脂(phospholipid); 而在胁迫条件下, 细胞内很快积累大量中性脂(neutral lipid), 如甘油三酯(triacylglycerol, TAG)。这期间细胞所经历的生理生化变化是近年来研究的热点。如 Li 等^[3-4]发现抑制莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的淀粉合成途径会提高油脂含量, 表明在衣藻中脂肪代谢与糖代谢密切相关。Chen 等^[5]发现微拟球藻(*Nannochloropsis*)的脂肪酸组成与初始细胞接种量密切相关, 接种细胞浓度较低时中性脂含量高, 而接种浓度较高时极性脂含量较高, 表明微藻脂肪酸组分可能与细胞所处光环境有关。Cakmak 等^[6]发现缺氮或缺硫都可以提高衣藻的 TAG 含量。Recht 等^[7]发现缺氮条件下雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)和微拟球藻均会大量积累油脂, 但它们的糖-脂比例存在不同的变化模式。

栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)属绿藻门(Chlorophyta)、绿球藻目(Chlorococcales), 是一种常见的淡水微藻, 广泛分布于湖泊、池塘、沼泽等静水生境。栅藻是研究水体环境、水体污染、光合作用的常用材料。同时, 由于其生长快速、能大量合成油脂, 是典型的产油微藻^[8]。栅藻对环境的适应性强,

耐污染能力强^[9], 甚至能在污水、城市生活废水中生长^[10], 这一特性使其在规模化培养方面较其他微藻更具优势。有学者研究了栅藻合成虾青素过程的色素组成和光合作用的变化^[11-13], 但关于其油脂积累过程的报道还较少。深入了解栅藻的产油过程将有助于推进利用栅藻生产微藻柴油的研究和应用。本研究利用栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)为实验材料, 考察了缺氮条件下栅藻的油脂含量和组分变化以及光合作用的改变。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养基

本实验所用栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)来自中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 所用培养基为 BG11^[14]。栅藻油脂诱导过程采用不含硝酸钠(NaNO_3)的缺氮 BG11 培养基, 其他组分及含量均不变, 对照组为完全 BG11 培养基培养。

1.2 反应器与培养方法

本实验所用反应器为玻璃柱式反应器, 内直径 0.05 m, 柱高 0.55 m, 工作体积 0.9 L。柱式反应器内

收稿日期: 2012-08-30; 修回日期: 2013-01-09

基金项目: 科技部国家科技支撑计划(2011BAD14B01); 中国科学院太阳能行动计划(KGCX2-EW-309)

作者简介: 刘金丽(1987-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事能源藻类生理学研究, 电话: 0532-80662737, E-mail: liu_jinli_ok@126.com; 王俊峰, 通信作者, E-mail: wangjif@qibebt.ac.cn

部有一直径 5 mm 的玻璃通气管。混合有 1.5% CO₂(*V/V*)的压缩空气(0.1 MPa)以 0.1 vvm 的速率通过通气管从反应器底部鼓泡,从而将藻液搅动并补充碳源。培养过程中连续照光,培养柱表面光强 100 μmol/(m²·s)。培养温度 25°C,培养过程中 pH 维持在 7.0~8.0。对照组(完全 BG11)和实验组(缺氮 BG11)各培养 5 支柱子,测定其中的 3 支,记为 3 个重复。

1.3 生长测定

用质量分析方法测定藻液生物量浓度。将孔径 0.45 μm,直径 50 mm 的混合纤维素滤膜(上海兴亚净化材料厂,上海)煮沸 3 次,并于 105°C 热风干燥 24 h 后称重。将一定体积的藻液过滤于滤膜上,并用 3 倍体积的去离子水冲洗 3 次,以去掉附着在细胞表面的盐分,105°C 热风干燥 24 h 后再次称重。根据两次质量之差计算出藻液生物量浓度。

叶绿素及类胡萝卜素含量参照甲醇提取叶绿素^[15]的方法。测定甲醇提取液在 666 nm, 653 nm, 470 nm 下的 OD 值。根据以下公式分别计算叶绿素 a(Chla), 叶绿素 b(Chlb), 类胡萝卜素(Car)的含量:

$$c(\text{Chla}) = 15.65 \times A_{666} - 7.34 \times A_{653} \quad (1)$$

$$c(\text{Chlb}) = 27.05 \times A_{653} - 11.21 \times A_{666} \quad (2)$$

$$c(\text{Car}) = (1000 \times A_{470} - 2.86 \times \text{Chla} - 129.2 \times \text{Chlb}) / 221 \quad (3)$$

1.4 电镜观察

1.4.1 扫描电镜(Scanning electron microscopy, SEM)

取少量藻液于 1.5 mL EPP 管中离心(5 000 g, 30 s),去上清,双蒸水清洗藻渣 3 次。加入 1 mL 的 2.5%戊二醛固定 2 h,然后加 1.5 mL 磷酸缓冲液(pH 7.0)清洗 3 次,每次 10 min。加 1%锇酸固定 1 h。固定完后,依次用 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%(*V/V*)乙醇脱水,每个梯度 15 min。再浸入 100%乙醇脱水 2 次,每次 10 min,然后浸入 1:1(*V/V*)的乙醇-叔丁醇混合液中 15 min,再浸入 100%叔丁醇中 2 次,每次 15 min,最后冷冻干燥。用导电胶带粘于样品台,喷金后观察 SEM 图像。

1.4.2 透射电镜(Transmission electron microscopy, TEM)

取样固定步骤同 1.4.1。固定后样品用磷酸缓冲液(pH 7.0)清洗 2 h,然后依次用 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%丙酮脱水,每个梯度 15 min。之后浸入 100%丙酮中 3 次,每次 10 min。然后浸入丙酮与 Epon812 树脂混合液(*V:V* = 7:3)中 5 h,再浸入丙酮与

Epon812 树脂混合液(*V:V* = 3:7)中过夜。最后纯 Epon812 树脂中浸没 5 h 并聚合硬化成包埋块,超薄切片切片,2%醋酸双氧铀染色 20 min 后观察 TEM 图像。

1.5 油脂含量及组分分析

将藻液离心收集后(5 000 g, 30 s),藻细胞真空冷冻干燥后研磨成干粉,依据有机溶剂氯仿-甲醇提取方法^[16]提取藻细胞中的总脂并称重定量。

分析油脂组分及含量用棒状薄层色谱法(TLC/FID)来测定。将提取的油脂用氯仿溶解,取 1 μL 分 4~5 次点样在棒状薄层色谱柱上,先后在两种展开剂中展开。展开剂 I:苯:氯仿:乙酸 = 50:20:0.75 (*V/V*),展开剂 II:苯:己烷 = 1:1 (*V/V*)。将分离开来的脂质成分出峰时间与标准样品相对比,确定其组成及相对含量。分析过程中的条件控制:空气流 2 L/min,氢气流 0.16 L/min。

1.6 光合放氧速率的测定

使用 Chlorolab-2 液相氧电极(Hansatech, 英国)测定栅藻细胞在不同光强(PFD)下的放氧速率。将藻液离心后(5 000 g, 30 s)沉淀用含有 50 mmol/L NaHCO₃ 的含氮或无氮 BG11 重新悬浮,调整悬浮液叶绿素浓度至 10 mg/L。将 1 mL 悬浮液加入反应杯中,通入纯氮气 1 min 赶走溶解氧,打开光源记录放氧速率。通过加减遮光片数量改变入射光强,设置的光强梯度为:400, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 0 μmol/(m²·s)。每个光强测定 3 次,每次测定前更换新藻液。根据叶子飘和李进省^[17]和 Ye^[18]的方法拟合 PFD-放氧速率曲线,并计算暗呼吸速率(*R_d*)、最大放氧速率(*P_{max}*)、光补偿点(*LCP*)和光饱和点(*LSP*)。

1.7 叶绿素荧光的测定

使用 Imaging-PAM (Walz, 德国)测定栅藻的最大光化学效率(F_v/F_m)和非光化学淬灭系数(Non-photochemical quenching co-efficiency, NPQ)。将藻液过滤与孔径 0.45 μm 的混合纤维素滤膜上,然后置于用含 50 mmol/L NaHCO₃ 的含氮或无氮 BG11 培养基润湿的滤纸上。将滤纸连同滤膜一起置于荧光仪 CCD 摄像头下暗适应 15 min。打开测量光,测定初始荧光(F_0),然后加饱和脉冲光(10 000 μmol/(m²·s)),测定最大荧光(F_m),之后打开活化光(100 μmol/(m²·s))。待荧光值稳定后再加一次饱和闪光,测定实际最大荧光(F_m')。按照如下公式计算相关参数^[19]:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (4)$$

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' \quad (5)$$

1.8 统计分析

使用 spss10.0 对实验组与对照组做 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时认为两者存在显著差异。图中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果

2.1 缺氮处理对栅藻生长的影响

电镜结果如图 1 所示, 其中(a)~(c)是扫描电镜结果, 标尺=3 μm ; (d)~(f)是透射电镜结果, 标尺=1 μm ; (a)和(d)是接种初始时结果; (b)和(e)是对照组(高氮)培养 10 d 的结果; (c)和(f)是缺氮培养 10 d 的结果; (g)是(d)图框定区域的放大, 标尺=0.5 μm 。SG 表示淀粉粒; TL 表示类囊体; LB 表示脂肪体。实验开始时栅藻细胞呈梭形, 并以四连体形式存在(图 1a), 细胞内可见淀粉粒被类囊体膜包裹, 无脂肪体(图 1d, g)。缺氮处理 10 d 后, 栅藻细胞四连体解体, 直径明显增大(图 1c), 细胞壁明显加厚, 细胞内部大量空间被脂肪滴和淀粉粒填充(图 1f)。高氮条件下(对照组)生长 10 d 后细胞形态与初始时变化不大(图 1b), 但细胞壁明显加厚, 淀粉粒明显增多(图 1e)。

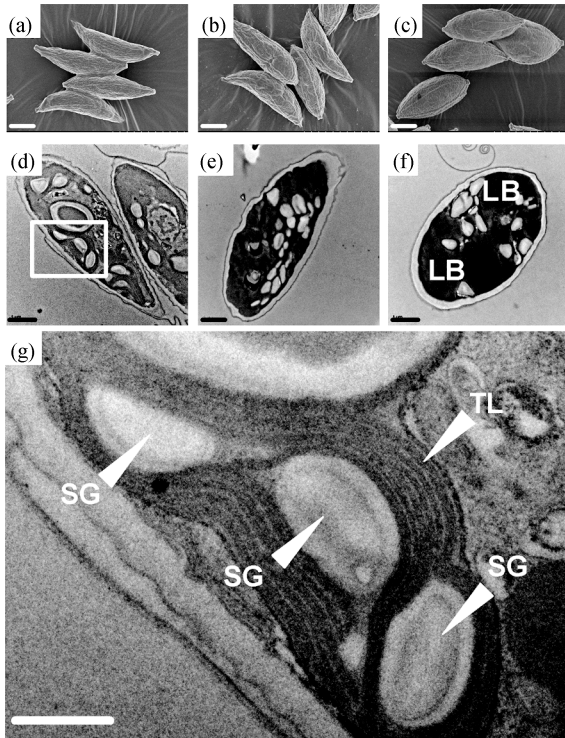


图 1 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)细胞形态和结构的影响

Fig.1 The effect of nitrogen starvation on the morphology and structure of the *Scenedesmus dimorphus*

缺氮处理的生物量积累与对照组在前 4 d 差别不大($P > 0.05$), 4 d 后缺氮处理生物量积累速率减慢并显著低于对照组($P < 0.05$)。对照组 10 d 内生物量增加到 (5.8 ± 0.03) g/L, 而缺氮处理组为 (4.1 ± 0.04) g/L(图 2)。

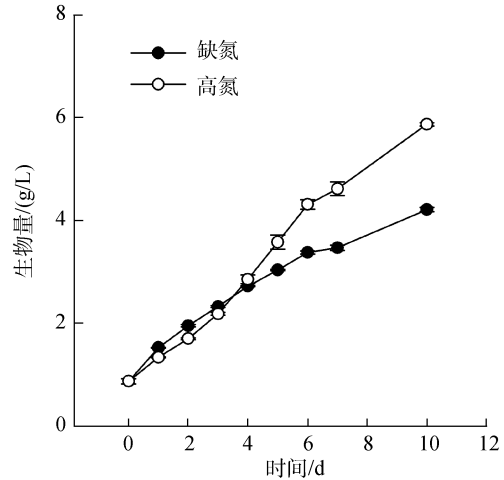


图 2 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)生长的影响
Fig.2 The effect of nitrogen starvation on the biomass accumulation of the *Scenedesmus dimorphus*

随着培养时间延长, 对照组和处理组的单位干重叶绿素和类胡萝卜素含量都降低, 但缺氮处理降低的更快(图 3a, 图 3b)。与对照组相比, 缺氮处理组的类胡萝卜素/叶绿素含量比值在培养过程中逐渐升高并一直显著高于对照组($P < 0.05$; 图 3c)。对照组与处理组的叶绿素 a/叶绿素 b 含量比值差别不大并一直维持在 2.2~3.1 之间(图 3d)。

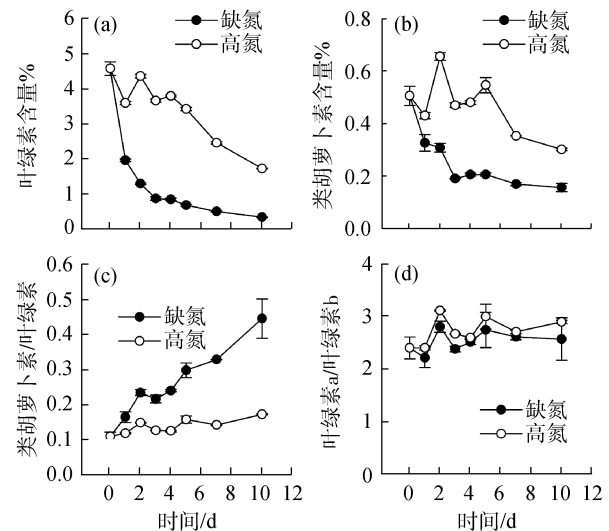


图 3 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)叶绿素和类胡萝卜素积累的影响

Fig.3 The effect of nitrogen starvation on the accumulation of chlorophyll and carotenoid in the *Scenedesmus dimorphus*

2.2 缺氮处理对栅藻油脂积累和油脂组分的影响

未经缺氮处理的栅藻细胞总脂含量占干重的(22.4 ± 0.6)%, 其中总脂的(92.8 ± 1.6)%为磷脂(PL), 中性脂(TAG)只占(4.6 ± 1.2)%(图 4)。缺氮处理后栅藻总脂含量逐渐升高, 13 d 后总脂含量升高到(36.3 ± 0.7)%(图 4), 显著高于($P < 0.05$)对照组的(30.1 ± 0.7)%; 其中 TAG 含量升高到(68.3 ± 2.5)%(图 4), 显著高于($P < 0.05$)对照组的(37.0 ± 0.1)%; PL 含量降低到(26.8 ± 2.0)%(图 4), 显著低于($P < 0.05$)对照组的(55.7 ± 2.4)%。

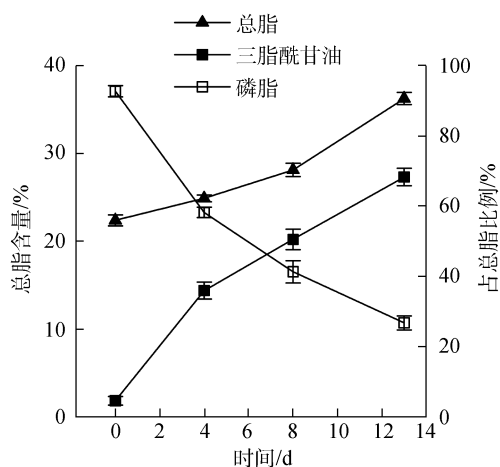


图 4 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)总脂含量和总脂组分的影响

Fig.4 The effect of nitrogen starvation on the total lipid content and lipid components of the *Scenedesmus dimorphus*

2.3 缺氮处理对栅藻光合作用的影响

缺氮处理使栅藻的暗呼吸速率(R_d)和光补偿点(LCP)迅速升高, 而对照组在实验过程中维持稳定(图 5a, d)。随着培养时间的延长, 缺氮处理组和对照组的最大放氧速率(P_{max})都逐渐降低, 至实验结束时分别为(37.6 ± 3.6) $\mu\text{mol O}_2 / \text{mgchl} \cdot \text{h}$ 和(75.4 ± 6.4) $\mu\text{mol O}_2 / (\text{mgchl} \cdot \text{h})$ (图 5b)。实验开始时, 栅藻的光饱和点(LSP)为(198.2 ± 6.8) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 之后实验组和对照组均降低, 到第 13 天时, 缺氮处理组降低到(94.4 ± 2.1) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 而对照组降低到 (119.7 ± 1.6) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (图 5c)。

培养过程中, 对照组的最大光化学效率(F_v/F_m)和非光化学猝灭系数(NPQ)基本维持稳定。缺氮处理 1 d 后栅藻 F_v/F_m 即明显低于对照组, 但前 4 d 内 F_v/F_m 一直维持在较高水平(>0.6), 之后开始逐渐下降, 到第 10 天时已降至 0.4 ± 0.01 ; 而 NPQ 在前 3 d

内较低且维持稳定, 从第 4 天开始逐步升高, 到第 10 天时以升高到 1.5 ± 0.01 , 是初始时的 1.8 倍(图 6)。

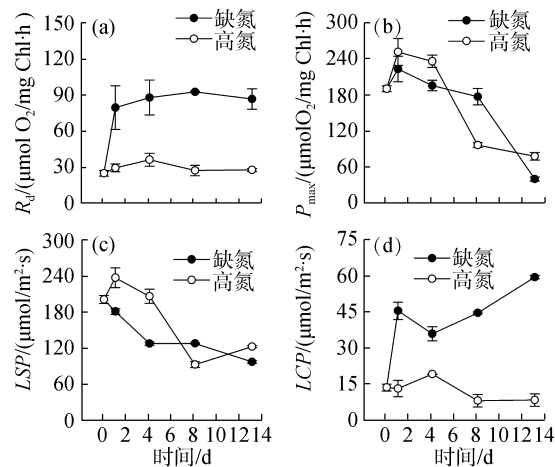


图 5 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)光合放氧参数的影响

Fig.5 The effect of nitrogen starvation on the photosynthetic oxygen evolution of the *Scenedesmus dimorphus*

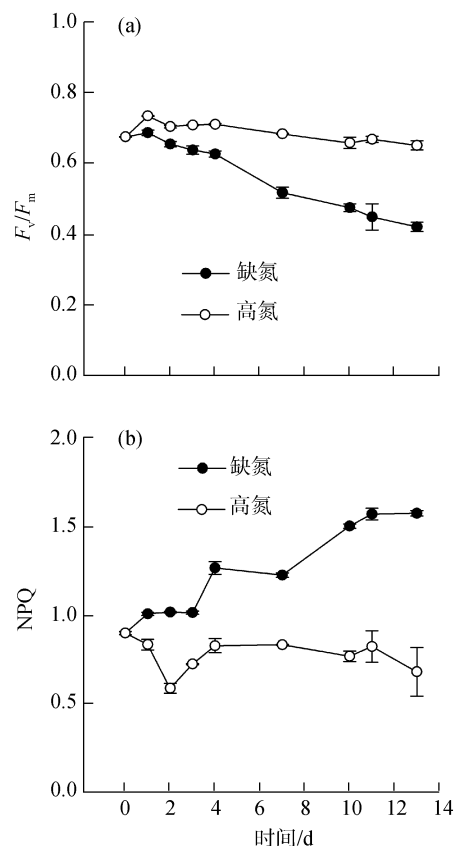


图 6 缺氮处理对栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)最大光化学效率(F_v/F_m)和非光化学猝灭系数(NPQ)的影响

Fig.6 The effect of nitrogen starvation on the maximum photo-chemical efficiency (F_v/F_m) and non-photochemical quenching co-efficiency (NPQ) of *Scenedesmus dimorphus*

3 讨论

三脂酰甘油(TAG)是优质的生物能源原料。经过酯化反应, TAG 中的脂肪酸链可以转化成能完全替代普通柴油的高热值、低污染的生物柴油,而剩余的甘油骨架既是重要的工业原料,也可以通过进一步加氢转化成生物乙醇^[20]。本研究发现培养 13 d 后,栅藻的总脂含量达到干重的 36%,显著高于油料作物大豆的平均水平^[21]。这一值与雨生红球藻(*Haematococcus*)的含油量接近^[7]而低于微拟球藻(*Nannochloropsis*)^[5]。高含油量,特别是高中性脂含量是微藻作为生物柴油原料来源的重要优势。目前,关于微藻脂肪代谢,特别是胁迫条件下 TAG 的积累过程的研究尚不充分^[21]。本研究发现缺氮条件下,随着 TAG 含量的升高,磷脂含量出现相应的下降(图 4),同时细胞内部的膜结构也逐渐减少(图 1f)。据此推测栅藻细胞内部可能存在将磷脂转化成 TAG 的机制。例如,通过磷脂二脂酰甘油酰基转移酶(Phospholipid diacylglycerol acyltransferase, PDAT)的磷脂代谢途径。在高等植物中 PDAT 途径广泛存在,而在微藻中只存在于少数种类^[22-23],而栅藻中尚未见报道。此外,胁迫条件下微藻细胞碳源的分配问题一直不太清楚。Li 等^[3-4]发现抑制衣藻的淀粉代谢会导致油脂积累的增加,说明淀粉合成和油脂合成会竞争碳源。Recht 等^[7]发现对于雨生红球藻来说在氮缺乏条件下存在由淀粉向 TAG 转化的代谢途径,而在 *Nannochloropsis* 中则不存在这样的途径。在本实验中,缺氮培养 13 d 后的栅藻细胞中,除了大量的脂肪体外,还存在较多的淀粉粒和较厚的细胞壁(图 1f),这说明栅藻的大量合成 TAG 的过程对糖代谢的影响较小,胞外碳源直接流向了能量密度较高的脂肪酸合成途径。

营养缺乏(特别是氮源缺乏)结合高光强是诱导微藻合成次生代谢物的常用方法^[6-7,24-25]。本研究中,培养用光强为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 左右,这一光强在实验初期远低于 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光饱和点(LSP),即使在培养后期也仅达到与 LSP 接近的水平(图 5c),所以栅藻细胞所处的环境只有缺氮胁迫而没有强光胁迫。与对照组相比,缺氮处理的栅藻细胞最明显的改变是叶绿素含量降低而呼吸速率升高,而且这些变化十分迅速,在处理第 1 天即表现出来(图 3a, 图 5a)。胁迫条件下叶绿素含量快速降低、呼吸速率升高的现象已经被广泛报道^[7,11,26],但多是在强光下

($>300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)或室外(光强 $>2000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)的研究结果。另外,许多研究表明在胁迫条件下微藻细胞内的类胡萝卜素含量升高^[6,11-13],但是本研究中,缺氮胁迫下栅藻细胞内类胡萝卜素含量实在培养过程中一直在降低(图 3b)。这表明类胡萝卜素(虾青素)的合成可能需要强光环境。叶绿素荧光参数 F_v/F_m 是反映光系统 II 完整性的重要指标^[27]。通常情况下,经充分暗适应的未受胁迫的绿藻 F_v/F_m 值在 0.7 左右,受到胁迫后该值降低。Parkhill 等^[28]发现营养盐的缺乏对微藻的 F_v/F_m 值的影响不明显,这与本文的结果不同,我们发现缺氮处理 1d 后栅藻 F_v/F_m 即明显低于对照组。但同时我们也注意到,在缺氮处理前期栅藻光系统 II 并没有受到严重损伤,4 d 之后光系统 II 的损伤逐步加剧,类似的情况也表现在最大光合放氧速率(图 5b)和 NPQ 上(图 6b)。如果说强光条件下减少叶绿素含量、增大呼吸速率、提高光系统 II 失活反应中心的比例、提高 NPQ 等改变有助于光合系统减少光能吸收、加快能量耗散,从而减少过剩激发能产生的伤害^[18],那么非饱和光下的类似变化如何解释?我们给出两种假设:1)碳同化和氮同化过程是光合作用产生的能量通汇(ATP)和还原力(NADPH)的主要流向^[29]。氮源缺乏的时候,ATP 和 NADPH 会相对过剩,进而导致光合电子传递链激发能的过度积累,可能会进一步造成光合作用的损伤,从而需要启动上述机制以保护细胞。2)上述生理学变化与光破坏的防御机制无关,而是栅藻细胞为了适应缺氮环境,将自身代谢模式由先前的营养生长主动转换到次生代谢物积累的结果,可能反映了细胞将暂时无用物质(如氮代谢酶系统)转化为能量储存物质(如 TAG)的过程。

参考文献:

- [1] Wijffels R, Barbosa M. An Outlook on Microalgal Biofuels [J]. *Science*, 2010, 329: 796-799.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 294-306.
- [3] Li Y, Han D, Hu G, et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol [J]. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 387-391.
- [4] Li Y, Han D, Hu G, et al. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas*

- reinhardtii*[J]. Biotechnol Bioeng, 2010, 107(2): 258-268.
- [5] Chen Y, Wang J, Liu T, et al. Effects of initial population density (IPD) on growth and lipid composition of *Nannochloropsis* sp. [J]. J Appl Phycol, 2012, 24(6): 1623-1627.
- [6] Cakmak T, Angun P, Demiray Y, et al. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(8): 1947-1957.
- [7] 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]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94: 1495-1503.
- [8] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. Plant J, 2008, 54: 621-639.
- [9] Lee Y K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential [J]. J Appl Phycol, 2001, 13: 307-315.
- [10] 吕素娟, 张维, 彭小伟, 等. 城市生活废水培养产油微藻的可行性 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 445-452.
- [11] 秦山, 刘国祥, 胡征宇. 斜生栅藻中虾青素的积累过程及其光合活性的变化 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(3): 509-515.
- [12] Qin S, Liu G, Hu Z. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) [J]. Process Biochem, 2008, 43: 795-802.
- [13] Pirastru L, Darwish M, Chu F, et al. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment [J]. J Appl Phycol, 2012, 24: 117-124.
- [14] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. Plant Cell Physiol, 1991, 32:1077-1082.
- [15] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. J Plant Physiol, 1994, 144: 307-313.
- [16] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37:911-917.
- [17] 叶子飘, 李进省. 光合作用对光响应的直角双曲线修正模型和非直角双曲线模型的对比研究 [J]. 井冈山大学学报 (自然科学版), 2010, 31(3):38-44.
- [18] Ye Z P. A newmodel for relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in *Oryza sativa* [J]. Photosynthetica, 2007, 45(4): 637-640.
- [19] 王俊峰, 冯玉龙, 李志. 飞机草和兰花菊三七光合作用对生长光强的适应 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(6): 542-548.
- [20] Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology [J]. Microb Cell Fact, 2010, 9: 3.
- [21] 王连铮, 王岚, 赵荣娟, 等. 高油大豆新品种中黄20(中作 983)的选育和提高大豆含油量的育种研究 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4): 35-43.
- [22] Merchant S, Kropat J, Liu B, et al. TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation [J]. Curr Opin Biotech, 2012, 23: 352-363.
- [23] Boyle R, Page M, Liu B, et al. Three acyltransferases and bitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas* [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 15811-15825.
- [24] Illman A M, Scragg A H, Shales S W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium [J]. Enzyme Microb Tech, 2000, 27: 631-635.
- [25] Lv J M, Cheng L H, Xu X H, et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions [J]. Bioresource Technol, 2010, 101(17): 6797-6804.
- [26] Wang J, Han D, Sommerfeld M, et al. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor [J]. J Appl Phycol, 2013, 25: 253-260.
- [27] Govindjee S A. On the relation between the Kautsky effect (Chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II:

- Basic and applications of the OJIP fluorescence transient [J]. J Photoch Photobio B, 2011, 104: 236-257.
- [28] Parkhill J, Maillet G, Cullen J J. Fluorescence-based maximum quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress [J]. J phycol, 2001, 37(4): 517-529.
- [29] Huppe H C, Turpin D H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45: 577-607.

The effects of nitrogen starvation on lipid accumulation and photosynthesis of *Scenedesmus dimorphus*

LIU Jin-li^{1, 2}, WANG Jun-feng², LIU Tian-zhong², GAO Li-li²,

(1. College of Food Science and Engineering Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. CAS Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Received: Aug., 30, 2012

Key words: *Scenedesmus dimorphus*; nitrogen starvation; lipid accumulation; photosynthesis

Abstract: The microalga *Scenedesmus dimorphus* could be potentially used as feedstock for biodiesel production. However, the changes in photosynthesis during lipid accumulation are still unclear for this organism. Herein, the effects of nitrogen starvation on the lipid content, lipid component and photosynthesis of *Scenedesmus dimorphus* were studied using lipid analyzing, photosynthetic oxygen evolution and chlorophyll fluorescence methods,. The results showed that the total lipid content was increased from $(22.4 \pm 0.6)\%$ to $(36.3 \pm 0.7)\%$ during the nitrogen starvation, companied by the increase of triacylglycerol from $(4.6 \pm 1.2)\%$ to $(68.3 \pm 2.5)\%$ and decrease of phospholipid from $(92.8 \pm 1.6)\%$ to $(26.8 \pm 2.0)\%$. The chlorophyll content was decreased steeply while the respiration rate was increased after 1 day nitrogen starvation treatment. The maximum photo-chemical efficiency of photosystem II (F_v/F_m) and non-photochemical quenching co-efficiency (NPQ) were kept in a stable level during the first several days of nitrogen starvation, and then F_v/F_m decreased while NPQ increased significantly after 4 days treatment. All these changes in photosynthesis might be due to 1) the defensive reaction against the excess light energy, or 2) non-related with the energy dissipation but due to the shift from vegetative growth to secondary metabolism.

(本文编辑: 康亦兼)