

小球藻培养过程代谢机制的跨组学研究

**Trans-omics Study of the Cellular
Metabolism of *Chlorella sorokiniana*
Cultivation**

一级学科：化学工程与技术

学科专业：生物化工

研 究 生：陆姝欢

指导教师：元英进 教授

天津大学化工学院

二零一二年六月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 天津大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：

签字日期：

年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津大学 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 天津大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

摘要

本文尝试结合多种组学手段,以接种密度为差异因子,研究小球藻(*Chlorella sorokiniana*)在不同培养条件下产油相关的代谢水平、磷脂水平及蛋白水平的相应变化,试图以此为依据寻找影响微藻产油的最关键调控因子并为微藻代谢及产油机制提供更全面的信息。

本研究通过高通量分析技术 GC-TOF-MS 与信息分析手段偏最小二乘法 (partial least-squares to latent structures, PLS) 联用,以微藻产油相关的代谢组变化为切入点,重点分析了不同接种密度下微藻生产脂肪酸甲酯能力与微藻代谢之间的关系。研究表明产脂相关的代谢物主要关联氨基酸代谢、脂肪酸代谢及糖代谢等碳代谢网络,这些关键代谢物与脂肪酸甲酯日产量及其十六烷值均成负相关关系,且代谢物水平在最高接种密度体系下达到最低值。由此推测接种密度引起的光源变化导致的光合作用改变,可能是碳相关代谢网络发生显著变化的主要原因。

本文运用蛋白质组学与代谢组学相结合的手段,研究了导致代谢差异的蛋白调控变化,结果发现参与光合作用的电子传递链与固碳反应相关蛋白在高接种密度培养体系中表达明显下调,而且通过典型相关分析发现这些光合蛋白的表达与代谢组学中所鉴定的生物标志物的代谢水平有较强的相关性。此外,其他蛋白在稳定期也有 78.4% 出现了下调。揭示了接种密度能够从蛋白水平影响小球藻光合作用,进而影响其他蛋白的合成与表达,这可能是最高接种密度体系下碳相关代谢水平整体下降的本质原因。而磷脂组学的研究也指出磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 和磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol, PG) 是造成接种密度体系磷脂组差异的关键磷脂分子,可见膜的疏密度和光合作用相关的类囊体膜的流动性在接种密度影响微藻生长代谢的过程中起着重要作用。

通过上述多组学分析,发现光调控在不同接种密度培养体系中的小球藻生长及代谢过程起到了决定性作用,为了验证这一推论,比较了不同光强 ($40\text{-}160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 对高接种密度培养体系下的小球藻代谢及产脂能力的影响。发现光强为 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时小球藻脂肪酸甲酯的日产量及饱和度最高,通过多元统计分析发现氨基酸代谢与脂积累负相关,而糖代谢及自由脂肪酸与脂积累正相关。说明光照条件确实可以改善高接种密度下小球藻的代谢状态及产脂能力,光调控是接种密度调控小球藻生长的关键代谢调控机制。

关键词: 小球藻, 接种密度, 生物柴油, 跨组学研究, 光合作用

ABSTRACT

A trans-omics approach was employed to study the change of the levels of oil production related metabolites, phospholipids and proteins in *Chlorella sorokiniana* under different inoculum sizes to reveal the most critical regulatory factors which affect microalgal oil production and provide more comprehensive information for the study of metabolism and oil production mechanism of microalgae.

The metabolome of *C. sorokiniana* under different initial cell densities was analyzed to reveal the metabolic relevance between lipid production and inoculum size by GC-TOF-MS. Furthermore, a tight correlation between metabolism and lipid accumulation in *C. sorokiniana* was revealed by partial least-squares to latent structures (PLS) analysis. It was interesting that most of the key metabolites selected by PLS were involved in the fixed carbon metabolism in photosynthesis and were negatively correlated to the daily productivity and cetane number(CN) of FAME. Moreover, most of the levels of these metabolites were remarkably reduced in the highest inoculum size culture. One possible explanation for this interesting observation is the accessibility of light to microalgae cells in culture. We therefore asked whether high cell density lessened the light permeability into the culture and led to low photosynthetic capacity of cells, which then reduced the carbon-related metabolic levels.

Proteomic was integrated with the metabolomic research to study the change of the proteins which caused the metabolic differences. The results showed that photosynthesis related proteins were decreased with the improvement of inoculation density, and meanwhile 78.4% of the other proteins also showed the similar trend in the stationary phase. It's clear that the inoculum size had a great effect on the level of photosynthetic protein in *C. sorokiniana*, which directly decided the energy metabolism and carbon fixation, and then changed the levels of other metabolism in the cell. This might be the crucial reason for the decline of overall level of carbon-related metabolism. The phospholipidome studies showed that a clear discrimination from the culutre with the inoculum size of 1×10^6 cells·mL⁻¹ to the others was found and the key phospholipids responsible for the discrimination were Phosphatidylethanolamine(PE) and phosphatidylglycerol(PG), which means the

degree of membrane density and the fluidity of thylakoid membrane might play an important role in inoculum-associated microalgal growth and metabolism.

All of the above omics results pointed that the lack of photosynthetic capacity might be a potential limiting factor in high inoculum size culture. To verify this hypothesis, we compared the metabolism level and FAME product in the culture with the highest inoculum size with different light intensity ($40\text{-}160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The results showed that the highest daily productivity and CN of FAME were achieved with the light intensity of $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Further analysis revealed that amino acid metabolism was negatively correlated to the production of FAME while sugar metabolism and free fatty acid metabolism were positively correlated to the lipid accumulation. Based on this study, we confirmed that light intensity did improve the metabolic status and lipid production of *C. sorokiniana* under high inoculum size culture and the light regulation was the key metabolic regulation mechanism in inoculum-dependent cultivation of *C. sorokiniana*.

KEY WORDS: *Chlorella sorokiniana*, inoculum size, biodiesel, trans-omics, photosynthesis,

目 录

前 言	1
第一章 文献综述	3
1.1 微藻的应用：挑战与机遇.....	3
1.1.1 微藻生产的生化基础和社会需求.....	3
1.1.2 微藻在生物能源方面的应用.....	6
1.1.3 微藻的其他应用	8
1.2 微藻的大规模生产的技术基础.....	10
1.2.1 微藻培养的历史	10
1.2.2 接种密度在微藻培养中的影响.....	11
1.2.3 光照在微藻培养中的影响.....	13
1.2.4 微藻培养中的其他影响因素.....	15
1.3 系统生物学	17
1.3.1 组学的联系和发展	17
1.3.2 系统生物学的技术支持.....	19
1.3.3 系统生物学在微藻研究中的应用.....	20
1.4 本文的研究意义及主要研究内容.....	21
1.4.1 研究意义	21
1.4.2 研究内容	22
第二章 材料与方法	23
2.1 主要仪器	23
2.1.1 常用仪器	23
2.1.2 气质联用系统	23
2.1.3 液质联用系统	23
2.2 主要试剂及配置	24
2.2.1 主要试剂	24
2.2.2 藻种鉴定用溶液	25
2.2.3 总脂肪提取溶液	25
2.2.4 FAME 分析用溶液.....	25
2.2.5 代谢分析用溶液	25
2.2.6 磷脂分析用溶液	26

2.3 实验方法	26
2.3.1 藻种的鉴定	26
2.3.2 藻种的培养及收获	27
2.3.3 不同接种密度培养体系的建立.....	28
2.3.4 总脂肪提取	28
2.3.5 FAME 分析.....	29
2.3.6 代谢物分析	31
2.3.7 磷脂分析	31
2.3.8 蛋白样品的提取与鉴定.....	32
2.3.9 小球藻色素的测定	34
2.3.10 数学分析	35
第三章 不同接种密度对小球藻产脂能力的影响.....	36
3.1 引言	36
3.2 结果与讨论	37
3.2.1 微藻的选择与鉴定	37
3.2.2 不同接种密度培养体系的建立.....	39
3.2.3 小球藻所产 FAME 的鉴定.....	41
3.2.4 不同接种密度对小球藻脂肪分布的影响.....	43
3.2.5 不同接种密度对小球藻 FAME 日产量的影响.....	45
3.2.6 不同接种密度对小球藻 FAME 质量的影响.....	46
3.3 小结	48
第四章 不同接种密度对小球藻代谢的影响.....	50
4.1 引言	50
4.2 结果与讨论	51
4.2.1 小球藻的代谢谱图的建立.....	51
4.2.2 不同接种密度对小球藻代谢水平的影响的初步分析.....	53
4.2.3 多元统计分析不同接种密度对小球藻代谢水平的影响.....	54
4.2.4 不同接种密度下小球藻的重要代谢标志物的变化及分析.....	56
4.2.5 不同接种密度对小球藻色素分布的影响.....	59
4.3 小结	60
第五章 磷脂组学研究	62
5.1 引言	62
5.2 结果与讨论	63
5.2.1 小球藻中磷脂组的检测.....	63

5.2.2 不同接种密度对小球藻磷脂分布的影响.....	66
5.2.3 不同接种密度对小球藻磷脂疏水尾链长的影响.....	67
5.2.4 不同接种密度对小球藻磷脂疏水尾不饱和度的影响.....	68
5.2.5 多元统计分析研究不同接种密度对小球藻磷脂的影响.....	69
5.3 小结	76
第六章 接种密度对小球藻蛋白组的影响.....	77
6.1 引言	77
6.2 结果与讨论	77
6.2.1 小球藻蛋白组的分布趋势.....	77
6.2.2 蛋白功能分析	85
6.2.3 小球藻光合作用中电子传递链的变化.....	92
6.2.4 不同接种密度对小球藻卡尔文循环的影响.....	94
6.2.5 小球藻光合蛋白与碳相关代谢的关联.....	95
6.2.6 不同接种密度对小球藻其他蛋白的影响.....	97
6.3 小结	98
第七章 光照条件对高接种密度培养的小球藻的影响.....	99
7.1 引言	99
7.2 结果与讨论	99
7.2.1 不同光照对小球藻产油能力的分析.....	99
7.2.2 不同光照对小球藻代谢的影响.....	102
7.2.3 PCA 分析不同光照强度下小球藻的代谢差异	103
7.2.4 OPLS 分析不同光强下小球藻代谢与 FAME 日产量的关系	104
7.2.5 不同光强下小球藻关键代谢物的变化趋势.....	106
7.2.6 接种密度影响小球藻生长和代谢的生物学模型的建立.....	107
7.3 小结	108
第八章 结论与展望	109
8.1 结论	109
8.2 创新点	110
8.3 展望	110
参考文献	112
发表论文和参加科研情况说明	128
缩写词与符号表	130
致 谢	133

前 言

微藻不但是当今世界上最具有潜力的生物能源原料,为全球能源危机和环境安全提供了新的解决之道,而且还能出产各种高附加值副产物如蛋白、不饱和脂肪酸和色素等,具有很高的营养医疗价值,因此微藻研究引起了国际上越来越多的关注。早在 1978 年美国国家能源部可再生能源实验室(The U.S. National Renewable Energy Laboratory, NREL)就展开了水生物种计划(Aquatic Species Program, ASP),开展了大量关于优质藻种筛选、产氢、产沼气、产生物柴油等微藻资源开发的实验^[1]。1992 年,美国生物柴油委员会(National Biodiesel Board)就提出在美国推行生物柴油商业化的建议^[2]。目前世界各国已经陆续制定了相应的标准和条例来评价生物柴油的质量并将其应用到具体社会生活中来,1997 年德国标准 DIN 51606 正式生效,2002 年美国标准 ASTM D6751 出台,之后,适用于整个欧洲的生物柴油标准 DIN EN14214 也被制订出来^[3,4]。在欧盟,生物柴油是柴油的主要替代品,大概占据了整个生物燃料生产总额的 82%,而且这个比例在欧洲、巴西和美国还在持续增长^[5]。

然而微藻代谢是由多个代谢途径整合而成的代谢网络,一个代谢物的积累往往涉及到多个复杂的蛋白调控和代谢反应,这使得对微藻的研究更为复杂;而且接种密度、光照条件和营养等影响微藻培养的外界因素之间还存在着相互作用,这无疑加大了研究的难度。当前对微藻培养的研究多以一个或几个生理指标作为研究靶点,从表型、目标产物产量甚至某类或某个蛋白或基因的变化来分析微藻培养的影响因素^[6-8],这往往会造成信息的片面性,从而错失关键知识。

系统生物学是一门强调获取生物体在遗传因子或环境因子影响下,某一类生命物质如蛋白质、糖类或脂质等代谢物的结构及丰度动态变化的“整体”信息,并通过信息挖掘等数学手段对这些海量数据进行整合的学科^[9],在一定程度上避免了单一靶点研究所造成的局限性。自 1978 年模式化微藻衣藻的叶绿体基因图谱展开研究以来^[10],关于微藻线粒体、质体、全基因组测序的工作陆续完成^[11]。这些工作的开展为微藻后续的转录组、蛋白组和代谢组研究提供了丰富的信息预测数据,打下了良好的基石。目前已有研究者通过系统生物学手段对微藻产氢^[12]、光合机理研究^[13]、碳浓缩机制研究(carbon-concentrating mechanism, CCM)^[14]及药物应激反应^[15]等进行了分析。可见已有科学家认识到了系统生物学手段在微

藻研究中的优势,但是目前这些全局性研究还主要着眼于微藻相关的某个机理性分析上,而且只是蛋白质组学或代谢组学的某一方面应用。

微藻培养同样涉及了复杂的环境调控和基因调控。以接种密度为例,众所周知接种密度的改变可以引起光照、营养及 pH 等微环境的改变,但是于细胞而言哪些变化最重要,细胞将会如何应对这些变化,需要调动哪些代谢网络进行协同作用或者何种代谢调控起到关键作用,又是如何调控的,都需要一个强力的研究手段为我们撕开迷雾,而系统生物学恰恰能够为我们提供大量的关于微藻的基因、转录、蛋白及代谢的基础信息,为微藻整体变化的研究提供新方法。而对多个组学信息进行整合,利用跨组学的思路对微藻进行研究能为相应机制的提出提供更全面、更有力的信息。本研究将跨组学研究手段引入接种密度对小球藻培养的研究中来,通过比较不同接种密度培养体系下小球藻细胞生长、脂质积累、代谢水平、磷脂水平及蛋白水平的差异,并且采用 PCA、PLS-DA、PLS 及 OPLS 等多种多元统计分析手段对数据进行整合分析以考察这些指标相互之间的关系,试图以此为依据揭示接种密度和脂质积累的代谢联系,并寻找最高接种密度培养体系下的潜在限制因素,最终通过光照实验对推测结果进行了验证。以上研究不但为更深入理解接种密度对小球藻的生理生化状态的影响和调控提供了基础,而且还为系统生物学在实际生产中的应用和条件优化提供了一种新的思路。

第一章 文献综述

1.1 微藻的应用：挑战与机遇

1.1.1 微藻生产的生化基础和社会需求

海洋、淡水湖、沙漠、温泉及冰雪等许多生态环境中都能发现微藻的踪迹。微藻种类繁多，根据胞内光合色素的种类、组成和细胞结构，可以将真核微藻分为绿藻、褐藻、硅藻、甲藻、红藻、金藻和轮藻等九大类；而原核生物蓝细菌是能够进行光合作用的浮游生物，很多生理生化性质和真核藻近似，因此也被称作蓝藻。

虽然没有根、茎、叶等具体分类，但是微藻的光合作用机制与植物相似，而且结构简单，其利用光能实现 CO_2 到生物质的转化效率更高^[7]。作为最重要的光合生产力，地球上超过 50% 的光合效能是通过微藻这个阳光工厂得到转化，因此微藻具有极高的应用潜力^[16]。随着化石能源的日益枯竭和人们对环境保护问题的不断反思，开发可持续发展的绿色新能源被提上日程并吸引了越来越多的关注。近年来，大量人力物力被投放到寻找和挑选能够生产生物燃料的优质生物质原料及相关工艺流程的创新与改进上来，并取得了显著成效。从废油废渣到工业污水，从油菜籽、甜菜、甘蔗等粮食作物到秸秆等农业废弃物，从陆生的麻风树到各种水生植物，从自然存在的光合菌株到转基因工程菌种，大量可能替代石化能源的生物质能原料被挑选出来并做进一步研究^[17]。

与其他生物能原料相比，微藻产能具有极大的优势。首先，微藻能够利用源源不绝的光能，具有强大的可持续发展性。而且光合作用还能大量消耗 CO_2 ，每生成 1 公斤微藻生物质就可消耗 1.8 公斤 CO_2 ，有助于缓解当前 CO_2 积累造成的环境危机^[18]。

其次，微藻家族成员众多，据统计，截至 2011 年世界上已发现的海洋微藻有 19600 种，淡水微藻有 21124 种^[19]，其生物多样性为生物质能源的发展及研究提供了庞大的后备军，而其含油生物机制则为基因工程改造提供了良好的素材。

再次，和陆生植物相比，微藻生长迅速，适宜的培养条件能够促进微藻大量生长，其生物量往往在 24 小时就能翻一番^[20]，极大提高了生物燃料积累的效率，而且微藻富含油脂、碳水化合物和蛋白质（表 1-1），不但具有极大的潜力来源

源不断地提供数量巨大，种类繁多的生物质能，还能广泛应用于食品、营养、医药和工业等许多行业中去。

表 1-1 常见微藻中不同原料成分总结表

Table 1-1 Different feedstock constituents from microalga

藻种	蛋白含量 /%	脂含量 /%	碳水化合物含量 /%	参考文献
<i>Anabaena sp.</i>	45	10	28	[21]
<i>Anabaena variabilis</i>	47	11	22	[21]
<i>Calothrix contanerii</i>	27	64	8	[21]
<i>Calothrix crustacea</i>	21	71	8	[21]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17	[22]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	[22]
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17	[22]
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	[22]
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–20	14–18	[22]
<i>Gloeocapsa crepidinum</i>	56	36	8	[21]
<i>Limicolaria martensiana</i>	19	76	5	[21]
<i>Lyngbya semiplena</i>	27	64	9	[21]
<i>Nodularia sp. (Chucula)</i>	43	12.6	17	[21]
<i>Nostoc commune</i>	40	8.4	38	[21]
<i>Nostoc paludosum</i>	40	10.4	27	[21]
<i>Oscillatoria formosa</i>	51	32	9	[21]
<i>Oscillatoria salina</i>	42	47	11	[21]
<i>Oscillatoria subbrevis</i>	45	57	12	[21]
<i>Phormidium corium</i>	50	34	16	[21]
<i>Phormidium sp.</i>	62	11	16	[21]
<i>Phormidium tenue</i>	63	22	15	[21]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–17	[22]
<i>Spirulina labyrinthiformis</i>	68	17	15	[21]
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	4–7	8–16	[22]
<i>Spirulina platensis</i>	46–77	4–14	8–18	[22]
<i>Spirulina subsalsa</i>	71	13	17	[21]
<i>Synechococcus spp.</i>	64	28	9	[21]

最后，如表 1-2 所示，微藻对土地的利用效率明显高于其他陆生植物^[23]，如果单纯使用产油植物进行生物能源的生产，即使所有国土面积投入进去，也不可能满足我国对能源的需求，但若单纯依靠微藻进行能源生产，其对国土面积的需求更容易得到满足，何况微藻的适应性强，易于存活，只要有阳光和简单的无机营养就可以生长。海洋、湖泊到滩涂、盐碱地、沙漠，无处不见微藻踪迹，为微藻的培养提供了便利，同时也能有效将无用的盐碱地变废为宝，因此微藻的大规

模培养能有效避免“与粮争地”问题。

表 1-2 富油植物与微藻在产油效率及所需土地面积的对比

Table 1-2 Comparison of the oil yield and land area required between oleaginous plant and

		microalage		
产油生物		油产率 ^{a, b}	所需土地 ^{a, c}	所需国土面积 ^d /%
		/L·ha ⁻¹ ·year ⁻¹	/×10 ⁸ ha	
产油植物	<i>Camelina</i>	561-608 ^[24]	45.6-49.42	474.96-514.75
	<i>Canola</i>	1028-1356 ^[24]	20.44-26.97	212.96-280.91
	<i>Coconut</i>	2338-2806 ^[24]	9.88-11.86	102.91-123.51
	<i>Corn</i>	168-187 ^[24]	148.25-165.01	1544.25-1718.89
	<i>Cotton</i>	327-421 ^[24]	65.85-84.78	685.92-883.1
	<i>Jatropha</i>	1309-1871 ^[24]	14.82-21.18	154.34-220.61
	<i>Mustard</i>	561-1310 ^[24]	21.16-49.42	220.44-514.75
	<i>Oil palm</i>	3742-6080 ^[24]	4.56-7.41	47.5-77.17
	<i>Peanut</i>	1059 ^[23]	26.18-26.18	272.69-272.69
	<i>Pongamia pinnata</i>	2590 ^[23]	10.7-10.7	111.5-111.5
	<i>Rapeseed</i>	1028-1216 ^[24]	22.8-26.97	237.48-280.91
	<i>Safflower</i>	748-795 ^[24]	34.87-37.06	363.24-386.06
	<i>Soybean</i>	374-514 ^[24]	53.93-74.12	561.82-772.12
	<i>Sunflower</i>	702-982 ^[24]	28.23-39.49	294.07-411.36
微藻	<i>Anabaena sp.</i>	12825-32270 ^[19]	0.86-2.16	8.95-22.52
	<i>Chlorella sp.</i>	2874-1199773 ^[19]	0.14-9.65	1.45-100.48
	<i>Chlorella sp.</i>	28960-86880 ^[25]	0.32-0.96	3.32-9.97
	<i>Chlorella vulgaris</i>	74469 ^[19]	0.37-0.37	3.88-3.88
	<i>Chlorophyta sp.</i>	16548-53782 ^[25]	0.52-1.68	5.37-17.45
	<i>Dunaliella salina</i>	91017-140663 ^[19]	0.2-0.3	2.05-3.17
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	49656 ^[19]	0.56-0.56	5.82-5.82
	<i>Isochrysis galbana</i>	23168-26891 ^[26]	1.03-1.2	10.74-12.46
	<i>Nannochloris sp.</i>	119977-132389 ^[19]	0.21-0.23	2.18-2.41
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	37234-128252 ^[19]	0.22-0.74	2.25-7.76
	<i>Neochloris oleabundans</i>	37234 ^[19]	0.74-0.74	7.76-7.76
	<i>Phaeodactylum</i>			
	<i>tricornutum</i>	1158-66194 ^[19]	0.42-23.94	4.36-249.37
	<i>Pleurochrysis carterae</i>	8274-91017 ^[19]	0.3-3.35	3.17-34.9
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	37234 ^[19]	0.74-0.74	7.76-7.76
	<i>Scenedesmus sp.</i>	12411-53783 ^[19]	0.52-2.23	5.37-23.27
	<i>Spirulina maxima</i>	86880 ^[19]	0.32-0.32	3.32-3.32
	<i>Spirulina platensis</i>	24823-74469 ^[19]	0.37-1.12	3.88-11.63
	<i>Spirulina sp.</i>	2482-28960 ^[19]	0.96-11.17	9.97-116.35

a.假设所得生物柴油的密度均为：882.25g·L⁻¹^[27]

b.假设培养池深度为 0.1m^[28]

c.按照 2010 年我国所消费标油总量计算：2445.8×10⁶ 吨^[29]

d.计算时使用国土面积为 960 万平方公里

1.1.2 微藻在生物能源方面的应用

最早生物能源来自于粮食作物，但由于占用耕地面积过多，引发了严重的粮食危机，现逐渐被第二代生物能源取代。第二代生物能源主要是通过秸秆等废弃的纤维素资源生产的乙醇，纤维素来源广泛而丰富，但是前处理过程产生大量的毒性抑制物质是一个严重的限制因素。如图 1-1 所示，与这些生物质相比，微藻具有天然的优势，可以作为不同种类的生物燃料来源，包括从微藻油脂中抽提精炼出来的生物柴油，生物乙醇、光合产氢及通过厌氧发酵微藻生物质获得甲烷气，甚至生物产电。

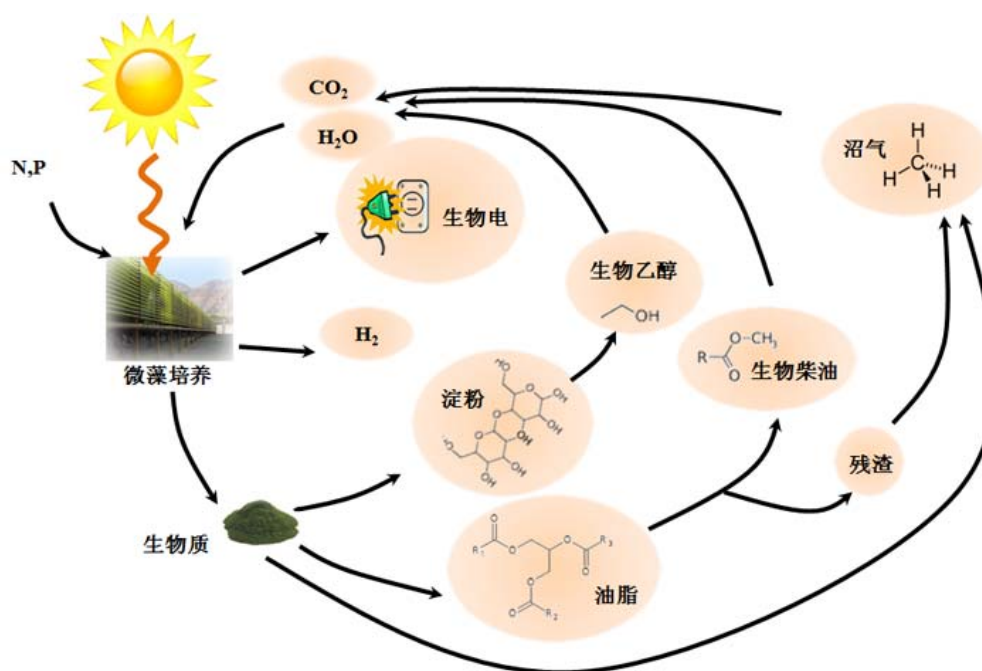


图 1-1 微藻生产生物能源

Figure 1-1 Energy production via microalgal cultivation

1、生物柴油

微藻富含油脂，Mata 指出微藻的脂含量一般在 1-70%，但是在特定条件下，有的微藻脂含量甚至能达到干重的 90%^[30]，如表 1-1 所示，大部分微藻的脂含量都高于 10%。通过甲基转移法可将微藻中的油脂转化为脂肪酸甲酯（Fatty Acid Methyl Ester, FAME）或者脂肪酸乙酯（Fatty Acid Ethyl Ester, FAEE）混合物，即生物柴油。由于生物柴油理化性质与柴油相似，且不需要对柴油机做任何更改就能安全使用，目前世界各国已经陆续制定了相应的标准和条例来评价生物柴油的质量并将其投入到具体社会生活中来，1997 年德国标准 DIN 51606 正式生效，

2002 年美国标准 ASTM D6751 出台, 之后适用于整个欧洲的生物柴油标准 DIN EN14214 也被制订出来, 这些标准对产品的皂化值 (saponification number, SN)、碘值 (iodine number, IN)、十六烷值 (cetane number, CN)、脂含量、黏度、密度和水份等数十项指标进行了界定^[3, 4]。在欧盟, 生物柴油是柴油的主要替代品, 大概占据了整个生物燃料生产总额的 82%, 而且由于政治和经济需要, 这个比例在欧洲、巴西和美国还在持续增长^[5]。然而, 生物柴油的价格与柴油相比缺乏竞争力, 只有真正解决了生物柴油的成本问题, 才能实现其产业化大规模应用。生物柴油的最终成本取决于原料, 这大概占据了生物柴油总成本的 60-75%^[31]。所以说, 只有解决了微藻大规模培养的成本问题才能大力推动微藻在生物柴油生产方面的发展。

2、生物乙醇

除了油脂, 微藻还含有大量碳水化合物 (表 1-1)。Dismukes 等将提取油脂后的微藻生物质残渣作为底物, 通过淀粉葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶及酵母的协同作用完成了生物乙醇的发酵^[32]。与秸秆等生物原料相比, 微藻木质纤维素含量极低, 能够有效避开木质纤维素前处理等生物乙醇发酵的生产瓶颈, 可见微藻细胞是进行生物乙醇发酵的优质原料。还有的科学家利用转基因手段将微藻光合能力与细菌生产醇类的能力相结合, 获得可以直接生产醇类的光合生物。Dexter 等将产乙醇的运动发酵单胞菌中的丙酮酸脱羧酶及乙醇脱氢酶整合到 PCC6803 中, 获得了能将 CO_2 直接转化为生物乙醇的转基因微藻^[33]。

3、生物沼气

早在 1959 年, Golueke 等就对利用微藻生产生物沼气进行了可行性研究^[34]。Sialve 等利用取完油脂后的微藻细胞残渣进行厌氧发酵获得了生物沼气^[22]。Chisti 也在综述中指出, 为了达到经济平衡, 油脂提取后的微藻生物质有必要进行再处理以生成生物沼气^[35]。Yen 等人在微藻沉淀物中加入 50% 的废纸以进行生物沼气的发酵, 其产量达到了 $1170 \pm 75 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ^[36]。

4、电能及燃料电池

早有报道微生物能够通过光电化学电池将光能转化为电能。在这些电池中, 通过光激发产生的高能电将转移到一种电子传递介质上, 再利用这种介质转移到电极上, 从而进行发电^[21]。Yuan 等人通过单室微生物燃料电池管检验了蓝绿藻生产生物电能的能力, 发现蓝绿藻的最大功率密度可达 $114 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ ^[37]。

5、生物产氢

利用微藻将水转化为氢不但能够提供生物能源新渠道, 也有助于捕捉大气中的 CO_2 , 减轻温室效应。早在 1942 年, Gaffron 就开始了微藻产氢的研究, 并成功观察到了放氢现象^[38]。Ananyev 等通过调控 pH 值、氮元素含量及光照强度等,

将 *S. maxima* 的产氢效率提升到了 $400\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[39]。Doebbe 还利用 *Chlamydomonas reinhardtii* 突变株研究了利用葡萄糖提高微藻产氢能力的可能性, 为微藻产氢提供了新思路^[40]。

1.1.3 微藻的其他应用

由于微藻富含油脂、碳水化合物及蛋白质等高附加值的生物化学物质, 因此, 除了能够生产生物燃料, 微藻在水产养殖、化妆品、营养、食品添加剂和医药等方面也有巨大的应用潜力。表 1-3 列出了目前较常见的微藻在能源领域之外的应用和研究。

1、多不饱和脂肪酸

微藻富含多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA), 这是健康饮食的必要组成部分。尤其是 ω -3 脂肪酸, 是人体必须脂肪酸, 对改善人体机能具有极大好处, 主要包括亚麻酸 (linolenic acid, ALA)、二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 及二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)。研究表明, ω -3 脂肪酸能够阻止心律失常, 降低心率和血压, 降低血小板聚集, 减少肝脏甘油三酯的生产, 清除血浆中的甘油三酯等, 这些功能可能是 EPA 及 DHA 能够降低冠心病风险的主要原因^[41]。Chen 通过大鼠试验证明 DHA 对胆汁淤积性肝损伤有保护作用^[42]。由 EPA 和 DHA 氧化产生的脂质调节剂 Resolvins 可抑制炎症反应, 缓解炎症所带来的疼痛问题^[43]。

美国心脏协会建议市民每周吃 3.5 盎司鱼来提高 EPA 及 DHA 的摄入量以降低心血管疾病的风险。2010 年美国人膳食指南也指出需要及时补充 ω -3 脂肪酸以应对每天所消耗的 EPA 及 DHA。目前人们一般通过食用鱼油来补充 ω -3 脂肪酸, 但是鱼油的来源不稳定, 而且炼制困难, 寻找一种来源稳定、价格低廉的鱼油替代品就显得尤为必要了。而微藻是最具潜力的替代品, *Phaeodactylum tricornutum*^[44], *Nannochloropsis sp.*^[44], *Chlorella minutissima*^[44], *Spirulina*^[45], *Chlorella vulgaris*^[46], *Scenedesmus obliquus*^[46], *Pavlova lutheri*^[46]等都含有大量的 PUFA。

2、色素

作为最古老的光捕获者, 微藻富含类胡萝卜素、角黄素、叶黄素及虾青素等各类色素。类胡萝卜素是最主要的维生素 A 原, Farhat 等指出优化培养 *Dunaliella salina* 的盐度, 可以显著提高类胡萝卜素的产量^[47], 是优质的类胡萝卜素来源。大量研究表明海洋褐藻及硅藻中的岩藻黄质对人类健康有重要作用。它不但可用来抗氧化、抗炎症、抗肥胖、抗癌、抗疟、治疗糖尿病, 而且对肝、脑血管、骨头、皮肤及眼睛具有保护作用, 是一种很有潜力的海洋药物^[48]。

表 1-3 微藻在其他领域的应用

Table 1-3 Application of microalgae in other areas

营养成分	营养医药价值	微藻
PUFA	保护心血管、阻止心律失常、降低心率和血压、降低血小板聚集、降低胆固醇	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> ^[44] , <i>Nannochloropsis sp.</i> ^[44] , <i>Chlorella minutissima</i> ^[44] , <i>Spirulina</i> ^[45] , <i>Chlorella vulgaris</i> ^[46] , <i>Scenedesmus obliquus</i> ^[46] , <i>Pavlova lutheri</i> ^[46]
β -胡萝卜素	抗氧化	<i>Dunaliella salina</i> ^[47] , <i>Chlamydomonas acidophila</i> ^[49] , <i>Arthrospira platensis</i> ^[50]
岩藻黄质	抗氧化、抗炎症、抗肥胖、抗癌、抗疟、治疗糖尿病	<i>Diatoms</i> ^[48]
虾青素	强力抗氧化剂、降低甘油三酯、提高机体免疫能力、护眼护肝、抗炎症、抗衰老	<i>Haematococcus pluvialis</i> ^[16]
叶黄素	抗氧化	<i>Chlorella sorokinian</i> ^[51] , <i>Chlamydomonas acidophila</i> ^[49]
藻青蛋白	提高免疫力、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、保肝、荧光试剂、着色剂	<i>Arthrospira platensis</i> ^[50]
藻红蛋白	荧光试剂	<i>Porphyridium</i> ^[52]
维生素 E	抗氧化	<i>Euglena gracilis</i> ^[53]

虾青素是一种天然存在于微藻的类胡萝卜素,不但可以作为三文鱼和鳟鱼的水产养殖添加剂^[54],更重要的是它具有多种临床价值,有良好的安全性和耐受性。虾青素是强力抗氧化剂,而且具有降低甘油三酯、提高高密度脂蛋白、降低肥胖患者和吸烟者的氧化应激、阻止氧化 DNA 损伤、降低 C 反应蛋白(C-reactive protein、CRP)和其他炎症生物标志物的水平、并且提高机体免疫能力、改善视敏度和眼睛调节、提高男性生殖能力、缓解运动疲劳、保护线粒体对抗内生氧化自由基、抗氧化胁迫、抗炎症及减缓衰老等功能^[55-57]。目前,虾青素已经被广泛用于保健品、化妆品和医药行业中来。天然虾青素主要存在于微藻、酵母和甲壳类生物体内,其中以雨生红球藻中含量最高,因此人们相信可以通过雨生红球藻来生产大量安全廉价的天然虾青素,近 30 年来投入了大量的人力物力,目前已初现成效,相应的工厂已经开始投入试运行^[58]。

3、蛋白

藻胆蛋白是一种普遍存在于红藻、隐藻和某些甲藻中的有色蛋白,主要可分为藻红蛋白、藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白及别藻蓝蛋白。有广泛的商业应用价值,藻胆蛋白具有强抗氧化性,它有减少发炎组织组胺的释放、降低前列腺素和白三烯的水平、缓解水肿程度、保护神经、保肝护肝、抑制细胞凋亡、降低血清胆固醇

等医疗效果^[52]。此外，藻胆蛋白还能应用于临床和免疫的荧光检验等方面。据统计，截止到 2007 年全球共有 289 个关于藻胆蛋白的专利，其中荧光应用方面 216 个，治疗方面 17 个，化妆品 2 个，饮料行业 3 个，提取纯化方面 23 个，培养获取方面 2 个，生产方面 26 个，其中荧光应用以美国专利居多，日本专利更侧重于藻胆蛋白的生产、纯化和在治疗和诊断方面的应用^[52]。

微藻不但能够作为粮食替代品，而且有极高的保健价值，其实小球藻和螺旋藻等早就作为健康食品或者食品强化剂被人们广泛接受。如台湾绿藻工业股份有限公司年产藻干重达到 400 吨，其旗下微藻产品绿宝食品系列畅销到日本、欧美等 35 个国家^[16]。

1.2 微藻的大规模生产的技术基础

1.2.1 微藻培养的历史

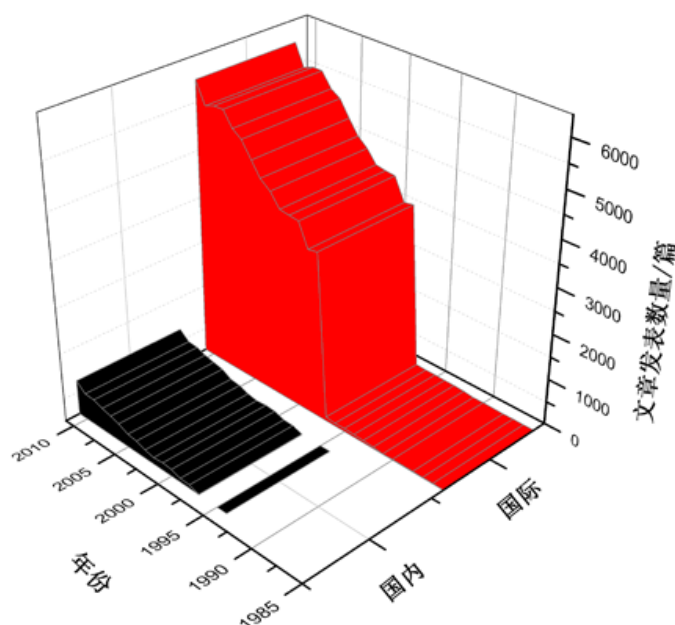


图 1-2 微藻研究趋势

Figure 1-2 The trend for algal research

在过去的 50 年中，从各种商业价值的发现，大规模培养到重要生物物质的提取，微藻吸引了许多知名跨国公司及各政府麾下研究机构的注意，他们不但运用各种手段对该领域进行评估分析，更为微藻商业化生产进行了许多设计和研发工作，尤其是 1998 年以来，人们对微藻的兴趣激增，越来越多的科学家投身

到微藻研究领域中来（图 1-2）。早在二战时期，德国就考虑过大规模生产微藻用作食材。上世纪 50 年代，我国中科院也展开了小球藻培养的研究。到 60 年代初期，日本第一次实现了小球藻的大规模培养^[59]。到了 70 年代，墨西哥也开始了对螺旋藻的培养和收获研究，之后澳大利亚开始使用杜氏藻生产 β -胡萝卜素。到了 80 年代螺旋藻和杜氏藻的大规模培养被列入了我国第七个五年计划。而微藻的培养工厂在美国和以色列次第建成，印度也开始了对蓝绿藻的培养。

第一次石油危机引起了包括日本美国在内的许多国家对微藻产油的思考，并最终推动 NREL 展开了 ASP 计划，从 1978 到 1996 年开展了大量微藻资源开发的实验，涉及到优质微藻筛选、产氢、产沼气、产生物柴油等各种方向^[1]。尽管人们看好微藻在能源、食品、医疗等各方面的应用，如何利用最有效和最廉价的技术去生产微藻还是一个漫长而艰巨的过程。早在 1992 年美国生物柴油委员会就提出在美国推行生物柴油商业化的建议^[2]。在美国，每生产一加仑生物柴油可以获得 1 美元的退税。在我国，《柴油机燃料调和用生物柴油》作为第一项生物柴油国家标准也已进入报批程序。虽然微藻在生物柴油生产领域具有极高的商业潜力，但是距离工业化的实现还有一段距离，只有找到高产的藻种及优化相应生产条件，大幅降低微藻产油成本和优化生产环节，获得了有竞争优势的产量及收益，才能真正实现微藻大规模产油的盛况。欧洲微藻生物协会（European Algae Biomass Association）认为至少还需要 10 到 15 年微藻产油才能走出实验室，正式开始工业大规模生产^[16]。

1.2.2 接种密度在微藻培养中的影响

从经济学角度来看，目前通过微藻产能的成本还是远高于直接使用化石能源，而微藻的培养成本是主要限制因素之一。影响微藻培养成本的指标一般包括生长速率、脂肪含量、抗逆能力、营养利用率、生物质的分离和处理以及获得其他有价值化学品的效率。适宜的参数调控不但能够提高微藻的产率，还能提高生产的稳定性和系统的抗逆性，污染和不良的生长往往是培养条件差的体现。因此如果希望实现微藻商业化，优化微藻培养条件，降低微藻培养成本势在必行。

大量研究证明接种密度是微藻培养最重要的因子之一^[6, 60]，它能够显著影响细胞培养周期，尤其是延滞期的长短，最大比生长速率，最终生物量及代谢产物产量。Lee 指出，在 *C. sorokiniana* 的混合培养体系里，将接种密度从 2g 增加到 7g，能明显影响微藻的生物质产量，葡萄糖消耗量以及葡萄糖的转化率^[60]。同样的接种密度影响也在 *Chlorella vulgaris* 批次培养中被观察到，当初始细胞密度从 $1.25 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升到 $10 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，细胞脂含量显著下降，但是脂产量却明显增高，最高接种密度下获得了最高脂产量 $49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ^[6]。然而高脂含

量与高生长速率并不是完全不能共存的,已有研究报道在循环回路的光生物反应器下培养 *Chlorella vulgaris*, 不但能够将其脂含量维持在 30%, 还能保持细胞高速生长^[61]。Lau 通过培养 *C. vulgaris* 发现, 当接种密度从 $5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提高至 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 营养去除效率也随之增加, 生长状态也越来越好^[62]。还有研究报道, 初始细胞密度与 *Phaeodactylum tricornutum* 总脂肪酸产量及 EPA 含量有较强的正相关关系^[63]。接种密度不但能影响微藻的生长和脂积累, 某些生物培养中, 外源脂肪还能和接种密度协同作用共同影响细胞生长。Schousboe 的研究结果表明在无脂肪补充的培养条件下, 当接种密度低于 $250 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, *Tetrahymena thermophila* 将无法存活^[64]。接种密度对微藻的脂肪组成也有显著影响, 这个推论已被证实并成功应用于优化 *Marchantia polymorpha* 细胞悬浮液生产 PUFA 的过程中^[65]。除了油脂, 接种密度还能影响微藻其他副产物的分泌和生产, Kaçka 发现, 改变 *C. vulgaris* 的初始细胞密度对其产甘油的能力有显著影响, $10 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 是其试验范围最高接种密度, 此时获得最高甘油产量 ($305.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[66]。

目前高密度接种被广泛应用于生物工程发酵研究中, 因为高密度接种不但可以缩短细胞培养周期, 还可以减少细胞培养体积。众所周知, 微藻产油一个必要环节是将细胞从其生长的液态环境中分离出来, 细胞培养体积的减少有助于强化下游的分离纯化过程, 能够有效节约成本, 提高产量。目前, 这种发酵策略已经被引入到微藻培养过程中来^[67]。Xiong 等人以 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的初始接种密度对 *Chlorella protothecoides* 进行异养高密度发酵最终获得了 $51.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的发酵液^[68]。而且高的藻种密度也能有效防止污染, 有研究指出高密度接种不但能够缩短 *Chlorella* 的生长周期, 还能够帮助 *Chlorella* 构建出种群竞争优势以减少生物污染^[69]。可见高接种密度不但能够提高生物质和代谢物的产量, 而且也是一个可行的控污办法。

鉴于高接种密度培养的诱人前景, 大量科学家展开了接种密度对细胞生长的内在影响机制的研究。细胞接种到新的培养体系之后, 需要一段时间适应, 这时微环境中的营养分布、空间大小、pH 等条件将影响细胞对新环境的适应过程, 而恶劣的环境, 如过热、过冷、过干、营养缺乏等都会减慢细胞的适应速率^[70], 此外细胞之间的互相接触也会对其适应新环境产生影响。如图 1-3 所示, 接种密度可以直接影响空间、pH、光源及营养分布, 而这些环境因子都会造成细胞的生理状态差异, 从而导致细胞代谢的差异和次生代谢物的分泌, 以及细胞的繁殖速率, 这些结果又会反过来影响所在环境变化, 从而造成一种反馈。尽管大量研究证实了接种量对微藻生长和产物生产的效果, 但直到现在, 人们对其内在生理

机制还是所知甚少，因此需要将有效的全方位研究手段引入到这一领域中来做深入研究。

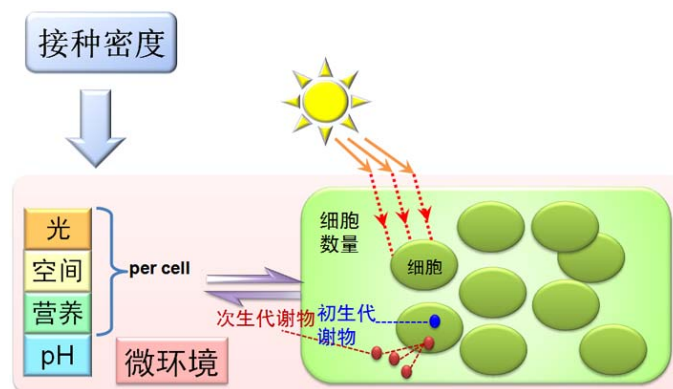


图 1-3 接种密度对细胞生长环境及细胞生长的影响

Figure 1-3 The influence of the inoculum size on the cell environment and cell growth

1.2.3 光照在微藻培养中的影响

虽然目前部分商业微藻如小球藻能够异养发酵，但是更多的微藻是不能脱离光源生长的，而且只有进行光合作用培养下的微藻才能发挥太阳能转化器的作用，生产绿色能源，可以说光源是微藻生产的必要条件。如图 1-4 所示，光合微藻中所有含碳化合物的化学能通过光合作用光反应获得，而其碳骨架则来自于碳反应中的 3-磷酸甘油醛（Glyceraldehyde 3-phosphate, G3P），这些物质构成了微藻生长及代谢的基础，可见光是光自养微藻的基础能量来源，光照强度和供光波长是影响微藻培养成败和质量的最关键因素之一。

一般说来，微藻能够吸收的光波长范围在 400-700nm，这个范围的光也被称作光合有效辐射（photosynthetic active radiation, PAR），而且不同波长的 PAR 光能是不一样的，如一个“绿”光光子（如 550 nm）比“红”光光子（如 680 nm）能量多出 20%，但是比“蓝”光光子（如 470 nm）少 15.5%^[7]。因此，不同波段的 PAR 对微藻的影响是有差异的。Baba 的研究指出不同的单色光对 *Botryococcus braunii* 的生长和代谢的影响有显著差异。不但各个单色光下细胞表型不一，而且红蓝光下的 *Botryococcus braunii* 生长速率及光合固碳能力要高于绿光^[71]。Das 发现不管是在光自养还是混养情况下，光的波长对 *Nannochloropsis sp.* 的生长和脂积累都有重要影响，其中蓝光下微藻的生长速率和脂肪产量都最高，但绿光下脂含量最高^[72]。

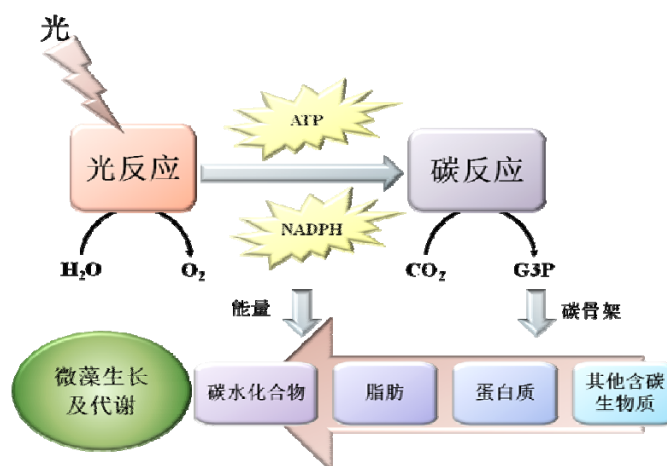


图 1-4 光对微藻生长代谢的影响

Figure 1-4 The effect of light on the growth and metabolism of microalgae

除了波长,光照强度对微藻的生长也是有影响的,而且光强并不是越强越好,因为当光强超过一定范围,将会出现光饱和现象,对于微藻培养体系来说,存在一个最适光强,当光强从零开始逐步增加,光合效率与能量的输入是成正比关系的,之后将达到一个临界点,即最适光强处,此时达到光饱和,这是光合系统所能利用光能的极限,之后光和效率将随着光能输入而下降,甚至导致光氧化,损坏光受体,从而降低了光合速率和生产力,即光抑制现象^[7]。而且微藻细胞暴露在强光下可能会引起氧化胁迫甚至细胞死亡^[73, 74]。Solovchenko 比较了 35、200 和 $400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下的 *P. incisa* 生长情况,发现 *P. incisa* 在强光下生长速率最高且由于生物质积累迅速,其总脂肪酸产量也最高^[75],相同的现象也在 *Arthronema africanum* 的培养过程中被证实^[76]。光照条件不但对微藻的光合作用有重要影响,还能影响细胞的脂肪积累和分布。Li 研究了 $0\text{-}200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度对 *Chlorella kessleri* 和 *Chlorella protothecoide* 生长和产脂能力的影响,结果发现其最适光照强度分别为 120 和 $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[77]。Yeesang 也指出当光照强度从 33 升至 $82.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,脂含量的变化是先上升后下降的趋势,对于脂积累来说 $49.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是最佳光强。报道指出强光培养的 *Chlamydomonas sp.* 比弱光培养的细胞中含有更多的 PUFA^[78]。

可见,光照条件不但是微藻的光合作用和生长的基础,还能影响细胞的代谢和组成。除了寻找最佳光照条件之外,还可通过对微藻进行基因构造的手段来改善光照对微藻的影响,如为天线系统“瘦身”,补充色素种类,或者提高 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase, Rubisco) 的活性等^[7]。可以说光能的供给和利用将成为实现光合微藻大规模培养最重要的科学技术挑战之一。

1.2.4 微藻培养中的其他影响因素

除了接种密度和光照之外，微藻培养还受到多方面因素的影响，一般可将其分为生物因素、非生物因素和操作因素三个方面^[79]。

1、生物因素

生物因素主要包括藻种本身、病原体（细菌、真菌、病毒）和其他竞争微藻。目前已发现的藻种超过了 3 万种，藻种的多样性为藻种选择提供了保障。若想要对微藻进行合理的高效利用，就需要慎重选择藻种并对所选藻种进行深入研究。很多情况下生物柴油的生产是藻种的脂肪含量和生长速率的平衡结果。如 *Botryococcus braunii* 的脂含量能够达到 75%，远高于 *Nannochloropsis oculata*（22.7–29.7%）和 *Dunaliella salina*（6.0–25.0%）的脂含量。但其生物质产量仅为 $0.02\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ，两相抵消，其油脂日产率仅为 $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ，明显低于 *Nannochloropsis oculata*（ $84.0\text{--}142.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ）和 *Dunaliella salina*（ $116.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ）^[30]。此外，有害微藻、霉菌、细菌和轮虫等生物能与微藻形成恶性竞争关系或者直接捕食微藻，而这往往是造成开放培养失败的主要原因之一^[80]。一般可以通过添加抗生素或者制造高温、高压、强光及强碱等极端环境来降低生物污染。如提高培养 *Dunaliella salina* 的盐度^[81]，或者为 *Arthrospira platensis* 创造高 pH 值环境^[82]，都是在微藻大规模培养中常用到的策略。

2、非生物因素

非生物因素主要有温度、营养、pH 值及盐度等。温度是微藻培养中最主要的限制因素之一。但是不同的藻，对温度变化的响应并不一致，当温度从 20 上升到 25℃ 后，*N. oculata* 胞内的脂含量几乎增长了一倍，但是当温度从 25 上升到 30℃ 后 *C. vulgaris* 的脂含量却从 14.71% 减少到了 5.90%^[83]。对大多数藻来说，最适温度的范围一般在 5℃ 之内，但存活温度的范围要宽得多。尽管如此，密闭系统中的微藻温度控制仍是一个难题，因为在温度较高的环境下，密闭系统不易散热，反应器内的热能会持续积累，尤其在大规模培养中，会出现培养体系对温度变化响应时间过长的现象，从而导致外部温度和最佳培养温度无法同步。

CO₂ 是微藻生长的重要碳源，其浓度直接影响其光合作用的进行和生物量的积累。在没有其他碳源补充而所通气体中 CO₂ 的含量又低于 0.033% 时，微藻的生长将会被限制^[69]。然而 CO₂ 的浓度并不是越高越好，高浓度 CO₂ 将导致微藻生理和代谢的显著变化，如培养液 pH 的下降，气孔密度减少，光呼吸和暗呼吸比例下降，电子循环产 ATP 被抑制及 C/N 比的上升等现象。Chinnasamy 比较了不同浓度 CO₂（0.036%–20%）对 *Chlorella vulgaris* 生长的影响，结果表明 6% 时微藻的叶绿素含量和生物质最高，之后 CO₂ 浓度与生物质和叶绿素水平成反比

例关系。 CO_2 高于 16% 后, 微藻生长状态比 CO_2 浓度为 0.036% 时更差^[84]。当然, 随着藻种的不同, 对 CO_2 的耐受和需要也就不同, 大量研究证明, 某些微藻能在极高 (>40%) 浓度的 CO_2 环境下快速生长^[85, 86]。 CO_2 不但为微藻的生长提供了碳骨架, 而且还能提供搅拌力, 为微藻培养中的营养物质均匀分配提供了动力。

氮源也是微藻培养, 尤其是生物柴油用途的微藻培养的一个重要环境因子。自从 1949 年 Spoehr 报道 N 饥饿能够将 *Chlorella pyrenoidosa* 的脂含量从 5% 提高到 85%^[87], 大量科学家展开了氮源与微藻油脂积累关系的研究, 发现氮缺失不但能改变微藻的脂肪组成^[88], 而且证实了氮缺乏可以引起 *N. oculata*, *C. vulgaris*, *Nannochloropsis sp.* 等大量微藻胞内脂质的积累^[83, 89], 然而随之而来的却是细胞生长的减缓, Li 在对 *Neochloris oleoabundans* 的研究中发现, 最高脂含量在最低氮 (3 mM) 浓度体系中得到, 但是适宜的氮浓度 (5 mM) 培养下才能得到最高脂产量^[90]。由此可见, 使用氮胁迫来提高产量时, 只有找到脂积累和细胞生长的平衡, 才能获得最高经济效应。还有研究证明氮源的缺失将造成生物质、胞内蛋白和叶绿素水平的显著下降^[90, 91]。

盐度对微藻的渗透胁迫、离子的压力及基于选择性离子渗透膜细胞离子比率等三个方面有显著影响。最简单的方法是通过添加淡水或海水进行盐度控制。研究指出改变盐度能将 *Botryococcus braunii* 中脂肪及色素的产量提高一倍以上^[92], 目前盐度对微藻的影响已被广泛用于 *Dunaliella salina* 产类胡萝卜素的生产^[47]。

3、操作因素

操作因素主要有搅拌效率、供氧效率、稀释率和收获频率等, 尤其是搅拌效率, 它会影响细胞、热、营养物质和代谢产物分布的均匀度。此外在光合细胞培养时, 一定程度的动荡有助于避免细胞自我遮挡, 这种现象在大规模生产中尤为常见^[93]。然而搅拌会引起剪切力胁迫, 甚至对细胞造成破坏, 不同藻种对搅拌强度的要求是不一样的, 需要在实际操作中进行检验。Moheimani 指出在玻璃瓶光反应器中, 搅拌速度从 0 升至 200rpm, *P. carterae* 的比生长速率和细胞收率显著上升, 200rpm 之后, 两者均开始下降, 到 600rpm 细胞开始死亡^[94]。混合能够保证微藻细胞一直处于悬浮状态及光照均匀, 有助于细胞生长和生物质积累, 同时也能减少细胞周围的边界层以促进代谢产物的分泌, *Nannochloropsis* 的大规模培养中, 将叶轮转速从 84rpm 提高到 126rpm, 生物质产量获得显著提高^[95]。

除上述培养因子, 还有一些特殊手段也能控制微藻培养的成本。Olguín 利用微藻废渣循环完成了微藻再培养, 为微藻利用的成本节约提供了良好的范本^[22]。将微藻培养基地建立在发电站附近以有效利用 CO_2 , 是公认的有助于降低成本的微藻大规模培养技术^[96]。此外还需要考虑培养模式, 分批培养还是连续培养, 培

养体系是封闭还是开放。这取决于藻种的选择，对环境条件的要求，营养的供给甚至结合其他控污手段，如污水处理或 CO_2 处理等。

除了成本问题，还需要考虑生物能源生产对环境造成的影响。生物燃料中最需考虑的两个环节是整个过程中化石能源的消耗量及 CO_2 的排放量。在接下来的日子里，科学家们也许能够通过建立筛选高产藻种，优化生产环节来改善这一状况。为了提高微藻生产效率，降低生产成本，应综合考虑优化培养、收获和处理技术。本文中引入高通量的系统生物学分析手段，恰巧能够为生物状态提供一个全局性参考指标，从而量化各培养因素对系统的影响。

1.3 系统生物学

1.3.1 组学的联系和发展

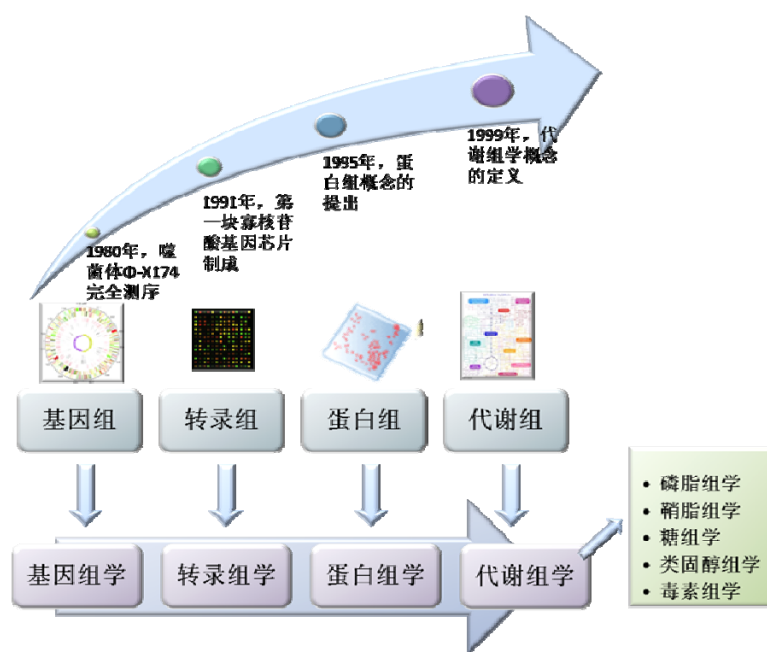


图 1-5 组学的相互关系及发展历程

Figure 1-5 Schematic view of “omics” cascade

生物体是由基因、蛋白及各种生命分子所组成的整体，其中基因承载着生物体的所有遗传信息，这些信息经过转录翻译，通过特定的蛋白获得执行，引起体内种种代谢变化，继而完成生物体的各种生命活动。正如 Henrik Kacser 所述：

“当你要了解一个整体，你就需要研究这个整体”^[97]。因此如果需要从本质上了解一个生物体的生命活动，就必须从整体的角度对其基因、蛋白及代谢进行研究。而系统生物学正是一门从全局角度研究生物系统的艺术，它涵盖了基因组学、转

录组学、蛋白质组学、代谢组学和数学建模等在内的各种技术，其核心要义在于“整体”二字。过去十年里，系统生物学被广泛用于遗传因子和环境因子引起的生物体 RNA、蛋白质和代谢物的结构、性质及丰度的动态变化的整体性研究，这些研究有助于揭示生理病理的发生机制、建立诊断标准，确定治疗靶点^[9]。

如图 1-5 所示，组学是从整体上研究基因、蛋白或代谢物等某一类具有共同生命特质的生物化学物质的结构及功能的系统生物学科。如基因组是一个生物体的所有遗传信息，即全部基因及非编码 DNA/RNA 的总集，而基因组学就是对整个基因组的结构和功能进行研究的学科^[98]。蛋白质组学是一个生物系统的细胞在给定条件下所有蛋白质组成及其活动规律的研究，它能获得整体蛋白质的生化特征，包括表达水平，翻译后修饰和相互作用等，从而获得对疾病发生发展，细胞生理生化过程和代谢过程上的蛋白质水平的全面认识。代谢组学则是研究生物体在不同环境下代谢物整体动态变化的系统科学，它能为我们打开一个生物体代谢的“总瞰图”。这是一种反向工程手段，能够反向解析被研究对象的生理生化状态与预设环境变化之间的关系^[99]。代谢物是细胞调控如生长，分化和防御反应等生理过程的最终产物，他们的水平代表了生物体系对遗传因子或环境因子的最终响应。因此，研究某一过程中代谢水平的动态变化对阐明其生理功能是非常重要的。自从英国帝国理工的 Jeremy Nicholson 教授和德国马普的 Oliver Fiehn 教授分别在 1999 年和 2000 年提出了 metabonomics 和 metabolomics 的概念^[100, 101]，代谢组学在医学、生理学、毒理学、药学和营养学等研究领域取得了长足的进展。相对而言，metabonomics 主要是基于核磁共振（nuclear magnetic resonance, NMR）的无损检测，常用于医学样品的研究，而 metabolomics 更偏重于质谱，最初应用于植物各种代谢产物的研究。由于代谢物种类繁多，而且相似结构的同类代谢物往往也有较为一致的生理生化功能，因此在代谢组学的基础上人们根据代谢物的分类，又将其细分为磷脂组学、鞘脂组学、糖组学、类固醇组学和毒素组学等^[102]。

遗传信息是通过基因-mRNA-蛋白获得传递和执行的，进而展开了细胞信号转导、细胞发育、新陈代谢等生命活动，之后的代谢组是这些生命活动执行的结果。有趣的是组学的发展也是由基因组学开始，随着对基因组信息的了解日益加深，探索基因的功能的愿望推动了转录组学，蛋白质组学，代谢组学的发展。基因组学是对于生物体基因型的研究，而强调基因表达水平（转录组学），包括翻译后修饰的蛋白翻译（蛋白质组学）以及代谢网络（代谢组学）等功能性研究的系统生物学则为人们提供了一系列的表型数据。而生物体内的各种生命活动不是仅靠一两个基因或蛋白就能够得到执行的，一个简单的代谢调控往往涉及到大量的基因与蛋白，因此如果要对生物体的各种复杂的生命活动进行全面深入的研究，必然要对蛋白和代谢进行整体的动态的综合研究。

可以说基因组学是一个遗传信息的源头，它界定了生物体从出生到发育，直至最后消亡的所有生命活动范围，野生酵母无法通过光合作用进行自养行为，野生三文鱼不能脱离水环境而存活，自然界中的微藻不存在细胞分化进而形成器官的生理发育，只有通过基因改造技术，使这些生物体获得相应的外源基因，才有可能获得这些原本不具备的生理功能。但是基因组与转录组、蛋白组及代谢组并不是一对一的关系，一个特定的基因可以有多种 mRNA 的剪接形式，而一个 mRNA 翻译的蛋白也有多种翻译后修饰。因此，即使是拥有完全相同的基因组的生物体，也不可能拥有完全一样的生命历程，这是因为随着时间、地点和环境变迁，生物体基因的表达转录形式会出现相应变化，而作为基因功能的执行者，蛋白表达将会出现极大的差异，与之对应的代谢组学也会随之发生变化。因此与基因组学不同，蛋白质组学和代谢组学是动态的概念，在不同的外界环境和细胞状况下，生物体的蛋白组和代谢组会可能表现出极大的差异，对这些差异的分析，有助于我们理解细胞的各项生命活动的本质差异，从而对其进行掌握和改造。

1.3.2 系统生物学的技术支持

高通量，高灵敏度和高精度的分析手段能够在短时间获得海量准确的数据，是组学研究的基础。大量物种的基因组测序完成成为后续的转录组、蛋白质组和代谢组的分析和研究提供了数据基础。蛋白质组学侧重于全部蛋白质在细胞、生物或组织的识别和量化。而且蛋白质表达水平受复杂的调控机制影响，因而非常敏感。目前蛋白质组学中常用的手段主要有二维凝胶电泳和液质联用技术^[103]。二维凝胶电泳是最早用于蛋白质组学的技术手段，发展相对成熟，然而在重现性和处理极端和低丰度蛋白上有着较明显的局限性，而且不能满足高效率分析蛋白组的要求^[104]，因而近年逐步被液质联用技术取代。液质联用主要分为非标记定量技术和标记定量技术，其中非标记定量技术由于不需要使用同位素标记，耗费较少，但是其对液质联用设备的重复性和稳定性要求更高^[105]，因此目前标记定量技术更为常用，主要包括 ^{18}O 标记法^[106]、细胞培养稳定同位素标记定量法 (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)^[107]、同位素亲和标签定量法 (isotope-coded affinity tags, ICAT)^[108]、同位素标记相对和绝对定量法 (isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[109]等。代谢组学需要分析细胞、有机体或分泌物中所有代谢物的变化，因此需要高通量，高灵敏度和高精度的现代分析手段作为技术支持，目前常用的技术主要有气质联用 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)^[110]、液质联用 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)^[111]和 NMR^[112]。随着分析手段的进步，系统生物学研究中所获得的数据日趋庞大，如果要对这些海量数据进行分析，不但需要完善的数

数据库支持,对数据的充分理解,还需要更好的算法将这些数据中的主要信息抽提出来。从研究的角度看,系统生物学研究过程中所产生的海量信息和这些信息之间错综复杂的相互联系不但需要强有力的数学研究手段来进行统计处理和分析,同时也需要适当的可视化工具将晦涩的数学结论用图像形象地表现出来。目前系统生物学中各组学根据自身特点和需要分别发展出了不同的数学算法和工具。

以代谢组学为例,其常用的数学手段主要有聚类分析法(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析法(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法(partial least-squares to latent structures, PLS)及正交偏最小二乘法(Orthogonal partial least squares, OPLS)等多元统计算法。PCA可以对代谢组学所得多维矩阵结果中的信息进行综合分析并压缩成含有大量信息的低维度的矩阵,这种方法可以在不损失主要信息的前提下将数据大大简单化^[113],从而形成新的二维或三维模型。所得结果不但可以用来研究观测点之间的聚类、分组和离群关系,还能指出造成这种关系的内在联系。

但是PCA是一种无导式的多元统计手法,它有可能导致重要信息的缺失和结果针对的偏差,因此在其基础上发展出了PLS等新算法。与之相比,PLS和OPLS是更为复杂精密的多元统计算法。它们不但需要代谢物结构和丰度变化所构成的X矩阵,还要根据研究需要引入Y矩阵对X矩阵进行矫正,从而确保分析方向不偏离需要解决的科学问题。根据这种有导式的统计方法所得到的模型还能分析X矩阵和Y矩阵的内在联系,从而通过新的X矩阵对Y值进行预测^[114, 115]。可以说,这些高新技术和精密数学算法的开发和应用为组学研究提供了基础,但反过来,组学的发展和需求也促进了这些技术的进步和更新。

1.3.3 系统生物学在微藻研究中的应用

系统生物学分析有助于阐明微藻胞内油脂、色素及碳水化合物等合成代谢的关键环节,为这些高附加值产物的生产提供理论上的优化方向,从而降低微藻产业的成本。然而转录组学和蛋白质组学高度依赖于基因组序列的研究程度,基因组数据的缺乏阻碍了微藻系统生物研究的进程。可喜的是自1978年模式化微藻——衣藻的叶绿体基因图谱展开研究以来^[10],关于衣藻线粒体、质体、全基因组测序的工作陆续完成^[116-118]。之后人们相继展开了对*Chlorella variabilis*、*Micromonas pusilla*、*Ostreococcus tauri*、*Thalassiosira pseudonana*、*Dunaliella salina*、*Prototheca wickerhamii*及*Phaeodactylum tricornutum*等微藻的基因组测序工作^[11, 119-121]。

这些工作的开展为微藻后续的转录组、蛋白组和代谢组研究提供了丰富的信息预测数据,打下了良好的基石。Chen等利用蛋白质组学研究了*Chlamydomonas*

reinhardtii 的产氢分子机制^[12]。Grouneva 通过蛋白质组学分析了两种海洋硅藻 *Thalassiosira pseudonana* 及 *Phaeodactylum tricornutum* 光合作用机制, 不但补充了光捕获天线的组成的相关知识, 还给出了类 LI818 光捕获蛋白 (LI818-like light harvesting proteins, Lhcx) 在硅藻中的分布情况^[13]。Oikawa 使用代谢组学的方法对不同胁迫下 *Chara australis* 不同细胞器中的代谢物的波动进行分析, 发现液泡和细胞质内的代谢变化不同步, 从而提出胞内代谢空间不同步调控的设想^[122]。Kluender 比较了光系统 II (photosystem II, PSII) 抑制剂扑草净处理过和没处理过的 *cenedesmus vacuolatus* 的代谢谱图, 揭示了处理后的详细代谢轨迹, 并指出胞内能量代谢的损伤, 分解代谢的激活及碳生物合成的减缓等是 *cenedesmus vacuolatus* 对扑草净处理的主要代谢响应, 为了解扑草净的毒性机制提供了重要的代谢数据和指标。这是代谢组学在微藻的生态毒理学上的成功应用^[15]。Shutova 利用气质联用技术研究了 *Chlamydomonas reinhardtii* 的 CCM 调控过程中的主要代谢产物的变化。研究共发现了 128 种差异代谢物, 并指出代谢差异在早期最为明显, 其中光呼吸增加是早期的碳浓缩机制诱导过程中的主要现象之一^[14]。

虽然系统生物学被逐步引入到微藻的研究中来, 但是还主要集中在机理的研究上。目前距离微藻真正产业化虽然还有很长的路要走, 但不可否认, 从环境改善到新能源开发, 从营养医疗到化学工业应用, 微藻都具有巨大的商业价值。但是这涉及了复杂的环境调控和基因调控, 需要一个强力的研究手段为我们撕开迷雾, 而系统生物学恰恰能够为我们提供大量关于微藻基因、转录、蛋白及代谢的基础信息, 为微藻整体变化的研究提供新方法。

1.4 本文的研究意义及主要研究内容

1.4.1 研究意义

化石能源的储备危机和环境的日益恶化迫使各国认识到开发可持续发展的绿色能源的必要性和战略意义, 然而第一代生物能源的“粮食危机”问题和第二代能源的预处理瓶颈遏止了生物能源的发展。作为第三代生物能源主要来源的微藻有种类丰富、生长迅速及易于培养等一系列优点。然而其大规模培养仍然存在不易收获, 成本过高等问题。要解决这些问题, 就需要对微藻的生长和色素、油脂及蛋白质等高附加值产物的积累的内在分子机制进行研究, 这样才能优选出最佳生长条件, 最大程度地利用高选择性环境生存等生理特征, 从而达到降低成本, 提高产量的目的。虽然大量研究表明接种密度、光照、碳源及氮源等能够极大影响微藻的生长和产物积累, 然而, 这些因素之间也存在错综复杂的联系和影响,

这些关系很大程度上加大了研究的难度。因此传统的研究手段在揭示微藻生理状态变化机制上有较大限制。

不同于普通研究手段,系统生物学能够为体系的生理生化变化提供一个整体的视角,它能够清晰地指出体系变化给细胞带来的生理生化变化途径和趋势,不但能够最大程度上避开重要信息的缺失,而且还能给出环境因子或遗传因子调控下细胞转录调控水平、蛋白表达水平、细胞代谢水平的综合变化,这是各个因子协同调控下的加合结果。本研究第一次将系统生物学引入到微藻培养监控和条件优化筛选上来,考察了不同接种密度下的小球藻在代谢水平、磷脂水平和蛋白水平上的整体变化,以揭示接种密度对小球藻生长和脂积累的调控机制,并寻找与接种密度有关联的潜在可优化环境因子。

1.4.2 研究内容

本文的研究内容主要包括五个方面:

第一、考察了随着接种密度改变,小球藻生长状态以及产油能力的变化,包括 FAME 的日产量和 SN、IN 及 CN 的变化情况。发现接种密度对小球藻的生长及脂积累都有显著影响。

第二、将代谢组学应用于不同接种密度体系以监控小球藻胞内代谢对接种密度变化的响应,并且通过 PLS 分析了小球藻代谢与脂积累的相关性,同时揭示了与脂积累相关的可能的代谢调控机制和可优化的环境因子。

第三、探讨了不同接种密度下小球藻磷脂组成及含量的变化情况,发现接种密度为 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养体系的磷脂状态显著不同于其他体系,进一步分析发现造成这种差异的磷脂分子主要是磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)和磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)。膜的流动性的调整也在接种密度差异体系中发挥了重要作用,这个调节主要是通过磷脂分子不饱和度完成的。

第四、主要研究了不同接种密度下小球藻中光合作用相关的蛋白质的变化规律,通过典型相关分析结合代谢组中所发掘的关键代谢物的变化,发现光合蛋白的表达是造成这些体系下小球藻代谢水平不同的关键因素。

第五、通过不同光照实验证实了优化光照因子有助于改善高接种密度对小球藻培养造成的负面影响,验证了接种密度所导致的光强变化是影响小球藻生长代谢的最关键环境因子;而光调控在不同接种密度培养体系中的小球藻生长及代谢过程起到了决定性作用。这为通过多组学联用综合分析环境因子对细胞生长代谢造成的复杂影响及发掘其中关键调控因子提供了新思路。

第二章 材料与方法

2.1 主要仪器

2.1.1 常用仪器

- 1、欧诺卧式光照大容量全温度恒温摇床 HNY-211A（天津欧诺）
- 2、分析天平 BS124S（0.1 mg, Germany）
- 3、漩涡混合器 MVS-1
- 4、旋转蒸发仪（BUCH Vacuum Rotavapor, Germany）
- 5、Milli-Q 超纯水制备系统（Millipore, Bedford, USA）
- 6、低温高速离心机（Sigma 3K18, Germany）
- 7、冷冻干燥机（Labconco freeze dryer, CHRIST, Germany）
- 8、荧光显微镜（Eclipse E800, Nikon, Melville, NY）
- 9、TU-1900 双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限公司）
- 10、PCR 扩增仪（My cycler thermal cycler, Bio RAD, USA）
- 11、紫外成像仪（UVP, USA）
- 12、电泳仪 DYY-6C（北京市六一仪器厂）

2.1.2 气质联用系统

本实验中涉及的气质联用系统为 Waters GCT Premier MICROMASS 系统，其中包括：

- 1、Agilent 7683 自动进样器
- 2、Agilent 6890 气相色谱（GC, Agilent Technologies, USA）
- 3、飞行时间质谱仪（TOF-MS, Waters Corp., USA）
- 4、J & W DB-5 毛细管石英柱（30 m length, I.D. 0.25 mm, Film 0.25 μ m, Agilent Technologies, USA）

2.1.3 液质联用系统

本实验中涉及磷脂分析的液质联用系统包括：

- 1、Waters alliance 2695E HPLC

2、Quattro Micro API (Micromass, Manchester, UK)

3、色谱柱: Venusil XBP Silica column (150 mm × 2.1 mm i.d., 5 μm, Agela, DE, USA)

本实验中涉及蛋白分析的 LC-MS 联用系统包括:

1、Agilent 1200 包括微升泵 (Agilent 1200), 纳升泵 (Agilent 1200)

2、micro-Q-TOF II (Bruker Daltonics, Germany)

3、色谱柱: ZORBAX BIO-SCX II column (3.5 μm, 35 × 0.3 mm)

ZORBAX 300SB-C18 trap column (5 μm, 5 × 0.3 mm)

ZORBAX 300SB-C18 column (3.5 μm, 150 mm × 75 μm)

2.2 主要试剂及配置

2.2.1 主要试剂

1、色谱级甲醇、色谱级氯仿、色谱级异丙醇及色谱级正己烷均购自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany);

2、色谱级氢氧化铵 (28%) 溶液购自 J&K Chemical 公司 (Beijing, China);

3、二丁基羟基甲苯 (BHT)、KCl、Tris-base 及吡啶 (pyridine, anhydrous, 99.8%) 均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA);

4、普通 DNA 产物纯化试剂盒 (离心柱型, DP204-02) 购自天根生物技术有限公司;

5、琼脂糖购自西班牙公司 (Biowest, France);

6、pfut、rans 2k plus DNA Mass 及 dNTP (2.5mM) 购自全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech, China);

7、脂肪酸标准品 heptadecanoic acid (C17:0)、三氟化硼 (BF₃)、甲氧胺盐酸盐 (methoxamine hydrochloride) 及 N-甲基-N-(三甲基硅基)-三氟乙酰胺 (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA) 均购自 Fluka 公司 (USA/Buchs, Switzerland);

8、氘标记琥珀酸 (succinic d4 acid) 购自 ISOTEC 公司;

9、磷脂标准品包括:

1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phospho (1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (PG12:0/12:0);

1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (PE12:0/12:0);

1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC12:0/12:0);

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho- (1'-*myo*-inositol) (ammonium salt) (PI16:0/16:0) ;

1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) (PS12:0/12:0) ;

1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (sodium salt) (PA14:0/14:0) ;

这些标准品均购自 Avanti Polar Lipids 公司 (Alabaster, AL, USA) ;

10、实验中配置试剂所需用水均为 Milli-Q 的超纯水。

2.2.2 藻种鉴定用溶液

1、破菌缓冲液：2%TritonX-100 (v/v) , 1%SDS (w/v) , 100mmol·L⁻¹NaCl, 1mmol·L⁻¹EDTA, 10mmol·L⁻¹Tris-Cl (pH 8.0) 。

2、50×TAE buffer:

①.称量 242g Tris, ;

②.100 mL 0.5M 的 EDTA-Na (pH 8.0) ;

③.57.1ml 的冰乙酸;

④.加去离子水定容至 1L 后, 室温保存。

⑤.所得母液用去离子水稀释 50 倍后使用。

2.2.3 总脂肪提取溶液

1、脂肪提取液：氯仿甲醇混合溶液 (2:1, v/v) , 其中含有质量百分比为 0.1%的 BHT。

2、1M KCl 溶液：其中含有质量百分比为 0.1%的 BHT。

2.2.4 FAME 分析用溶液

1、脂肪酸内标：取 2mg 十七烷酸溶于甲醇中, 配置成 2mg·mL⁻¹ 的标准液, 现配现用。

2、甲酯化试剂：14%的三氟化硼-甲醇溶液 (wt%) , 现配现用。

2.2.5 代谢分析用溶液

1、代谢终止液：含有 1500mg·L⁻¹NaNO₃, 36mg·L⁻¹CaCl₂·2H₂O, 75mg·L⁻¹MgSO₄·7H₂O 和 40mg·L⁻¹K₂HPO₄·3H₂O 的甲醇水溶液, 其中甲醇和水的体积比为 1:2, 混匀后置于-40℃备用。

2、代谢物提取液 (metabolite extract solution, MES) : 体积百分含量为 50% 的甲醇水溶液, 混匀后置于-20℃备用。

3、代谢物内标：取 2mg 氘标记琥珀酸溶于 Milli-Q 水中，配置成 $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液， 4°C 保存备用。

4、衍生化试剂：

脲化试剂：取 20mg 甲氧基胺盐酸盐溶于吡啶中，配制成 $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的脲化试剂， 4°C 保存备用。甲基硅烷化试剂：MSTFA，直接使用， 4°C 保存。

2.2.6 磷脂分析用溶液

1、磷脂提取液：同 2.2.3 中脂肪提取液。

2、磷脂溶解液：氯仿甲醇混合溶液（v/v：1:1），其中含有质量百分比为 0.1%的 BHT。

3、磷脂内标：取 PG12:0/12:0、PE12:0/12:0、PC12:0/12:0、PI16:0/16:0、PS12:0/12:0 及 PA14:0/14:0 各 1mg，分别溶于 1mL 磷脂溶解液中，配置成 1mg mL^{-1} 的单标母液，使用时，各取 $100\mu\text{L}$ ，混合，加磷脂溶解液至 1mL，配置成各磷脂溶液分别为 $100\mu\text{g mL}^{-1}$ 的母液，置于 -40°C 保存。使用时稀释 100 倍。

2.3 实验方法

2.3.1 藻种的鉴定

1、取少量新鲜藻液，置于 400 倍显微镜下进行形态观察，作初步鉴定；

2、取 10mL 藻液，5000rpm 离心 2min，弃上清。1.0ml 水重悬后 12000rpm 离心 30 秒，收集藻体。

3、加入 $200\mu\text{L}$ 破菌缓冲液重悬细胞，加入 $200\mu\text{L}$ 体积石英砂和 $100\mu\text{L}$ 酚（ $\text{PH}>7$ ，Tris 饱和）与 $100\mu\text{L}$ 氯仿，高速涡旋 10min。

4、使用 DNA 产物纯化试剂盒提取 DNA， -20°C 保存；

5、通过 PCR 扩增获得目标 DNA 片段，其中：

a.PCR 扩增条件如下：

①. 94°C 预变性 5min；

②. 94°C 变性 30s， 55°C 退火 30s， 72°C 延伸 1min，如此 40 个循环；

③. 72°C 延伸 10min；

④. 4°C 保存。

b.扩增反应体系如表 2-1 所示，

表 2-1 PCR 体系

Table 2-1 PCR system

试剂	用量/ μL
5 \times pfu buffer (10mM Mg^{2+})	4
dNTP (2.5mM)	2
上引 (10 mM)	0.4
下引 (10 mM)	0.4
DNA	2
Fatpfu (2.5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	0.2
ddH ₂ O	11

6、PCR 产物于 1%的琼脂糖凝胶上电泳以对扩增结果进行检验；

7、对 PCR 产物进行测序，并且通过 NCBI 的 Gene Bank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 上 blast 同源检测结果，获得相关藻种信息。

2.3.2 藻种的培养及收获

表 2-2 BG11 培养基基本组成

Table 2-2 The basic components of medium BG11

母液	组成	重量/g	分子量	每 L 培养基所需 母液体积/mL	终浓度 /mmol $\cdot\text{L}^{-1}$
stock1	NaNO_3	30	85	50	17.647059
	$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.8	228.22		0.1752695
	Na_2CO_3	0.4	106		0.1886792
stock2	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.3	210.14	2	0.0285524
	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$	0.3	487.84		0.0122991
	EDTA	0.05	372.24		0.0026864
stock3	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.8	147.02	2	0.2448646
stock4	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.75	246.67	2	0.3040499
stock5	H_3BO_3	2.86	61.83	1	0.0462559
	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	197.91		0.0091456
	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222	287.54		0.0007721
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39	241.95		0.0016119
	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	249.68		0.0003164
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04947	291.05		0.00017

本实验采用施定基教授改良过的 BG11 培养基对小球藻细胞进行培养，其配方如表 2-2 所示。先用 stock1、4 和 5 配置成 980mL 的初制培养液，121℃ 高压蒸气灭菌 20 min。冷却后在超净台依次加入 stock2 及 3，补充灭菌超纯水至 1L。再使用 Tris-base 调节 pH 至 7.5。使用含 1.6% 的琼脂的 BG11 固体培养基进行藻种品系保存，每 60 天继代一次，25℃ 于 $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下静置培养。不同接种密度实验采用液体悬浮培养，接种密度分别为 1×10^4 ， 1×10^5 ， 1×10^6 及 1×10^7 $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在 24 小时 $65\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 连续光照条件下，25℃ 恒温以 135rpm 的转数进行震荡培养。种子在含有 50mL 新鲜培养基的 150mL 三角瓶中培养，而实验体系在含有 150mL 新鲜培养基的 250 mL 三角瓶中培养。在光照实验中，细胞接种密度为 $1\times 10^7\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，光照时间为 24 小时，光照条件分别为 40，70，110 及 $160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，取稳定期细胞进行分析研究。

分别取指数期和稳定期的细胞进行分析，其中为了避免生长速率对小球藻状态的影响，指数期细胞的生长速率达到 $0.22 \pm 0.01\text{day}^{-1}$ 时进行取样。在光照实验中，取稳定期细胞进行分析研究。取新鲜细胞 150mL，低温离心后，弃上清，立即向细胞中加入 10mL -40℃ 代谢终止液，淬灭 5min。离心弃上清，-70℃ 下冷冻干燥过夜后保存于 -80℃ 冰箱至后续分析。

2.3.3 不同接种密度培养体系的建立

1、生长曲线的测定方法

分别采用浊度法（OD560nm）和细胞计数法建立小球藻的生长曲线。

2、比生长速率的计算方法

$$\mu_{n-1} = (\ln(A_n) - \ln(A_{n-2})) / 2 \quad \text{公式 (2-1)}$$

其中， μ_{n-1} 为第 n-1 天的比生长速率， A_n 为第 n 天的生物量，而 A_{n-2} 为第 n-2 天的生物量。

2.3.4 总脂肪提取

总脂提取方法参照本实验室杨松博士论文^[123]及国际上微藻领域的相关文献^[8]。取冻干细胞 15-25mg 置于离心管中，每管加入 0.75mL 氯仿及 0.3mL 超纯水，100rpm 室温震荡 1h；再加入 2mL 脂肪提取液，室温下以 100rpm 震荡 0.5h，收集氯仿相；向残渣中加入 2mL 脂肪提取液，室温下以 100rpm 震荡 0.5h，收集氯仿相；反复提取 3 次，将氯仿相合并，加入 0.5mL 1M KCl 水溶液，震荡，

3000-4000rpm, 离心 3 min, 弃水相, 再加入 1mL 超纯水, 震荡, 3000-4000rpm, 离心 3-5 min, 弃水相, 30-35°C 真空干燥得总脂肪干物质。

2.3.5 FAME 分析

1、确定内标

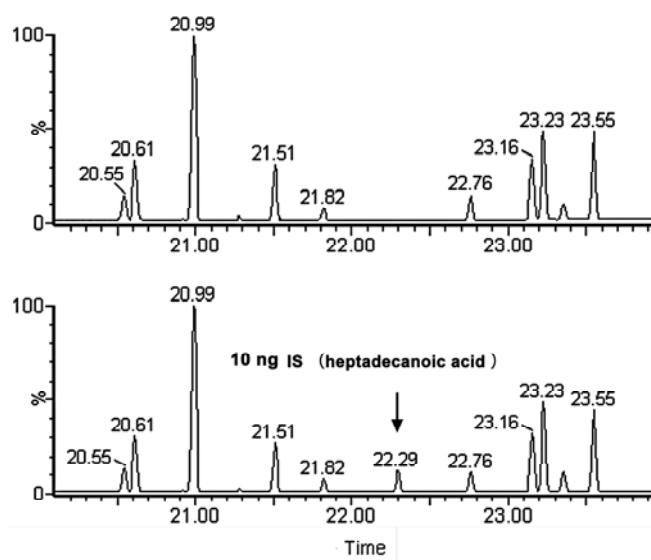


图 2-1 脂肪酸甲酯内标确定

Figure 2-1 Identification of internal standard in fatty acid methyl ester study

向甲酯化后的小球藻总脂肪样品中加入 10 μ g 十七烷酸标品, 根据图 2-1 可确定, 实验对象小球藻内不含有十七烷酸, 因此选用十七烷酸作为 FAME 实验的内标, 加入量调整为 20 μ g。

2、脂肪甲酯化

将所得总脂肪酸溶于 600 μ L 质量百分比为 14%的三氟化硼-甲醇溶液中, 加入 20 μ g 十七烷酸做为内标, 置于 15mL 密封管内, 在 100°C 水浴 30min, 待温度降至室温, 加入 500 μ L 正己烷震荡萃取 30s, 5000rpm 离心 2min, 得到正己烷相; 取 100-200 μ L 正己烷相放入已编号的 GC 进样瓶;

3、采用 GC-MS 对正己烷相中的 FAME 进行定性和定量处理,

a. GC 条件如下:

色谱柱: DB-5 气相色谱柱, 其规格为 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m; 进样量: 1 μ L; 分流比: 5:1; 进样口温度: 280°C; GC interface 温度: 270°C; 载气: 高纯氮; 氮气流速: 恒压, 91KPa; 升温程序: 初始温度 70 °C, 保持 2min, 以 8°C \cdot min⁻¹ 的速度升到 290°C, 并在 290°C 保持 6min。

b. TOF/MS 质谱条件如下：

质谱电离方式：正离子模式的电轰击电离（EI⁺）；电离电压：70eV；源温：250°C；扫描范围：50-800 m/z；扫描速度：2 scan·s⁻¹；

4、FAME 的定性和定量分析

采用 Masslynx 软件（Version 4.1, Waters Corp., USA）对 GC-TOF 数据进行定性定量分析。其中色谱峰的识别是通过在 NIST 数据库（National Institute of Standard and Technology library, NIST, 2005, Gaithersburg, MD）中检索比对完成的。之后通过 Masslynx 软件中的 QuanLynx 对各代谢物峰面积进行自动积分。通过各种物质的总离子流图的峰面积与同一张谱图上内标的峰面积的比值以获得标准化的 FAME 及代谢图谱数据矩阵，如公式（2-2）所示。

$$M_i = A_i / A_{IS} \quad \text{公式（2-2）}$$

其中， M_i 为代谢物相对量， A_i 为代谢物峰面积， A_{IS} 为内标物的峰面积

5、日产量计算

根据如下公式计算微藻 FAME 混合物的日产量（mg·d⁻¹·L⁻¹）：

$$P = TY / (TCV \times TGP) \quad \text{公式（2-3）}$$

其中 P 是微藻 FAME 日产量，TY 是 FAME 的总产量，TCV 是收获时微藻培养液的总体积，TGP 是从微藻接种到微藻收获的时间长度，

6、CN 的确定

根据 Krisnangkura^[124]及 Azam^[125]的经验公式可以对微藻所得 FAME 的 SN、IN 及 CN 进行计算。

$$SN = \sum (560 \times P_i) / MW_i \quad \text{公式（2-4）}$$

$$IN = \sum (254 \times D \times P_i) / MW_i \quad \text{公式（2-5）}$$

$$CN = 46.3 + 5458 / SN - 0.225 \times IN \quad \text{公式（2-6）}$$

其中 SN 是皂化值；IN 是碘值；CN 是十六烷值； P_i 是所得样品中每种 FAME 的干重百分比， MW_i 是所得样品中每种 FAME 的分子量，D 是所得样品中每个脂肪酸甲酯的双键数量。

2.3.6 代谢物分析

小球藻胞内代谢物的提取方法是根据韩培培博士提取红豆杉胞内代谢物的方法进行修改得到的^[126]。

1、提取

将 20mg 冻干细胞置于离心管中，加入-40 °C 的代谢提取液 1mL，混匀，盖紧并放入液氮中，反复冻融 3-5 次，在-20 °C 下 5000rpm 离心 2 min，收集上清，另向残渣中加入 0.5mL 代谢提取液，-20 °C 下 5000rpm 离心 2 min，离心后，两次上清液混合，加入 20 μ g 氘标记琥珀酸，得混合液，取 200 μ L 混合液，在-80 °C 下冷冻干燥 2-4 小时得代谢物冻干粉；

2、代谢物衍生化

代谢物冻干粉中加入 20mg·mL⁻¹ 的甲氧基铵盐酸盐/吡啶溶液 50 μ L，于 40°C 水浴中反应 80min，反应结束后加入 80 μ L N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺，于 40°C 水浴再反应 80min，12000rpm 离心 1 min，取上清 100 μ L 放入已编号的 GC 进样瓶，室温放置 2h；

3、采用 GC-MS 对样品进行定性和定量分析，

a. GC 条件如下：

升温程序：70°C 保持 2min，以 5°C·min⁻¹ 的速度升到 290°C，并在 290°C 保持 6min；其他条件同 FAME 检测（参见 2.3.5）

b. TOF/MS 质谱调谐条件同 FAME 检测（参见 2.3.5）

4、数据分析

色谱峰的识别、积累和代谢物定量分析同 FAME 定性定量分析(参见 2.3.5)。

5、代谢图谱的热图分析

使用 EXpression Analyzer and DisplayER (Expander) 4.1 软件构建热图 (heat map) 分析小球藻最高接种密度培养体系下的代谢水平与其他培养体系的比值。

2.3.7 磷脂分析

1、提取方法同总脂提取方法，见 2.3.4。

2、LC-MS 联用分析：

a. 色谱条件如下

色谱柱：Venusil XBP 硅柱 (150mm \times 2.1mm i.d., 5 μ m, Agela Technologies Inc., USA)；进样量：5 μ L；色谱柱内流速为 0.2mL·min⁻¹；柱温：25°C；流动相配比：流动相 A：氯仿/甲醇/28%氢氧化铵 (89.5/10/0.5, v/v/v)；流动相 B：

氯仿/甲醇/水/28%氢氧化铵（55/39/5.5/0.5，v/v/v）；流动相线性梯度程序见图 2-2。

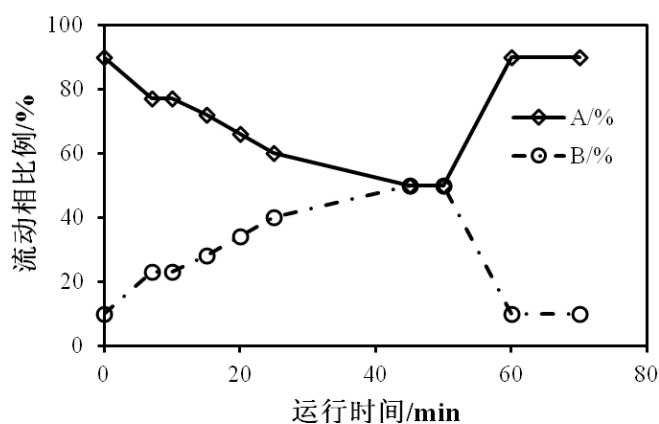


图 2-2 流动相梯度图

Figure 2-2 Linear gradient of the mobile phase

b. 质谱条件如下

离子化方式：负离子电喷雾模式（ESI⁻）；毛细管电压：3.0KV；离子源温度：100℃；锥孔电压：30V；萃取电压：3V；RF 离子透镜电压：0.1V；去溶剂气：氮气；去溶剂气流速：400L·h⁻¹；去溶剂化温度：350℃；锥孔风速：50L·h⁻¹；进口电压：50V；出口电压：50V；扫描范围：m/z 500~1000；扫描速度 1000scan·s⁻¹；内扫描延迟时间 100ms。

3、数据分析

根据分子离子峰及内标确定磷脂结构，TIC 图抽提峰面积与内标对比获得丰度信息，具体计算方法参见 2.3.5。

2.3.8 蛋白样品的提取与鉴定

2.3.8.1 蛋白提取

1、细胞收集及淬灭：

在 4℃ 下，以 4000~6000rpm 的转速离心，收集下层的细胞，并用 pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞。

2、蛋白提取

取 100mg 破碎细胞，分别置于离心管中，每管加入 0.5ml 细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎 20s；加入 10μL 的质量比为 2:1 的 DNase I/RNaseA 酶混合溶液，混匀，4℃ 静置反应 10min；加入 10μL 80mM 的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，

4°C 静置 1h; 15000rpm 离心 25min; 取上清, 得到蛋白溶液。所述细胞裂解液为: 8mol·L⁻¹ 尿素, 质量浓度为 4% 的 (3-[(3-胆酰胺丙基) -二乙胺]-丙磺酸) (CHAPS), 40mM 的 Tris, 余量为水;

3、蛋白浓度确定

采用 Bradford 试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中, 测定蛋白溶液在 595nm 处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

4、蛋白沉淀

分别取包含 100μg 蛋白的蛋白溶液, 加入 4 倍体积的 -20°C 的丙酮, 沉淀 12h; 离心, 弃上清, 沉淀用 -20°C 的体积浓度为 80% 的丙酮水溶液洗涤; 冷冻干燥备用; -80°C 贮存;

5、蛋白还原以及酶解

向干燥蛋白添加 20μL 50mM 的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白;

加入 1μL 三 (2-羧乙基) 膦, 在 50°C 反应 1h, 对各个蛋白进行还原化处理 (打开二硫键); 然后加入 1μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应 10min (烷基化反应); 再加浓度为 0.2μg·μL⁻¹ 的胰蛋白酶水溶液 30μL, 37°C 反应 12 小时, 进行蛋白酶解;

6、蛋白标记

在蛋白酶解液中加入一管用 70μL 乙醇溶解的 iTRAQ 标记试剂, 室温反应 1h;

7、差异表达蛋白鉴定

对已标记混合液进行 Q-TOF 质谱鉴定, 得到蛋白谱, 通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白。

2.3.8.2 蛋白鉴定

a. 色谱条件如下:

多肽样品进样量: 5 μL;

①. 一维强阳离子交换柱分离:

色谱柱: 强阳离子交换柱 (ZORBAX BIO-SCX II, 3.5μm, 35×0.3mm); 流动相: 水/乙腈/甲酸 (95/5/0.1, v/v/v); 流动相流速: 10μL·min⁻¹; NH₄Cl 溶液浓度: 10mM, 40mM, 80mM, 100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 500mM, 1M; NH₄Cl 溶液进样量: 5μL。

②. 二维 C18 柱分离:

色谱柱: ZORBAX 300SB-C18 trap 柱(5 μ m, 5 \times 0.3 mm); ZORBAX 300SB-C18 柱(3.5 μ m, 150 mm \times 75 μ m); 流动相配比: 流动相 A: 水/乙腈/甲酸(95/5/0.1, v/v/v); 流动相 B: 乙腈/水/甲酸(95/5/0.1, v/v/v); 流动相流速: 300nL \cdot min⁻¹; 流动相线性梯度程序: 见表 2-3。

表 2-3 流动相梯度

Table 2-3 Linear gradient of the mobile phase		
time/min	A/%	B/%
0	100	0
5	100	0
80	65	35
90	20	80
100	5	95
105	5	95
106	100	0
120	100	0

b. 质谱条件如下:

离子化方式: 正离子电喷雾模式(ESI⁺); 电压: 1500V; 离子源温度: 150 $^{\circ}$ C; 离子化针内径: 10 \pm 1 μ m; 去溶剂气: 氮气; 气体流速: 2L \cdot h⁻¹; 扫描范围: m/z 70~2500; 母离子选择范围: m/z 400~1200; 选择母离子数目: 5。

c. Mascot 搜索蛋白数据库信息如下:

种属: NCBI-other green plant; 酶: 胰蛋白酶; 酶漏切最大位点数: 1; 固定修饰: Methylthio (C), iTRAQ 4-plex (N-term), iTRAQ 4-plex (K); 可变修饰: Oxidation (M)。

肽段质量误差: 0.5Da

二级碎片质量误差: 0.1Da

2.3.9 小球藻色素的测定

取 1-3ml 新鲜小球藻液, 5000rpm 离心 2min, 弃上清, 加入 3ml 80%丙酮, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 5000rpm 离心 2min, 取上清, 测吸光度。根据如下公式计算色素含量 [127, 128]。

$$\text{Chl a 含量 } (\mu\text{g}\cdot(\text{mg}\cdot\text{DCW})^{-1}) = (12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}) \times V / \text{DCW} \quad \text{公式(2-7)}$$

$$\text{Chl b 含量 } (\mu\text{g}\cdot(\text{mg}\cdot\text{DCW})^{-1}) = (20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}) \times V / \text{DCW} \quad \text{公式(2-8)}$$

$$\text{类胡萝卜素含量 } (\mu\text{g}\cdot(\text{mg}\cdot\text{DCW})^{-1}) = (4.69 \times A_{440} - 1.96 \times A_{663} - 4.74 \times A_{646}) \times V / \text{DCW} \quad \text{公式(2-9)}$$

其中 V 是取样体积数, DCW 是所取样品对应细胞干重, A_{440} , A_{663} 及 A_{646} 是在 440, 663 及 646nm 的吸光度。

2.3.10 数学分析

2.3.10.1 多元统计分析

本研究中一共采用了六种种多元统计分析方法: PCA、PLS、PLS-DA、OPLS、OPLS-DA 及典型相关分析, 分析软件为 SIMCA-P Demo (Umetrics AB, Sweden) 及 SPSS version10.0 software (SPSS, USA), 数据预处理方法为中心化预处理 (centre scaling) 及 par 预处理 (pareto scaling)。模型的质量可以用三个参数进行表征: $R^2(X)$ 可以用来表示所建数模对 X 矩阵的解释程度; $R^2(Y)$ 可以用来表示所建数模对 Y 矩阵的解释程度; $Q^2(Y)$ 可以用来表示所建数模对 Y 矩阵的预测能力。所有三个参数的范围都是在 0-1 之间, 数值越高, 模型的解释能力、预测能力和可靠度就越高。

2.3.10.2 统计分析

本论文中所有实验条件对应数据都保证三个以上平行, 所得结果用平均值 \pm 标准偏差表示。采用方差分析法 (Analysis of variance, ANOVA) 确定不同实验条件所得数据差异的显著性, 本文中若无具体说明, 那么*代表具有显著性差异 ($P<0.05$), **则代表具有高度显著性差异 ($P<0.005$)。

第三章 不同接种密度对小球藻产脂能力的影响

3.1 引言

随着化石能源的日益枯竭和人们对环境保护问题的逐渐重视,开发可持续发展的绿色新能源被提上日程并吸引了越来越多的关注。最早生物能源以粮食作物为原料,但由于与粮争地,引起了严重的粮食危机,现逐渐被第二代生物能源取代。第二代生物能源主要是通过来自于秸秆等废弃的纤维素资源生产的乙醇,纤维素来源广泛而丰富,但是前处理过程产生大量的毒性抑制物质限制了它的发展。因此以微藻为主的第三代生物能源——生物柴油应运而生,这是从富油生物质中获得的 FAME 混合物,其理化性质和柴油相似,可以直接应用于现有引擎,而且微藻来源广泛,易于培养,生长迅速,能适应极端环境,具有极强的生物能源应用潜质。此外,培养微藻还能结合发电站减排及废水处理,有助于缓解温室效应和环境治理,而且微藻富含蛋白、色素及 PUFA 等多种高附加值产物,可见微藻具有较高的产业化价值。但目前人们对微藻产油等相关的代谢机制却仍旧不甚明了,这也成为了工业上大规模使用微藻生产生物柴油的一个关键限制性因素。

大量研究证明接种密度是微藻培养最重要的因子之一^[6, 60],有研究报道随着接种密度增加(从 $1.25 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $10 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$), *Chlorella vulgaris* 的脂产量不断升高,并且在最高接种密度处达到最高值($49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)^[6]。Kaçka 还发现接种密度对 *C. vulgaris* 的甘油生产也有显著影响,并且在最高接种密度($10 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)处获得最大甘油产量($305.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[66]。接种密度对微藻的脂肪组成也有显著影响,Chiou 在 *Marchantia polymorpha* 的培养过程中发现,接种密度与 PUFA 的积累正相关关系^[65]。尽管大量实验证明接种密度对藻的生长和脂肪代谢有重要作用,但是人们对其内在生理机制仍然所知甚少。

本研究的出发点是,作为微藻培养的重要调控因子之一的接种密度,在微藻的生长和脂积累都能发挥重要作用。所以以 FAME 的生产为着眼点,寻找微藻生长和脂积累的最佳接种密度。并以此为基础,通过与系统生物学联用,希望为理解接种密度对微藻的调控机制和寻找潜在优化方向提供更多的信息。

3.2 结果与讨论

3.2.1 微藻的选择与鉴定

3.2.1.1 显微镜观察

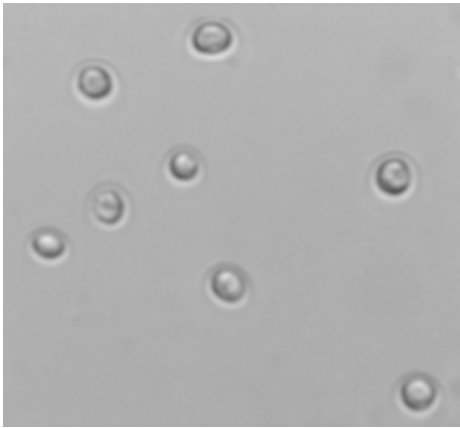


图 3-1 待鉴定藻种的显微镜照片

Figure 3-1 Morphology of unidentified microalgae

本实验藻种是由天津科技大学施定基老师赠送的未鉴定淡水藻种。藻液呈绿色，如图 3-1 所示，在显微镜下呈球形，无鞭毛，细胞中央有一个细胞核。初步可以推断可能是绿藻门小球藻，但是若要确定具体藻种，则需要进行保守序列的鉴定。

3.2.1.2 引物设计

表 3-1 引物序列表

Table 3-1 Primer sequence

PCR 反应	区域	预计长度/kb	引物名称	引物序列
S1	SSU	1.7	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
			NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC
S2	SSU	0.65	NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
			NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG
I	ITS	0.5	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
			ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

为了确保鉴定结果的可靠性,本实验分别通过对待鉴定藻种核基因组中核糖体小亚基 rDNA 基因 (Small subunit RNA, SSU) 及核糖体基因内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 进行序列测定,其中 SSU 的分子功能在长期进化中基本保持恒定,藻类研究中通常利用这个特性对藻种进行分类鉴定。而作为核糖体 DNA 上的一个非编码区域,ITS 进化速度快于编码区域,与 SSU 相比,序列具有更多特异性,可以提供更丰富的进化信息^[129],因而本实验中将其用来做株系鉴定的进一步补充,表 3-1 给出了相关引物序列的设计结果。

3.2.1.3 电泳结果分析

由图 3-2 可以看出 PCR 扩增片段 S1、S2 及 I 的长度与预计长度相符,故取 S1 及 I 做 DNA 测序,以获得进一步的遗传信息。

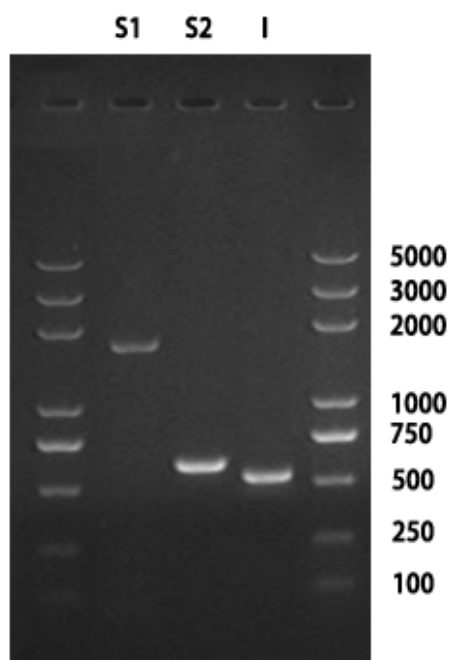


图 3-2 目标 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-2 Agarose gel electrophoresis of target PCR product

3.2.1.4 PCR 扩增片段测序结果

根据 PCR 扩增片段 S1 和 I 的测序结果做 BLAST 比对,结果如表 3-2 所示。可以看出, S1 和 I 与绿藻门的小球藻 (*Chlorella sorokiniana*) 的基因片段相似度分别达到 96%和 97%, 因此可以确定本实验中所鉴定的藻种是 *C. sorokiniana*。

表 3-2 PCR 扩增片段测序结果

Table 3-2 PCR fragment sequencing results

PCR	Genebank	Species	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
S1	FM205860.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	340	340	96%	3.00E-90	86%
	FM205859.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	340	340	96%	3.00E-90	86%
	FM205834.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	340	340	96%	3.00E-90	86%
	X62441.2	<i>Chlorella sorokiniana</i>	1916	1916	97%	0	98%
I	FM205860.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	1916	1916	97%	0	98%
	FM205859.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	1916	1916	97%	0	98%
	FM205834.1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	1916	1916	97%	0	98%

3. 2. 2 不同接种密度培养体系的建立

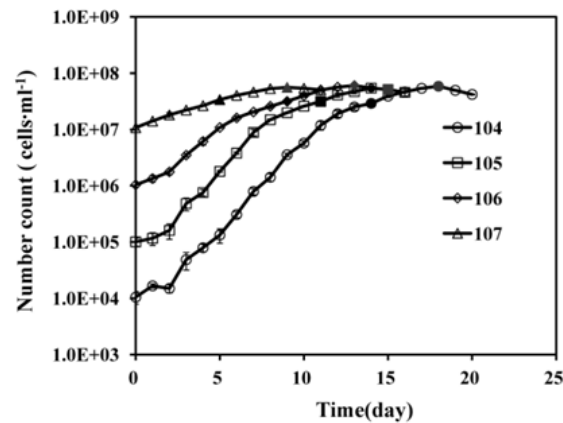


图 3-3 不同接种密度下小球藻生长曲线图

Figure 3-3 Growth curves of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

采用细胞计数法分别对初始密度为 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 及 1×10^7 cells·mL⁻¹ 的小球藻进行生长监控, 所得生长曲线如图 3-3 所示。为了便于描述, 将这几个接种密度体系由低至高分别叫做: IN10⁴, IN10⁵, IN10⁶ 及 IN10⁷ 培养体系。可以看出在 IN10⁴ 及 IN10⁵ 体系中, 出现了短暂的延滞期, 但是接种密度更高的培养体系, 无法观察到延滞现象。而且接种密度越高, 达到稳定期的时间越短, 因此最高接种密度体系的总生长时间远小于其他体系。然而接种密度对最大细胞数量并没有显著影响。文献指出在一定范围内, 高接种密度能够让细胞对新环境有更强的适应性, 因而可以缩短延滞期, 从而减少培养时间^[70]。Lau 等指出在 *C.*

vulgaris 的污水中培养体系中, 在接种密度为 5×10^6 到 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内, 无法观察到延滞期, 但是如果使用 5×10^5 到 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的接种密度进行培养, 将会出现 4 到 6 天的延滞期^[62]。如图 3-3 所示, 同 $\text{IN}10^7$ 培养体系相比, $\text{IN}10^4$ 培养体系到达稳定期的时间延长了一倍。

如图 3-4 所示, 通过公式 (2-1) 可获得小球藻的比生长速率, 可以观察到接种密度越高, 细胞比生长速率越低, 尤其是当接种密度高于 $1 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 这种趋势更为明显。而且当接种密度低于 $1 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞的比生长速率起伏很大, 但趋势一致, 都是先上升至某峰值, 再逐渐回落至 0 day^{-1} 以下。其中 $\text{IN}10^4$ 培养体系甚至出现了两个峰值(第 3 天和第 6 天)。与其他体系相比, $\text{IN}10^7$ 培养体系的生长波动不大, 从第一天开始, 基本持平, 第 5 天开始下降。此外, 接种密度能显著影响最大比生长速率, 在 $\text{IN}10^7$ 体系中微藻的最大比生长速率仅为 0.26 day^{-1} , 而其他的培养体系却能达到 0.62 到 0.89 day^{-1} , 与其相比提高了 1.38 到 2.42 倍。需要指出的是, $\text{IN}10^6$ 体系可能是接种密度影响小球藻生长的一个关键拐点, 因为它的比生长速率与低接种密度体系比较接近, 但是它和 $\text{IN}10^7$ 一样无法观察到延滞期。

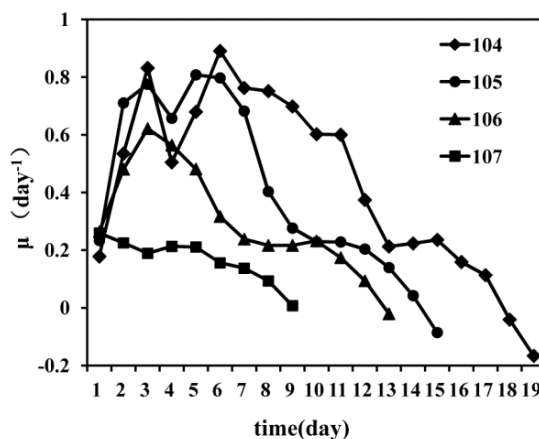


图 3-4 不同接种密度下小球藻比生长速率

Figure 3-4 Growth rate of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

这种接种密度显著影响细胞比生长速率的现象在其他微藻研究中有报道, Bosma 指出在 *Monodus* 培养体系中, 当初始接种密度由 OD530 为 0.75 降至 0.1 后, 导致细胞比生长速率提高了 1.8 倍^[130]。即使在逆境培养环境下, 接种密度也能对生长造成较大影响, Franklin 指出在铜胁迫下, 同时提高 *Chlorella sp* 及 *Selenastrum capricornutum* 的接种量能够显著降低其比生长速率^[131]。细胞接种密度的差异不但能直接导致培养体系内的营养分配差异, 如碳源、氮源、能量、微

量元素等，而且可以改变细胞所处的微环境，如温度、光源及 pH 值等，此外细胞数量的多寡还能改变细胞胞外分泌物和信号分子释放的种类和数量^[132-134]，因此研究接种密度对微藻的生长状态的影响对我们研究微藻产业的发展是有重大意义的。

3.2.3 小球藻所产 FAME 的鉴定

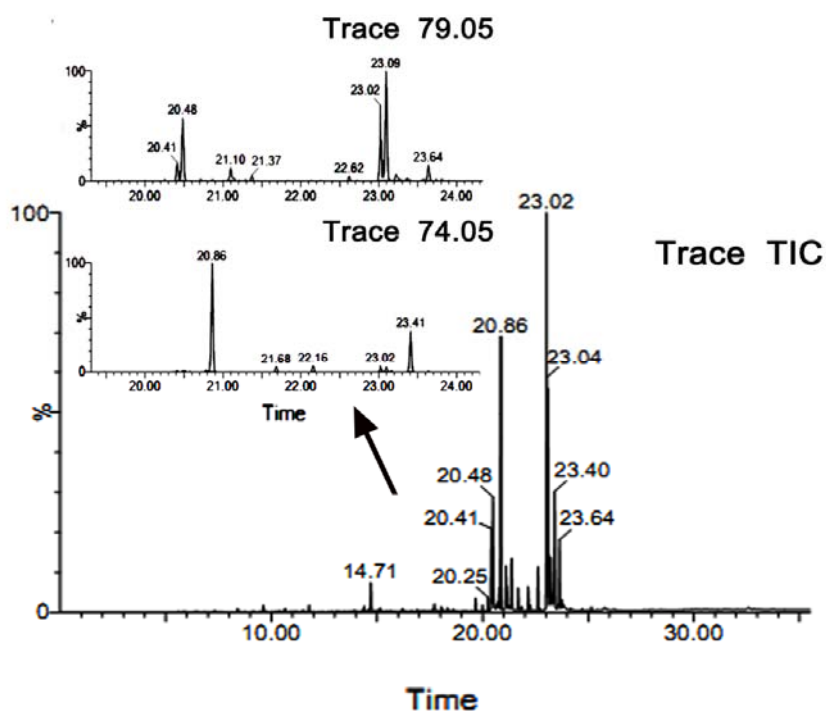


图 3-5 小球藻脂肪酸甲酯样品总离子流图

Figure 3-5 Total ion chromatograms of FAME from *C. sorokiniana*

生物柴油的生产主要是通过酯交换反应将生物体中提取的油脂转化为 FAME 或者 FAEE 混合物。目前常见的酯交换反应主要有同相酸催化、同相碱催化、多相酸催化、多相碱催化、酶催化、超临界转酯化、次临界转酯化、微波辅助转酯化、超声波辅助转酯化等技术^[135]。其中同相酸碱催化是最常用且相对成熟的技术，比较而言，碱催化速度较快，但是对油脂的纯度要求很高，不但水会对其造成影响，自由脂肪酸的存在也会对催化效果造成较大影响，故本研究选用了硼酸催化的方法对小球藻生产 FAME 的能力进行了研究。图 3-5 给出的是小球藻 FAME 混合物的 GC-TOF-MS 检测结果。可以看出，出峰位置主要集中在 14-25min，而其中最主要的特征离子碎片是 m/z 为 74.05 和 79.05 的峰。通过对

特征离子峰进行抽提，发现包含离子峰 74.05 的 FAME 主要出峰位置在 20.86 和 23.41min 出峰，而包含离子峰 79.05 的 FAME 主要在 20.41、20.48、23.02 及 23.09min 出峰。为了鉴定这些物质的具体结构，需要将其质谱图与 NIST 数据库进行比对。

图 3-6 给出了 20.86min 时出峰物质的待鉴定质谱图与 NIST 数据库标准质谱图的比对结果。通过比较其与十六烷酸甲酯的标准质谱图中的各个特征离子峰的丰度比例，获得如下结果：匹配度为 920，而可能性达到 86.1% (>80%)，故认为比较可信，因此确定 20.86min 处出峰的 FAME 为十六烷酸甲酯。但是丰度较低的物质会出现匹配度和可能性偏低的情况，需要对其进行元素组成分析和同位素分析，具体分析方法可参见本实验室肖文海博士的论文。

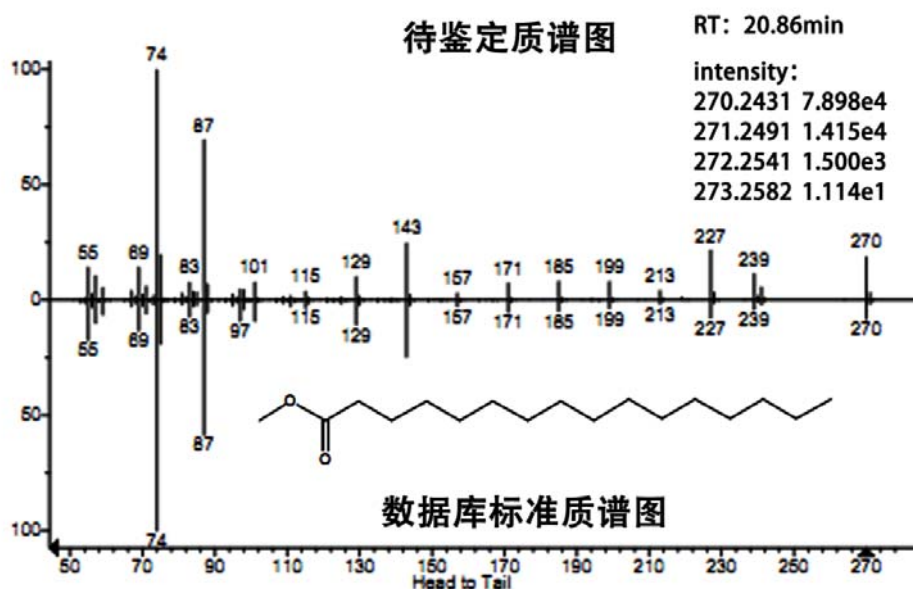


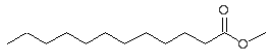
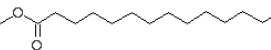
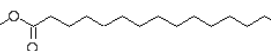
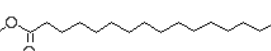
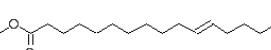
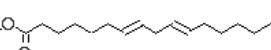
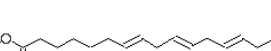

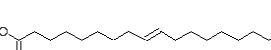
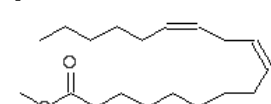
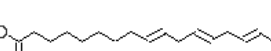
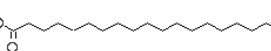

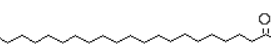
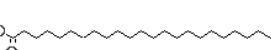
图 3-6 小球藻中的 C16:0 的质谱鉴定结果图

Figure 3-6 Mass spectra and structures of C16:0 in *C. sorokiniana*

通过分析可以发现，饱和脂肪酸（saturated fatty acid, SFA）和单不饱和脂肪（monounsaturated fatty acid, MUFA）的特征离子碎片峰 m/z 为 74.05，对应的是醋酸甲酯基团，其分子离子式为 $[C_3H_6O_2]^+$ ，79.05 是 PUFA 的特征离子碎片峰，对应的是 1, 4-己二烯基团，其分子离子式为 $[C_6H_7]^+$ 。由于本研究中使用的是 J & W DB-5 毛细管石英柱，因此分子量越小的 FAME 越早出峰，相同链长的 FAME 的出峰时间则取决于其双键数量及位置。表 3-3 给出了小球藻 FAME 混合样品的主要鉴定结果，可以看出小球藻中的脂肪酸链长范围是 12-24，其所含双键数一般在 0-3 个。

表 3-3 小球藻的 FAME 鉴定结果

Table 3-3 Summary of identified FAME of *C. sorokiniana*

Compound	RT	Name	Formula	Match	R.Match	Structure
FAME12:0	14.96	Dodecanoic acid, methyl ester	$C_{13}H_{26}O_2$	712	761	
FAME14:0	18.05	Methyl tetradecanoate	$C_{15}H_{30}O_2$	840	868	
FAME15:0	19.49	Pentadecanoic acid, methyl ester	$C_{16}H_{32}O_2$	836	864	
FAME16:0	20.86	Hexadecanoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	894	897	
FAME16:1	20.78	11-Hexadecenoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{32}O_2$	800	810	
FAME16:2	20.41	7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{30}O_2$	853	862	
FAME16:3	20.48	7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{28}O_2$	851	853	
FAME18:0	23.41	Octadecanoic acid, methyl ester	$C_{19}H_{38}O_2$	884	920	
FAME18:1	23.16	9-Octadecenoic acid, methyl ester	$C_{19}H_{36}O_2$	862	864	
FAME18:2	23.02	9,12-Octadecadienoic acid(Z, Z)-, methyl ester	$C_{19}H_{34}O_2$	889	900	
FAME18:3	23.09	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	$C_{19}H_{32}O_2$	846	897	
FAME19:0	24.6	Nonadecanoic acid, methyl ester	$C_{20}H_{40}O_2$	690	723	
FAME20:0	25.74	Eicosanoic acid, methyl ester	$C_{21}H_{42}O_2$	752	771	
FAME22:0	27.9	Docosanoic acid, methyl ester	$C_{23}H_{46}O_2$	723	743	
FAME24:0	29.91	Tetracosanoic acid, methyl ester	$C_{25}H_{50}O_2$	756	769	

3.2.4 不同接种密度对小球藻脂肪分布的影响

图 3-7 给出了不同接种密度培养体系下小球藻不同 FAME 的分布情况。可以看出，本实验藻株中主要含有十六烷酸（palmitic acid）、十六碳二烯酸（hexadecadienoic acid）、十六碳三烯酸（hexadecatrienoic acid）、十八烷酸（stearic acid）、十八碳二烯酸（linoleic acid）及十八碳三烯酸（linolenic acid），这些脂肪酸在细胞总脂肪酸中的比例总共达到了 92.32-93.96%。

尽管主要的脂肪酸种类没有发生大的变化，但是接种密度对这些主要脂肪酸

的比例分布却有着显著的影响。尤其是十八碳三烯酸，当接种密度从 1×10^4 增加到 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其指数期和稳定期占总脂的质量百分比分别从 24.67% 和 20.33% 下降到 15.81% 和 14.54%。

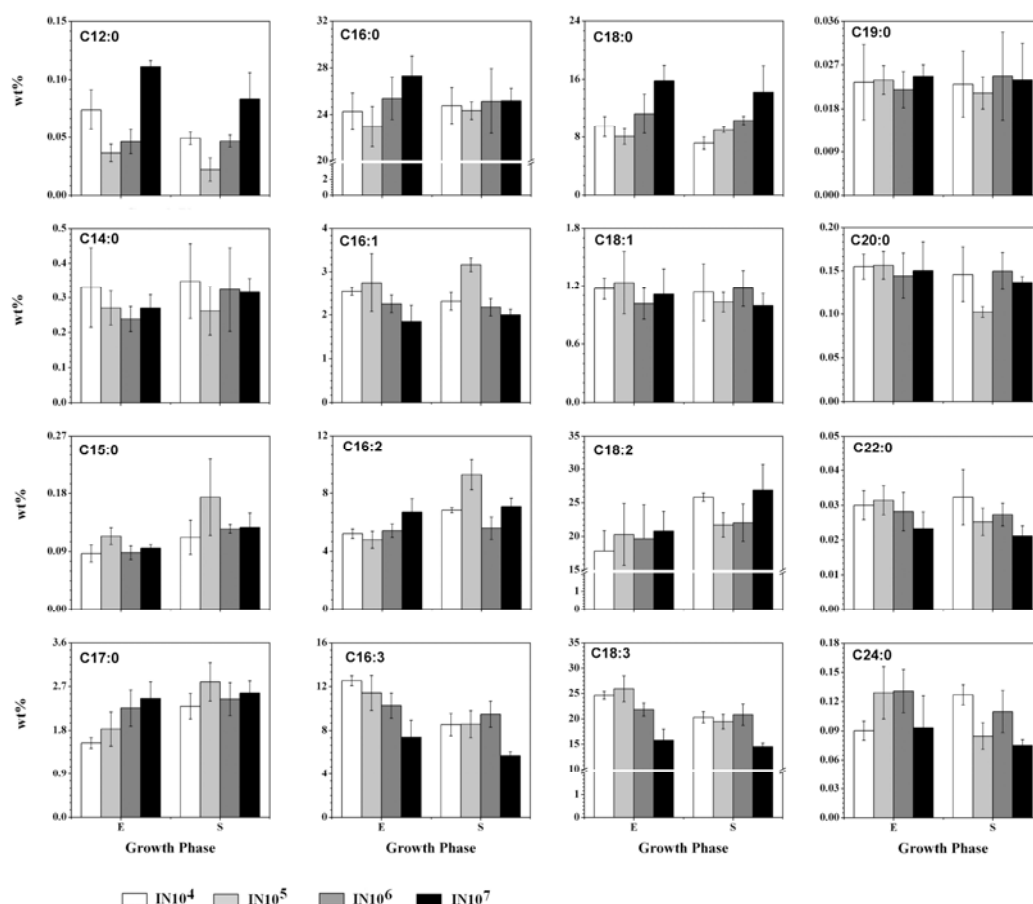


图 3-7 不同接种密度对脂肪酸甲酯组成的影响

Figure 3-7 FAME composition of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

为了进一步了解接种密度对 FAME 的影响，对 FAME 的链长和不饱和度进行分析。图 3-8 对 FAME 中脂肪酸链 C12-C24 的分布及 SFA、MUFA 和 PUFA 的分布分别进行了研究。图 3-8A 表明 C16 和 C18 是小球藻中最主要的脂肪酸，各占据了总脂含量的 40.00%-45.36% 和 51.16%-56.66%，这种以 C16 和 C18 为主要脂肪酸的分布情况在其他微藻研究中也有报道^[136]。然而，图 3-8A 中并未观察到不同培养体系间的显著差异，可见接种密度对脂肪酸的链长并没有太大影响。图 3-8B 显示，SFA 占总脂肪酸的 33.59%-46.36%，而 PUFA 占总脂肪酸的 50.69%-62.43%，这二者占据了小球藻总脂含量的 90% 以上。此外当细胞接种密度

从 1×10^4 提高到 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 小球藻脂肪酸分布无明显变化, 尤其是 $\text{IN}10^4$ 与 $\text{IN}10^5$ 的脂肪分布几乎一致, 但是当接种密度上升至 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, PUFA 的质量百分比分别从 60.22%(指数期)和 61.49%(稳定期)跌至 50.69%和 54.20%, 同时 SFA 则从 36.07%(指数期)和 35.07%(稳定期)分别上升至 46.36%和 42.80%, 出现了显著变化 ($p < 0.005$)。

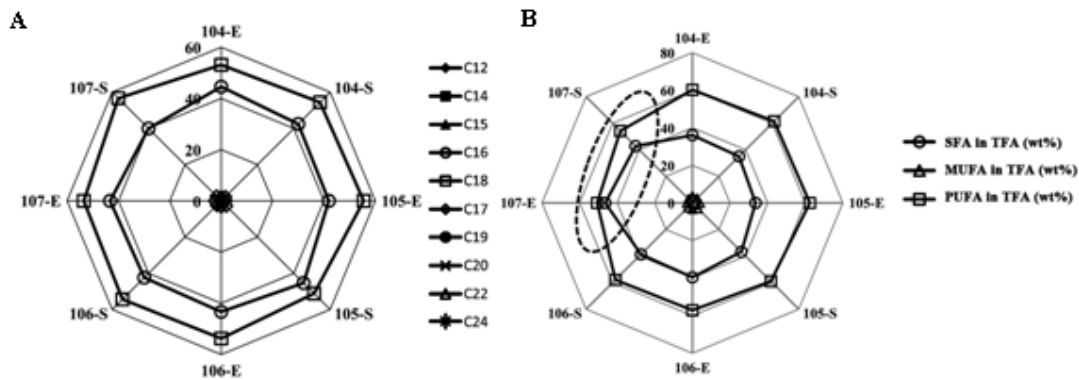


图 3-8 不同接种密度对小球藻胞内脂肪酸分布的影响

A 不同接种密度下脂肪酸链长的分布; B 不同接种密度下不饱和度的分布

Figure 3-8 The effect of inoculum size on the distribution of FAME in *C. sorokiniana*

A. the varying chain length, B. the varying degree of unsaturation

3. 2. 5 不同接种密度对小球藻 FAME 日产量的影响

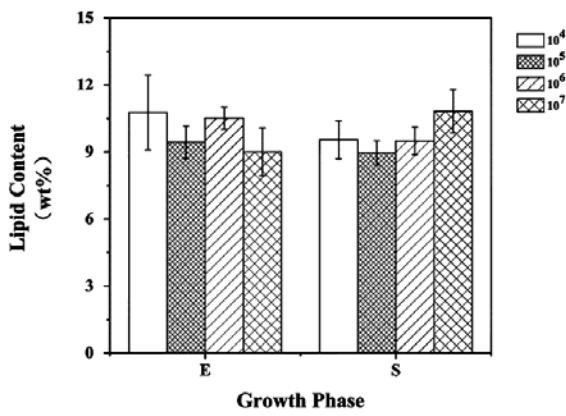


图 3-9 接种密度对小球藻胞内脂肪含量的影响

Figure 3-9 The effects of varying inoculum sizes on the lipid content of *C. sorokiniana*

从图 3-9 可以看出不同体系下小球藻的保内脂肪含量没有显著差异, 因此可知接种密度的变化对小球藻脂含量影响不大。

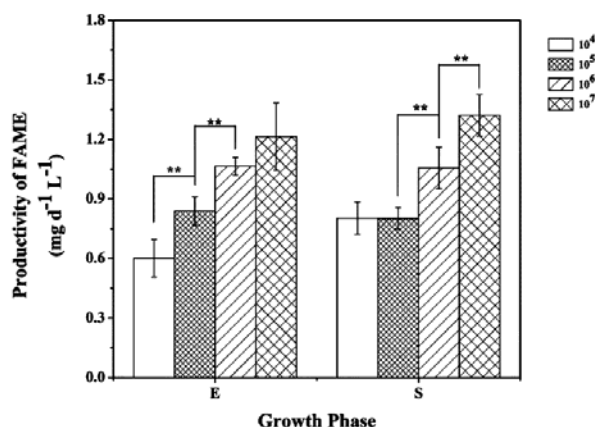


图 3-10 不同接种密度对小球藻生物柴油日产量的影响

Figure 3-10 The effects of varying inoculum sizes on the daily FAME productivity of *C. sorokiniana*

图 3-10 是对不同接种密度下小球藻 FAME 日产量变化的分析,可以看出随着初始密度的增加,小球藻的日产量得到了显著的提高,并且在最大接种密度时获得最高日产量,其中指数期收获的日产量为 $1.21\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$,而稳定期则达到了 $1.32\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ 。与之相比,IN 10^4 培养体系指数期和稳定期的日产量仅为 0.60 及 $0.80\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$,分别下降了 50.49% 和 39.22% 。Stephenson 指出将接种密度从 1.25×10^7 提高到 $10\times 10^7\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后, *C. vulgaris* 的脂含量呈下降趋势,同时脂肪日产量显著上升,在其实验范围的最高接种密度处,脂产量达到了最高^[6]。由于脂肪酸日产量与小球藻总脂产量及培养周期相关,且图 3-9 及图 3-3 显示本研究体系中接种密度对小球藻脂肪含量及最终收获时的生物质产量影响不大,因此可以推测高接种密度下细胞的培养周期显著缩短是导致其脂肪酸日产量提高的主要原因。

3.2.6 不同接种密度对小球藻 FAME 质量的影响

国际上已逐步将生物柴油投入市场,并制定了一系列的标准来描述其质量优劣。FAME 的组成是相应生物柴油质量的重要影响因素,它不但能够影响到生物柴油的密度、粘度、凝固点等物理性质,还能影响其不饱和度、IN、SN 和 CN 等化学和燃烧性质^[137-139]。其中 SN 是指中和或皂化 1g 脂肪所需氢氧化钾毫克数,与脂肪酸的链长成反比,IN 可以用来表征脂肪酸不饱和程度,且与不饱和度成正比关系。而 CN 则可以表征柴油在压缩点火时的燃烧质量,这是柴油质量最重要的表征之一。根据 Krisnangkura^[124]及 Azam^[125]等人的研究,脂肪组成对生物柴油质量的影响可以量化并通过公式计算出来。

从图 3-11 可以看出接种密度的变化对 SN 影响不大,其波动范围不超过 1%,尽管如此,还是可以看出 SN 随着接种密度上升而下降的趋势,这个现象在 $IN10^7$ 体系中尤为明显。相对而言,IN 受接种密度的影响就显著多了,虽然 $IN10^4$ 及 $IN10^5$ 培养体系互相重叠在一起,但是从 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 开始,接种密度对 IN 的影响就明朗起来。当接种密度从 1×10^5 上升至 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, IN 一直呈现明显下降趋势,而且指数期和稳定期分别下降了 23.22%和 12.97%。

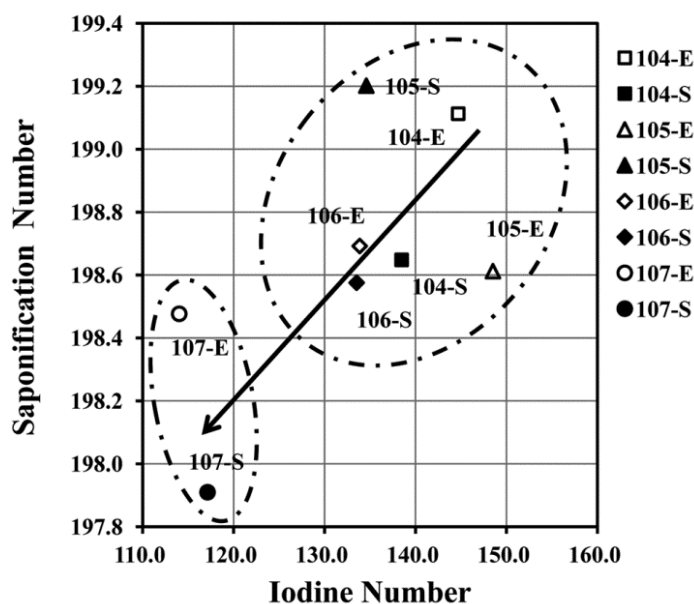


图 3-11 不同接种密度对小球藻生物柴油皂化值和碘值的影响

Figure 3-11 The distribution of the SN and IN of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

CN 是表征生物柴油质量的重要指标,它可以用来评判生物柴油的点火性能,其值的高低对生物柴油在柴油机中的启动性和燃烧有显著影响^[140]。一般说来 CN 过低则启动困难,燃烧不完全且动力供给不足,但过高则容易燃烧不完全,经济性下降,因此需要控制在一定范围之内。目前欧美各国纷纷建立了生物柴油的评定标准, CN 就是其中必不可少的指标,如生物柴油标准 ASTM D6751 (美国)要求 CN 不得小于 47。

小球藻中所提取到的 FAME 的 CN 在 40-50 之间,且随着接种密度的升高,有明显上升趋势。由图 3-12 可知 $IN10^4$ 和 $IN10^5$ 培养体系所得 FAME 的 CN 几乎相等,当升到 $IN10^6$ 体系时, CN 有一定提高,接种密度增到 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,出现了显著增长,其中在指数期和稳定期分别达到了 48.15 和 47.52,均达到了 ASTM D6751 的要求。由公式 (2-6) 可以看出, CN 与 SN 和 IN 是负相关关系,

而 SN 是衡量油脂链长的度量工具, IN 则与不饱和度成正比关系。联系到图 3-8 可以推测 PUFA 含量的显著下降是最高接种密度下小球藻 FAMECN 显著明显上升的根本原因,尤其是十八碳三烯酸含量的变化,其指数期和稳定期的质量比重分别从 24.67 % 和 20.33 下降到 15.81%和 14.54%。

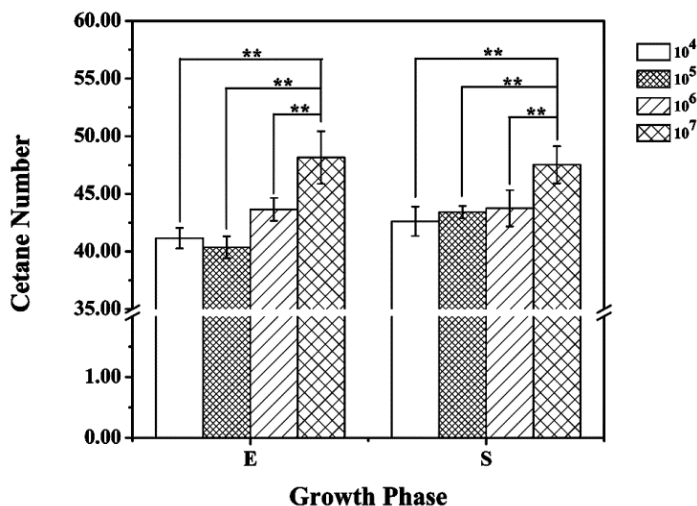


图 3-12 不同接种密度对小球藻生物柴油十六烷值的影响

Figure 3-12 The CN variation of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

本实验中小球藻的生长和脂积累都表现出了较强的接种密度相关性。大量研究指出,不同物种的接种密度相关的生理学变化有一定的相似性,而且都可能与接种密度引起的如光照、营养分配、细胞接触频率等细胞培养微环境变化相关^[62, 130, 133]。然而在微藻系统中接种密度所引起的这许多变化究竟何者为主,何者为辅?与胞内代谢网络又是如何呼应的?这与微藻产油机制之间是否存在关联,如何关联的?这些问题都需要做进一步的研究才能寻找到答案。

3.3 小结

- 1、本研究确定了所研究藻种是绿藻门的小球藻 (*C. sorokiniana*)。
- 2、本研究建立了不同接种密度的小球藻培养体系,并且发现接种密度对小球藻的生长有明显影响,不但延滞期随着接种密度增加而减少,而且比生长速率也随着接种密度增加而降低,其中最高接种密度体系的培养周期比最低接种密度培养体系缩短了一半,但是最大比生长速率也减少了一倍有余。
- 3、本研究发现接种密度对小球藻脂肪含量影响不大,但是对脂产量却有显著影响,接种密度越高,其 FAME 日产量也越高,这与不同体系的培养周期差

异有直接联系。而且接种密度对 FAME 的分布也有显著影响，在最高接种密度体系下，细胞脂肪的不饱和度显著下降，直接导致了 IN 的下降和 CN 的上升，提高了小球藻所产 FAME 的质量。

第四章 不同接种密度对小球藻代谢的影响

4.1 引言

接种密度是生物培养的重要调控因子,它不但能直接影响接种后细胞所处的微环境,如温度、盐度及酸碱度等,还能直接导致如碳、氮、氧、磷、钾等营养元素分配的差异。而且接种密度可以影响适应新环境的细胞的数量,从而影响细胞适应并开始繁殖的时间,此外,接种密度还能影响初始细胞接触的频率,对微藻来说还可能会影响胞内有害物质的积累,因为微藻在生长过程中将会不断释放如胞外碳、胞外酶、氨基酸、碳水化合物、维生素、脂类、促生长因子或抑制因子、毒素等胞外代谢产物^[141, 142],可能激发与密度相关的信号分子的传导,如种群效应和种群竞争等都受到接种密度直接调控。由此可以看出接种密度对生物体系的培养至关重要。

代谢物是细胞对遗传因子或环境因子做出生理响应后的最后产物,因此对代谢物的研究可以帮助人们反向解析被研究对象的生理生化状态与预设环境变化之间的关系,从而促进对其中相应机理和本质的理解。然而微藻培养受到温度、光照、营养分子及搅拌系数等多重因素的调控,这些因素之间又存在相互影响关系,这种环境的复杂性使得单单研究某一种或某一类代谢物,容易造成片面性,从而错过重要相关因素的分析。而且代谢网络是由大量代谢通路互相交联影响而形成,而且一个代谢物的水平不是由某一条代谢通路所决定的,而是多条通路协同作用的结果,因此将某个代谢物孤立起来研究往往会造成结果的片面性和局限性,从而降低了数据的可信度。

代谢组学则是研究生物体在不同环境下代谢物水平的整体动态变化的系统生物学,它能给出从起点(遗传因子或环境因子)到终点(目标产物)的代谢全局图,从而人们能够清晰地看到与之有关的代谢网络调控路径,从而给出更为全面可靠的理论机制。藻类研究者已经陆续认识到代谢组学的研究优势,并逐步将其引入到共生机制^[143]、极端生存机制^[144]及胁迫响应^[122]等研究中来,但是微藻培养机制的研究还未曾应用到组学技术。培养因子的复杂性增加了研究的难度,有必要引入整体研究的手段来做深入的分析研究。本文首次将代谢组学手段引入到小球藻培养体系的研究中来,分析了在不同接种密度下小球藻的代谢组差异,从而为揭示接种密度影响小球藻生物生长的内在代谢机制提供了全局性的数据信息。

4.2 结果与讨论

4.2.1 小球藻的代谢谱图的建立

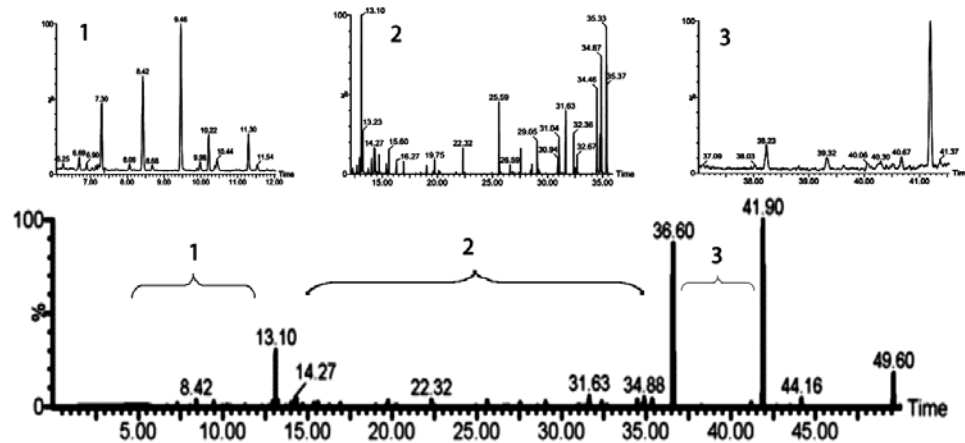


图 4-1 小球藻代谢物的 GC-MS 总离子流图

Figure 4-1 Identification of total metabolites from *Chlorella sorokiniana*

第三章的研究结果指出，接种密度对小球藻的生长和脂积累都有较强影响，而代谢物是小球藻细胞对接种密度差异的最终响应，要想了解接种密度调控细胞生长和脂积累的内在代谢机制，有必要对不同接种密度体系的代谢组差异进行分析。通过 GC-TOF-MS 对小球藻胞内代谢物提取液进行分析，可以获得小球藻的代谢图谱。图 4-1 是小球藻代谢物的 GC-MS 总离子流图，通过对色谱图的信号分布研究分析，发现小球藻胞内代谢物分布较广。和脂肪酸甲酯结构鉴定一样，同样通过与 NIST 数据库进行结构谱图比对，可以获得相应的代谢物鉴定结果。

表 4-1 小球藻中所检测到的代谢物对应代码及其分类

Table 4-1 Annotated and classified metabolites detected in *C. sorokiniana* cultures

代码	代谢物	种类	代码	代谢物	种类
M1	L-Valine	氨基酸	M45	Hexadecadienoic acid	脂质
M2	L-Alanine	氨基酸	M46	Hexadecatrienoic acid	脂质
M3	β -Alanine	氨基酸	M47	Palmitoleic acid	脂质
M4	L-Serine	氨基酸	M48	Palmitic acid	脂质
M5	Isoleucine	氨基酸	M49	Linoleic acid methyl ester	脂质
M6	L-Threonine	氨基酸	M50	Linolenic acid methyl ester	脂质
M7	Glycine	氨基酸	M51	Heptadecanoic acid	脂质
M8	Aspartate	氨基酸	M52	Phytol	脂质
M9	5-oxo-L-Proline	氨基酸	M53	Linoleic acid	脂质

代码	代谢物	种类	代码	代谢物	种类
M10	GABA	氨基酸	M54	Linolenic acid	脂质
M11	N-Acetyl-L-glutamate	氨基酸	M55	Stearic acid	脂质
M12	Glutamate	氨基酸	M56	Nonadecane	脂质
M13	Ornithine	氨基酸	M57	Tetradecanoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester	脂质
M14	L-Lysine	氨基酸	M58	Hexadecanoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester	脂质
M15	Tyrosine	氨基酸	M59	Hexadecanoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester	脂质
M16	Hydroxylamine	胺类	M60	Octadec-9-enoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester	脂质
M17	Ethanolamine	胺类	M61	Octadecanoic acid 2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl ester	脂质
M18	Uracil	胺类	M62	Octadecanoic acid 2,3-dihydroxy-propyl ester	脂质
M19	Amphetamine	胺类	M63	Ribose	糖类
M20	Tromethamine	胺类	M64	Xylose	糖类
M21	Putrescine	胺类	M65	Fucose	糖类
M22	Pyruvic acid	有机酸	M66	Galactose	糖类
M23	Lactic acid	有机酸	M67	Xylitol	糖类
M24	3-Hydroxyl-butyrates	有机酸	M68	Glucose	糖类
M25	Succinic acid	有机酸	M69	Palatinose	糖类
M26	Glyceric acid	有机酸	M70	Sucrose	糖类
M27	Fumaric acid	有机酸	M71	Melibiose	糖类
M28	Malic acid	有机酸	M72	Ins-3-P	糖类
M29	2,3,4-Trihydroxybutanoic acid	有机酸	M73	Maltose	糖类
M30	α -Ketoglutaric acid	有机酸	M74	Maltotriose	糖类
M31	3-Phosphoglyceric acid	有机酸	M75	Unkown1	未确定
M32	Phosphoric acid monomethyl ester	其他	M76	Unkown2	未确定
M33	Orthophosphoric acid	其他	M77	Unkown3	未确定
M34	CAMP	其他	M78	Unkown4	未确定
M35	Phosphoric acid mono-(3-hydroxy-2-hydroxymethyl-propyl)ester	其他	M79	Unkown5	未确定
M36	1,3-Propanediol	其他	M80	Unkown6	未确定
M37	Glycerol	其他	M81	Unkown7	未确定
M38	1,5-Dihydroxy-6-methoxyxanthone	其他	M82	Unkown8	未确定
M39	Myoinositol	其他	M83	Unkown9	未确定
M40	Lauric acid	脂质	M84	Unkown10	未确定
M41	Phthalic acid diisobutyl ester	脂质	M85	Unkown11	未确定
M42	Hexadecadienoic acid methylester	脂质	M86	Unkown12	未确定
M43	Hexadecatrienoic acid methyl ester	脂质	M87	Unkown13	未确定
M44	Palmitic acid methyl ester	脂质	M88	Unkown14	未确定

本研究一共获得了 88 种代谢物的定性结果，其中有 74 种被鉴定出来，包括 15 种氨基酸，10 种有机酸，6 种胺类，23 种脂质，12 种糖类及 8 种其他物质。为了便于后续分析，对这些代谢物进行编号，其结果如表 4-1 所示。

4.2.2 不同接种密度对小球藻代谢水平的影响的初步分析

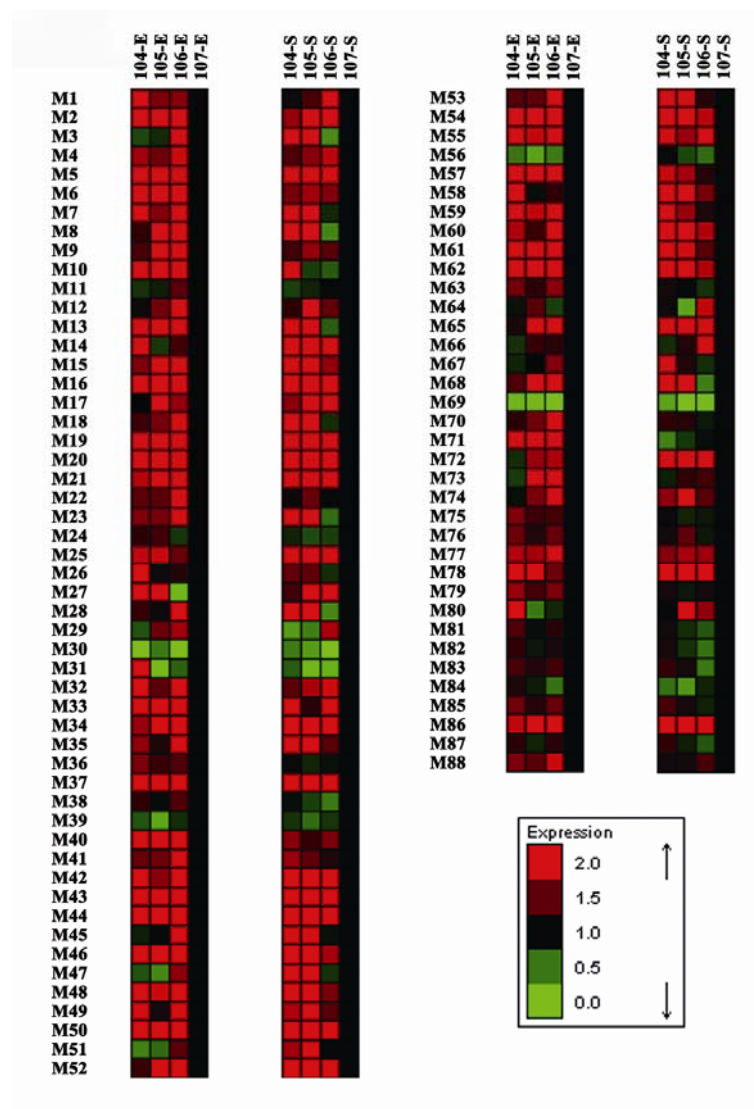


图 4-2 其他培养体系相对于 IN107 的小球藻细胞的代谢变化情况分析

Figure 4-2 A metabolic heat map that summarizes the differences in the metabolite fingerprints against the metabolite variations of inoculum sizes, compared to those in IN107

通过比对不同接种密度下培养的小球藻脂积累的差异可以发现，IN10⁷ 体系与其他体系差异最大，故通过热图分析 IN10⁷ 体系与其他体系培养下的小球藻在代谢水平上的差异，所得结果如图 4-2 所示。几乎所有 IN10⁷ 培养体系下的代谢

物水平都低于其同期其他体系。可见 $IN10^7$ 培养体系下的小球藻的代谢水平显著不同于其他体系，这个现象与不同接种密度下小球藻产油水平的变化具有相似性。然而这两者之间是否存在内在关联呢？前三个培养体系的代谢状态是否完全一致呢？这些代谢变化到底与那些代谢机制和网络相关，这些变化是如何引起的，这些变化与脂积累的是否存在关联，如果有，他们之间的关系是什么？为了解答这些问题，本文将采用多元统计分析方法做深入研究。

4.2.3 多元统计分析不同接种密度对小球藻代谢水平的影响

由于小球藻代谢受多种因素影响，这些因素会影响我们分析结果的精度和准确度。因此分别选用有导式的 OPLS-DA 及 PLS 来研究不同接种密度培养体系之间小球藻代谢谱的差异。

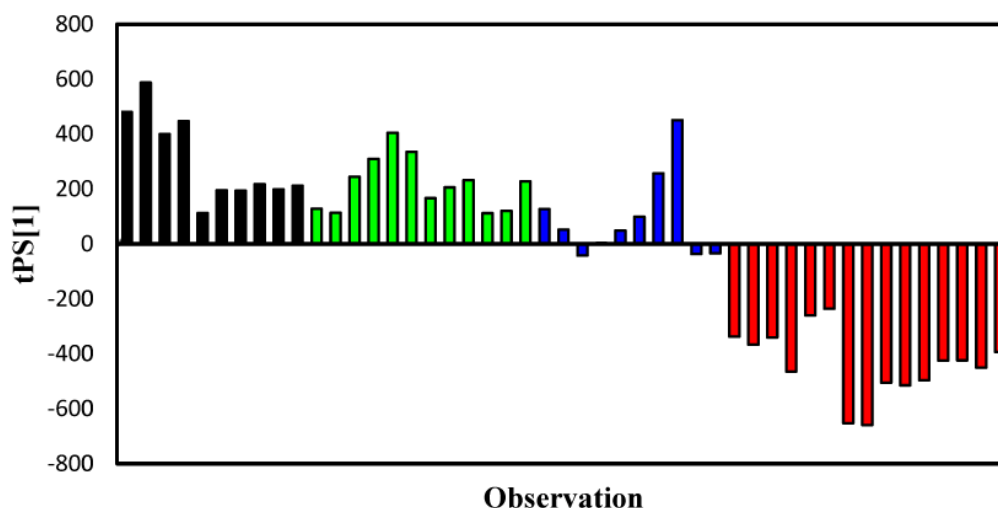


图 4-3 不同接种密度下的小球藻代谢分析的 OPLS-DA 模型

Figure 4-3 OPLS-DA analysis in the metabolic profile of *C. sorokiniana* from different inoculum size cultures

以 47 个样品中 88 种代谢物的丰度变化作为原始矩阵，建立 OPLS-DA 模型，所得模型表现了较好的解释能力和预测能力（ $R^2X=0.883$ ， $R^2Y=0.473$ ， $Q^2=0.352$ ），其中第一主成分所能解释的数据信息高达 58%。如图 4-3 所示，黑、绿、蓝、红分别代表 $IN10^4$ 、 $IN10^5$ 、 $IN10^6$ 及 $IN10^7$ 所对应的代谢状态，其中 $IN10^4$ 及 $IN10^5$ 培养体系显著不同于 $IN10^7$ 培养体系。比较而言 $IN10^6$ 培养体系下的小球藻的代谢状态与低接种密度小球藻更为接近，但已经出现向高密度接种体系变化的趋势。可见当接种密度从 $1 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升至 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，小球藻胞内代谢未发生显著变化，但是当接种密度升至 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后，接种

密度对小球藻代谢的影响开始显现出来, 接种密度达到 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 小球藻胞内代谢产生了极大的变化。因此 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的接种密度可能是低密度到高密度变化的一个过渡和界限, 过了这个阈值, 细胞生理生化将出现很大不同。这个以 10^6 培养体系为明显分界的现象在小球藻生长状态实验中曾被观察到 (图 3-3 及图 3-4)

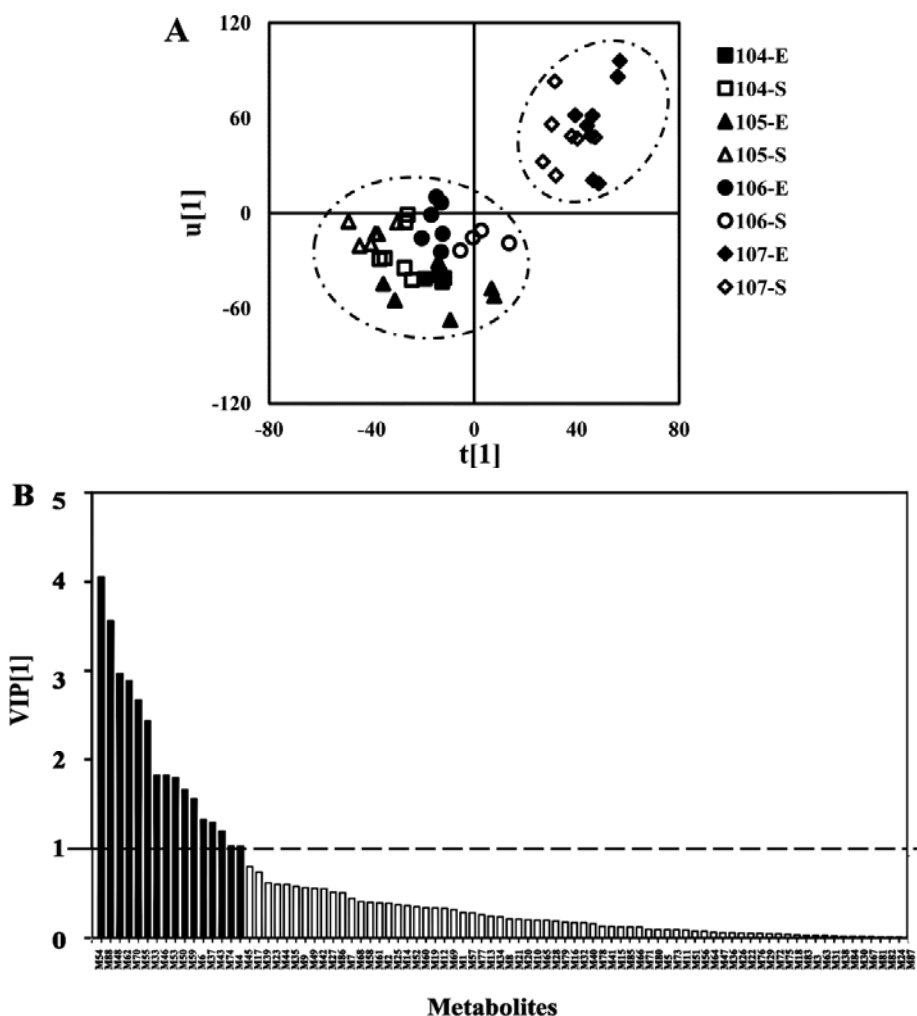


图 4-4 PLS 分析小球藻代谢水平和脂积累相关性。A. $t[1]/u[1]$ 图; B. VIP 图

Figure 4-4 The PLS model was established based on the metabolic profile and FAME production under different inoculum sizes. A. PLS score plot $t[1]/u[1]$; B. The VIP plot

为了分析这种代谢变化的本质及其与脂积累之间的关联, 同样以 47 个样品中的 88 种代谢物组成 X 矩阵, 而与之对应的样品中的脂肪酸甲酯的日产量和 CN 则构成了 Y 矩阵, 进行 PLS 建模。PLS 模型能够帮助我们了解这两组变量之间的相关性。所得 PLS 模型的 R^2X , R^2Y 及 Q^2 分别为 0.793, 0.791 及 0.694,

且第一主成分的得分为 0.539，具有较强解释能力。这充分说明了所得模型能够较好地解释不同接种密度下小球藻的代谢变化和脂积累变化，同时也说明了通过该模型可以对小球藻的产值能力进行可靠的预测。图 4-4A 是 PLS 得分图—— $t[1]/u[1]$ 图，由图可以看出接种密度为 $1 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ 的样品集中在得分图的第一象限，这代表着较高的 CN 和脂肪酸甲酯日产量。与之相对的是第三象限的其他培养体系样品点，代表了较低的 CN 和脂肪酸甲酯日产量，其中 $\text{IN}10^6$ 培养体系的样品位于低密度培养体系和高密度培养体系的中间。这些样品点通过代谢物丰度和脂肪酸甲酯的产量及 CN 清楚地分为两个组合，即最高接种密度培养下的小球藻样品能和其他培养体系的小球藻样品明显区分开来，这表明 $\text{IN}10^7$ 培养体系下的小球藻的代谢机制与其他培养体系有显著不同。此外，还能发现样品的分布存在一定线性关系，这说明不同接种密度下的小球藻的代谢和脂积累有较强的相关性。

为什么高密度接种会有这么显著的特异表现呢？PLS 模型的变量投影重要性（the variable importance in the projection, VIP）图可以量化模型中每个变量对观测点，即样本的的贡献。VIP 值越大，对应变量对分类的贡献度越大，换言之，在组间比较时所表现出的差异最明显。VIP 图能给出每个变量对 PLS 模型整体贡献的排名，一般认为 $\text{VIP} > 1.0$ 的变量是模型中有统计学意义的变量，并且需要进行下一步的代谢路径分析^[145]，如图 4-4B 所示，在 VIP 图中用黑柱表示 $\text{VIP} > 1.0$ 的变量，由此可选出 15 个不同接种密度下小球藻样品中变化最显著的变量，这些变量对应着与第一主成分分类密切相关的已鉴定的关键代谢物。通过分析这些关键代谢物随接种密度变化的趋势及与之相关的代谢通路，有助于我们了解接种密度对小球藻代谢和脂积累的影响，以及这两者之间的相互作用关系，这能为揭示接种密度相关的内在主要代谢机制提供启示。

4.2.4 不同接种密度下小球藻的重要代谢标志物的变化及分析

对这 15 个已知关键代谢物作代谢途径分析，结果如图 4-5 所示，每个样品中代谢丰度的变化都在虚线框中展示出来，其中 $\text{IN}10^4$ 培养体系（空白）、 $\text{IN}10^5$ 培养体系（点图）、 $\text{IN}10^6$ 培养体系（向上斜格图）、 $\text{IN}10^7$ 培养体系（菱形图），而误差线代表标准误差（ $n \geq 4$ ）。可以看出根据代谢网络所属，这些关键代谢物一共可以分为四类：氨基酸代谢（L-苏氨酸及 L-丝氨酸）、淀粉代谢（蔗糖和麦芽三糖）、脂肪代谢（十六烷酸、十六碳三烯酸、十八烷酸、十八碳二烯酸、十八碳三烯酸、2,3-棕榈酸甘油酯及 2,3-硬脂酸甘油酯）及其他（甘油和磷酸）。此外，VIP 大于 1.0 的已鉴定代谢物还有十八碳三烯酸甲酯和十六碳三烯酸甲酯，

虽然脂肪酸甲酯在体内的生理机能并不清楚,但是已有文章报道在微藻中发现了自然存在的脂肪酸甲酯^[146]。

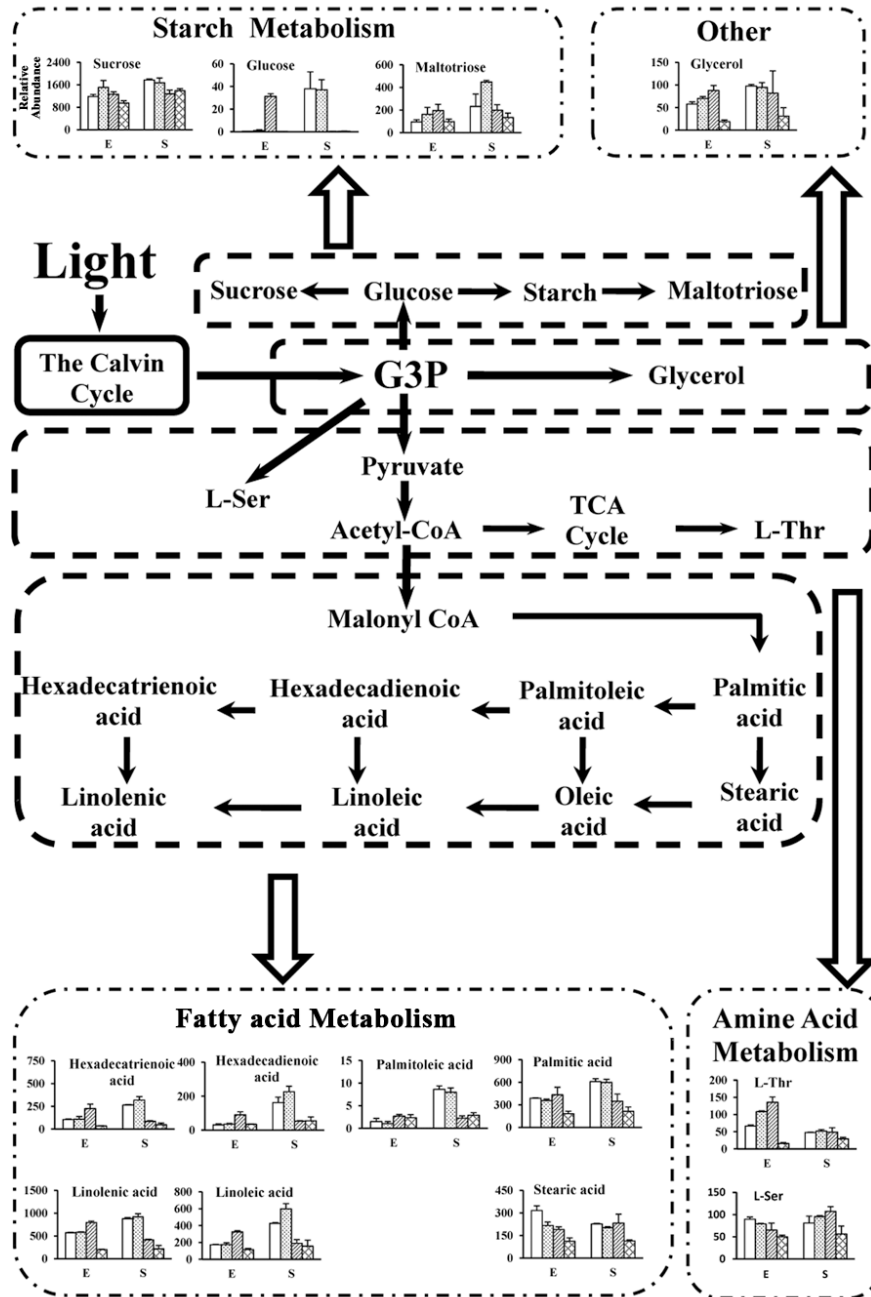


图 4-5 不同接种密度培养条件下代谢变化情况, 包括淀粉代谢途径, 脂肪酸代谢途径, 氨基酸代谢途径和其他代谢途径。

Figure. 4-5 A model of the metabolic variations under different inoculum cultivation, including starch metabolic pathway, fatty acid metabolic pathway, amino acid metabolic pathway and others

可以看出, 最高接种密度的氨基酸水平明显低于其他体系 ($P<0.005$), 而蔗糖、葡萄糖、麦芽三糖和甘油的变化与氨基酸一致 ($P<0.01$)。在脂肪代谢中, 除了十六碳单烯酸和十六碳二烯酸外, 其他收获到的最高接种密度培养体系中的脂肪酸都显著低于其他培养体系 ($P<0.005$)。在微藻中, 所有有机物质如蛋白质、脂肪及碳水化合物等, 其碳骨架均来源于开尔文循环中产生的 G3P, 而其合成过程中所需的 ATP 及 NADPH 则来自光合作用中所捕获的光源^[147], 甘油也是微藻体内固碳相关产物之一。作为微藻细胞中主要的储存物质之一, 淀粉的合成与脂肪代谢途径之间有明显的竞争抑制作用。Li 构建了一株 *Chlamydomonas reinhardtii* 的缺失淀粉合成机制的突变株 BAFJ5, 当在强光下置于缺氮的 TAP-N 培养基中培养, 其脂肪含量能累积可达到细胞干重的 46.4%, 与野生藻种相比, 提高了 3.5 倍。之后再通过比较光自养培养、混和培养及异养培养的结果, 确定了 BAFJ5 中的脂增长的碳骨架主要是来自于光合作用碳固定过程中的碳源重新分配, 而不是异化分解醋酸盐^[8, 148]。很多研究都观察到 N 缺失培养环境下微藻细胞内脂含量增加的现象, 这与蛋白代谢被抑制从而碳源被分配到其他碳相关的代谢途径有关^[149, 150]。Spoehr 指出 N 饥饿能够将 *Chlorella pyrenoidosa* 的脂含量从 5% 提高到 85%^[87], 还有科学家证实了氮缺乏可以引起 *N. oculata*、*C. vulgaris* 及 *Nannochloropsis sp.* 等大量微藻胞内脂质的积累^[83, 89], Li 在对 *Neochloris oleoabundans* 的研究中发现, 最高脂含量在最低氮浓度 (3mM) 体系中得到^[90]。可见氨基酸的合成与胞内脂积累也存在着竞争关系。此外, 普遍认为自由脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 是脂肪合成的前体, 有报导指出调控 FFA 代谢相关的基因可以改变胞内的脂肪含量^[151]。

几乎所有的关键代谢物都与脂肪酸甲酯的日产量及 CN 负相关, 且在最高接种密度时达到最低值。然而最高接种密度培养体系中的脂含量与其他体系相似, 推测最高接种密度培养体系并不是最适合小球藻生长的, 其代谢状态还有待于改善, 其日产量显著高于其他体系得益于其所需培养周期远短于其他体系。而 CN 的提高可能与最高接种密度培养体系下小球藻代谢力不足, 无法提供更多的还原力生成多不饱和脂肪酸有关。由此可知, 只要寻找到最高接种密度生长受限的原因, 就可以在其基础上进一步提高日产量, 甚至脂肪酸甲酯的质量。

既然这些关键代谢物都涉及到碳相关的主要代谢途径, 为什么他们都下降了呢? 多出来的碳的流向是往哪里呢? 或者相对于其他体系, 最高接种密度的碳源出现了不足? 糖类与脂肪是生物体内最重要的能量储存物质, 他们代谢水平的降低预示着高接种密度体系下能量的不足。在空间、光照、pH、盐度等与接种密度密切相关的微环境中, 只有光强是与能量输入相关的, 因此我们推测光强在介导接种密度引起的小球藻生理生化变化过程中起到了关键作用: 微藻生长密度变

化会引起光照变化,细胞密度越高,入射过程中被细胞吸收的光就越多,进入培养体系的深度就越短。不但细胞密度高时会限制光的透射;而且细胞密度低时,入射光强度可能过高引起光抑制,可也能对细胞生长造成不良影响^[152],因此需要具体问题具体分析。从图 3-3 可以看出 IN10⁷ 体系中的细胞密度始终高于同时期其他体系,这时可能会出现光源不足的情况,从而造成光合效率弱于其他体系,进而引起碳相关代谢流的减弱,为了验证这个猜想,进行小球藻色素的测定实验。

4.2.5 不同接种密度对小球藻色素分布的影响

为了研究接种密度对小球藻光合能力的影响,检测了不同接种密度对小球藻叶绿素 a、叶绿素 b 及胡萝卜素的影响。图 4-6 给出了与 IN10⁷ 相比,其他体系夏各色素的含量变化。叶绿素是微藻中最重要光捕获基团,而类胡萝卜素也是植物、藻类和蓝藻光合组织中普遍存在的重要组成部分,它不但能够在光合过程中捕获光能,还能防止光合组织的光氧化损伤。可以看出,随着接种密度上升,小球藻胞内叶绿素含量逐渐下降,但是胡萝卜素影响不显著,不过在微藻中叶绿素含量显著高于胡萝卜素^[76],故可推断接种密度对小球藻的光合效率是有较显著影响的。

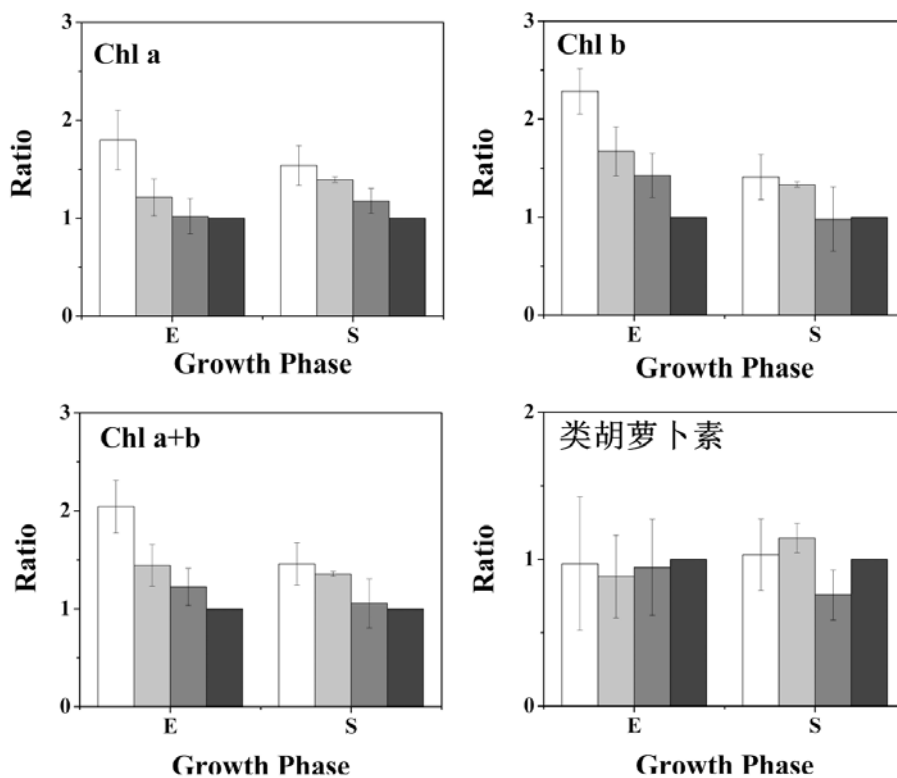


图 4-6 不同接种密度对小球藻色素含量的影响

Figure 4-6 The pigment content of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

而作为光合作用的重要参与者,微藻中色素对不同光照条件的适应性已经被很多研究者证实。Chaneva 在培养 *Arthronema africanum* 时发现,将光照强度从 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 增加到 $300\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,叶绿素 a 的含量增加了将近一倍,但是类胡萝卜素变化不太明显^[76]。Bohne 发现单细胞绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 的类胡萝卜素合成过程中八氢番茄红素合酶和去饱和酶对光都表现出了快速上调的趋势。而且一般说来,类胡萝卜素基因与其他光合色素合成和光捕获相关是同步表达的,所以一定光强范围内色素调控基因的表达水平与光强是正相关的^[153]。一个分子水平实验也证实了在 *C. reinhardtii* 体系中也存在类似的光照调控色素的机制^[154]。不但光照条件能够影响微藻的脂积累机制,反过来说,微藻的脂肪代谢也同样能够对其光合效率产生影响。强光条件下的微藻需要增加 PUFA 来提高类囊体膜的流动性,这不但与光合反应中心各组件的光合效率相关,而且还能影响 Q_A 和 Q_B 之间的电子传输速率^[155]。故可得出结论,接种密度的确在一定程度上影响了小球藻的光合能力,这可能是最高接种密度体系代谢水平明显不同于其他体系的重要原因。但是这种改变的程度有多大,涉及的范围有多广,是仅在色素含量上发生了改变,还是出现了更深层次的变化?这都需要作进一步的研究。

4.3 小结

1、通过 GC-TOF-MS 分析了小球藻的代谢图谱,共检测了 88 种代谢物,并鉴定了其中的 74 种代谢物,包括 15 种氨基酸,10 种有机酸,6 种胺类,23 种脂质,12 种糖及其他代谢物。

2、通过热图和 OPLS-DA 对不同接种密度体系下的小球藻的代谢谱进行研究,发现当接种密度小于 $1\times 10^5\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时候,接种密度对小球藻的代谢的影响并不显著,但是当接种密度上升至 $1\times 10^6\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$,小球藻代谢开始出现变化,到了 $1\times 10^7\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$,小球藻的代谢显著不同于其他体系,且此时代谢水平整体弱于其他体系。

3、通过 PLS 分析本研究体系中小球藻代谢水平和 FAME 日产量及 CN 的关系,发现不同接种密度培养体系下的小球藻碳相关代谢途径与脂积累有较强的负相关性。其中 IN10⁷ 中 FAME 日产量提高主要与生长周期相关,而 CN 的变化可能与接种密度差异引起的小球藻光合能力不足,从而导致 PUFA 减少有关,而且他碳相关代谢水平的下降也可能是由光合能力下降造成的,可见 IN10⁷ 体系培养下的小球藻产脂能力具有较高的提升空间。

4、本研究通过研究接种密度对小球藻胞内色素变化的影响,发现接种密度

越高，小球藻胞内的叶绿素含量越低，从侧面证实光合能力降低可能是导致高接种密度下小球藻代谢水平显著低于其他培养体系的关键因子之一。

第五章 磷脂组学研究

5.1 引言

细胞膜是细胞感受外界环境变化,并作出相应反应的第一级感受器。外界环境因子能够通过影响细胞膜的性质,进而改变膜表面蛋白和受体的分布及构象,影响细胞的生长代谢。磷脂双分子层是目前公认的细胞膜的基础结构,人们对磷脂的生命功能的认识始于生物膜的基本组成部分,几乎所有细胞在细胞膜和胞内膜水平所完成的功能都直接或间接地受到磷脂定位及磷脂结构转化的影响。生物体内的膜的组成是动态平衡的,外界的扰动或生物体的内部变化都可能引起膜上磷脂组成的变化。对膜上磷脂的组成变化的研究有助于侧面理解膜在应激机制中的作用。膜上磷脂的变化不但会影响膜的流动性和通透性,而且膜脂组成还是调节膜蛋白的重要途径,有研究指出酵母心磷脂酰基链的代谢水平会对酮戊二酸脱氢酶和抑制素复合体的表达水平产生显著影响^[156]。

磷脂不但能够通过影响蛋白表达对生命活动进行调节,磷脂本身及其相关衍生物也是重要的信号分子,如磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、甲基茉莉酮酸及磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)等^[157]。Darwish 在研究大米叶子时发现 PA 及 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP₂)能迅速对盐胁迫产生响应^[158]。Tian 发现高密度接种会引起磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)及 PG 的整体提高,这可能是细胞在高密度胁迫下的一种自我保护机制^[159]。Yang 在红豆杉细胞凋亡过程中观察到磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)和磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)介导的磷脂响应现象^[115]。而且通过这些研究可以看出不同物种在不同的生长阶段和外界环境下都有其独特的磷脂组成,对这种显著多样性的研究能够帮助我们了解在外界环境或内部遗传信息出现变化的情况下,磷脂分子在细胞信号转导中扮演的角色以及生物膜的相应变化情况,有助于我们分析在外界信号发起的初始阶段细胞的可能应对机制。

细胞膜是细胞最先感受到初始细胞密度所改变的微环境(温度、盐度及 pH 等)变化的部分,而作为细胞与环境因子的重要屏障,细胞膜在微藻适应接种密度变化的过程中一定发挥了重要作用,对不同接种密度下的小球藻磷脂组成的研究有助于深入了解接种密度所导致的小球藻代谢机制的变化。

5.2 结果与讨论

5.2.1 小球藻中磷脂组的检测

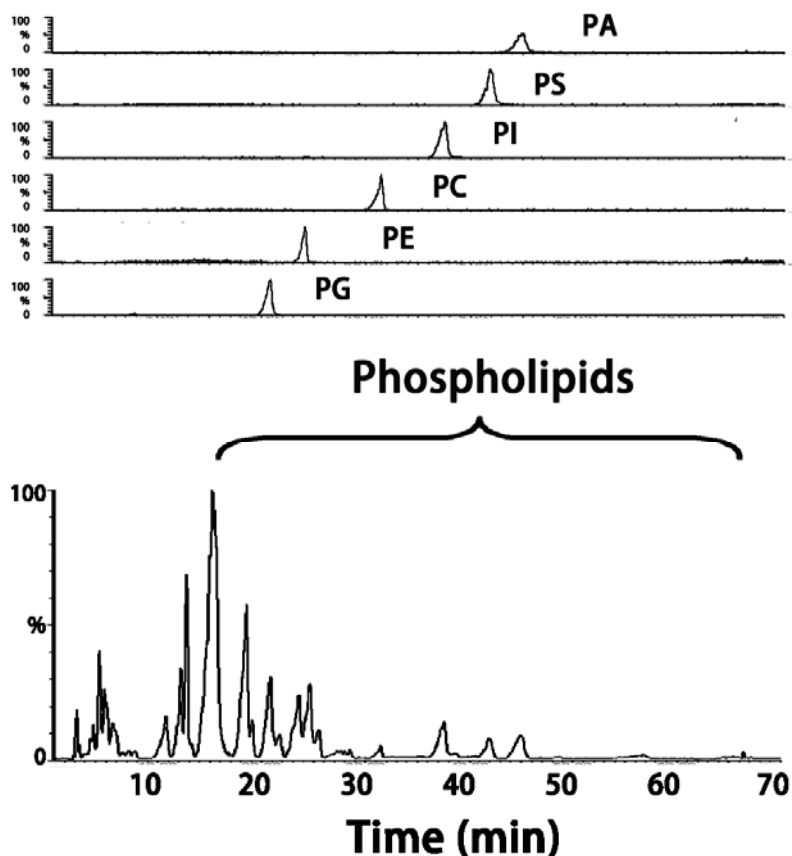


图 5-1 小球藻磷脂样品的总离子流图

Figure 5-1 Total ion chromatogram of phospholipids from *C. sorokiniana*

与高等植物一样，微藻需要大量的磷脂作为细胞膜的基本构架。磷脂以甘油骨架为基础结构，其 sn-1 及 sn-2 位上以酯键连接脂肪酸（疏水尾），并在其 sn-3 位以酯键连接一个含有磷酸的极性“头部基团”。根据其在磷酸基上的“极性头”的不同可以将其分为七大类，除了前文提到的 PA、PS、PE、PG 和 PI，还有磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine, PC）及二磷脂酰甘油（diphosphatidylglycerol, DPG）。此外磷脂还可脱去一个疏水尾，形成溶血性磷脂，如溶血性磷脂酰胆碱（lysophosphatidylcholine, LPC）。正相色谱连接质谱分析手段是磷脂组学中比较常见的技术，其基本原理是根据磷脂分子的极性头的不同对磷脂进行分类，这样通过同类的磷脂分子标准品及相应质谱峰就能对磷脂样品混合液进行定性分析了。从图 5-1 可以看出，在小球藻中一共可以检测到 6 类磷脂分子，其中极性

越小的磷脂分子出峰时间越早，依次是：PG、PE、PC、PI、PS 及 PA。通过保留时间和质核比分析小球藻中磷脂的组成，所得结果列于表 5-1。

表 5-1 小球藻的磷脂组成

Table 5-1 Composition of phospholipids in *C. sorokiniana*

磷脂种类 疏水尾	PG	PE	PC	PI	PS	PA
C 32:6	—	678.5	756.9	—	—	—
C 32:5	—	680.5	758.9	—	—	—
C 32:4	—	682.5	760.9	—	—	—
C 32:3	—	684.7	762.9	803.8	726.5	—
C 32:2	—	686.8	764.9	805.8	730.7	—
C 32:1	719.8	688.8	766.6	807.8	732.7	—
C 32:0	721.8	690.9	768.5	809.8	—	—
C 34:6	—	706.5	784.8	—	—	—
C 34:5	—	708.7	786.8	—	—	—
C 34:4	741.8	710.5	788.8	829.8	754.7	—
C 34:3	743.8	712.8	790.8	831.8	—	—
C 34:2	745.8	714.7	792.8	833.8	758.7	—
C 34:1	747.7	716.8	794.8	835.8	760.7	—
C 34:0	748.9	718.5	796.8	837.8	—	—
C 36:6	—	734.6	812.8	—	—	691.5
C 36:5	—	736.7	814.7	855.8	—	—
C 36:4	—	738.9	816.7	857.8	—	—
C 36:3	—	740.7	818.8	859.8	—	—
C 36:2	773.9	742.9	820.8	861.8	—	—
C 36:1	—	744.7	822.8	863.8	—	—
C 36:0	—	746.7	824.6	—	—	703.5
C 38:4	—	—	844.8	—	810.5	—
C 38:3	799.7	768.5	846.8	—	—	725.5
C 38:2	801.9	770.8	848.8	—	—	727.5
C 38:1	803.8	772.7	—	891.8	—	—
C 38:0	805.7	774.6	—	893.8	—	—
C 40:4	—	794.5	872.8	—	—	—
C 40:3	—	796.5	874.6	—	—	753.5
C 40:2	—	798.5	876.8	—	—	755.5
C 40:1	—	800.5	—	—	—	757.5
C 40:0	—	802.5	—	—	—	759.5
C 42:3	—	824.5	902.5	—	868.5	781.5
C 42:2	—	—	904.5	—	870.5	—
C 42:0	—	830.6	—	—	—	—
C 44:6	—	846.5	924.5	—	—	—
C 44:5	—	848.5	926.5	—	892.5	—
C 44:4	—	850.5	928.5	—	894.5	—
C 44:3	—	852.5	930.5	—	—	—
C 44:2	—	854.5	932.5	—	—	—

如表 5-1 所示，小球藻中共检测出 119 种磷脂分子，包括 12 种 PG，37 种 PE，34 种 PC，16 种 PI，11 种 PS 及 9 种 PA。可见磷脂疏水尾上的碳链种类以 16 碳到 22 碳的脂肪酸为主，这与本文发现的脂肪酸种类组成（图 3-7）是吻合

的。其中 PE 和 PC 的种类最为丰富，几乎涵盖了所有的碳链类型。相对来说，PG 的链长较短，含有较多 SFA；PI 的链长也比较短，但 PUFA 居多；PS 的分布范围较广，以短链及长链脂肪酸较多，中间的链长出现了较大空白，且 PUFA 偏多；PA 中只含有中长链脂肪酸。如图 5-2 所示，微藻磷脂的代谢途径主要包括 CDP-DAG 途径及 Kennedy 途径 (<http://www.kegg.jp>)。其中 PI 及 PG 主要来自于 CDP-DAG 途径，而 PE 和 PC 可以通过两种途径合成，在整个磷脂代谢网络中起着关键的作用，这可能是 PI 与 PG 的酰基分布比较相似，而 PE 与 PC 的酰基分布最广的原因。

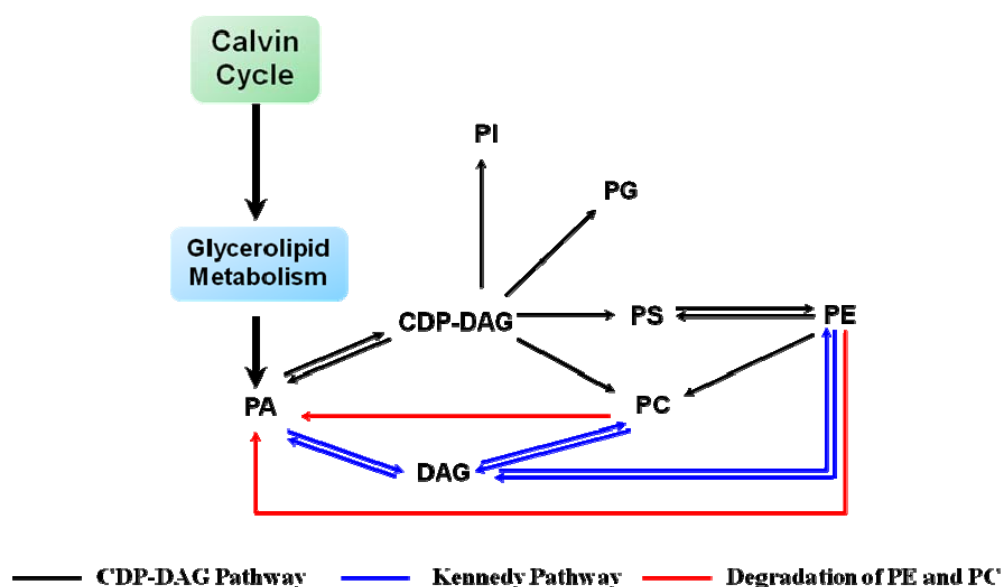


图 5-2 磷脂代谢示意图

Figure 5-2 Schematic diagram of phospholipid metabolism

一般说来，在大多数微藻中 PC、PE 及 PG 是主要的磷脂，其次还可能存在少量 PS、PI、PA 及 DPG。而且这些磷脂在细胞中的分布各不相同，PG 是唯一在类囊体膜上大量存在的磷脂，其他的磷脂主要分布在其他的细胞器膜及细胞膜上^[160]。然而不同的藻种磷脂组成很不相同，Goncharova 研究了四种微藻的磷脂组成，其中 *A. tobuchiensis* 中含有 PC、PE、PG 及 PI；*L. japonica* 中含有 PC、PE、PA、PG 及 PI；*S. pallidum* 中含有 PE、PG 及 PI；*U. fenestrata* 中含有 PS、PE、PA、PG 及 PI^[161]。He 等人利用 LC-MS 在 *Nannochloropsis oculata* 中检测出 PC、LPC、PG、PE、LPE、PI 及 LPI 等磷脂分子^[162]。Muradyan 在 *Dunaliella salina* 中检测出 PG、PE、PC 及 PI 四类磷脂分子，并且给出了相关的疏水尾信息，其疏水尾主要有 C14:0、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2 及 C18:3，其中 C16

和 C18 是主要的疏水尾结构^[163]。*Nitzschia laevis* 中的主要磷脂分子有 PC、LPC、PI、PG 及 DPG，且主要脂肪酸链为 C14:0 到 C20:5，其中 C16 含量最高^[164]。

5.2.2 不同接种密度对小球藻磷脂分布的影响

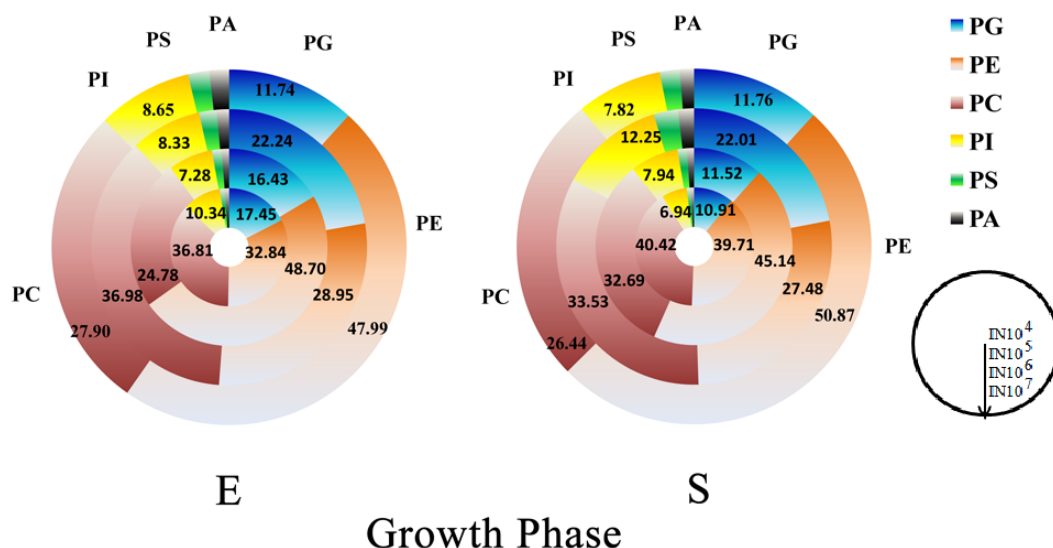


图 5-3 不同接种密度对小球藻的磷脂组成的影响

Figure 5-3 Phospholipid composition of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

图 5-3 中的两个同心圆分别表示了在指数期和稳定期下不同接种密度对小球藻磷脂分布的影响，可见 PG、PE 和 PC 是小球藻中的主要磷脂，这三者的总含量达到了小球藻总磷脂含量的 83.02-91.04%。不管是指数期还是稳定期，IN10⁶ 的小球藻的磷脂分布都显著不同于其他三个接种密度培养体系。而且指数期变化趋势与稳定期基本一致，但这种差异在稳定期更为明显。故以稳定期为例进行说明，其具体表现为与其他体系相比，该接种密度下 PG 的含量从 10.91-11.76% 上升至 22.01%，PE 的含量从 39.71-50.87% 下降到 27.48%。接种密度为 1×10⁴ 到 1×10⁶ cells·mL⁻¹ 的小球藻在 PC 含量上差异不大，但是与最高接种密度体系相比，其含量上升了 23.63-52.87%。不同的藻种磷脂含量的分布也不一样。*Nannochloropsis oculata* 中的 PI 和 PG 含量最高，其次是 PC、LPE、LPC、PE 及 LPI^[162]。在 *Dunaliella salina* 中 PG 是含量最多的磷脂分子，其次为 PC 和 PI，PE 含量较少^[163]。Goncharova 比较了四种微藻的磷脂含量，其中 *A. tobuchiensis* 中含量最高的为 PC，其次依次为 PG、PE 及 PI，PC 是 *L. japonica* 中含量最高的磷脂，其次为 PA、PG、PE 及 PI，*S. pallidum* 中磷脂含量由高到低分别为 PE、PG 及 PI，*U. fenestrata* 中最高含量的是 PG，其次为 PA、PE、PS 及 PI^[161]。Chen

指出 PC 是 *Nitzschia laevis* 中含量最高的磷脂分子，而 PI、PG、DPG 及 LPC 的含量差异不大^[165]。

5.2.3 不同接种密度对小球藻磷脂疏水尾链长的影响

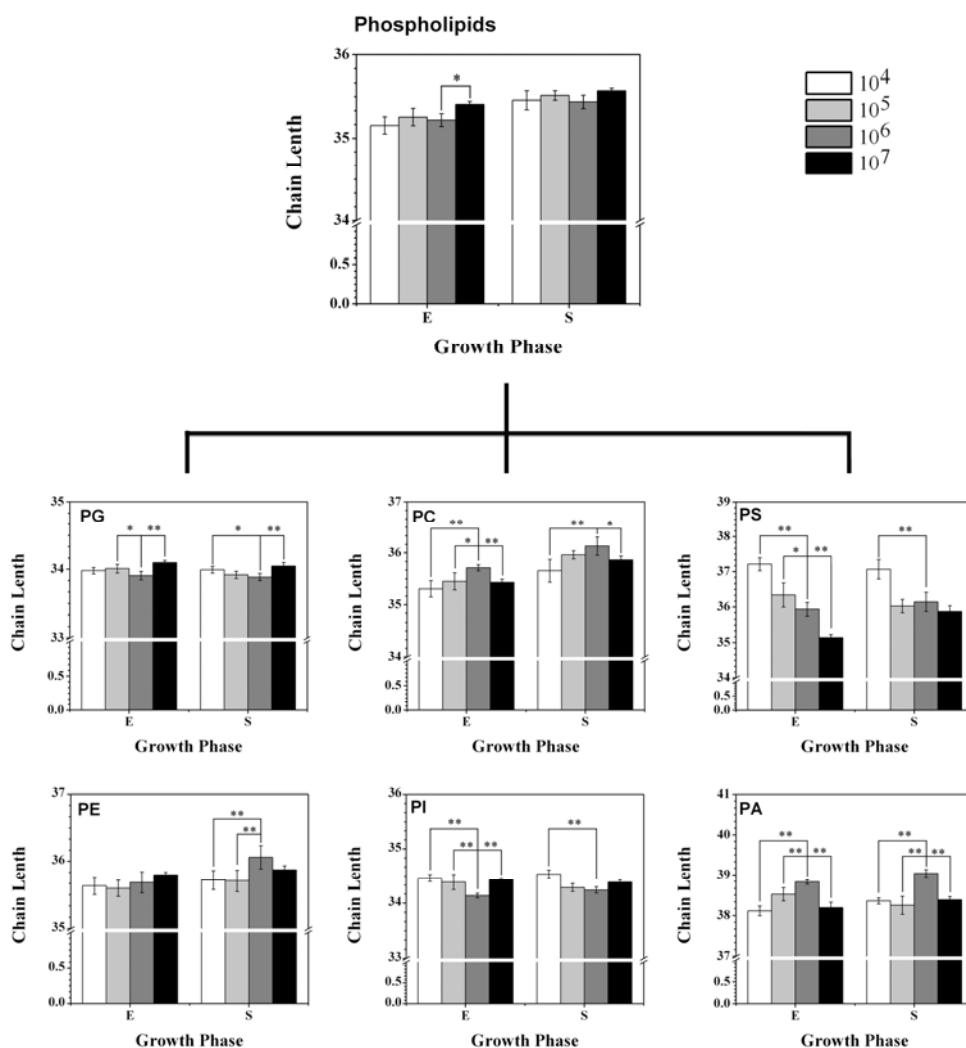


图 5-4 不同接种密度对小球藻磷脂链长的影响

Figure 5-4 The chain length of phospholipid of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

不仅仅磷脂的极性头变化会对细胞产生重要影响，磷脂上的疏水尾变化也能对磷脂的物理化学特性造成影响，从而引起或反映各种重要的生理变化^[115]。图 5-4 给出了接种密度对小球藻磷脂疏水尾链长的影响情况。可以看出，接种密度对磷脂链长影响不大，两条疏水尾的平均链长在 35.15-35.57。然而，如果细化到每个种类，则可发现不同类的磷脂链长差异很大，而且同类磷脂的链长受接种密度影响也很大。相对而言，PG 及 PI 的链长最短，其次是 PE 和 PC，PS 的链长

跨度较大,而 PA 的链长远高于其他磷脂,与同体系下的 PG 相比,链长增长了 12.00-15.21%。

由于 IN10⁶ 培养体系下的小球藻磷脂分布显著不同于其他体系,故在磷脂疏水尾链长及不饱和度的分析过程中也以这个体系为基准进行比较。可以发现不管是指数期还是稳定期的 IN10⁶ 培养体系下的小球藻的 PG 及 PI 的链长都短于其他体系,而 PC 与 PA 的链长却高于其他体系。指数期的 PE 链长受接种密度影响不大,但稳定期的 PE 在 IN10⁶ 培养体系中达到最高。接种密度对 PS 链长的影响是梯度的,接种密度越大,PS 链长越短。可见,接种密度对小球藻磷脂链长的影响可能只是基于磷脂各种类之间相互转化所造成的,因此才会出现接种密度对小球藻各种磷脂链长都有较大影响,然而其整体链长却没有大的变化的现象。

大量研究证明,磷脂分子的链长能够对膜的稳定性和流动性等理化特性造成显著影响,从而影响膜的生理功能。Zhao 利用不同链长的 PC 构建了细胞膜模型,发现链长越长,疏水链间的范德华力更大,所形成的膜更不稳定,且可压缩性更弱,而且还发现 PC 链长对紫杉醇与磷脂分子的相互作用有很大影响,链长越长,紫杉醇分子越难与磷脂分子结合,其临界表面压力越小^[166],Niemelä 采用不同比例的鞘磷脂研究了不同链长和饱和度对膜的影响。增加链长能够显著提高膜的厚度^[167],大量超长链酰基的聚集还能导致膜的刚性增加,甚至会导致膜的形态呈现一种类似晶体的固体形态^[168]。可见 IN10⁶ 体系中 PG 和 PI 的变化导致膜的流动性增加,而 PC、PE 和 PA 的变化则有使膜的刚性相对更强的趋势,这可能是与各磷脂种类特性相关。如 PG 是唯一能出现在类囊体膜上的磷脂,其生理特性与微藻的光合作用密切相关^[169],类囊体膜的流动性的增加可能有助于电子传递速率和光合作用效率的提高^[155]。

5.2.4 不同接种密度对小球藻磷脂疏水尾不饱和度的影响

与链长变化不同,磷脂疏水尾总体的不饱和度受接种密度影响很大,IN10⁶ 培养体系的磷脂总体不饱和度显著低于其他体系(图 5-5)。有趣的是,此时各种磷脂内部的变化反而不如链长变化那么显著。但总的说来,还是有一定变化的,其中 PG, PE, PS 及 PI 在 IN10⁶ 中的不饱和度要显著低于 IN10⁴ 及 IN10⁵。指数期的 IN10⁶ 体系中的 PC 的不饱和度明显低于 IN10⁷ 体系,稳定期的 IN10⁶ 体系中的 PC 的不饱和度显著低于 IN10⁴ 体系。而指数期的 PA 含量受接种密度影响很小,但是稳定期 IN10⁶ 中 PA 不饱和度显著低于 IN10⁵ 及 IN10⁷。

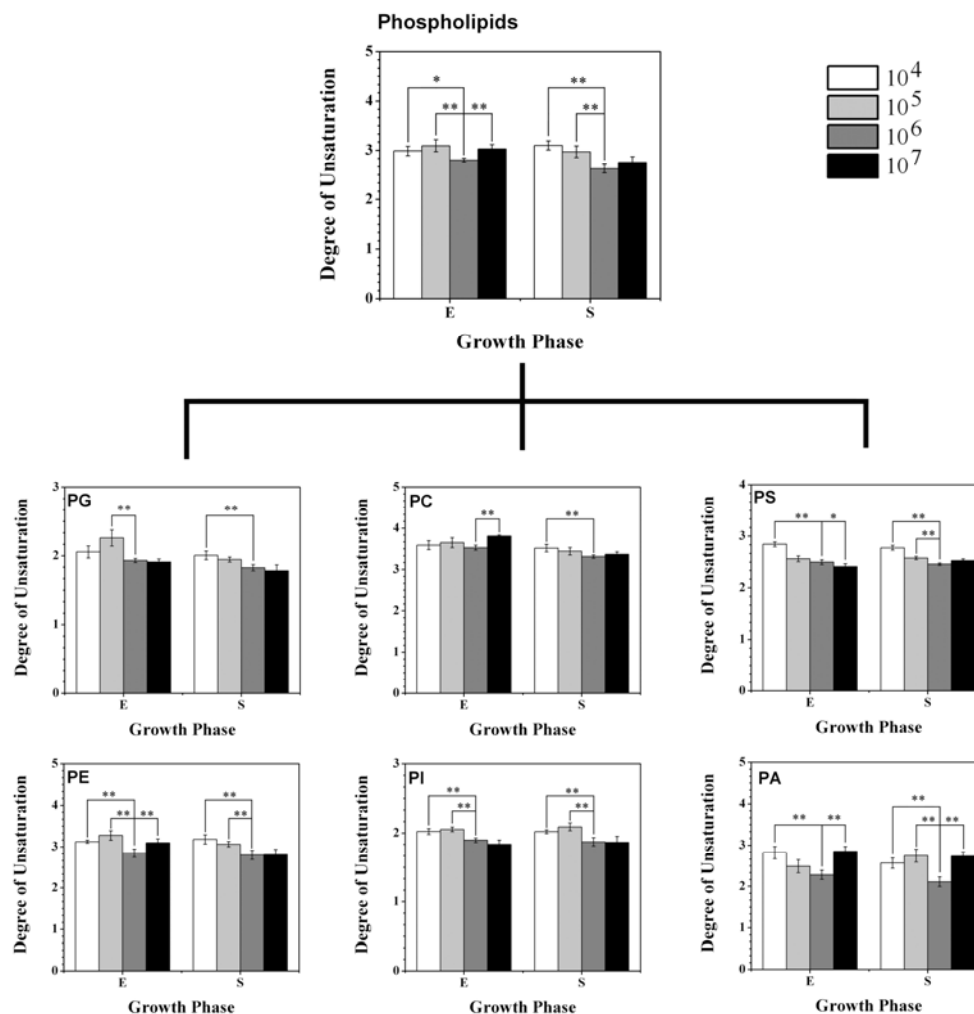


图 5-5 不同接种密度对小球藻磷脂不饱和度的影响

Figure 5-5 The degree of unsaturation of phospholipid of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

可见小球藻磷脂的变化主要是因为几乎所有种类的磷脂在 $IN10^6$ 培养体系中的不饱和度都降低了, 从而导致其整体水平的下降。高不饱和度的磷脂会使膜的空间构象变大, 还会增加膜的流动性, 这对很多重要的膜生理功能, 如抗低温等有重要影响; 而大量饱和酰基顺序紧密充满于双分子层膜的中心将有助于形成刚性液态有序相, 即脂筏的分离^[168], 而脂筏在蛋白转运和信号传导方面有重要作用。

5.2.5 多元统计分析研究不同接种密度对小球藻磷脂的影响

对不同接种密度体系下小球藻的磷脂组变化做 PLS-DA 分析, 所得结果如图 5-6 所示。所得模型的 R^2X 、 R^2Y 及 Q^2 分别为 0.938, 0.966 及 0.915, 能够对数

据进行较好的解释。图 5-6A 为 PLS 模型的三维得分图，可以看出不同体系在不同收获时间可以完美地分开，不过从距离可以看出，除了 IN10⁴，其他接种体系的指数期和稳定期的样本是比较接近的，这说明接种密度对样本的影响大于收获时间对样本的影响。为了更清楚地看到各样本的分离情况，将第一主成分及第三主成分单独提出来分析（如图 5-6B 所示），这两个主成分分别解释了磷脂组变化信息的 39.2%及 17%，是比较可靠的。可以看出 IN10⁶ 的两个不同收获时间的样本及指数期的 IN10⁴ 与第一主成分正相关，而其他样本与第一主成分负相关。同时通过第三主成分能将稳定期的 IN10⁶、指数期的 IN10⁶、指数期的 IN10⁴ 完美地分开。此外，还可以发现指数期的样本基本上与第三主成分负相关，而稳定期的样本基本上与第三主成分正相关。

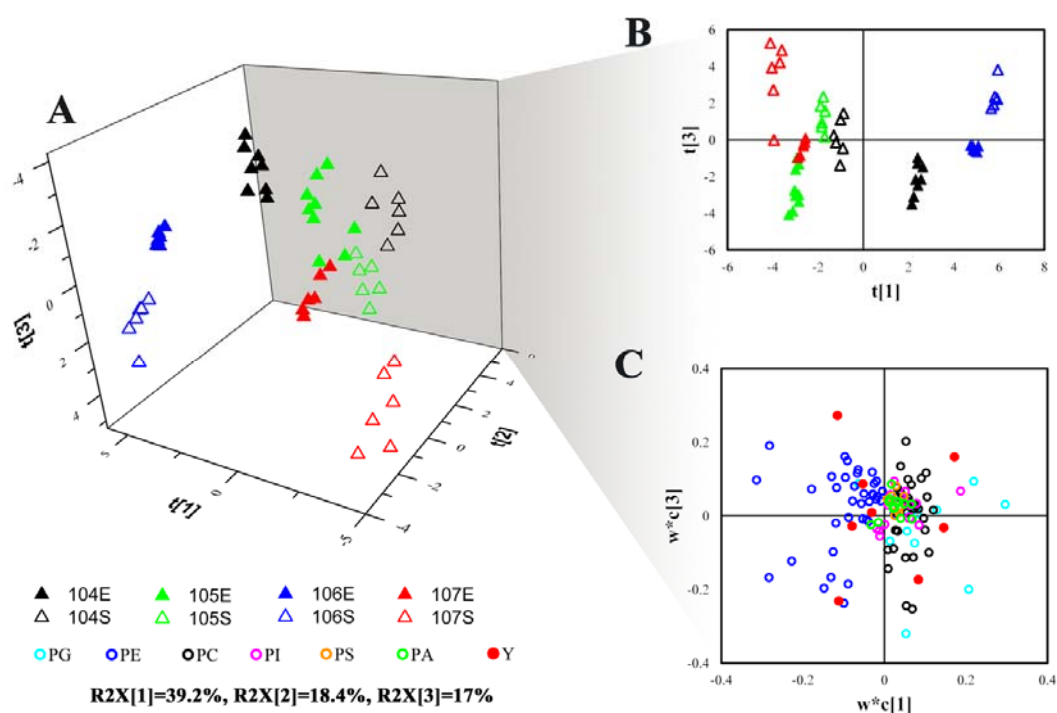


图 5-6 不同接种密度对小球藻磷脂水平的影响构建 PLS-DA 模型 A.小球藻磷脂 PLS-DA 分析的 3D 得分图; B.小球藻磷脂 PLS-DA 模型的 $t[1]$ - $t[3]$ 得分图; C.小球藻磷脂 PLS-DA 分析的 $w*c[1]$ - $w*c[3]$ 载荷图

Figure 5-6 The PLS-DA model were established based on the phospholipid profile under different inoculum sizes. A. PLS-DA 3D score plot; B. PLS-DA score plot $t[1]$ - $t[3]$; C. PLS-DA loading plot $w*c[1]$ - $w*c[3]$

图 5-6C 是 PLS-DA 模型的得分图，它能够揭示各个变量对模型建立的影响，可以看出大部分 PG、PE 及 PC 分子远离原点，说明这些磷脂分子是造成样本聚

集和分离的主要原因。通过 PLS-DA 模型的 t_1 - t_3 得分图知道, 第一主成分主要是关于不同接种体系间的分离, 而第三主成分主要是关于不同收获时间体系间的分类, 故 $w*c[1]$ - $w*c[3]$ 载荷图中的 $w*c[1]$ 中绝对值较大的变量主要是对不同接种体系间的差异负责, 而 $w*c[3]$ 中绝对值较大的变量主要造成了不同收获时间体系间的磷脂组差异。

表 5-2 各磷脂及样品点在 PLS-DA 模型得分图中的排名

Table 5-2 The rank of the phospholipids and samples in the loading plot of PLS-DA model

排名	$w*c[1]$	$-w*c[1]$	$w*c[3]$	$-w*c[3]$
1	PG 34:2	PE 36:4	107S	PG 34:4
2	PG 32:0	PE 36:5	PC 44:6	PC 34:5
3	PG 34:3	PE 34:2	PE 34:2	PC 34:6
4	PI 34:2	PE 34:3	PE 34:1	PE 32:3
5	106S	PE 36:3	106S	105E
6	106E	PE 36:6	PE 38:1	PG 34:3
7	PG 34:1	PE 34:5	PC 44:5	PE 36:6
8	PC 38:3	PE 40:3	PE 32:1	PE 34:6
9	PC 32:3	PE 34:4	PE 36:1	104E
10	PC 38:2	PE 40:4	PC 34:2	PE 36:5

因此分别对各磷脂分子的 $w*c[1]$ 及 $w*c[3]$ 得分值进行最高值和最低值的排序, 所得结果如表 5-2 所示。与 $w*c[1]$ 正相关的关键磷脂分子分别属于 PI、PG 和 PC, 这些分子的不饱和度较低, 且 PI 和 PG 分子的链长较短, 同时这些关键分子也与 IN10⁶ 体系两个收获时间的样本正相关; 而与 $w*c[1]$ 负相关的关键磷脂分子都属于 PE, 且饱和度较高。与 $w*c[3]$ 正相关的磷脂分子归属于 PE 分子和 PC 分子, 其中 PC 分子的不饱和度较高, 而 PE 分子都是饱和度较低的磷脂分子, 而且这些关键磷脂分子与 IN10⁶ 及 IN10⁷ 的稳定期成正相关关系; 与 $w*c[3]$ 高度负相关的磷脂分子同时包括了 PG, PE 及 PC, 这些分子的共同特点是不饱和度和度较高, 此外这些磷脂分子与 IN10⁴ 及 IN10⁵ 的指数期样本成正相关。

由此可以看出 PG、PE 及 PC 是造成这些样本分类的最重要因素, 因此对 PG、PE 及 PC 分子做进一步分析。图 5-7 是小球藻 PG 分子在不同接种密度下的变化, 其中左图是关于指数期取样的比较, 而右图是关于稳定期取样的比较, 与指数期和稳定期区分相关的 PG 分子分别用椭圆型框选中标记在相应的收获时间变化图内。可以发现, 指数期样品中除了 PG34:4 外, 其他所有 PG 分子的最高值都是在 IN10⁶ 培养体系中达到, 而稳定期样品中除了 PG36:2 外, 其他所有 PG 分子的最高值也都是在 IN10⁶ 培养体系中达到, 而且这种 IN10⁶ 体系相关的差异在稳

定期的时候更为显著。这也从侧面验证了大多数 PG 分子与 IN10⁶ 培养体系正相关的现象。

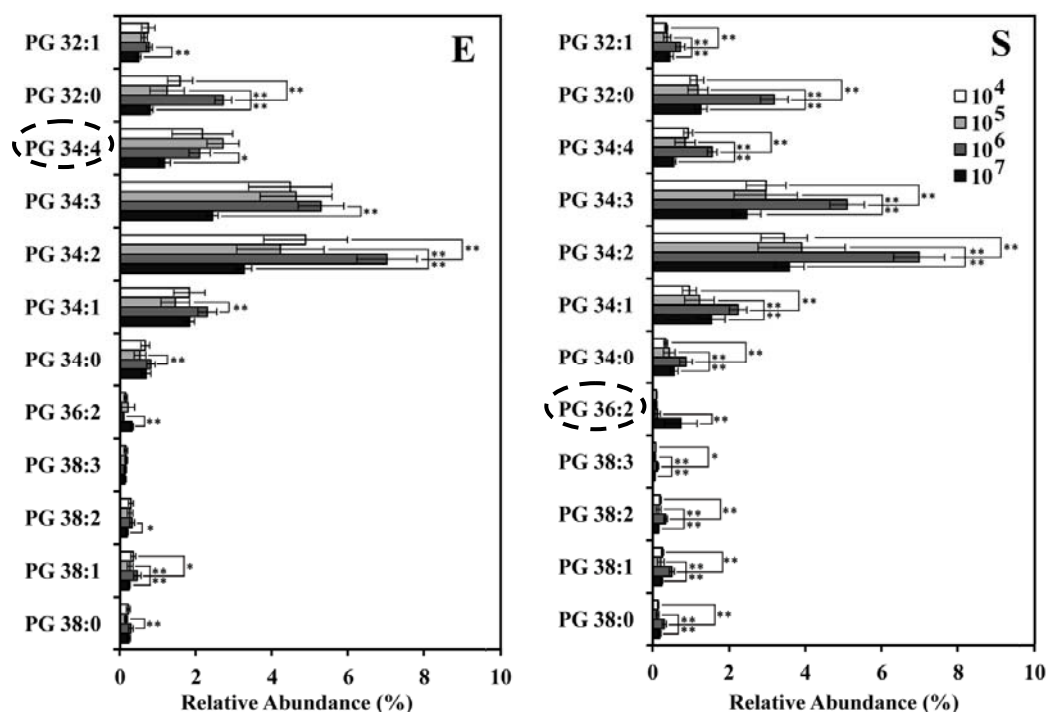


图 5-7 小球藻中关键 PG 在不同接种密度体系中的变化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$

Figure 5-7 The PG content of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

图 5-8 给出了小球藻中关键 PE 在不同接种密度体系中的变化，与指数期和稳定期区别相关的 PE 分子分别用椭圆型框选中标记在相应的收获时间变化图内，可以发现几乎所有关键的 PE 分子的最低值都是在 IN10⁶ 培养体系中得到，而且这种差异具有显著性。这应该是 IN10⁶ 体系显著区别于其他体系的重要原因之一，也是这些关键 PE 分子与 IN10⁶ 成负相关的主要原因。此外，还需注意的是获得 PE 分子最高值的培养体系，其中 PE32:1、PE34:2、PE34:1、PE36:1 及 PE38:1 是与第三主成分显著正相关的磷脂分子，其最高值均在 IN10⁷ 培养体系中达到；而 PE32:3、PE34:6、PE36:6 及 PE36:5 是与第三主成分负相关的磷脂分子，其峰值在 IN10⁵ 培养体系下达到。

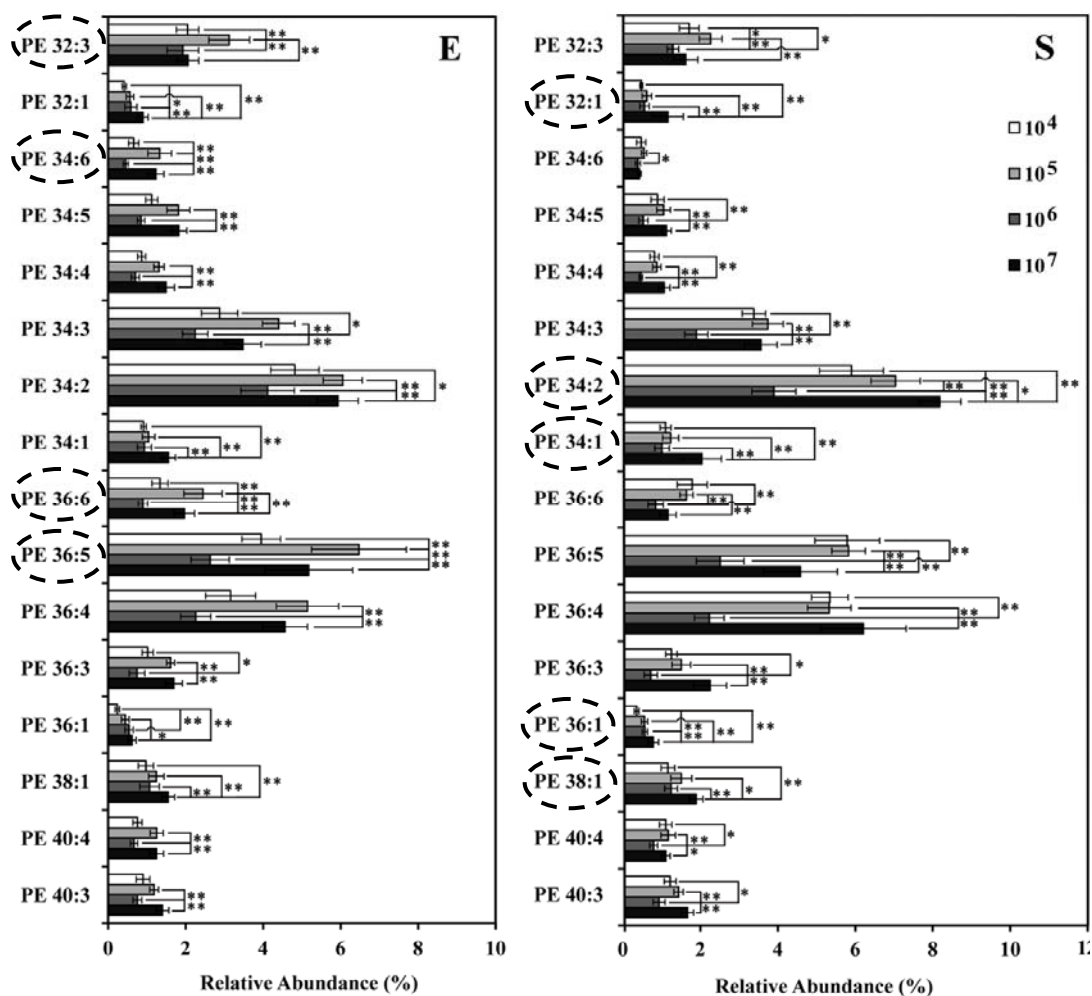


图 5-8 小球藻中关键 PE 在不同接种密度体系中的变化

* P<0.05, **P<0.005

Figure 5-8 The PE content of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

小球藻中关键 PC 在不同接种密度体系中的变化可以在图 5-9 中观察到，其中圆角矩形框中的 PC 是与第一主成分正相关的分子，椭圆型框中的是与第三主成分相关的分子。可以发现指数期 PC 分子普遍在 IN10⁶ 及 IN10⁴ 培养体系下较高，但是在稳定期的变化没有一致性。其中 PC38:3、PC32:3 及 PC38:2 受收获时间影响较小，且在 IN10⁶ 及 IN10⁴ 培养体系下较高，而 PC34:5 及 PC34:6 指数期时在 IN10⁵ 培养体系下最小，而稳定期时却出现了随接种密度上升而下降的趋势。PC34:2 在 IN10⁷ 培养体系下最小，但稳定期也出现了随接种密度上升而下降的趋势。指数期下的 PC44:6 及 PC44:5 均在 IN10⁶ 体系达到峰值，但是这种接种密度导致的差异在稳定期就没有那么明显了。

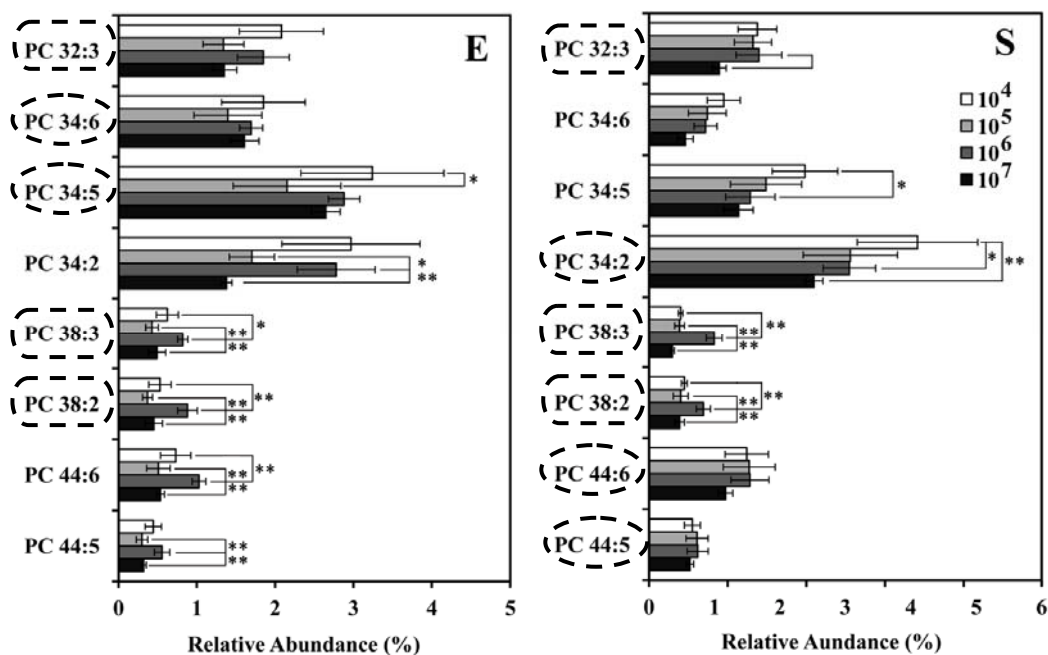


图 5-9 小球藻中关键 PC 在不同接种密度体系中的变化

* P<0.05, **P<0.005

Figure 5-9 The PC content of *C. sorokiniana* under different inoculum sizes

可见接种密度对小球藻磷脂种类的影响主要体现在 IN10⁶ 体系上, 在这个体系中 PE 分子含量整体出现了显著的下滑, 而 PG 分子含量整体出现了显著的上升, PC 分子含量虽然有不同变化, 但总的说来其数值在 IN10⁶ 中相对较高, 且显著高于 IN10⁷ 体系。大量研究指出, 随着温度、光照和营养的改变, 磷脂分子的含量会出现显著变化。PC 是内质网、线粒体等细胞器膜及细胞膜的主要组成部分, 也是色素体膜的构成之一, 在叶绿体中, 它主要集中在膜外侧靠近细胞质基质部分, 但受到外界扰动时, 会被 PLD 等磷脂酶攻击降解成 PA, 开始一系列信号转导过程^[169]。PE 分子是微藻细胞膜的主要构成之一, 有研究表明 PE 能够酰化形成 N-酰基磷脂酰乙醇胺 (N-Acylphosphatidylethanolamine, NAPE), 这种物质能够在细胞受到胁迫时对细胞膜形成保护作用, 增强细胞耐受能力^[170]。还有报道表明 PE 在细胞膜表面的重新分配可能调控肌动蛋白细胞骨架调控组织, 而且能够介导细胞膜和肌动蛋白的协调运动来达到成功分化细胞的作用^[171]。当膜内富含 PE 时, 可能导致层状六边形相的转化, 而这种变化不但会影响蛋白在膜上的整合, 蛋白在膜内的横向运动及某些蛋白的折叠与稳定^[172], 还会影响膜与膜的接触, 液泡形成过程中的双分子层融合以及液泡介导的蛋白转运^[173]。IN10⁶ 上的 PE 含量明显下降, 说明其膜的紧密程度可能有所上升。PG 分子是唯一存在于类囊体膜及叶绿体内膜上的磷脂分子, 且直接参与捕光复合体 (light

harvesting complex II, LHCII) 三聚物的形成, PG 等阴性脂质分子的缺失将导致叶绿素含量减少、光合能力受损及生长受限^[169]。Pineau 等利用 *Chlamydomonas reinhardtii* 构建了 PG 合成能力受限的突变株,发现 PSII 的活性也受到了限制^[174],可见 PG 是保证 PSII 复合体活性的必要分子。还有研究证明在一定范围内,降低光强,将导致 PG 分子含量增加^[160]。接种密度越大,细胞生长过程中接受到的平均光强就越弱,这可能是 IN10⁶ 体系中 PG 分子含量高于低密度接种体系的原因之一。然而,光照的改变不是接种密度的唯一影响,因此虽然 IN10⁷ 的光照比 IN10⁶ 更弱,但是其 PG 分子的含量仍远小于 IN10⁶ 培养体系。

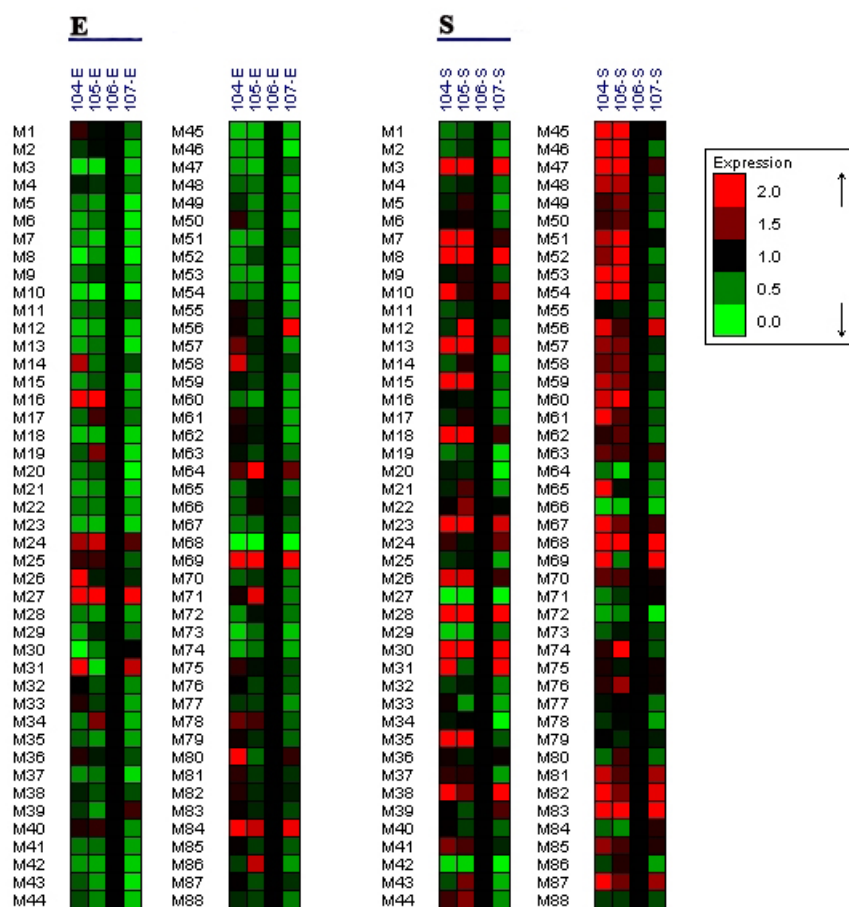


图 5-10 相对于接种密度为 1×10^6 cells·mL⁻¹ 小球藻细胞,其他接种密度下小球藻代谢变化

Figure 5-10 A metabolic heat map that summarizes the differences in the metabolite fingerprints against the metabolite variations of inoculum sizes, compared to those of *C. sorokiniana* inoculated at 1×10^6 cells·mL⁻¹

根据磷脂分子在不同接种密度下的变化可以推断, IN10⁶ 培养体系下磷脂的显著变化可能和细胞的光合能力相关,随着接种密度上升,细胞接受到的光源变少,因此不同培养体系下的细胞的光合能力各有不同,而且根据 PG 的变化可以

推测虽然 IN10⁶ 体系下的细胞受到的光照少于前两个培养体系,但是此时的光源还未少至成为限制性因素,只有到了 IN10⁷,细胞接受的光源已经不足,从而导致了 PG 的显著降低,第四章关于色素的测定也验证了这一推论。这种高密度引起资源不足和细胞胁迫的现象在酵母培养体系中也有报导^[159]。因此可以推测 IN10⁶ 的生长状态可能优于其他培养体系,图 5-10 给出了 IN10⁶ 培养体系下小球藻代谢状态与其他体系的对比,可以发现,大多数代谢物的水平都在 IN10⁶ 培养体系下最高,这种现象在指数期更为明显。可见,IN10⁶ 培养体系下的细胞生长状态明显优于 IN10⁷,而且指数期的 IN10⁶ 代谢状态是所有培养体系中最好的。 $1\times 10^6\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 是在目前培养条件下最适合小球藻生长代谢的接种密度。

5.3 小结

1、通过 LC-MS 检测在小球藻细胞中共发现 119 种磷脂分子,包括 12 种 PG、37 种 PE、34 种 PC、16 种 PI、11 种 PS 及 9 种 PA,其中 PC、PE 及 PG 的丰度最高。

2、本研究发现磷脂分子的整体链长没有显著变化,但是不同种类磷脂的链长却出现了显著变化,其中 IN10⁶ 体系下 PG 及 PI 的链长都短于其他体系;而 PC 与 PA 的链长却高于其他体系;指数期 PE 链长受接种密度影响不大,但稳定时期时 IN10⁶ 培养体系下的 PE 链长达到峰值;接种密度对 PS 链长的影响是梯度的,接种密度越大,PS 链长越短,提示接种密度对磷脂酰基链长的影响有种类依赖性,但在整体水平体现了动态平衡。

3、本研究发现接种密度不但对各磷脂分子的不饱和度有显著影响,而且这种接种密度相关的差异具有一致性,即 IN10⁶ 培养体系下的各磷脂分子的不饱和度显著低于其他体系的同类磷脂分子,这导致该体系下磷脂总不饱和度也达到所有体系最低值。这表明磷脂分子不饱和度的改变是接种密度引起的膜生理变化的生理基础。

4、本研究发现 IN10⁶ 培养体系的磷脂变化显著不同于其他培养体系,主要表现在 PE 的含量明显低于其他培养体系,而与此同时 PG 的含量出现了显著提升,此外 PC 的含量也明显高于 IN10⁵ 及 IN10⁷ 培养体系。这说明接种密度能够改变细胞的疏密程度,更重要的是接种密度对细胞受光的影响可能导致了类囊体膜的生理状态的改变,从侧面反应出光合作用的改变可能在接种密度引起的小球藻生理变化上起到了关键作用。而通过与代谢组学结果比较,发现指数期 IN10⁶ 体系下的代谢水平要明显高于其他体系,这种组学结果差异度的相似性需要进一步的研究以揭示其可能的内在联系。

第六章 接种密度对小球藻蛋白组的影响

6.1 引言

前几章研究结果表明,接种密度对小球藻的生长、脂积累、胞内代谢及磷脂变化都有显著影响,然而这些结果都是接种密度对小球藻生理生化影响的最终体现。尽管可以提供大量小球藻相应状态的整体变化信息,并在一定程度上揭示接种密度对小球藻生理生化功能调控的机制变化,但是代谢组学和磷脂组学都是反向工程手段,他们虽然能够反向解析小球藻的生理生化状态与预设环境变化之间的关系,但这都不是表征接种密度差异导致小球藻生理变化机制的直接证据,这些结果只能告诉我们发生了什么,如果要明确为什么会出现这些结果,还需要做进一步的蛋白质研究才能获得更多的本质信息。

蛋白质是生物体内遗传基因的具体表达者,所有的生命功能和反应都需要以蛋白质为媒介得以进行,它是连接上游基因,以及下游代谢产物的桥梁,是细胞生理生化功能的执行者。对蛋白质结构和功能的研究可以揭示生物体在不同生理状态下的变化机制,不但可以揭示上游基因调控的变化,还能推测下游代谢变化。而且蛋白调控机制贯彻于细胞生长至死亡的全体生理生化调控过程。而蛋白质组学研究是一门强调对细胞、生物体或组织中所有蛋白质的结构和丰度检测的技术。通过蛋白质组学分析,我们将得到一系列关于在外界扰动或内在遗传信息变化下蛋白质表达的动态变化结果,如相应蛋白质功能、蛋白质调控机理及蛋白质相互作用关系等相关信息。因此将蛋白质组学引入不同接种密度培养小球藻体系的研究中来,有助于从本质上了解接种密度影响小球藻生理生化变化的具体调控机制和相应代谢机理。

本研究通过 Q-TOF 液质联用技术对 iTRAQ 标记后的小球藻蛋白质样品进行分析,研究不同接种密度下小球藻胞内蛋白质的组成及含量变化,试图建立不同接种密度影响小球藻生长、脂积累及代谢的内在机制推断。

6.2 结果与讨论

6.2.1 小球藻蛋白组的分布趋势

为了研究接种密度对小球藻蛋白质水平上的影响,本章进行了不同接种密度

体系下小球藻稳定期的比较蛋白质组学研究。利用 mascot 搜索引擎, 以及质谱测定肽段得到的 mgf 文件, 将待鉴定蛋白与 NCBI 蛋白数据库中的 other green plant 分类进行比对, 通过设置一定筛选条件, 完成蛋白质的鉴定。同时, 利用 mascot 中的定量工具, 实现蛋白的定量。本研究一共鉴定出 695 种蛋白质, 其中 241 种蛋白质丰度达到定量要求, 对这些蛋白做进一步分析。表 6-1 给出了这些蛋白在本研究中的编号、NCBI 数据库的 gi 序列号、蛋白名称及相关蛋白的数据来源。

表 6-1 小球藻中所鉴定的蛋白列表

Table 6-1 The identified protein from *C. sorokiniana*

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P1	1066153	cysteine synthase	<i>Spinacia oleracea</i>
P2	108773245	P700 apoprotein A2 of photosystem I	<i>Chara vulgaris</i>
P3	108773331	CF1 alpha subunit of ATP synthase	<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>
P4	108796812	D1 reaction center protein of photosystem II	<i>Staurostrum punctulatum</i>
P5	11022876	photosystem II D2 protein	<i>Ceratophyllum demersum</i>
P6	111120239	RNA ligase isoform 1	<i>Triticum aestivum</i>
P7	11134148	Phosphoglycerate kinase	—
P8	11135108	Thioredoxin F-type	—
P9	11466350	photosystem II 47 kDa protein	<i>Mesostigma viride</i>
P10	115349987	CP43 chlorophyll apoprotein of photosystem II	<i>Stigeoclonium helveticum</i>
P11	115826	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	—
P12	116000537	DNA alkylation damage repair protein	<i>Ostreococcus tauri</i>
P13	116056774	DNA repair and transcription factor XPB1	<i>Ostreococcus tauri</i>
P14	116057346	NADP+-dependent malic enzyme	<i>Ostreococcus tauri</i>
P15	116058579	ABC transporter family protein	<i>Ostreococcus tauri</i>
P16	116058671	unnamed protein product	<i>Ostreococcus tauri</i>
P17	116058994	chloroplast inner envelope protein-related	<i>Ostreococcus tauri</i>
P18	116059153	P0016F11.32 gene pro	<i>Ostreococcus tauri</i>
P19	116060765	terminal acidic SANT 1	<i>Ostreococcus tauri</i>
P20	118441534	ribulose 1,5 biphosphate carboxylase-oxygenase	<i>Passerina burchellii</i>
P21	119358781	H2a Histone H2A, probable	<i>Ostreococcus tauri</i>
P22	119720772	zinc finger A20 and AN1 domains-containing protein	<i>Brassica rapa</i>
P23	121077704	superoxide dismutase	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>
P24	121974	Histone H2A.2.1	—
P25	12200	Photosystem II 32kDa Q-B protein	<i>Phaseolus vulgaris</i>
P26	122022	RecName: Full=Histone H2B.1	—
P27	124360733	IMP dehydrogenase/GMP reductase, related	<i>Medicago truncatula</i>
P28	125492040	phosphoribulokinase	<i>Geranium dissectum</i>
P29	131259	Photosystem II protein D1	—
P30	131963	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	—

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P31	131975	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	—
P32	132051	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	—
P33	1346963	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	—
P34	13603578	maturase	<i>Coeliopsis hyacinthosma</i>
P35	1402512	S-receptor kinase SRK9	<i>Brassica rapa</i>
P36	14423687	2-phosphoglycerate dehydratase 2	—
P37	145342447	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901
P38	145343541	polyketide synthase	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901
P39	14586968	pol polyprotein	<i>Citrus x paradisi</i>
P40	146215980	actinidin Act2a	<i>Actinidia deliciosa</i>
P41	147742769	hypothetical protein	<i>Brassica rapa</i>
P42	147766787	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P43	147775945	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P44	147784408	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P45	147794978	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P46	147806478	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P47	147814957	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P48	147815238	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P49	147816888	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P50	147828688	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P51	147853391	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P52	147853925	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P53	147856331	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P54	147857328	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P55	148524161	elongation factor-1 alpha-like protein	<i>Micromonas pusilla</i>
P56	148906184	unknown	<i>Picea sitchensis</i>
P57	150251526	hypothetical protein CYtaCp093	<i>Cycas taitungensis</i>
P58	150406456	ATP synthase F1 subunit alpha	<i>Chlorokybus atmophyticus</i>
P59	154358483	At4g33250-like protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. petraea</i>
P60	156619126	photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein	<i>Floydia terrestris</i>
P61	156619313	ribosomal protein S2	<i>Chlamydomonas moewusii</i>
P62	157688316	choline monooxygenase	<i>Leymus chinensis</i>
P63	157836599	Chain A, Crystal Structure Of Rubisco, A Large-Subunit V331a Mutation	<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>
P64	159463146	predicted protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P65	159464597	hypothetical protein CHLREDRAFT_188353	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P66	159465251	predicted protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P67	159471237	flagellar associated protein, callose synthase-like protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P68	159473066	dynein heavy chain 2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P69	159473354	ribosomal protein L4, component of cytosolic 80S	<i>Chlamydomonas</i>

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
		ribosome and 60S large subunit	<i>reinhardtii</i>
P70	159474920	citrate synthase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P71	159475587	chaperonin 11	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P72	159476938	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P73	159478274	dynammin-related GTPase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P74	159482940	phosphoglycerate kinase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P75	159485398	predicted protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P76	159488652	biotin carboxylase, acetyl-CoA carboxylase component	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P77	159489256	DnaJ-like protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P78	161728809	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	<i>Chara braunii</i>
P79	162460340	lipxygenase	<i>Zea mays</i>
P80	166084569	NBS-LRR disease resistance protein	<i>Musa acuminata</i>
P81	167345246	caffeoyl-CoA-O-methyltransferase	<i>Pinus radiata</i>
P82	168009600	GPB2 heterotrimeric G protein beta subunit protein	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp. patens</i>
P83	168022943	SNF2 family DNA-dependent ATPase	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp. patens</i>
P84	168040923	predicted protein	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp. patens</i>
P85	168060457	predicted protein	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp. patens</i>
P86	168069947	predicted protein	<i>Physcomitrella patens</i> <i>subsp. patens</i>
P87	168566768	granule-bound starch synthase	<i>Sorghum bicolor</i>
P88	169142781	RNA polymerase beta~ subunit	<i>Aneura mirabilis</i>
P89	16975080	Chain A, Rubisco	<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>
P90	1770182	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	<i>Coprosma pumila</i>
P91	18605405	ribosome-inactivating protein benincasin	<i>Benincasa hispida</i>
P92	192910824	60S ribosomal protein L7	<i>Elaeis guineensis</i>
P93	193735614	photosystem II 44 kDa protein	<i>Chlorella vulgaris</i>
P94	194693590	unknown	<i>Zea mays</i>
P95	195612018	nucleolar RNA helicase 2	<i>Zea mays</i>
P96	195612924	40S ribosomal protein S5	<i>Zea mays</i>
P97	195623336	60S ribosomal protein L34	<i>Zea mays</i>
P98	195653505	calcium-dependent protein kinase	<i>Zea mays</i>
P99	195655049	nucleus protein	<i>Zea mays</i>
P100	197701160	nitrate reductase	<i>Chlorella vulgaris</i>
P101	20067421	glutathione transferase	<i>Triticum aestivum</i>
P102	206584345	NAC domain protein NAC4	<i>Gossypium hirsutum</i>
P103	21322752	cold shock protein-1	<i>Triticum aestivum</i>
P104	217071150	Methyltransf_6	<i>Medicago truncatula</i>

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P105	220938712	phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Spartina anglica</i>
P106	224031877	unknown	<i>Zea mays</i>
P107	224066791	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P108	224073335	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P109	224082982	SAUR family protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P110	224089042	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P111	224114619	cytochrome P450	<i>Populus trichocarpa</i>
P112	224128680	glutathione peroxidase	<i>Populus trichocarpa</i>
P113	224131422	histone 2	<i>Populus trichocarpa</i>
P114	224141399	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P115	224179427	D2 reaction center protein of photosystem II	<i>Pycnococcus provasolii</i>
P116	224179479	beta~ subunit of RNA polymerase	<i>Monomastix sp. OKE-1</i>
P117	224179512	CP47 chlorophyll apoprotein of photosystem II	<i>Monomastix sp. OKE-1</i>
P118	224593225	translation elongation factor-like protein	<i>Parachlorella kessleri</i>
P119	225016138	methyltransferase	<i>Glycine max</i>
P120	225442801	PREDICTED: hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>
P121	225447045	ATP-dependent helicase rhp16-like	<i>Vitis vinifera</i>
P122	226454357	Drug/Metabolite transporter superfamily	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P123	226456620	predicted protein	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P124	226458101	predicted protein	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P125	226459537	helicase	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P126	226460863	nucleosome positioning protein	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P127	226461401	predicted protein	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545
P128	226499766	threonine endopeptidase	<i>Zea mays</i>
P129	226502452	nodulin-like protein	<i>Zea mays</i>
P130	226504302	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic	<i>Zea mays</i>
P131	226506906	calmodulin binding protein	<i>Zea mays</i>
P132	226530677	tetratricopeptide-like helical	<i>Zea mays</i>
P133	226968660	ATP synthase CF1 alpha chain	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P134	22797375	thylakoid structural protein (PsbB)	<i>Platanus racemosa</i>
P135	23343885	metacaspase 1	<i>Solanum lycopersicum</i>
P136	2454484	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P137	2501578	Ethylene-inducible protein HEVER	—
P138	255070071	IFT52 intraflagellar transport protein-like protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P139	255071689	cytochrome b6-f complex subunit IV	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P140	255072357	condensin complex component	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P141	255076079	Drug/Metabolite transporter superfamily	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P142	255082774	predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P143	255083386	histone deacetylase	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P144	255083400	fructose bisphosphate aldolase class i	<i>Micromonas sp. RCC299</i>

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P145	255083687	eukaryotic initiation factor	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P146	255085564	predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P147	255086493	dynein heavy chain	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
P148	255540695	phosphoglycerate mutase, putative	<i>Ricinus communis</i>
P149	255543188	pentatricopeptide repeat-containing protein,	<i>Ricinus communis</i>
P150	255546439	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative	<i>Ricinus communis</i>
P151	255560697	ATP binding protein, putative	<i>Ricinus communis</i>
P152	255560721	n-myristoyl transferase, putative	<i>Ricinus communis</i>
P153	255560866	dead box ATP-dependent RNA helicase, putative	<i>Ricinus communis</i>
P154	255562796	DNA-directed RNA polymerase beta chain	<i>Ricinus communis</i>
P155	255565451	DNA ligase I, putative	<i>Ricinus communis</i>
P156	255569583	myosin vIII, putative	<i>Ricinus communis</i>
P157	255571634	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P158	255572219	retinoblastoma-binding protein, putative	<i>Ricinus communis</i>
P159	255573419	transcription factor, putative	<i>Ricinus communis</i>
P160	255575855	structural molecule, putative	<i>Ricinus communis</i>
P161	255578441	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P162	255579134	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast	<i>Ricinus communis</i>
P163	255579694	ATP binding protein, putative	<i>Ricinus communis</i>
P164	255582195	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P165	255586439	50S ribosomal protein L2, putative	<i>Ricinus communis</i>
P166	255590142	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P167	255592933	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P168	255597131	anthranilate synthase component I, putative	<i>Ricinus communis</i>
P169	255600665	skp1, putative	<i>Ricinus communis</i>
P170	255603912	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>
P171	259490765	IAA19 - auxin-responsive Aux/IAA family member	<i>Zea mays</i>
P172	27228029	photosystem II protein (psbA)	<i>Bryum coronatum</i>
P173	28204657	auxin efflux carrier protein	<i>Medicago truncatula</i>
P174	298068	myosin heavy chain	<i>Anemia phyllitidis</i>
P175	3059122	glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Marsilea quadrifolia</i>
P176	31096626	isoamylase	<i>Aegilops tauschii</i>
P177	3132304	Cl--pumping ATPase a subunit	<i>Acetabularia acetabulum</i>
P178	32399383	photosystem II G protein	<i>Calycanthus floridus var. glaucus</i>
P179	33320343	photosystem II CP43 protein	<i>Chaetosphaeridium globosum</i>
P180	34105768	ribosomal protein L3	<i>Triticum aestivum</i>
P181	34398358	41 kDa ribosome-associated protein precursor	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P182	34536707	large subunit of Rubisco	<i>Chlamydomonas noctigama</i>
P183	37721099	photosystem II CP43 protein	<i>Blandfordia punicea</i>
P184	38045385	EIL1	<i>Petunia x hybrida</i>
P185	38455498	oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>Pseudochlorella sp. CCAP 211/1A</i>

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P186	38603431	maturase K	<i>Hydrobryum loeicum</i>
P187	3893824	ATPase beta subunit	<i>Nicotiana sylvestris</i>
P188	39939489	polyubiquitin	<i>Clusia minor</i>
P189	4099796	alpha-tubulin	<i>Dunaliella salina</i>
P190	42565411	thioredoxin	<i>Hyacinthus orientalis</i>
P191	46241274	geranyl diphosphate synthase large subunit	<i>Antirrhinum majus</i>
P192	46906217	phospholipase D2	<i>Papaver somniferum</i>
P193	49473448	chloroplast light-harvesting complex II (Lhc II)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
P194	50058693	ribosomal protein L2	<i>Dinetus truncatus</i>
P195	50659119	phytochelatin synthase PCS2-7R	<i>Lotus japonicus</i>
P196	54399516	EF-1 alpha-like protein	<i>Helicosporidium sp. ex Simulium jonesi</i>
P197	548689	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	—
P198	55375996	anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase	<i>Malus x domestica</i>
P199	5738864	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺)	<i>Solanum tuberosum</i>
P200	59859191	PsbC	<i>Vanilla imperialis</i>
P201	60549178	chloroplast chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor	<i>Fragaria x ananassa</i>
P202	6561861	cold-responsive protein COR14b	<i>Triticum aestivum</i>
P203	72256517	pyridoxine biosynthesis protein	<i>Lotus japonicus</i>
P204	7263121	disease resistance-like protein	<i>Glycine max</i>
P205	74272665	G protein beta subunit-like polypeptide	<i>Chlamydomonas incerta</i>
P206	7524779	ATP synthase CF1 alpha subunit	<i>Chlorella vulgaris</i>
P207	7524799	photosystem II protein D2	<i>Chlorella vulgaris</i>
P208	7524809	elongation factor Tu	<i>Chlorella vulgaris</i>
P209	7524825	photosystem II protein VI	<i>Chlorella vulgaris</i>
P210	7524831	acetyl-CoA carboxylase beta subunit	<i>Chlorella vulgaris</i>
P211	7524847	photosystem II 47 kDa protein	<i>Chlorella vulgaris</i>
P212	7524848	photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	<i>Chlorella vulgaris</i>
P213	7524850	photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	<i>Chlorella vulgaris</i>
P214	7524904	ATP synthase CF1 beta subunit	<i>Chlorella vulgaris</i>
P215	75336622	ATP synthase subunit beta	—
P216	7544132	NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Chlamydomonas sp. W80</i>
P217	7595348	globulin-like protein	<i>Cucumis melo</i>
P218	76262500	pherophorin-C2 protein precursor	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P219	81051946	conserved hypothetical protein	<i>Asparagus officinalis</i>
P220	81250724	disease resistance gene analog	<i>Zizania latifolia</i>
P221	84180633	glutamine synthetase	<i>Helicosporidium sp. ex Simulium jonesi</i>
P222	84514159	cytochrome P450 monooxygenase CYP72A61	<i>Medicago truncatula</i>
P223	87330844	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit A	<i>Chlorella sp. JP-2005</i>
P224	87330881	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit A	<i>Scherffelia dubia</i>
P225	88911222	EF-1 alpha-like protein	<i>Mesostigma viride</i>

编号	gi 序列	蛋白名称	蛋白数据来源
P226	904147	adenosine triphosphatase	<i>Sinofranchetia chinensis</i>
P227	90959425	large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	<i>Chlamydomonas acidophila</i>
P228	161728809	33kDa oxygen evolving protein of photosystem II	<i>Chara braunii</i>
P229	3860315	40S ribosomal protein S19	<i>Cicer arietinum</i>
P230	6440794	60S ribosomal protein L31	<i>Chlamydomonas sp. HS-5</i>
P231	7524738	photosystem I subunit VII	<i>Pinus thunbergii</i>
P232	445116	light-harvesting complex IIa protein	—
P233	115826	RecName: Full=Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I, chloroplastic; Short=CAB; Short=LHCP; Flags: Precursor	—
P234	159487741	transketolase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P235	20729	unnamed protein product	<i>Pisum sativum</i>
P236	159486853	serine hydroxymethyltransferase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P237	162458005	photosystem II subunit29	<i>Zea mays</i>
P238	3021512	isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺)	<i>Nicotiana tabacum</i>
P239	159482924	heme oxygenase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
P240	224055797	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
P241	7524932	ribosomal protein L23	<i>Chlorella vulgaris</i>

对这些蛋白做亚细胞器定位，发现这些蛋白主要来自叶绿体、类囊体膜、质体、细胞核、核糖体、细胞质及细胞膜等各个亚细胞结构，如图 6-1 所示。

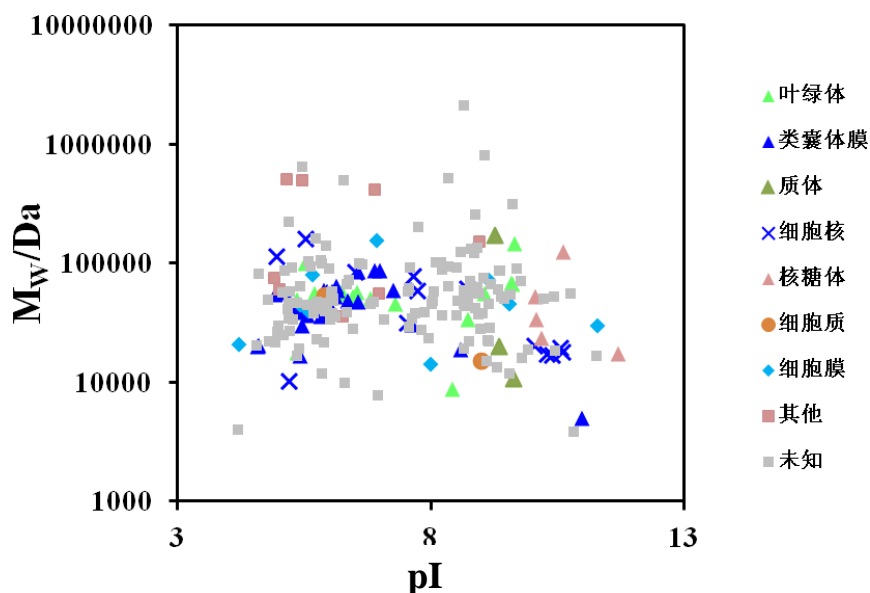


图 6-1 小球藻蛋白质组的质量-等电点二维图谱

Figure 6-1 The Mw-pI two dimensional map of the protein from *C. sorokiniana*

可见本次分析到的蛋白的分子量分布从 1000Da 到 10000000Da, 而等电点从 3 直到 13, 可见 iTRAQ 结合 Q-TOF 液质联用技术是能对小球藻蛋白组进行相对全面的分析的。此外还可以看出叶绿体、类囊体膜和细胞核中被分析到的蛋白种类多于其他亚细胞结构, 这可能与国际上微藻研究中对叶绿体的基因测序工作更为深入有关。

6.2.2 蛋白功能分析

小球藻内的各项生理活动的发生都需要蛋白的参与, 这导致了蛋白的多样性, 根据检索到的 gi 序列在 NCBI 及 kegg 数据库搜索相应蛋白质对应的基因编码, 并且根据 GO 分类 (Gene ontology) 对本研究所测蛋白组中各蛋白的生理功能进行检索, 所得结果如表 6-2 所示。

表 6-2 小球藻中所鉴定的蛋白功能分析表

Table 6-2 Functional categories of the identified protein from *C. sorokiniana*

编号	编码基因	生理功能
P1	cysC	Amino Acid Metabolism; Cysteine and methionine metabolism
P2	psaB	electron transport chain, photosynthesis
P3	atpA	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P4	psbA	photosynthetic electron transport in photosystem II
P5	psbD	photosynthetic electron transport in photosystem II
P6	-	ND
P7	PGK	glycolysis, reductive pentose-phosphate cycle
P8	TRXF	cell redox homeostasis
P9	psbB	photosynthetic electron transport chain
P10	psbC	photosynthetic electron transport chain
P11	LHC-IIb	photosynthesis, light harvesting
P12	Ot01g03050	response to stress
P13	Ot03g04120	nucleotide-excision repair
P14	Ot04g03750	malate metabolic process
P15	Ot07g00130	ND
P16	-	ND
P17	Ot07g04280	ND
P18	-	biosynthetic process
P19	Ot12g01530	regulation of transcription, DNA-dependent
P20	rbcL	carbon fixation, photosynthesis
P21	H2a	nucleosome assembly
P22	-	ND
P23	fsd1	superoxide metabolic process
P24	-	nucleosome assembly
P25	PsbA	photosynthetic electron transport in photosystem II

编号	编码基因	生理功能
P26	LOC543489	nucleosome assembly
P27	-	Nucleotide Metabolism; Purine metabolism
P28	PRK	carbohydrate metabolic process
P29	psbA	photosynthetic electron transport in photosystem II
P30	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P31	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P32	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P33	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P34	matK	mRNA processing
P35	-	mediating protein-protein or protein-carbohydrate interactions
P36	ENO ₂	glycolysis
P37	AtpB	ATP hydrolysis coupled proton transport, ATP synthesis coupled proton transport
P38	pks2	Ketoreductase (KR) and fatty acid synthase (FAS)
P39	pol	DNA integration
P40	Peptidase_C1A	Peptidase C1A subfamily
P41	-	ND
P42	-	ND
P43	-	ND
P44	-	ND
P45	VITISV_043898	RNA-dependent DNA replication
P46	-	DNA integration, RNA-dependent DNA replication
P47	-	DNA integration
P48	-	ND
P49	VITISV_014882	ND
P50	VITISV_008516	RNA-dependent DNA replication
P51	-	ND
P52	-	ND
P53	VITISV_039114	transcription initiation from RNA polymerase II promoter
P54	-	ND
P55	-	ND
P56	-	ND
P57	CYtaCp093	ND
P58	atp1	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P59	-	ND
P60	psbB	photosynthetic electron transport chain
P61	rps2	translation
P62	CMO	aromatic compound catabolic process
P63	rbcL	ND
P64	-	ND
P65	CHLREDRAFT_188353	protein localization
P66	-	ND
P67	FAP228	(1->3)-beta-D-glucan biosynthetic process
P68	DHC2	microtubule-based movement
P69	RPL4	translation

编号	编码基因	生理功能
P70	CIS2	tricarboxylic acid cycle
P71	CPN11	protein folding
P72	CHLREDRAFT_134382	ND
P73	DRP3	ND
P74	PGK1	glycolysis
P75	CHLREDRAFT_142530	proteolysis
P76	accC	ND
P77	DNJ35	protein folding
P78	psbO	photosynthesis, photosystem II stabilization
P79	LOX12	oxylipin biosynthetic process
P80	nbs	defense response
P81	CCoAOMT	ND
P82	GPB2	adaptor/regulatory modules in signal transduction
P83	CHR1530	ATP-dependent RNA or DNA unwinding
P84	-	ND
P85	-	folic acid-containing compound biosynthetic process
P86	-	ND
P87	Wx	starch synthase
P88	rpoC2	ND
P89	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P90	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P91	-	Ribosome inactivating
P92	-	translation
P93	psbC	photosynthetic electron transport chain
P94	-	ND
P95	-	ND
P96	-	translation
P97	-	translation
P98	-	ND
P99	-	ND
P100	-	nitrate assimilation
P101	gstu2	ND
P102	NAC4	regulation of transcription, DNA-dependent
P103	WCSP1	regulation of transcription, DNA-dependent
P104	-	Biosynthesis of secondary metabolites
P105	pckC	gluconeogenesis
P106	-	ND
P107	POPTRDRAFT_754535	ND
P108	-	ND
P109	SAUR38	Plant hormone signal transduction
P110	-	ND
P111	CYP728F1	ND
P112	PtrcGpx4	response to oxidative stress
P113	HTA909	nucleosome assembly

编号	编码基因	生理功能
P114	POPTRDRAFT_778519	proteolysis
P115	psbD	photosynthetic electron transport in photosystem II
P116	rpoC1	ND
P117	psbB	photosynthetic electron transport chain
P118	-	ND
P119	-	ND
P120	LOC100265256	nucleosome assembly
P121	-	ND
P122	DUF914	ND
P123	-	ND
P124	-	ND
P125	MICPUCDRAFT_39643	DNA replication, recombination, and repair
P126	MICPUCDRAFT_47106	nucleosome positioning
P127	-	ND
P128	LOC100286116	Amino Acid Metabolism
P129	LOC100285026	ND
P130	FBP	glycolysis
P131	LOC100285565	ND
P132	LOC100285395	ND
P133	atpA	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P134	psbB	photosynthetic electron transport chain
P135	MCA1	proteolysis
P136	CHRSAMS	S-adenosylmethionine biosynthetic process
P137	PDX1	pyridoxal phosphate biosynthetic process
P138	OLM6	ND
P139	PETD	photosynthetic electron transport chain, respiratory electron transport chain
P140	MICPUN_56550	DNA recombination, DNA repair, chromosome condensation
P141	MICPUN_108076	ND
P142	MICPUN_61525	ND
P143	MICPUN_97888	ND
P144	fbaB	glycolysis
P145	EIF4G	RNA metabolic process
P146	-	ND
P147	DHC1.2	microtubule-based movement
P148	-	ND
P149	-	ND
P150	RCOM_1052220	fatty acid metabolic process
P151	-	ND
P152	-	N-terminal protein myristoylation
P153	RCOM_1063350	ATP-dependent RNA unwinding
P154	rbcl	carbon fixation
P155	RCOM_0474620	DNA ligation involved in DNA repair, DNA recombination, DNA replication
P156	RCOM_1254430	ND

编号	编码基因	生理功能
P157	rbcl	carbon fixation
P158	RCOM_0834180	ND
P159	RCOM_1277790	regulation of transcription, DNA-dependent
P160	-	ND
P161	-	ND
P162	glpX-SEBP	carbohydrate metabolic process
P163	-	ND
P164	-	ND
P165	RCOM_1120050	translation
P166	-	ND
P167	-	ND
P168	-	biosynthetic process
P169	RCOM_1912270	ubiquitin-dependent protein catabolic process
P170	RCOM_1950980	ND
P171	LOC100304074	auxin mediated signaling pathway, regulation of transcription, DNA-dependent
P172	psbA	photosynthetic electron transport in photosystem II
P173	PIN2	transmembrane transport
P174	myo22	myosin complex
P175	gapA	glucose metabolic process
P176	-	carbohydrate metabolic process
P177	atpA	ATP synthase
P178	psbG	ATP synthesis coupled electron transport
P179	psbC	photosynthetic electron transport in photosystem II
P180	RPL3	translation
P181	Rap41	Cell envelope biogenesis, outer membrane / Carbohydrate transport and metabolism
P182	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P183	psbC	photosynthetic electron transport chain
P184	-	transcription factor
P185	psbO	photosynthesis, photosystem II stabilization
P186	matK	RNA splicing, mRNA processing
P187	atpB	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P188	Ubq1	ND
P189	-	microtubule-based movement
P190	TRX	cell redox homeostasis
P191	-	isoprenoid biosynthetic process
P192	PLD2	lipid catabolic process, phosphatidylcholine metabolic process
P193	Lhc II	photosynthesis, light harvesting
P194	rpl2	translation
P195	pcs2	ND
P196	efl	ND
P197	rbcL	photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle
P198	-	ND
P199	ICDH-2	tricarboxylic acid cycle

编号	编码基因	生理功能
P200	psbC	photosynthetic electron transport in photosystem II
P201	LHC-IIId	ND
P202	cor14b	cold responsive
P203	-	pyridoxal phosphate biosynthetic process
P204	-	disease resistance
P205	cbIP	adaptor/regulatory modules in signal transduction
P206	atpA	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P207	psbD	photosynthetic electron transport in photosystem II
P208	tufA	ND
P209	psbF	photosynthetic electron transport chain
P210	accD	fatty acid biosynthetic process
P211	psbB	photosynthetic electron transport chain
P212	psaA	electron transport chain, photosynthesis
P213	PsaB	electron transport chain, photosynthesis
P214	atpB	ATP synthesis/hydrolysis coupled proton transport
P215	atpB	ATP hydrolysis/synthesis coupled proton transport
P216	gap-1	glucose metabolic process
P217	-	ND
P218	-	ND
P219	-	ND
P220	RGA	defense response
P221	-	ND
P222	CYP72A61	ND
P223	gapA	glucose metabolic process
P224	gapA	glucose metabolic process
P225	-	ND
P226	-	Purine metabolism
P227	rbcL	carbon fixation, photosynthesis
P228	psbO	photosynthetic electron transport chain
P229	-	translation
P230	-	translation
P231	psaC	photosynthetic electron transport chain
P232	LHCIIa	photosynthesis, light harvesting
P233	LHCII	photosynthesis, light harvesting
P234	TK	glucose metabolic process
P235	-	ND
P236	SHMT1	L-serine metabolic process
P237	pab29	photosynthesis, light harvesting
P238	-	tricarboxylic acid cycle
P239	HMOX2	heme oxidation
P240	-	ND
P241	-	translation

可见这些蛋白主要与 ATP 合成、DNA 代谢、脂质代谢、mRNA 代谢、RNA 代谢、TCA 循环、蛋白代谢、光合作用、信号转导、碳水化合物代谢、翻译与转录调控等生命活动相关，根据这些功能对蛋白进行分类，发现相关蛋白质被检测数量最多的生命活动是光合作用相关的电子传递、光捕获、光反应和固碳过程，如图 6-2 所示。

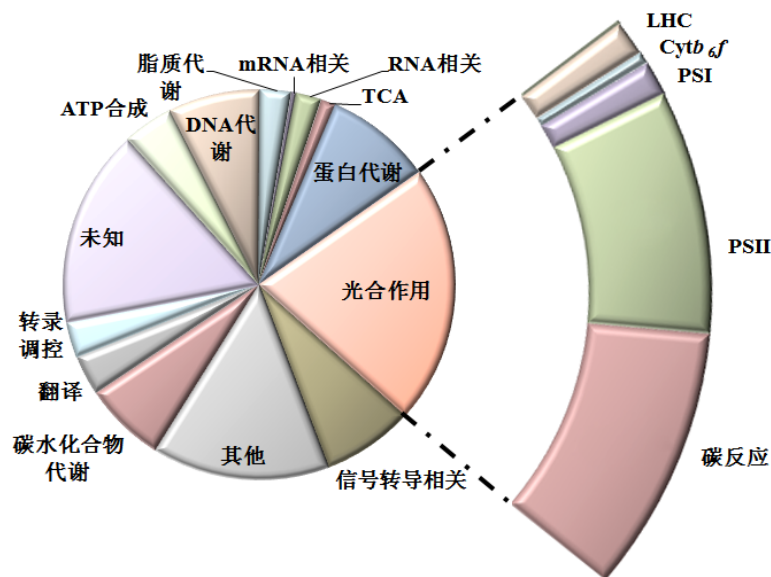


图 6-2 差异蛋白质组的功能分布

Figure 6-2 The function distribution of the differential proteome from *C. sorokiniana*

这可能与叶绿体的基因测序研究结果比较成熟相关。有趣的是相关于 TCA 循环的蛋白质只检测到了三个，可能是其他 TCA 相关蛋白丰度太低所造成，这样的结果与代谢研究中发现的 TCA 相关代谢物含量偏低的结果是吻合的。本研究中所检测到的蛋白将近 700 种，然而通过搜库检索获得具体蛋白性质的只有三分之一，这与微藻的基因组学研究起步较晚，基因组数据较为贫瘠的现状有关。

由于所检测到的大部分蛋白质属于光合作用相关蛋白质，光合作用主要包括两个阶段，即将光能转化为化学能的光反应和将 CO_2 转化为碳水化合物的碳反应，其中光反应主要涉及到光捕获和电子传递与 NADPH 及 ATP 的生成，而碳反应也叫卡尔文循环（Calvin cycle）或磷酸戊糖还原途径（reductive pentose-phosphate cycle, RPPC），主要涉及到 CO_2 在基质酶中的转化及相关碳水化合物的生成。因此下面将针对光合作用的能量传递和碳骨架合成两方面进行分析，此外本研究中发现接种密度对小球藻的生长、脂积累、磷脂变化及代谢都有较大影响，因此根据所得数据对相应体系的蛋白进行具体分析和研究。

6.2.3 小球藻光合作用中电子传递链的变化

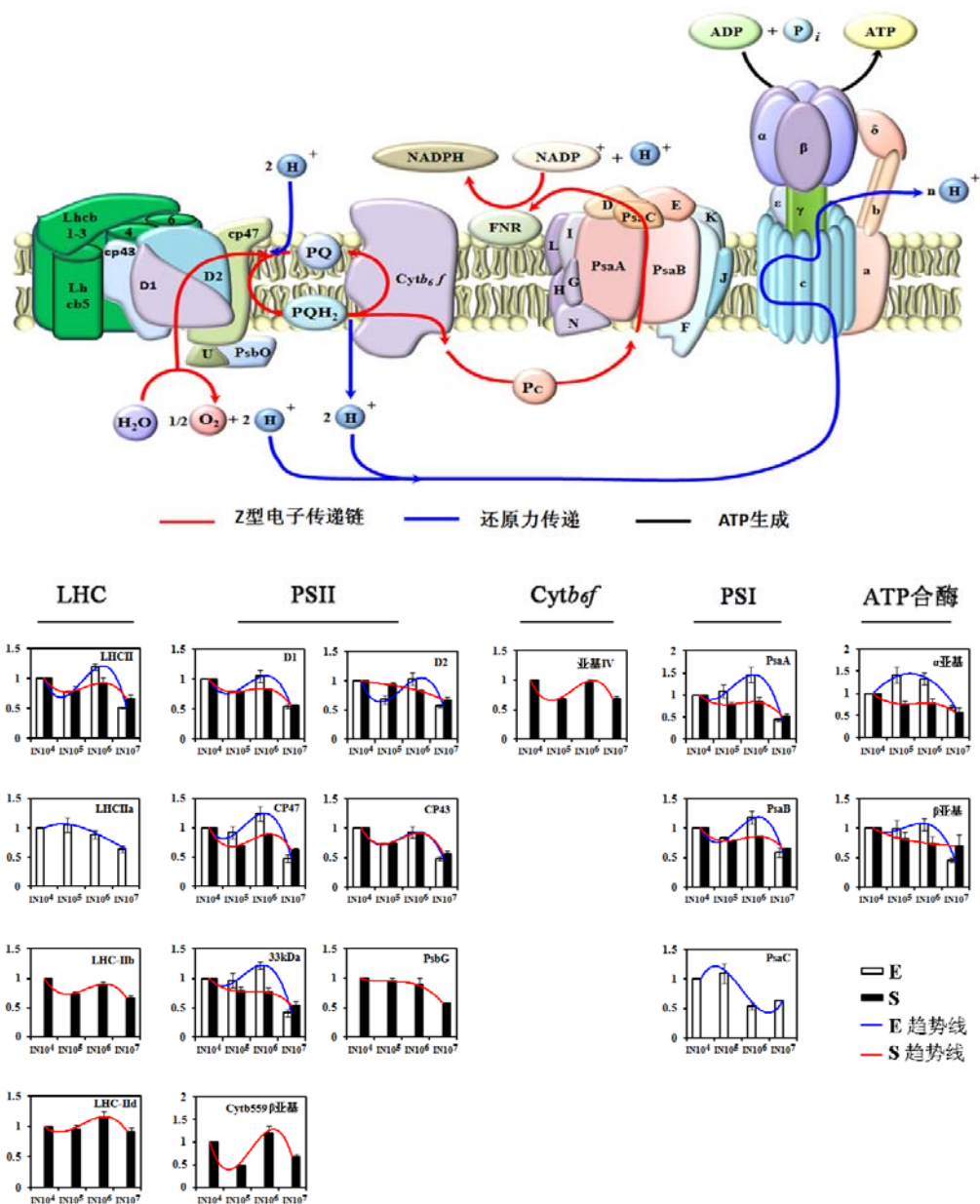


图 6-3 接种密度对非环式电子传递链相关蛋白的表达的影响

Figure 6-3 The effect of the inoculum size on the present of the proteins related to noncyclic photosynthetic electron transfer chain

光反应是在叶绿体中类囊体膜上的光反应中心进行的, 这个反应中心主要包括存在于基质膜上的光系统 I (photosystem I, PSI) 和存在于基粒膜上的 PSII 膜蛋白复合体, 而且其位于类囊体膜的不同部位^[175]。光能被天线蛋白捕获后可以通过非环式电子传递链 (noncyclic photosynthetic electron transfer chain), 即通常所说的 Z 型电子传递链生产 ATP, 从而为生物体提供生命所需的化学能。如

图 6-3 所示,这种能量传递过程涉及到多种种膜蛋白复合体,依次为 LHCII、PSII、细胞色素 *b₆f* 复合体 (cytochrome *b₆f* complex, *Cytb₆f*)、质蓝素 (plastocyanin, Pc)、PSI 及 ATP 合酶 (ATP synthase, ATPase)。图中红线为 Z 型电子传递链的线路图,电子从水转移到质体醌再通过 *Cytb₆f*, Pc 传递到 PSI,最后电子被传递给铁氧还蛋白 (ferredoxin--NADP⁺ reductase, FNR) 并将 NADP⁺ 还原为 NADPH。水不但提供了大量的电子,还能产生大量的 O₂ 和质子,这些质子除了为电子传递链的进行提供原料之外,其他的都运送到 ATP 合酶的内腔,形成质子浓度梯度,这是 ATP 合酶合成 ATP 的关键^[147]。当光强过强时,体系呈现过还原状态电子传递链将由 Z 型向环形传递方式转化^[176],此时涉及到的蛋白复合体则只有 PSI、*Cytb₆f* 和 ATP 合酶。本研究中所测到的 PsaA 和 PsaB 是 PSI 中结合电子载体的主要蛋白亚基,这些电子载体主要有光合中心色素分子 P700 (P700)、叶绿素 a 受体分子 (A₀) 及叶绿素醌 (A₁) 及 Fe-S 中心 (A₂)。而 D1、D2、CP47、CP43、*Cytb₅₅₉*β 亚基、33kDa 及 PsbG 是本研究中检测到的 PSII 中的蛋白亚基,其中 D1 和 D2 是反应中心蛋白,CP47 和 CP43 是天线结合蛋白,而 33kDa 是光合放氧相关蛋白。除了 PSI 及 PSII 外,本研究还检测到 LHC 相关蛋白及亚基 4 个 (LHC-II、LHC IIa、LHC IIb 及 LHC-IId), *Cytb₆f* 相关蛋白亚基 1 个 (亚基 IV), ATP 合酶的多肽亚基两个,都属于 CF1 (α 亚基和 β 亚基)。

可以看出接种密度能够显著影响这些蛋白或亚基的表达,而且其变化趋势比较一致,但是这种变化不是线性的。总的说来,指数期时这些光合作用能量相关的蛋白在 IN10⁶ 处较高,但是稳定期时这些光合作用能量代谢相关蛋白却随着接种密度的提高而下调,尤其到了 IN10⁷ 培养体系,出现了很明显的下调趋势。推测这可能与接种密度所造成的光源分配不足有关。培养小球藻时,细胞受到的光照并不是一致的,随着光线在瓶内的散射、折射以及被细胞吸收等过程,光强会越来越弱直至外层细胞将光线完全阻拦下来,内层细胞将接受不到光照,这即为常说的“自身遮影” (self-shade)^[177],因此可以根据光投入摇瓶的距离和位置将摇瓶培养空间分为光照区和阴影区,可以推测,细胞越多,自我遮挡现象将会越严重,因此阴影区也就越大。而摇瓶的震荡频率一致,故不管细胞多寡,到达某个位置的频率应该一致。可见在光照条件一致的情况下密度越大,细胞受到的平均光照越弱。由图 3-3 可知,接种密度越大,同一时间的细胞密度也越大,因此细胞受到的平均光照会越弱。Torre 指出在 *Hordeum vulgare* L. Boone 中,高光下初生叶内的类囊体膜上电子传递链上 PSI 上的 P700 反应中心、PSII 上的醌分子 (2,5-dimethyl-p-benzoquinone, BQ) 及 *Cytb₆f* 水平要显著高于低光培养所得样品^[178]。Bailey 指出,当光照强度从 35 增加到 600 μmol·m⁻²·s⁻¹, *Arabidopsis thaliana* 叶子中的可溶性蛋白含量增多,同时单位叶绿素中 Rubisco 的含量也逐

渐增大,但是这时 LHC 变化并不一致,有的随着光强增高反而降低,与本研究中所得到的 HLC-IIId 的变化比较相似,这可能天线大小降低以抵御光损伤有关^[179]。可见接种密度的确能够影响微藻的光合作用相关蛋白,从而导致微藻整个代谢水平的变化,而这种蛋白水平的变化又与接种密度导致微藻受光水平变化密切相关。

6.2.4 不同接种密度对小球藻卡尔文循环的影响

如图 6-4 所示,五碳化合物 1,5-二磷酸核酮糖(Ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)是卡尔文循环中最关键的物质,它能够与 CO₂ 反应,通过 Rubisco 羧化生成两个三碳化合物 3-磷酸甘油酸(Glycerate-3P, 3-PGA),之后经过两步还原反应得到 G3P,这为光自养生物所有含碳化合物的合成提供了碳骨架,之后通过一系列再生反应重新生成 RuBP,回到起点。卡尔文循环涉及到的酶主要有 10 种,本研究共检测出 8 种,在图 6-4 中用蓝色线标记出来,分别为 Rubisco、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+), GAPDH)、醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase, FBA)、1,6-二磷酸果糖磷酸酶(fructose 1,6-diphosphate phosphatase, FBP)、1,7-二磷酸景天庚酮糖磷酸酶(sedoheptulose 1,7-diphosphatase, SBPase)、转酮醇酶(transketolase, TK)及磷酸核酮糖激酶(phosphoribulokinase, PRK)。其他未检测出的酶有 2 种,分别为磷酸核糖异构酶(phosphoriboisomerase, rpiA)及磷酸核酮糖异构酶(ribulose-phosphate 3-epimerase, RPE)。可以看出所检测到的卡尔文循环相关蛋白与电子传递链相关蛋白的表达趋势接近,即 IN10⁷ 体系的蛋白表达最低,但是其他接种密度体系的变化有区别,其中指数期时峰值主要在中间两个接种密度获得;而稳定期时表达略有差异:其中 PRK、Rubisco、PGK、FBA 及 SBPase 在 IN10⁴ 及 IN10⁶ 培养体系中较大,IN10⁵ 体系下表达有下调,而 GAPDH 在 IN10⁴ 中表达显著高于其他体系,至于 FBP 在前三个接种密度体系中表现出了较明显的下调趋势,接种密度越大,其表达越低,但总的说来卡尔文循环相关的蛋白表达随着接种密度的增加呈整体下降趋势。

细胞接受到的光强能显著影响碳反应相关蛋白, Bailey 指出,随着光照的增强, *Arabidopsis thaliana* 叶子中的可溶性蛋白含量增多,同时单位叶绿素中 Rubisco 的含量也逐渐增大^[179]。另一方面,这些碳相关蛋白的表达也能反过来影响光合生物的光合能力, Stephenson 指出过表达 Rubisco 的活性有助于提高光饱和的上限,提高 Rubisco 的活性能够显著提高光合效率^[7]。可见接种密度引起的系统光照变化不但能够影响光合作用电子传递链活力,还能显著影响碳反应相关

蛋白的表达,进而影响碳骨架的合成,这可能就是 $IN10^7$ 碳相关代谢水平普遍低于其他培养体系的主要原因。由这个结果与不同接种密度小球藻稳定期代谢水平结果也是互相呼应的,由图 5-10 可知稳定期时 $IN10^4$ 体系的平均代谢水平要高于 $IN10^6$ 及 $IN10^7$ 体系。

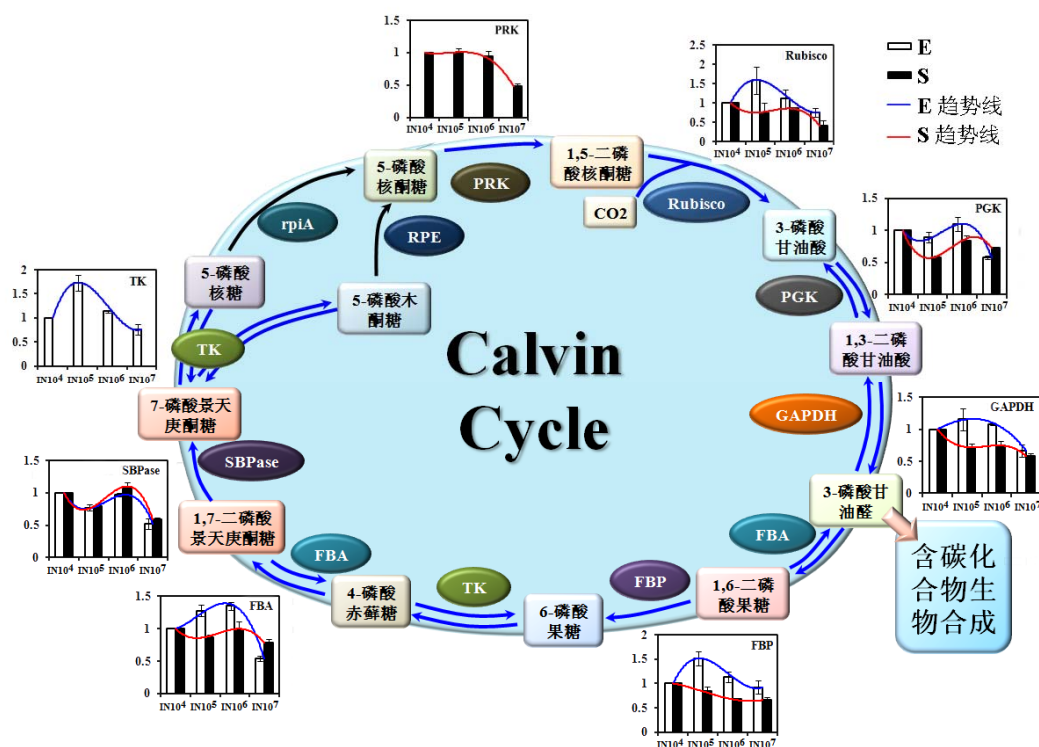


图 6-4 接种密度对卡尔文循环相关蛋白的表达的影响

Figure 6-4 The effect of the inoculum size on the present of the proteins related to Calvin cycle

6.2.5 小球藻光合蛋白与碳相关代谢的关联

为了揭示不同培养条件下小球藻蛋白表达和代谢之间的关系,对两个时期同时被测到的小球藻光合蛋白(Rubisco、FBA、FBP、SBPase、PGK、GAPDH、LHCII、PsaA、PsaB、D1、CP47、CP43、D2、33kDa、 α 亚基、 β 亚基)及代谢组研究中发掘出的代谢标志物(图 4-4B)做典型相关分析。结果显示来自于蛋白质变化的第一典型变量 P1 可以解释相应变量组 47.1%的组内变差,而第二典型变量 P2 只能解释 17.8%的变差。同样,来自于代谢物变化的第一典型变量 M1 可以解释相应变量组 48%的组内变差,而第二典型变量 M2 只能解释 3.6%的变差。而且通过 Bartlett 的 χ^2 检验可知第一典型相关系数是显著的(其显著性概率为 0, 小于 0.05)。故对 P1 及 M1 做典型结构示意图(如图 6-5 所示)。

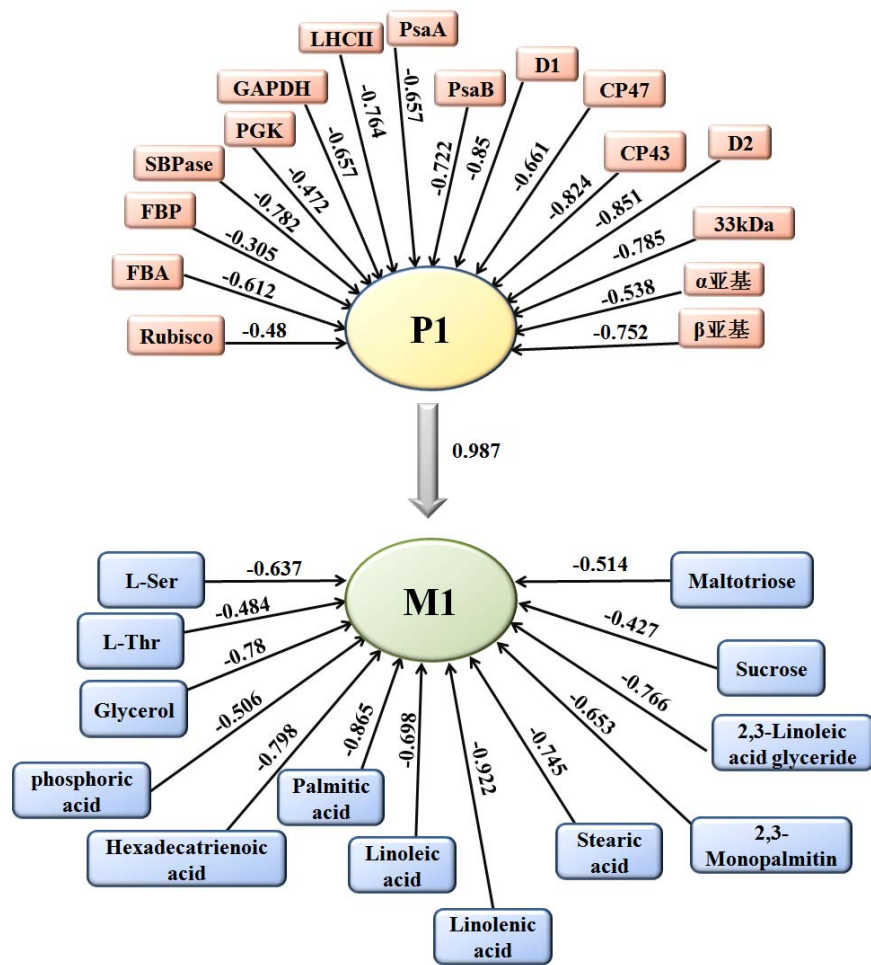


图 6-5 第一对典型变量典型结构示意图

Figure 6-5 The canonical correlation structure diagram of the first pair canonical variable

可以看出 SBPase、LHCII、PsaB、D1、CP43、D2、33kDa 及 β 亚基的相关系数分别为 -0.782、-0.764、-0.722、-0.85、-0.824、-0.851、-0.785 及 -0.752，可以较好地由典型变量 P1 来预测，可见 P1 更偏向于电子传递链相关蛋白的表达。而 Glycerol、Hexadecatrienoic acid、Palmitic acid、Linolenic acid、Stearic acid 及 2,3-Linoleic acid glyceride 的相关系数较大，分别为 -0.78、-0.798、-0.865、-0.922、-0.745 及 -0.766，可以较好地由典型变量 P1 来预测，因此可以说 M1 更偏向于脂肪代谢途径相关的代谢物。由于 P1 及 M1 的相关系数达到了 0.987，而且 P1 及 M1 分别揭示了近 50% 的小球藻关键蛋白和代谢物的信息，可见不同接种密度下小球藻的蛋白组变化与代谢组变化的确存在着较强的相关性，其中尤其是电子传递链相关蛋白与脂肪代谢途径的关系更为紧密。

6.2.6 不同接种密度对小球藻其他蛋白的影响

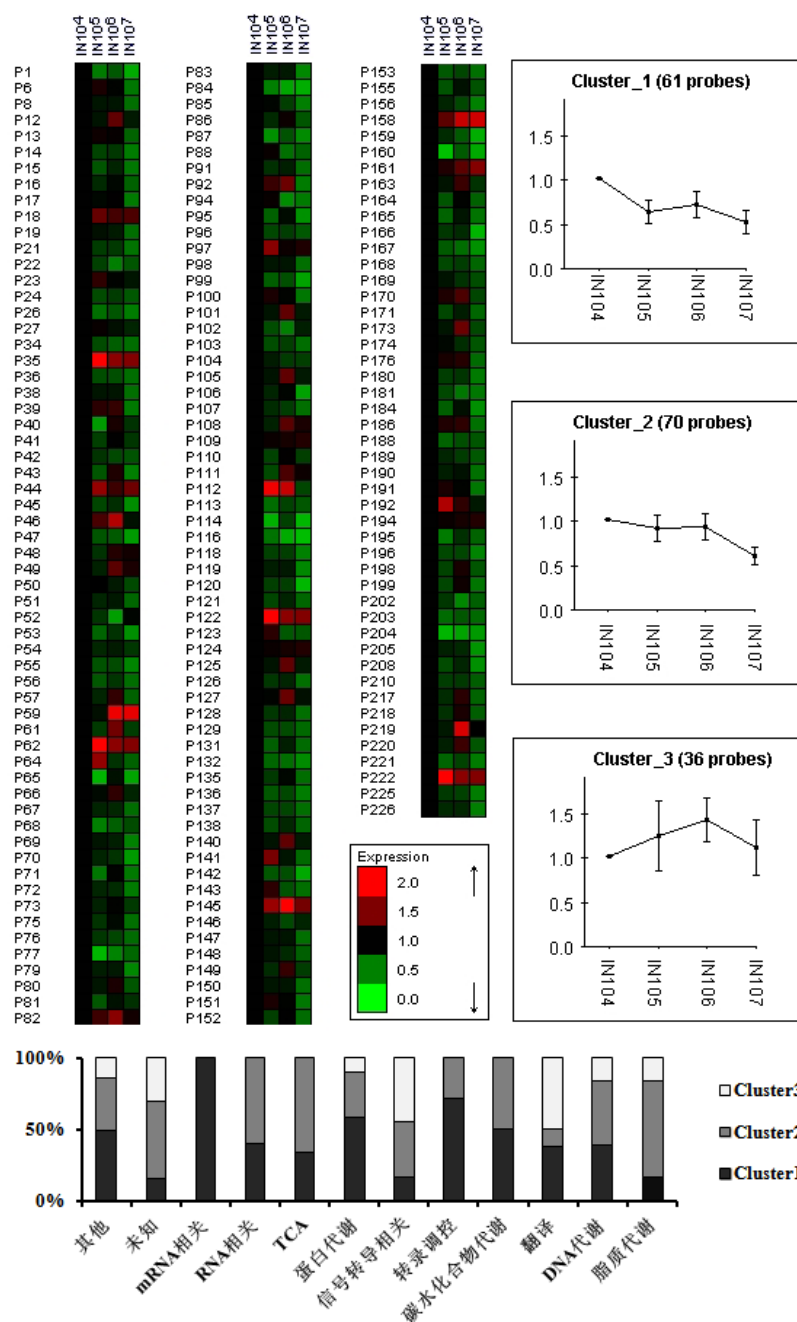


图 6-6 其他蛋白在不同接种密度体系下的变化趋势
Figure 6-6 The difference of the other proteins under different inoculum size

由图 6-2 可知本研究除了光合作用相关蛋白,还检测到接近 200 种其他蛋白,以稳定期为例,对这些蛋白做 CLICK (Cluster Identification via Connectivity Kernel) 聚类分析,所得结果如图 6-6 所示。从热图可以发现,与 IN10⁴ 体系相比,大部分检测到的蛋白在其他体系下都出现了下调。根据他们的变化趋势,将这些蛋白分为三大类,第一类蛋白有 61 种,其相似度达到 0.894,这类蛋白随着

接种密度的增加而下调,但是这种变化在低密度体系比较明显,即 IN10⁴ 体系下显著高于其他三个体系,而 IN10⁵ 到 IN10⁷ 之间变化不大。第二类蛋白有 70 种,其相似度达到 0.848,这类蛋白的表达也是随着接种密度的增高而下调,不过这种变化在高密度体系下更为明显。第三类蛋白有 36 种,其相似度为 0.605,在低接种密度范围内这类蛋白随着接种密度升高而升高,并在 IN10⁶ 体系中达到峰值,之后出现随着接种密度升高而下降的趋势。而且由柱形图可以看出部分蛋白代谢、信号转导、翻译、DNA 代谢及脂质代谢相关蛋白属于第三类蛋白,而 mRNA 相关、RNA 相关、TCA 转录调控及碳水化合物代谢相关蛋白全部属于第一类和第二类蛋白。这可能与稳定期 IN10⁴ 体系的光合作用能力较强有关,较强的光合作用可以提供更多的能量和碳骨架,从而导致其他途径的蛋白表达也相对旺盛。

6.3 小结

1、本研究一共检测到 695 种蛋白,并对其中 241 种蛋白进行了定量分析。通过功能分析发现这些蛋白主要与 ATP 合成、DNA 代谢、脂质代谢、mRNA 代谢、RNA 代谢、TCA 循环、蛋白代谢、光合作用、信号转导、碳水化合物代谢、翻译与转录调控等生命活动相关。

2、本研究分析了不同接种密度对小球藻光合作用中电子传递链的影响,发现所检测到的光合作用能量代谢相关蛋白对接种密度的响应与收获时期密切相关,指数期时在 IN10⁶ 体系中表达相对较高,而稳定期时却随着接种密度的提高而下调,尤其在 IN10⁷ 培养体系,出现了很明显的下调。表明接种密度对小球藻的光合作用有显著影响,而这种影响与接种密度导致的光源的变化具有一致性。

3、本研究分析了不同接种密度对小球藻光合作用碳反应的影响,发现其变化趋势与电子传递链比较一致。这说明接种密度能够直接影响细胞的固碳能力,在本研究体系中,最高接种密度体系下的小球藻固碳能力最低,这也是最高接种密度体系下的小球藻的碳相关代谢水平显著低于其他体系的直接原因。

4、通过典型相关分析发现光合蛋白与代谢组学所发现的关键代谢分子有较强的相关性,其第一对典型相关变量的相关系数达到了 0.987。可见不同接种密度下小球藻的蛋白组变化与代谢组变化的确存在着较强的相关性,其中尤其是电子传递链相关蛋白与脂肪代谢途径的关系更为紧密。

5、以稳定期为例分析了不同接种密度对小球藻其他蛋白的影响,发现随着接种密度的增加而下调的蛋白占据了所分析蛋白总量的 78.4%,这种大部分蛋白在最低接种密度体系下高表达的原因可能与低接种密度导致的光合作用效率上调有关。

第七章 光照条件对高接种密度培养的小球藻的影响

7.1 引言

通过对不同接种密度培养体系下小球藻的生长状态、产脂能力、代谢组、磷脂组及蛋白质组的变化研究,发现虽然最高接种密度培养下小球藻 FAME 的日产量和 CN 均达到最高值,但是此时小球藻碳代谢相关的代谢合成途径水平要显著弱于其他培养体系;其磷脂的状态也表明这不是生长状态最佳的培养体系;而蛋白质组结果表明最高接种密度下小球藻的蛋白质表达水平,尤其是光合作用相关的蛋白质表达水平要显著弱于其他培养体系。由此可以推断最高接种密度下存在着潜在的生长和代谢限制因素,如果能够将其发掘出来并加以优化,将会对 FAME 日产量的进一步提高起到关键影响。

初步推测这可能与接种密度所造成的光源分配不足有关。由于所有体系在同一时间所接受的光强是一定的,随着深入过程中小球藻细胞对光线的不断吸收,进入培养体系中的光强会越来越弱。光线减弱的强度、深入的距离同小球藻细胞的密度及其吸收光线的能力都有关系。由生长曲线(图 3-3)可以看出 1×10^7 培养体系中的细胞密度始终高于同时间的其他培养体系的细胞密度。虽然接种密度可以导致多种环境变化,但是结合代谢组及蛋白质组的变化可以推测接种密度导致的光强变化是所研究体系中对小球藻生长代谢影响最大的环境因子;而光调控在不同接种密度培养体系中的小球藻生长及代谢过程起到了决定性作用。如果这个结论成立,那么改变高接种密度培养体系的光照条件将能显著改善其代谢水平,甚至促进脂积累,进而提高脂产量。

本章通过研究以 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为接种密度的小球藻培养体系在不同光照强度下的产脂肪酸甲酯能力及代谢水平的变化,试图验证光调控在小球藻最高接种密度体系培养中的作用,并依此寻找提高最高接种密度培养小球藻代谢水平和产脂能力的方法。

7.2 结果与讨论

7.2.1 不同光照对小球藻产油能力的分析

为了研究光照强度对高密度接种培养下小球藻生长和代谢的影响,以 1×10^7

cells·mL⁻¹ 为接种密度, 分别在 40、70、110 及 160 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的光照条件下对小球藻进行培养, 并取稳定期细胞进行 FAME 产量和质量的分析及相应代谢组学研究。为了便于描述, 将这几个光照体系由低至高分别叫做: I40、I70、I110 和 I160 培养体系。图 7-1 给出了不同光照强度下小球藻 FAME 日产量的分析结果。可以看出光强对高密度接种体系的脂积累有显著影响。FAME 日产量随着光照强度增高而增加, 直到 110 μmol·m⁻²·s⁻¹ 时达到最大值 (2.26 mg·L⁻¹·day⁻¹), 与 I70 体系相比, 提高了 47.71%, 但是之后光照强度再升至 160 μmol·m⁻²·s⁻¹, 产值没有出现显著变化。

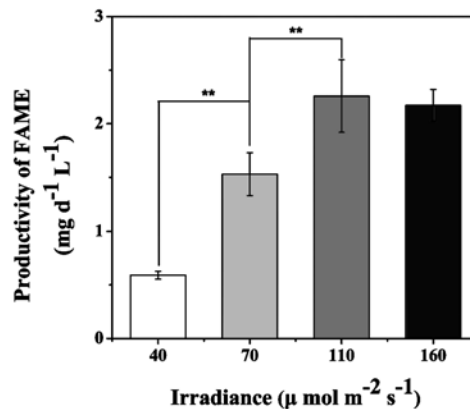


图 7-1 不同光照对小球藻脂肪酸甲酯日产量的影响

Figure 7-1 The FAME productivities of *C. sorokiniana* under different light intensities

同样的, 从图 7-2 可以看出, 当光强从 40 μmol·m⁻²·s⁻¹ 升至 110 μmol·m⁻²·s⁻¹, 脂含量也出现了显著提升, 之后略有下降。由此可见, 改变光照强度不但能够提高油含量, 而且能显著提高脂产量, 但是这种提高是有限度的, 在本研究体系中, 当光强超过 110 μmol·m⁻²·s⁻¹, 这种增长趋势将不存在, 甚至会出现下滑的状态, 这可能是因为此时已经快到光饱和点, 再提高光强已经无法加大细胞的光合效率, 甚至会导致光损伤。Solovchenko 研究了光强从 35 上升到 400 μmol·m⁻²·s⁻¹ 后 *P. incisa* 的变化, 发现强光下的 *P. incisa* 生长速率最高且此时生物质积累更为迅速, 因此获得了最高的总脂肪酸产量^[75], *Arthronema africanum* 培养过程中也发现了相同的现象^[76]。可见光照条件不但对微藻的光合作用有重要影响, 而且对细胞中脂肪积累和分布有重要影响^[180, 181]。Li 研究了 0-200 μmol·m⁻²·s⁻¹ 的光照强度对 *Chlorella kessleri* 和 *Chlorella protothecoide* 生长和产脂能力的影响, 结果发现其最适光照强度分别为 120 和 30 μmol·m⁻²·s⁻¹^[77]。Yeesang 也指出当光照强度从 33 升至 82.5 μmol·m⁻²·s⁻¹, *Botryococcus* 的脂含量变化是先上升后下降的趋势,

$49.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是脂积累的最佳光强^[182], 此外这种随着光照强度升高, 脂含量先升后降的趋势在 *Chlorella protothecoide*^[77]的研究中也有报道。

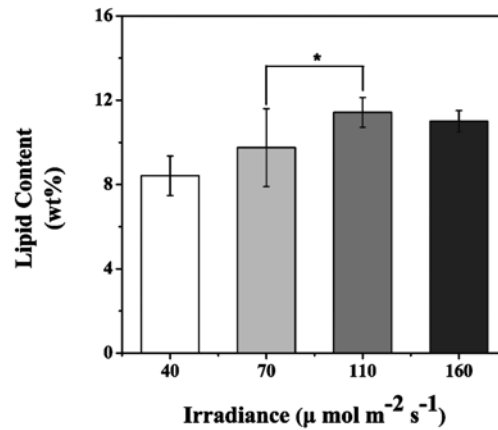


图 7-2 不同光照对小球藻脂肪酸含量的影响

Figure 7-2 The FAME contents of *C. sorokiniana* under different light intensities

图 7-3 给出了不同光照强度对小球藻 FAME 组成的影响情况。可以看出当光照强度从 $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 升至 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 小球藻的脂肪酸组成没有明显变化。但是当光强升至 $160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 后, 其 PUFA 的体积百分比比 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时上升了 11.06% ($P<0.005$)。

这种光照强度影响细胞脂肪积累的现象在其他微藻细胞中也有报道。Solovchenko 指出, 随着光照强度增加(范围为 $35\text{--}400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), *Parietochloris incisa* 的脂含量也逐渐增加^[75], Poerschmann 的研究表明当温度维持在 20°C 下, 强光培养的 *Chlamydomonas sp.* 比弱光培养的细胞中含有更多的 PUFA^[78]。有研究报道光照条件不但对微藻的光合作用有重要影响^[76], 而且对细胞中脂肪积累和分布有重要影响^[180, 181]。此外, 微藻细胞暴露在强光下可能会引起氧化胁迫甚至细胞死亡^[73, 74]。一项关于蓝绿藻 *Synechocystis* PCC 6803 的研究指出, 光照能够通过影响去饱和酶的表达从而影响膜脂的不饱和度。此外, 光照还能影响微藻基因的表达, desA、desB 和 desD 都是 *Synechocystis* PCC 6803 中调控去饱和酶的基因, 光环境下这些基因的转录水平都比暗环境下增加了近 10 倍^[183]。不同的光照条件能够改变小球藻的脂积累, 同样的, 脂代谢也能影响微藻的光捕获能力。在强光条件下, 微藻细胞需要额外的代谢来将多余的光能消耗掉以避免这些光子对细胞产生光氧化伤害。同时提高膜上脂肪的不饱和度有助于增强类囊体膜的流动性, 这与光合膜蛋白的光合机制的运转密切相关^[184]。而且, 强光能为二烯酸去饱和成为三烯酸提供更多的 ATP 和 NADPH^[185]。因此无论是从细胞自我保护,

细胞对环境的适应, 还是能量供给方面, 强光下 PUFA 的数量增加都是有其生理价值的。有趣的是, 本文发现光照强度从 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 上升至 $160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, PUFA 的质量百分比随之上升了 11.06%, 但是在 $40\text{-}110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照范围内, 却观察不到光强对细胞不饱和度的明显影响。

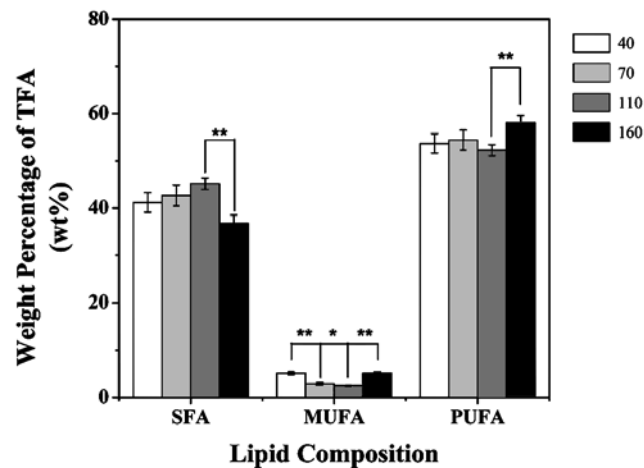


图 7-3 不同光照对小球藻脂肪酸甲酯组成的影响

Figure 7-3 The FAME compositions of *C. sorokiniana* under different light intensities

本文 FAME 的最高日产量和脂含量都是在 I110 体系下达到, 这并不是实验范围的最高光照强度, 代谢水平指数期的研究结果也观察到了相同的趋势 (图 5-10)。光照实验的结果结合接种密度的研究成果可以推断, 光照强度是能够通过影响光合色素的含量来改变光合效率, 从而导致光合固碳和光能捕获的能力的变化, 进而对后续的脂质积累造成影响。然而, 光强并不是唯一受到接种密度影响的环境因子, 因此仅仅提高光强并不一定能够保证脂积累的提高, 还需要综合考虑其他影响因素。

7.2.2 不同光照对小球藻代谢的影响

第四章研究指出高接种密度的小球藻的代谢状态并不好, 当时的推测是接种密度可能影响了光源的分配, 而高接种密度可能会导致光源不足, 从而引起体系中小球藻的代谢水平较低。为了验证这一设想, 本章将会对不同光照强度下的高接种密度培养小球藻代谢情况作详细的分析。由于 FAME 研究发现在 I110 体系下小球藻的产脂能力最佳, 因此以 I110 的小球藻的代谢为基准, 对其他体系的小球藻代谢情况作分析, 结果如图 7-4 所示。可以看出 I40 和 I70 下的小球藻的有机酸显著低于 I110 体系, 而其他代谢种类没有观察到这种一致的趋势。但是

当光强升至 $160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，大部分代谢物的水平都要弱于 I110 体系。为了了解不同光强下小球藻代谢物与产脂能力的关系，利用所得结果做多元统计分析。

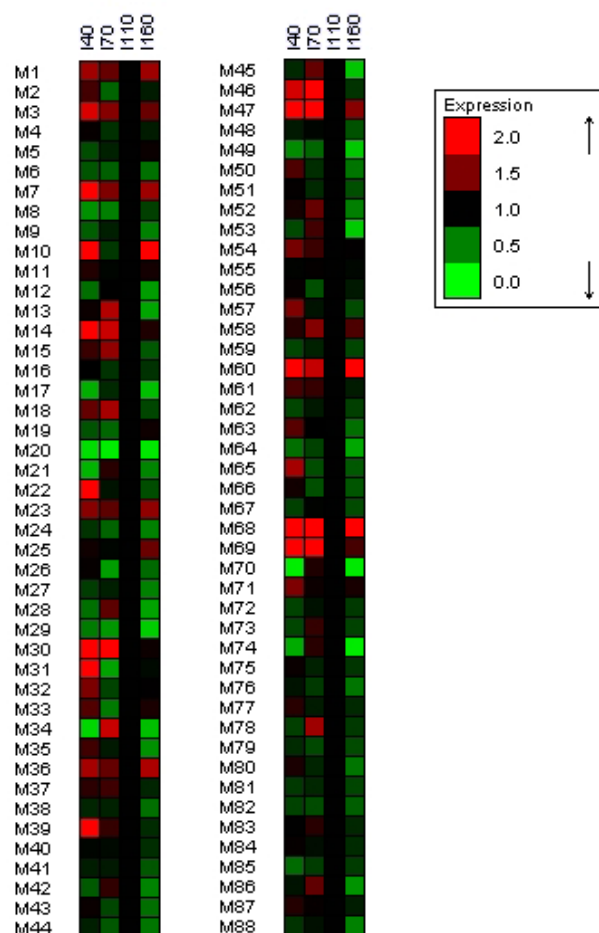


图 7-4 相对于光照为 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 小球藻细胞，其他接种密度下小球藻代谢变化

Figure 7-4 A metabolic heat map that summarizes the differences in the metabolite fingerprints against the metabolite variations of inoculum sizes, compared to those of *C. sorokiniana* under the light intensity with $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

7.2.3 PCA 分析不同光照强度下小球藻的代谢差异

图 7-5 给出了对不同光强下的小球藻的代谢谱进行 PCA 分析所得到的结果。其第一主成分的贡献率达到了 85.16%，第二主成分为 6.53%，这个 PCA 模型的前两个主成分能够解释代谢谱 91.69% 的信息，是比较可信的。由图 7-5A 可以看到，第一主成分将 I70 与 I110 同其他两个体系完全分开，但是 I70 与 I110 都与第一主成分正相关，且在两个主成分上存在明显重叠。而 I40 及 I160 与第一主成分负相关，其中 I40 与第二主成分正相关，I160 与第二主成分负相关。由此可以通过代谢谱将四个光强梯度体系分成三个集团，即 I40、I160 及 I70 与 I110。

图 7-5B 为 PCA 模型的 loading 图, 这解释了各个代谢物对模型建立的贡献大小, 其值越大, 对模型的贡献率也越大, 其中红色的点代表着贡献率较大的代谢物, 即造成不同光照小球藻组间代谢差异的关键代谢物, 对这些代谢物做单因素方差分析, 所得结果如表 7-1 所示。可以发现, 除了 M54, 大部分关键代谢物在不同的培养体系之间都表现出了显著性差异 ($P < 0.05$), 但是相对来说, 这种差异在 I70 与 I110, I40 与 I160 之间不太明显。这种结果与我们的 PCA 得分图的结果是吻合的。

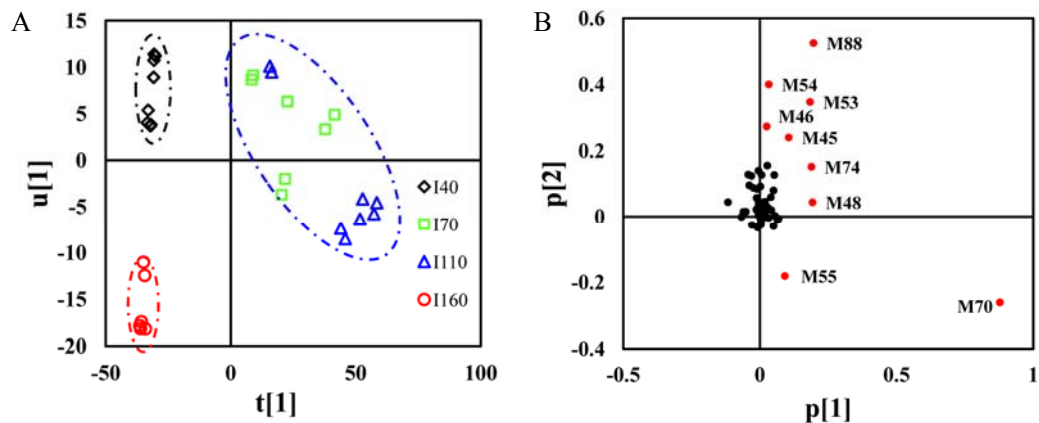


图 7-5 不同光照条件下的小球藻代谢分析的 PCA 模型

Figure 7-5 PCA analysis in the metabolic profile of *C. sorokiniana* under different light

7.2.4 OPLS 分析不同光强下小球藻代谢与 FAME 日产量的关系

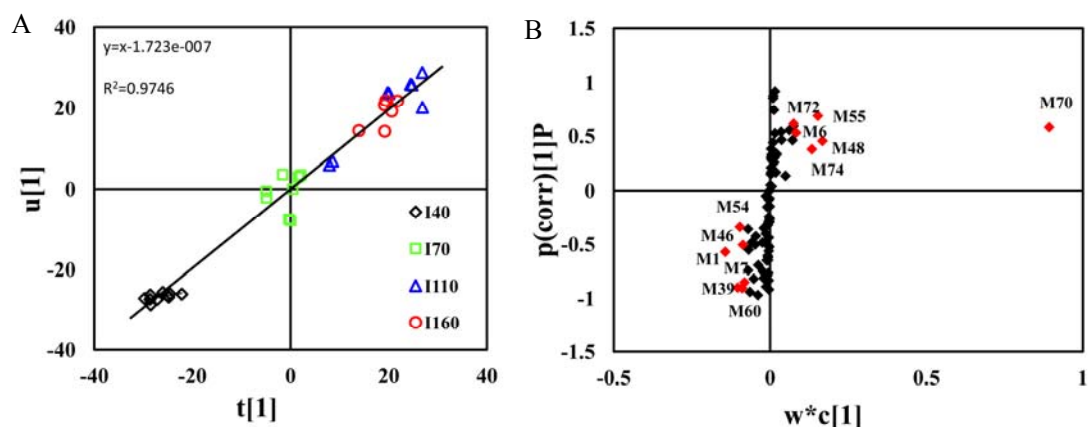


图 7-6 不同光照下小球藻代谢水平和脂肪酸甲酯日产量进行多元统计分析结果。

A. $t[1]/u[1]$ 图; B. S-plot 图

Figure 7-6 The OPLS model was established based on the metabolic profile and FAME productivity of *C. sorokiniana* under different light intensities. A. $t[1]/u[1]$; B. The S plot

为了进一步分析不同光照强度下小球藻代谢与产脂能力之间的关联,对不同光照下小球藻代谢水平和 FAME 日产量进行 OPLS 分析,其中代谢谱为 X 矩阵,日产量为 Y 矩阵,所得结果如图 7-6 所示,此时的分类结果已经同 PCA 有较大不同, I40 被单独区分出来,而 I70 与其他两组相近,但是还有一定差别, I110 及 I160 逐渐靠在一起。这种分类的差异主要是来自于 FAME 日产量对模型的矫正。因为在小球藻培养过程中,会有多重因素对其造成影响,PCA 分析会对所有的信息进行分析,没有任何偏重性,但是 OPLS 将会根据 Y 值做矫正,其结果也会更多地偏向与 Y 相关的信息。

表 7-1 不同光照下小球藻关键代谢物的单因素方差分析分析结果

Table 7-1 The ANOVA result of the key metabolites in *C. sorokiniana* under different light intensities

代谢物	显著性	intensities						所属模型
		I40 vs I70	I40 vs I110	I40 vs I160	I70 vs I110	I70 vs I160	I110 vs I160	
M1	L-缬氨酸	*	**	NS	**	*	**	OPLS
M6	L-苏氨酸	NS	**	NS	**	NS	**	OPLS
M7	甘氨酸	**	**	**	*	NS	*	OPLS
M39	肌醇	**	**	**	NS	NS	NS	OPLS
M45	十六碳二烯酸	**	**	**	NS	**	**	PCA
M46	十六碳三烯酸	**	*	*	**	**	**	PCA OPLS
M47	十六碳单烯酸	**	**	**	**	*	NS	
M48	十六烷酸	**	**	NS	**	**	**	PCA OPLS
M53	十八碳二烯酸	**	**	**	NS	**	**	PCA
M54	十八碳三烯酸	NS	NS	*	NS	NS	NS	PCA OPLS
M55	十八烷酸	*	**	NS	*	NS	*	PCA OPLS
M60	2-亚油酸甘油酯	**	**	**	*	NS	**	OPLS
M70	蔗糖	**	**	NS	*	**	**	OPLS
M72	甘油-3-磷酸肌醇	**	**	*	**	**	**	OPLS
M74	麦芽三糖	**	**	NS	NS	**	**	PCA OPLS
M88	未知 14	**	**	**	**	**	**	PCA

a NS: 无显著性差异; * P<0.05; ** P<0.005

通过与图 7-1 和图 7-2 的结果进行对比,可以发现,与其他培养体系相比, I40 的脂含量和日产量都是最低的,这也是图 7-6A 中这个体系的样品点处于下方象限的主要原因之一。而且从得分图可以看出,抽提出来的代谢信息与 FAME 的日产量有很强的相关性。图 7-6B 给出了与之相关的关键代谢物信息。对这些代谢物进行单因素方差分析,其结果如表 7-1 所示。可以看出除了 M54,大部分

关键代谢物在不同的培养体系之间都表现出了显著性差异 ($P<0.05$)，尤其表现在 I40 与其他三组的分析比较上。这样的结果与我们在 t[1]/u[1]图上观察到的结果也是吻合的。

7.2.5 不同光强下小球藻关键代谢物的变化趋势

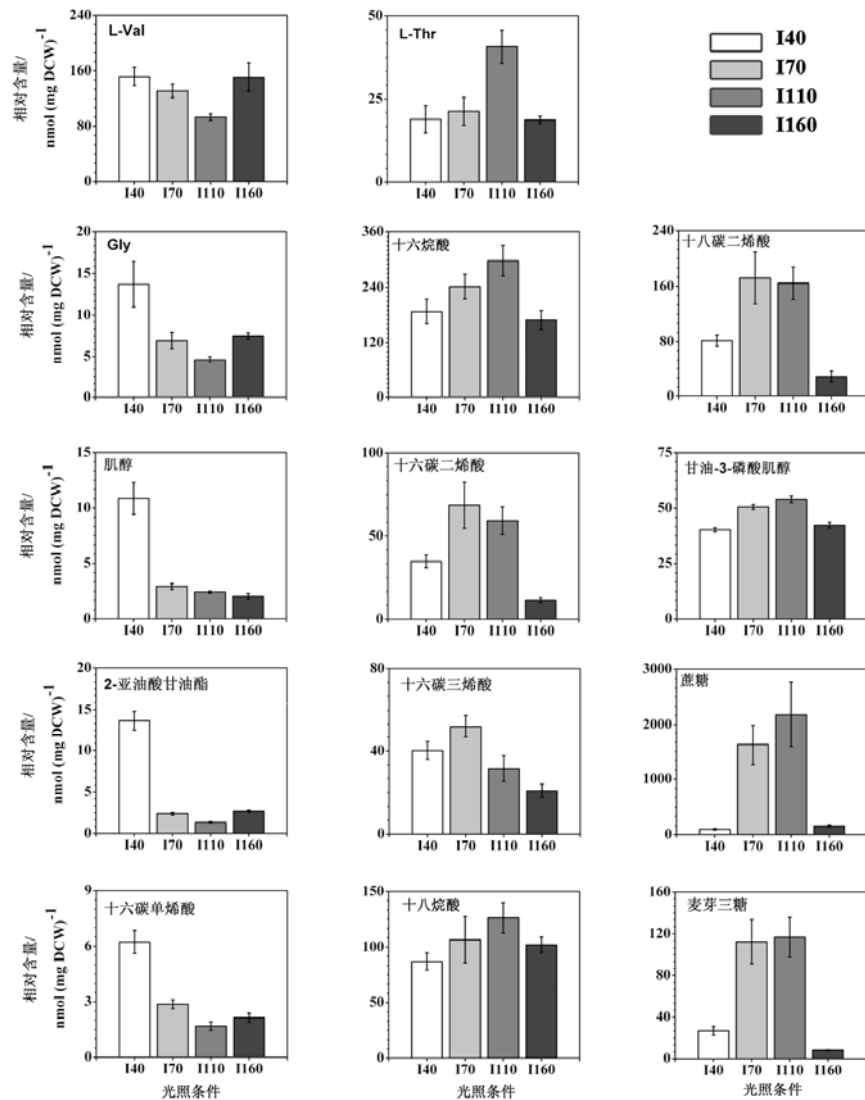


图 7-7 不同光照下主要代谢物的变化

Figure 7-7 Difference of the key metabolites under varing light intensities

根据表 7-1 所得结果选出具有显著性差异的已鉴定代谢物进行深入分析，所得结果见图 7-7。可以看出根据变化趋势，可以将这些代谢物分为两类：一类随着光照强度上升而不断下降，但是除了肌醇，其他代谢物在 I110 时达到最低后略有上升；另一类随着光照强度上升而上升，大部分都在 I110 时达到峰值，除

了十六碳二烯酸、十六碳三烯酸及十八碳二烯酸是在 I70 达到峰值。此外可以观察到，在 I160 体系下除了缬氨酸，其关键代谢物丰度普遍偏低。

将这些关键代谢物的变化趋势同脂肪酸日产量和脂积累的变化关联起来，可以发现，大部分氨基酸与 FAME 日产量呈负相关趋势，而糖代谢及自由脂肪酸表现出显著的正相关趋势。缬氨酸的碳骨架来自于丙酮酸，甘氨酸的合成需要大量 3-磷酸甘油酸，而 3-磷酸甘油酸可以转化为磷酸烯醇式丙酮酸，从而生成丙酮酸，这是乙酰辅酶 A 的前体，而乙酰辅酶 A 恰好是合成脂肪酸的必要前体，可见缬氨酸、甘氨酸与脂肪酸合成可能存在竞争关系。而自由脂肪酸是合成脂肪的第一步，从图 7-7 可以看出，与其他体系相比，I110 体系中积累了大量的自由脂肪酸，这与此时最高的脂肪积累结果相互印证。糖代谢是除了脂肪代谢的另一重要碳代谢途径，糖的积累是生物体重要的能量储存机制，需要消耗大量的碳骨架、能量 ATP 及还原剂 NAD(P)H。I70 及 I110 时较高的糖积累暗示着此时的光合能力可能更强，生长状态可能更好，细胞内有更多的存储物质以应对环境变化。

7.2.6 接种密度影响小球藻生长和代谢的生物学模型的建立

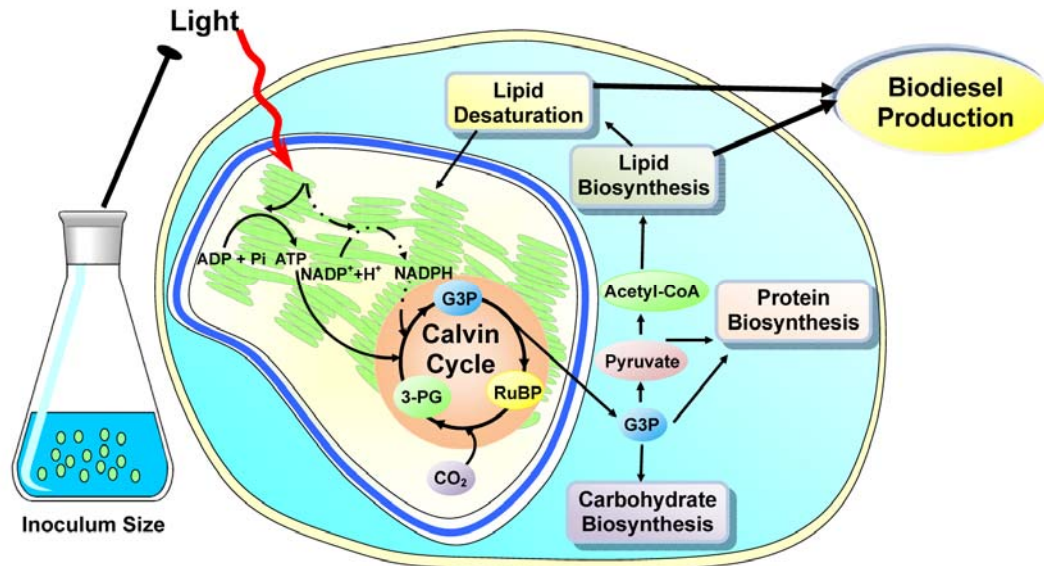


图 7-8 接种密度影响小球藻的代谢和生物柴油生产示意图

Figure 7-8 Proposed scheme of the biodiesels production and metabolic changes of *C. sorokiniana* based on inoculum size.

通过代谢组学、磷脂组学和蛋白质组学的研究以及本章的光照验证试验结果可以推断，在受接种密度影响的所有环境因子中，光强对小球藻生长代谢影响最

大,同时光调控也是接种密度体系中最关键的代谢调控途径。图 7-8 给出了接种密度影响小球藻的代谢和生物柴油生产示意图。如图所示,在光自养的小球藻培养体系中,保持光照强度一定的情况下,接种密度越高,光进入培养体系后被细胞吸收的损失也就越多,内部的细胞受到的光照也就越少,而小球藻是在持续震荡的环境下生长,细胞交替出现在光暗区,理论上来说每个细胞接受到的光子能量是持平的。换言之,接种密度越高,细胞所接收到的平均光子也就越少,从而导致光反应中传递的能量减少,ATP 及 NADPH 的合成减少,同时暗反应中的 G3P 的合成减少。碳骨架和能量供应的降低将导致后续的蛋白合成、碳水化合物合成及脂肪合成的削弱,从而引起生物柴油产量的降低。同时光合作用的减弱也会导致脂肪去饱和过程需要的能量降低,无法提供足够的还原力生成 PUFA,这对生物柴油质量也有重要影响。可见接种密度对小球藻生长代谢的调控主要是通过对光合作用造成影响来实现的。

7.3 小结

1、研究了不同光照强度对高接种密度培养体系的小球藻 FAME 组成及其日产量的影响。发现光照强度对高接种密度体系培养的小球藻的产脂能力的确有显著影响,且在 I110 体系下获得 FAME 的最高日产量及最低不饱和度,这说明光照强度的确是高接种密度培养小球藻的限制因素。

2、研究了不同光照强度对高接种密度培养体系的小球藻代谢水平的影响,发现光照强度为 $160\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,代谢水平最弱,推测可能此时光照已经达到饱和,过多的光照强度反而会对细胞造成损伤有关。可见光强并不是越强越好,超过一定的阈值反而会出现反效果。

3、通过 PCA 分析发现 $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 及 $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的高接种密度培养小球藻的代谢状态较为一致,能够与其他两个体系明显分开。再通过 OPLS 对不同光照条件下的小球藻 FAME 日产量及代谢状态的关系进行了研究,发现其有一定的相关性。而氨基酸代谢、糖代谢及自由脂肪酸代谢是关键代谢物,其中氨基酸代谢趋势与脂积累负相关。而糖代谢及自由脂肪酸与脂积累正相关。暗示 I110 时光合能力可能更强,生长状态可能更好,细胞内有更多的存储物质以应对环境变化, $110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是本研究体系中最适细胞生长的光强。

4、通过结合接种密度实验可以确定接种密度导致的光强变化是影响小球藻生长的直接原因,通过光强的改变有助于提高最高接种密度培养体系下的小球藻生长及产脂能力。

第八章 结论与展望

本文将代谢组学、磷脂组学及蛋白质组学等系统生物学手段引入微藻培养体系,试图以接种密度为例,通过多组学研究手段分析小球藻培养过程中油脂积累、代谢组变化、磷脂组变化及蛋白质组调控之间的关系。对这些生理生化特性的考察为揭示接种密度影响小球藻生长和脂积累的代谢机制提供了重要信息,并揭示了光调控是接种密度影响小球藻生长代谢的关键调控手段,最后通过对不同光照强度影响最高接种密度下小球藻代谢和脂积累的研究对该设想进行了验证。

8.1 结论

1、基于 GC-TOF-MS 手段获得了小球藻胞内油脂及代谢组在不同接种密度培养下的变化,发现产脂相关的代谢物主要关联氨基酸代谢、脂肪代谢及糖代谢等碳代谢网络,这些主要代谢物水平与小球藻 FAME 日产量及 CN 负相关,并通过小球藻胞内色素变化侧面验证了不同接种密度培养体系下小球藻光合能力的差异。

2、利用 LC-MS 构建了小球藻的磷脂图谱,共鉴定出 6 类 119 种磷脂分子。发现接种密度对磷脂酰基链长的影响有种类依赖性,但 IN10⁶ 培养体系的磷脂总体不饱和度显著低于其他体系。而且 IN10⁶ 培养体系 PE 的含量明显低于其他培养体系,且 PG 的含量出现了显著提升,这说明接种密度能够改变细胞的疏密程度,更重要的是接种密度对细胞受光的影响可能导致了类囊体膜的生理机能,从侧面反应出光合作用的改变可能在接种密度引起的小球藻生理变化上起到了重要作用。

3、采用 iTRAQ 定量法比较了不同接种密度体系的蛋白质组,对其中 241 种蛋白进行了定量分析。发现所检测到的光合作用能量代谢及碳反应相关蛋白随着接种密度的提高而下调,这些光合蛋白与代谢组学所发现的关键代谢分子有较强相关性。而且稳定期 78.4% 的其他蛋白随着接种密度的增加而下调,这种大部分蛋白在最高接种密度体系下低表达的原因可能与高接种密度导致的光合作用效率下调有关。

4、通过对高接种密度体系下进行不同光照培养实验以验证光在接种密度所导致的小球藻生长代谢中的作用。研究结果表明光照强度能显著影响高接种密度培养体系的小球藻 FAME 组成及其日产量,其中光强为 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时其日产

量及 SFA 含量均最高。得出结论光照条件的确是小球藻高接种密度培养的主要限制因素之一。接种密度主要是通过改变单个细胞接受到的光强来对小球藻生长代谢产生影响的，光调控是不同接种密度体系下最关键的代谢调控因子。

8.2 创新点

本文开创性地使用跨组学研究策略，将代谢组学、磷脂组学以及蛋白质组学等技术引入到小球藻培养研究领域，并对其结果进行了综合总结，主要创新如下：

1、目前国际上对微藻的研究主要集中在表型研究上，将代谢组学技术引入到微藻培养领域的研究中来，在国内外研究中尚属首次。首次鉴定了小球藻的代谢谱，开创性地展示了接种密度对小球藻整体代谢水平的影响，而且找到了与脂积累相关的代谢网络，并阐述了接种密度限制小球藻细胞光合作用的可能机理，得到了不同接种密度培养体系下小球藻的相对完整的代谢调控网络（第三、四章）。

2、本文第一次将磷脂组学技术引入到不同接种密度培养微藻的研究中来，首次鉴定了小球藻的磷脂谱，并将其与代谢组学结果相互印证，首次揭示了细胞膜疏密调控及光合作用相关的膜调控在细胞适应不同接种密度过程中的重要作用（第五章）。

3、本文首次将蛋白质组学技术引入到小球藻研究中来，首次鉴定了小球藻的蛋白谱，并首次将蛋白质组学和代谢组学相结合，第一次揭示出接种密度导致的小球藻光合蛋白的表达差异显著影响了小球藻的主要代谢调控网络，并通过光照实验验证了接种密度通过影响小球藻光合能力来调控其整体代谢水平的推论（第六、七章）。

8.3 展望

1、微藻生产生物能源受到国际上的极大关注，然而微藻大规模生产条件的复杂性和微藻自身代谢机制研究的认知限制了微藻的产业化发展，系统生物学能够从全局性对生物体的各项生理指标进行监控，是解决复杂问题的有效手段，然而目前组学技术仍然存在很多局限性，如如何对低丰度的代谢物及蛋白质进行定性定量分析、降低研究成本及提高结果的精度及可靠度都是目前急需解决的问题

2、本文以小球藻脂积累和代谢水平的研究为切入点，分析了接种密度对小球藻代谢的调控机制，但由于目前国际上未能完成对小球藻基因的测序分析，因此限制了转录组学在本研究中的应用，同时也降低了蛋白质组的可检测度。

3、微藻的代谢是在多个不同细胞器中进行的，引入细胞器定位系统生物学技术将有助于进一步了解各生物分子在细胞内的运输调控机制。

4、本文通过跨组学技术对不同接种密度引起的小球藻生理生化变化进行了研究，发现光调控在其中所起到的关键作用，后续实验中需要对小球藻的光合放氧效率、PSII 活性及叶绿体超微结构等指标做深入研究，以充实组学研究所得内容。

参考文献

- [1] Blackburn S.I. and Volkman J.K. Microalgae: A Renewable Source of Bioproducts. Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing, 2012: 221-241
- [2] Ramadhas A., Jayaraj S., and Muraleedharan C. Use of vegetable oils as IC engine fuels—a review. Renewable Energy, 2004, 29(5): 727-742
- [3] Knothe G., Cermak S.C., and Evangelista R.L. Methyl esters from vegetable oils with hydroxy fatty acids: comparison of Lesquerella and castor methyl esters. Fuel, 2012, 96: 535-540
- [4] Lin L., Cunshan Z., Vittayapadung S., *et al.* Opportunities and challenges for biodiesel fuel. Applied Energy, 2011, 88(4): 1020-1031
- [5] Bozbas K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2008, 12(2): 542-552
- [6] Stephenson A.L., Dennis J.S., Howe C.J., *et al.* Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. Biofuels, 2010, 1(1): 47-58
- [7] Stephenson P.G., Moore C.M., Terry M.J., *et al.* Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. Trends in Biotechnology, 2011, 29(12): 615-623
- [8] Li Y., Han D., Hu G., *et al.* Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(2): 258-268
- [9] Yang S., Sadilek M., and Lidstrom M.E. Streamlined pentafluorophenylpropyl column liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry and global ¹³C-labeled internal standards improve performance for quantitative metabolomics in bacteria. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(47): 7401-7410
- [10] Birky Jr C.W. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. Annual review of genetics, 1978, 12(1): 471-512
- [11] Lü J., Sheahan C., and Fu P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. Energy & Environmental Science, 2011, 4(7): 2451-2466

-
- [12] Chen M., Zhao L., Sun Y.L., *et al.* Proteomic analysis of hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 3854-3866
- [13] Grouneva I., Rokka A., and Aro E.M. The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(12): 5338-5353
- [14] Renberg L., Johansson A.I., Shutova T., *et al.* A metabolomic approach to study major metabolite changes during acclimation to limiting CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 2010, 154(1): 187-196
- [15] Kluender C., Sans-Piché F., Riedl J., *et al.* A metabolomics approach to assessing phytotoxic effects on the green alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Metabolomics*, 2009, 5(1): 59-71
- [16] Milledge J.J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2011, 10(1): 31-41
- [17] Nigam P.S. and Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, 37(1): 52-68
- [18] Talukdar J., Kalita M., Bhatnagar S., *et al.* Prospects of microalgae of North East India for biodiesel production. *Algae Biofuel*, 2011: 69-90
- [19] Huo S., Dong R., Wang Z., *et al.* Available Resources for Algal Biofuel Development in China. *Energies*, 2011, 4(9): 1321-1335
- [20] Xu N., Duan S., Li A., *et al.* Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae*, 2010, 9(1): 13-17
- [21] Quintana N., Van der Kooy F., Van de Rhee M.D., *et al.* Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 471-490
- [22] Sialve B., Bernet N., and Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 409-416
- [23] Singh J. and Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(9): 2596-2610
- [24] Frey G.W. and Linke D.M. Hydropower as a renewable and sustainable energy resource meeting global energy challenges in a reasonable way. *Energy Policy*, 2002, 30(14): 1261-1265

- [25] Hase R., Oikawa H., Sasao C., *et al.* Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89(2): 157-163
- [26] Boussiba S., Sandbank E., Shelef G., *et al.* Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. *Aquaculture*, 1988, 72(3): 247-253
- [27] Alptekin E. and Canakci M. Determination of the density and the viscosities of biodiesel–diesel fuel blends. *Renewable energy*, 2008, 33(12): 2623-2630
- [28] Ogbonna J.C. and Tanaka H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation–Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(3): 207-218
- [29] 张抗 and 卢雪梅. 经济和能源地缘格局变化及中美战略对策. *中外能源*, 2012, 17(2): 1-7
- [30] Mata T.M., Martins A.A., and Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14(1): 217-232
- [31] Canakci M. and Sanli H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(5): 431-441
- [32] Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., *et al.* Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 235-240
- [33] Dexter J. and Fu P. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energy & Environmental Science*, 2009, 2(8): 857-864
- [34] Golueke C.G. and Oswald W.J. Biological Conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Applied Microbiology*, 1959, 7(4): 219-227
- [35] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306
- [36] Yen H.W. and Brune D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 2007, 98(1): 130-134
- [37] Yuan Y., Chen Q., Zhou S., *et al.* Bioelectricity generation and microcystins removal in a blue-green algae powered microbial fuel cell. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187(1): 591-595
- [38] Gaffron H. and Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *The Journal of General Physiology*, 1942, 26(2): 219-240

- [39] Ananyev G., Carrieri D., and Dismukes G.C. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium "*Arthrospira (Spirulina) maxima*". Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 6102-6113
- [40] Doebe A., Rupprecht J., Beckmann J., *et al.* Functional integration of the *HUP1* hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: impacts on biological H₂ production. Journal of Biotechnology, 2007, 131(1): 27-33
- [41] Harris W.S., Miller M., Tighe A.P., *et al.* Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. Atherosclerosis, 2008, 197(1): 12-24
- [42] Chen W.Y., Lin S.Y., Pan H.C., *et al.* Beneficial effect of docosahexaenoic acid on cholestatic liver injury in rats. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(3): 252-264
- [43] Xu Z.Z., Zhang L., Liu T., *et al.* Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. Nature Medicine, 2010, 16(5): 592-597
- [44] Christian B., Lichti B., Pulz O., *et al.* Fast and unambiguous determination of EPA and DHA content in oil of selected strains of algae and cyanobacteria. Acta Agronomica Hungarica, 2009, 57(2): 249-253
- [45] Karkos P., Leong S., Karkos C., *et al.* *Spirulina* in clinical practice: evidence-based human applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2010, 2011: eCAM:1-4
- [46] G.A. C., Amaro H.M., Barbosa C.R., *et al.* Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. Food Research International, 2011, 44(9): 2721-2729
- [47] Farhat N., Rabhi M., Falleh H., *et al.* Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella Salina*(chlorophyceae)1. Journal of Phycology, 2011, 47(5): 1072-1077
- [48] Peng J., Yuan J.P., Wu C.F., *et al.* Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. Marine Drugs, 2011, 9(10): 1806-1828
- [49] Garbayo I., Cuaresma M., Vilchez C., *et al.* Effect of abiotic stress on the production of lutein and β -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. Process Biochemistry, 2008, 43(10): 1158-1161
- [50] Mary Leema J., Kirubakaran R., Vinithkumar N., *et al.* High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. Bioresource Technology, 2010, 101(23): 9221-9227

-
- [51] Cordero B.F., Obraztsova I., Couso I., *et al.* Enhancement of Lutein Production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by Improvement of Culture Conditions and Random Mutagenesis. *Marine Drugs*, 2011, 9(9): 1607-1624
- [52] Sekar S. and Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(2): 113-136
- [53] Fujita T., Ogbonna J.C., Tanaka H., *et al.* Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(2): 185-191
- [54] Bazyar Lakeh A.A., Ahmadi M.R., Safi S., *et al.* Growth performance, mortality and carotenoid pigmentation of fry offspring as affected by dietary supplementation of astaxanthin to female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(1): 35-39
- [55] Ohno M., Darwish W.S., Ikenaka Y., *et al.* Astaxanthin rich crude extract of *Haematococcus pluvialis* induces cytochrome P450 1A1 mRNA by activating aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *Food Chemistry*, 2012, 130(2): 356-361
- [56] Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic*, 2011, 16(4): 355-364
- [57] Palozza P., Torelli C., Boninsegna A., *et al.* Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 2009, 283(1): 108-117
- [58] Li J., Zhu D., Niu J., *et al.* An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 568-574
- [59] Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., *et al.* Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2): 87-96
- [60] Lee Y.K., Ding S.Y., Hoe C.H., *et al.* Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 1996, 8(2): 163-169
- [61] Hill G.A., Sasi D., Mitra P., *et al.* Growth kinetics and lipid production using *Chlorella vulgaris* in a circulating loop photobioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2011, 86(6): 875-880
- [62] Lau P., Tam N., and Wong Y. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 1995, 89(1): 59-66

-
- [63] Yongmanitchai W. and Ward O. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(2): 419-425
- [64] Schousboe P. and Rasmussen L. Survival of *Tetrahymena thermophila* at Low Initial Cell Densities. Effects of Lipids and Long-Chain Alcohols. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1994, 41(3): 195-199
- [65] Chiou S.Y., Su W.W., and Su Y.C. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *Journal of Biotechnology*, 2001, 85(3): 247-257
- [66] Kaçka A. and Dönmez G. Isolation of *Dunaliella spp.* from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8348-8352
- [67] Bumbak F., Cook S., Zachleder V., *et al.* Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 91(1): 31-46
- [68] Xiong W., Li X., Xiang J., *et al.* High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(1): 29-36
- [69] Singh N.K. and Dhar D.W. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2011, 31(4): 605-629
- [70] Robinson T.P., Aboaba O.O., Kaloti A., *et al.* The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70(1): 163-173
- [71] Baba M., Kikuta F., Suzuki I., *et al.* Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 266-270
- [72] Das P., Lei W., Aziz S.S., *et al.* Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 2011, 102(4): 3883-3887
- [73] Wang J., Sommerfeld M., and Hu Q. Occurrence and environmental stress responses of two plastid terminal oxidases in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 2009, 230(1): 191-203
- [74] Wang J., Sommerfeld M., and Hu Q. Cloning and expression of isoenzymes of superoxide dismutase in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(6): 995-1003

- [75] Solovchenko A., 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*. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(3): 245-251
- [76] Chaneva G., Furnadzhieva S., Minkova K., *et al.* Effect of light and temperature on the cyanobacterium *Arthronema africanum*-a prospective phycobiliprotein-producing strain. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19(5): 537-544
- [77] Li Y., Zhou W., Hu B., *et al.* Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012:
- [78] Poerschmann J., Spijkerman E., and Langer U. Fatty acid patterns in *Chlamydomonas sp.* as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microbial Ecology*, 2004, 48(1): 78-89
- [79] Williams J.A. Keys to bioreactor selections. *Chemical Engineering Progress*, 2002, 98(3): 34-41
- [80] Gachon C.M.M., Sime-Ngando T., Strittmatter M., *et al.* Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(11): 633-640
- [81] Chen H., Jiang J.G., and Wu G.H. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(14): 6178-6182
- [82] Ferreira L.S., Rodrigues M.S., Converti A., *et al.* Kinetic and growth parameters of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(2): 444-450
- [83] Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., *et al.* Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2009, 48(6): 1146-1151
- [84] Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., *et al.* Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(2): 518-532
- [85] Miyachi S., Iwasaki I., and Shiraiwa Y. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low-and extremely high-CO₂ conditions. *Photosynthesis Research*, 2003, 77(2): 139-153

-
- [86] Papazi A., Makridis P., Divanach P., *et al.* Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO₂ concentrations induce an intense biomass production. *Physiologia Plantarum*, 2008, 132(3): 338-349
- [87] Spoehr H. and Milner H.W. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant physiology*, 1949, 24(1): 120-149
- [88] Zhila N.O., Kalacheva G.S., and Volova T.G. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(4): 309-315
- [89] Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., *et al.* Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low - cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1): 100-112
- [90] Li Y., Horsman M., Wang B., *et al.* Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(4): 629-636
- [91] Piorreck M., Baasch K.H., and Pohl P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 1984, 23(2): 207-216
- [92] Rao A.R., Dayananda C., Sarada R., *et al.* Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 2007, 98(3): 560-564
- [93] Marshall J. and Sala K. A stochastic Lagrangian approach for simulating the effect of turbulent mixing on algae growth rate in a photobioreactor. *Chemical Engineering Science*, 2011, 66(3): 384-392
- [94] Moheimani N.R., Isdepsky A., Lisec J., *et al.* Coccolithophorid algae culture in closed photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(9): 2078-2087
- [95] Moazami N., Ashori A., Ranjbar R., *et al.* Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 39: 449-453
- [96] Borowitzka M.A. and Moheimani N.R. Sustainable biofuels from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2010: 1-13
- [97] Kacser H. On parts and wholes in metabolism. The organization of cell metabolism, 1986: 327-337
- [98] Medie F.M., Davies G.J., Drancourt M., *et al.* Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10: 227-234

-
- [99] Nicholson J.K. and Lindon J.C. Systems biology: metabonomics. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056
- [100] Nicholson J.K., Lindon J.C., and Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189
- [101] Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(11): 1157-1161
- [102] Christie W.W. Lipidomics—A personal view. *Lipid Technology*, 2009, 21(3): 58-60
- [103] Yates J.R., Ruse C.I., and Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2009, 11: 49-79
- [104] Rabilloud T., Chevallet M., Luche S., *et al.* Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(11): 2064-2077
- [105] de Souza G.A., Fortuin S., Aguilar D., *et al.* Using a label-free proteomics method to identify differentially abundant proteins in closely related hypo- and hypervirulent clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2010, 9(11): 2414-2423
- [106] Balch W.E. and Yates J. Application of mass spectrometry to study proteomics and interactomics in cystic fibrosis. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2011, 742: 227-247
- [107] Geiger T., Cox J., Ostasiewicz P., *et al.* Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 383-385
- [108] Butler G.S., Dean R.A., Morrison C.J., *et al.* Identification of cellular MMP substrates using quantitative proteomics: isotope-coded affinity tags (ICAT) and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ). *Methods in Molecular Biology*, 2010, 622(4): 451-470
- [109] Ma Q., Zhang W., Zhang L., *et al.* Proteomic Analysis of *Ketogulonicigenium vulgare* under Glutathione Reveals High Demand for Thiamin Transport and Antioxidant Protection. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32156
- [110] Shuman J.L., Cortes D.F., Armenta J.M., *et al.* Plant metabolomics by GC-MS and differential analysis. *Methods in Molecular Biology* 2011, 678: 229-246
- [111] Bueschl C., Kluger B., Berthiller F., *et al.* MetExtract: a new software tool for the automated comprehensive extraction of metabolite-derived LC/MS signals in metabolomics research. *Bioinformatics*, 2012, 28(5): 736-738

- [112] Benahmed M.A., Santelmo N., Elbayed K., *et al.* The assessment of the quality of the graft in an animal model for lung transplantation using the metabolomics ¹H high - resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2012:
- [113] Yang J., Yang S., Gao X., *et al.* Integrative investigation of lipidome and signal pathways in human endothelial cells under oxidative stress. *Molecular BioSystems*, 2011, 7(8): 2428-2440
- [114] Blaise B.J., Giacomotto J., Elena B., *et al.* Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(50): 19808-19812
- [115] Yang S., Lu S.H., and Yuan Y.J. Lipidomic analysis reveals differential defense responses of *Taxus cuspidata* cells to two elicitors, methyl jasmonate and cerium (Ce⁴⁺). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2008, 1781(3): 123-134
- [116] Randolph-Anderson B.L., Boynton J.E., Gillham N.W., *et al.* Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, 236(2): 235-244
- [117] Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, 318(5848): 245-250
- [118] Maul J.E., Lilly J.W., Cui L., *et al.* The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *The Plant Cell*, 2002, 14(11): 2659-2679
- [119] Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M., *et al.* Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(11): 5967-5972
- [120] Blanc G., Duncan G., Agarkova I., *et al.* The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *The Plant Cell*, 2010, 22(9): 2943-2955
- [121] Oudot-Le Secq M.P., Grimwood J., Shapiro H., *et al.* Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 277(4): 427-439
- [122] Oikawa A., Matsuda F., Kikuyama M., *et al.* Metabolomics of a single vacuole reveals metabolic dynamism in an alga *Chara australis*. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 544-551

-
- [123] Yang S., Lu S.H., and Yuan Y.J. Cerium elicitor-induced phosphatidic acid triggers apoptotic signaling development in *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2009, 159(1): 13-20
- [124] Krisnangkura K. A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, 63(4): 552-553
- [125] Azam M.M., Waris A., and Nahar N.M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 2005, 29(4): 293-302
- [126] Han P.P. and Yuan Y.J. Metabolic profiling as a tool for understanding defense response of *Taxus cuspidata* cells to shear stress. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(5): 1244-1253
- [127] Douki T., Reynaud-Angelin A., Cadet J., *et al.* Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*, 2003, 42(30): 9221-9226
- [128] Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144(3): 307-313
- [129] Letourneau A., Seena S., Marvanová L., *et al.* Potential use of barcoding to identify aquatic hyphomycetes. *Fungal Diversity*, 2010, 40(1): 51-64
- [130] Bosma R., Miazek K., Willemsen S., *et al.* Growth inhibition of *Monodus subterraneus* by free fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(5): 1108-1114
- [131] Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C., *et al.* Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(4): 742-751
- [132] Zhang C.H., Wu J.Y., and He G.Y. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 2002, 60(4): 396-402
- [133] Ding M.Z., Tian H.C., Cheng J.S., *et al.* Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. *Journal of Biotechnology*, 2009, 144(4): 279-286
- [134] Perego P., Converti A., and Del Borghi M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 2003, 89(2): 125-131

- [135] Vyas A.P., Verma J.L., and Subrahmanyam N. A review on FAME production processes. *Fuel*, 2010, 89(1): 1-9
- [136] Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 621-639
- [137] Ramos M.J., Fernández C.M., Casas A., *et al.* Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 261-268
- [138] Francisco É.C., Neves D.B., Jacob-Lopes E., *et al.* Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 395-403
- [139] Mohibbe Azam M., Waris A., and Nahar N. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 2005, 29(4): 293-302
- [140] Bamgboye A.I. and Hansen A.C. Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *International Agrophysics*, 2008, 22(1): 21-29
- [141] Li J., Fergola P., and Ma Z. Effects of allelochemicals produced by one population in a chemostat-like environment. *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 284(1): 99-105
- [142] DellaGreca M., Zarrelli A., Fergola P., *et al.* Fatty Acids Released by *Chlorella vulgaris* and Their Role in Interference with *Pseudokirchneriella subcapitata*: Experiments and Modelling. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36(3): 339-349
- [143] Gordon B.R. and Leggat W. *Symbiodinium*—Invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine Drugs*, 2010, 8(10): 2546-2568
- [144] Weber A.P.M., Horst R.J., Barbier G.G., *et al.* Metabolism and metabolomics of eukaryotes living under extreme conditions. *International Review of Cytology*, 2007, 256: 1-34
- [145] Ni Y., Su M., Lin J., *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS letters*, 2008, 582(17): 2627-2636
- [146] Zhang Z. and Sachs J.P. Hydrogen isotope fractionation in freshwater algae: I. Variations among lipids and species. *Organic Geochemistry*, 2007, 38(4): 582-608
- [147] Buchanan B.B., Gruissem W., and Jones R.L. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Vol. 40. 2000: American Society of Plant Physiologists.

- [148] Li Y., Han D., Hu G., *et al.* *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(4): 387-391
- [149] Li Y., Han D., Sommerfeld M., *et al.* Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* *sp.*(Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 123-129
- [150] Packer A., Li Y., Andersen T., *et al.* Growth and neutral lipid synthesis in green microalgae: A mathematical model. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 111-117
- [151] Radakovits R., Jinkerson R.E., Darzins A., *et al.* Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(4): 486-501
- [152] Wahal S. and Viamajala S. Maximizing algal growth in batch reactors using sequential change in light intensity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 161(1): 511-522
- [153] Bohne F. and Linden H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2002, 1579(1): 26-34
- [154] Voronova E.N., Volkova E.V., Kazimirko Y.V., *et al.* Response of the photosynthetic apparatus of the diatom *Thalassiosira weissflogii* to high irradiance light. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2002, 49(3): 311-319
- [155] Mock T. and Kroon B. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, 2002, 61(1): 53-60
- [156] van Gestel R.A., Rijken P.J., Surinova S., *et al.* The influence of the acyl chain composition of cardiolipin on the stability of mitochondrial complexes; An unexpected effect of cardiolipin in [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase and prohibitin complexes. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(4): 806-814
- [157] Foley P.M., Beach E.S., and Zimmerman J.B. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. *Green Chemistry*, 2011, 13(6): 1399-1405
- [158] Darwish E., Testerink C., Khalil M., *et al.* Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant and cell physiology*, 2009, 50(5): 986-997
- [159] Tian H.C., Zhou J., Qiao B., *et al.* Lipidome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* reveals pitching rate-dependent fermentative performance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1507-1516
- [160] Guschina I.A. and Harwood J.L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 2009: 1-24

- [161] Goncharova S., Kostetsky E.Y., and Sanina N. The effect of seasonal shifts in temperature on the lipid composition of marine macrophytes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, 51(2): 169-175
- [162] He H., Rodgers R.P., Marshall A.G., *et al.* Algae Polar Lipids Characterized by On-Line Liquid Chromatography Coupled with Hybrid Linear Quadrupole Ion Trap/Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy & Fuels*, 2011, 25(10): 4770-4775
- [163] Muradyan E.A., Klyachko-Gurvich G.L., Tsoglin L.N., *et al.* Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, 51(1): 53-62
- [164] Chen G.Q., Jiang Y., and Chen F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chemistry*, 2008, 109(1): 88-94
- [165] Chen G.Q., Jiang Y., and Chen F. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry*, 2007, 104(4): 1580-1585
- [166] Zhao L. and Feng S.S. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 274(1): 55-68
- [167] Niemelä P.S., Hyvönen M.T., and Vattulainen I. Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers. *Biophysical Journal*, 2006, 90(3): 851-863
- [168] Prinetti A., Loberto N., Chigorno V., *et al.* Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009, 1788(1): 184-193
- [169] Joyard J., Ferro M., Masselon C., *et al.* Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49(2): 128-158
- [170] Zhang C. and Tian S. Peach fruit acquired tolerance to low temperature stress by accumulation of linolenic acid and N-acylphosphatidylethanolamine in plasma membrane. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 864-872
- [171] Umeda M. and Emoto K. Membrane phospholipid dynamics during cytokinesis: regulation of actin filament assembly by redistribution of membrane surface phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1999, 101(1): 81-91

- [172] Salvador G.A., López F.M., and Giusto N.M. Age - related changes in central nervous system phosphatidylserine decarboxylase activity. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, 70(3): 283-289
- [173] Birner R., Bürgermeister M., Schneiter R., *et al.* Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 2001, 12(4): 997-1007
- [174] Pineau B., Girard - Bascou J., Eberhard S., *et al.* A single mutation that causes phosphatidylglycerol deficiency impairs synthesis of photosystem II cores in *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(2): 329-338
- [175] Bumba L. and Vácha F. Electron microscopy in structural studies of Photosystem II. *Photosynthesis Research*, 2003, 77(1): 1-19
- [176] Rochaix J.D. *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. *FEBS Letters*, 2002, 529(1): 34-38
- [177] Reynolds C. Ecological pattern and ecosystem theory. *Ecological Modelling*, 2002, 158(3): 181-200
- [178] Torre W.R. and Burkey K.O. Acclimation of barley to changes in light intensity: photosynthetic electron transport activity and components. *Photosynthesis Research*, 1990, 24(2): 127-136
- [179] Bailey S., Walters R.G., Jansson S., *et al.* Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta*, 2001, 213(5): 794-801
- [180] Mock T. and Kroon B. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, 2002, 61(1): 41-51
- [181] Leu E., Falk-Petersen S., Kwaśniewski S., *et al.* Fatty acid dynamics during the spring bloom in a High Arctic fjord: importance of abiotic factors versus community changes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2006, 63(12): 2760-2779
- [182] Yeesang C. and Cheirsilp B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3034-3040
- [183] Kis M., Zsiros O., Farkas T., *et al.* Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(8): 4209-4214

- [184] Becker S., Graeve M., and Bischof K. Photosynthesis and lipid composition of the Antarctic endemic rhodophyte *Palmaria decipiens*: effects of changing light and temperature levels. *Polar Biology*, 2010, 33(7): 945-955
- [185] Klyachko-Gurvich G.L., Tsoglin L.N., Doucha J., *et al.* Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiologia Plantarum*, 1999, 107(2): 240-249

发表论文和参加科研情况说明

发表的论文:

- [1] **Shuhuan Lu**, Jiangxin Wang, Yanhong Niu, Jie Yang, Jian Zhou, Yingjin Yuan*. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. Biotechnology and Bioengineering (一区, IF: 3.7), 2012. 109 (7) :1651-1662.
- [2] Jingsheng Cheng, Yanhong Niu **Shuhuan Lu**, Yingjin Yuan*. Metabolome analysis reveals ethanolamine as potential marker for improving lipid accumulation of model photosynthetic organisms. Journal of Chemical Technology and Biotechnology (三区, IF: 1.818), 2012.
- [3] Song Yang, **Shuhuan Lu**, Yingjin Yuan*. Cerium elicitor-induced phosphatidic acid triggers apoptotic signaling development in *Taxus cuspidata* cell suspension cultures. Chemistry and Physics of Lipids (三区, IF: 2.861), 2009, 159 (1) :13-20.
- [4] Song Yang, **Shuhuan Lu**, Yingjin Yuan*. Lipidomic analysis reveals differential defense responses of *Taxus cuspidata* cells to two elicitors, methyl jasmonate and cerium(Ce^{4+}). Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids (二区, IF: 5.084), 2008.1781 (3) :123-134.
- [5] Song Yang, Bin Qiao, **Shuhuan Lu**, Yingjin Yuan*. Comparative lipidomics analysis of cellular development and apoptosis in two *Taxus* cell lines. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids (二区, IF: 5.084), 2007. 1771 (5) :600-612.
- [6] 陆姝欢, 杨松, 元英进*. 脂质组学在医药研究中的应用. 细胞生物学杂志, 2007, 29 (2) : 169-172
- [7] **Shuhuan Lu**, Jiangxin Wang, Jie Yang, Qian Ma, Yanhong Niu, Yingjin Yuan*. Comparative lipidomics analysis of cellular development of *Chlorella sorokiniana* under different inoculum size. Preparing
- [8] Qian Ma, Jiangxin Wang, **Shuhuan Lu**, Yajin lv, Yingjin Yuan*. Proteomic profiling reveals close relationship between photosynthesis and inoculum size of *Chlorella sorokiniana*. Preparing

申请的专利：

- [1] 元英进, **陆姝欢**, 杨洁, 牛艳红, 马倩。一种分析微藻磷脂组的方法[P]。中国: 201210159133.4。2012
- [2] 元英进, 马倩, **陆姝欢**, 吕亚金。一种微藻蛋白组的分析方法[P]。中国: 201210159134.9。2012
- [3] 元英进, **陆姝欢**, 杨洁, 牛艳红。一种利用代谢组学改进微藻培养条件以提高产油能力的方法[P]。中国: 201110384759.0。2011
- [4] 元英进, **陆姝欢**, 丁明珠, 牛艳红。一种分析微藻代谢组的方法[P]。中国: 201110384769.4。2011
- [5] 元英进, **陆姝欢**, 杨洁, 牛艳红。一种评价微藻产油能力的方法[P]。中国: 201110384755.2。2011
- [6] 元英进, 程景胜, 牛艳红, **陆姝欢**。乙醇胺提高微藻脂含量的用途[P]。中国: 201110384783.4。2011
- [7] 元英进, 程景胜, 牛艳红, **陆姝欢**。用酵母发酵废液培养绿藻的方法[P]。中国: 201210040942.3。2012

参与的科研项目：

- 国家科技支撑计划重点项目 (2007BAD42B02)
- 国家重点基础研究发展计划 (“973” Program: 2011CBA00802)
- 国家自然科学基金重大国际合作研究计划 (20736006, 21020102040),

缩写词与符号表

3-PGA	Glycerate-3P	3-磷酸甘油酸
ALA	linolenic acid	亚麻酸
ANOVA	Analysis of variance	方差分析法
ASP	Aquatic Species Program	水生物种计划
ATPase	ATP synthase	ATP 合酶
BQ	2,5-dimethyl-p-benzoquinone	醌分子
CCM	carbon-concentrating mechanism	碳浓缩机制研究
CLICK	Cluster Identification via Connectivity Kernel	CLICK 聚类分析
CRP	C-reactive protein	降低 C 反应蛋白
Cyt _{b₆f}	cytochrome b ₆ f complex	细胞色素 <i>b₆f</i> 复合体
DHA	docosahexaenoic acid	二十二碳六烯酸
DPG	diphosphatidylglycerol	二磷脂酰甘油
EPA	eicosapentaenoic acid	二十碳五烯酸
FAEE	Fatty Acid Ethyl Ester	脂肪酸乙酯
FAME	Fatty Acid Methyl Ester	脂肪酸甲酯
FBA	fructose-bisphosphate aldolase	醛缩酶
FBP	fructose 1,6-diphosphate phosphatase	1,6-二磷酸果糖磷酸酶
FFA	free fatty acid	自由脂肪酸
FNR	ferredoxin--NADP ⁺ reductase	铁氧还蛋白
G3P	Glyceraldehyde 3-phosphate	3-磷酸甘油醛
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP ⁺)	3-磷酸甘油醛脱氢酶
GC-MS	gas chromatography mass spectrometry	气质联用
GO	Gene ontology	基因功能分类体系
HCA	hierachical cluster analysis	聚类分析法
ICAT	isotope-coded affinity tags	同位素亲和标签定量法
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantitation	同位素标记相对和绝对定量法
ITS	Internal Transcribed Spacer	核糖体基因内转录间隔区
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry	液质联用
LHCII	light harvesting complex II	捕光复合体

Lhex	LI818-like light harvesting proteins	类 LI818 光捕获蛋白
LPC	lysophosphatidylcholine	溶血性磷脂酰胆碱
MSTFA	N-Methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide	N-甲基-N-三甲硅烷基-三氟乙酰胺
MUFA	monounsaturated fatty acid	单不饱和脂肪
NAPE	N-Acylphosphatidylethanolamine	N-酰基磷脂酰乙醇胺
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
NREL	The U.S. National Renewable Energy Laboratory	美国国家能源部可再生能源实验室
OPLS	Orthogonal partial least squares	正交偏最小二乘法
PA	phosphatidic acid	磷脂酸
PAF	platelet activating factor	血小板活化因子
PAR	photosynthetic active radiation	光合有效辐射
PC	phosphatidylcholine	磷脂酰胆碱
Pc	plastocyanin	质蓝素
PCA	principal component analysis	主成分分析法
PE	Phosphatidylethanolamine	磷脂酰乙醇胺
PG	phosphatidylglycerol	磷脂酰甘油
PGK	phosphoglycerate kinase	磷酸甘油酸激酶
PI	phosphatidylinositol	磷脂酰肌醇
PIP ₂	phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate	4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇
PLA ₂	phospholipase A ₂	磷脂酶 A ₂
PLD	phospholipase D	磷脂酶 D
PLS	partial least-squares to latent structures	偏最小二乘法
PRK	phosphoribulokinase	磷酸核酮糖激酶
PS	Phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
PSI	photosystem I	光系统 I
PSII	photosystem II	光系统 II
PUFA	polyunsaturated fatty acids	多不饱和脂肪酸
RPE	ribulose-phosphate 3-epimerase	磷酸核酮糖异构酶
rpiA	phosphoriboisomerase	磷酸核糖异构酶
RPPC	reductive pentose-phosphate cycle	磷酸戊糖还原途径
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase	1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶

RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate	五碳化合物 1, 5-二磷酸核酮糖
SBPase	sedoheptulose 1,7-diphosphatase	1, 7-二磷酸景天庚酮糖磷酸酶
SFA	saturated fatty acid	饱和脂肪酸
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture	细胞培养稳定同位素标记定量法
SSU	Small subunit RNA	核糖体小亚基 rDNA 基因
TK	transketolase	转酮醇酶
VIP	the variable importance in the projection	变量投影重要性

致 谢

一晃眼，已经到了离去的时候，整个博士生涯都在盼着毕业，然而到了毕业的时候，突然发觉自己有着深深的不舍，不舍得恩师，不舍得同门，也不舍得海棠飘飞的校园，呵，不知不觉间我的身上已经深深地刻上了北洋的烙印，这是我一生的骄傲。这一页很短，无法倾诉我深深的感激，这一页也很长，浓缩了我最美好的十年。本科就遇到了恩师元英进教授，印象里他一直很忙碌，除了科研，学校里还有各种忙，然而只要不出差，每天我们都能见到他，他很喜欢和学生聊天，谈科研，谈工作，谈学习，谈理想，他不但为我们提供了非常良好的科研条件，也为我们的成长倾注了满腔心血，他用自己的睿智、勤奋和广博为我们树立了良好的榜样。在此我想向导师表示深深的谢意，没有你的指导和教育，就没有我现在的成长。博士伊始，元老师就为我争取了两年海外学习的机会，因此我接触到了 Mary Lidstrom 教授，一位优雅智慧的女士，她的宽容温柔耐心给我留下了深刻的印象，现在还常常回想起她比比食指指尖，微笑着说：“实验有时需要一点小幸运，放点耐心。”从两位好老师身上我明白了，师者，传道授业解惑也。还要感谢实验室的其他几位老师：赵广荣老师、程景胜老师、李霞老师、马忠海老师和秦秀云老师，在很多方面给予我热心的帮助和支持。

在此我要特别感谢王江新老师，他为我文章的成稿提供了极大帮助，他深厚的专业背景、精湛的实验技巧、工作上的聪慧敏锐和生活上的风趣幽默都令我深深受益。我还想感谢儒雅的张卫文老师和严谨的施定基老师，张老师为我文章提供的宝贵意见使我获益匪浅，施老师在微藻培养方面给了我很多有益的意见，真的很感激。

读博期间，我还遇到了三位良师益友，在此也要对他们表示深深的感谢。首先是我的师兄杨松博士，他对我的悉心指导和深切关怀至今令我感念不已，对我来说，他不但是我的老师，也是我的兄长，希望他在西雅图一切都好。然后是我的师姐杨洁博士，学习上，她是一个知识丰富的人，为我解答各种疑问；生活上，她是一个很随和的人，容忍我的各种小任性，真的很感激我的生命中有这么一位好师姐。最后还要谢谢马倩师妹，这是一个聪明热情的小姑娘，没有她的帮助，我无法完成蛋白质组学的研究，她是我的蛋白小老师，也是我的好朋友。

感谢我的同窗好友肖文海博士和小师妹牛艳红，一起求学一起欢笑的日子是永远的美好回忆。还要感谢博士周晓、乔斌、夏金梅、韩培培、李炳志和丁明珠，在我求学期间，受到了他们很多的关照，他们的陪伴和支持为我提供了前进的动力。

博士生姚坤在英文写作上给予我很多帮助，在此深表谢意。而与组内其他同门查建、杜瑾、邹旻、曹英秀、周剑、陈艳、刘夺、高赟、许瑞娟、杨扬、张莹、张正伟和吕亚金所进行的学术讨论也使我受到不少启发，在此一并感谢。

特别感谢我的父母，多年的养育之恩和谆谆教诲时刻铭记于心，一直受到他们无条件的关爱和支持，谁言寸草心，报得三春晖？感谢外公外婆和奶奶，他们对我的呵护伴我一路成长。还要感谢七外公和七外婆，他们不但在我求学过程中给予了许多无私的帮助和鼓励，也为我树立了做人的榜样。我的男友程昂，一直忍受我的坏脾气，他对我的理解、鼓励和支持是我努力坚持下来的重要力量。感谢我的家人，为我提供了最安全的港湾，使我无畏风雨，由衷地希望你们一切都好！

帮助我的人还有很多很多，限于篇幅，不能一一感谢，在此向所有曾给予我帮助、支持和鼓励的师长、同窗和朋友们一并向你们道谢。