

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170099

数字出版日期: 2018-06-26; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20180626.1438.004.html>

氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫下盐生杜氏藻 代谢响应分析

吕和鑫, 齐兵兵, 崔相敢, 贾士儒

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 是一种可在营养胁迫条件下大量积累类胡萝卜素的单细胞嗜盐微藻。为了解氮源、磷源、硫源共同营养胁迫条件对盐藻的影响, 本文采用 GC-MS 方法在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫 (-N-P-S) 条件下, 研究盐生杜氏藻胞内小分子代谢物的变化。研究结果共鉴定到 80 种代谢物, 其中包括 16 种氨基酸、20 种糖类、12 种脂肪酸、1 种无机酸、11 种有机酸、12 种醇类、5 种胺类以及 NIST 数据库 (2011) 不能识别的 3 种代谢物。主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 与偏最小二乘法 (partial least squares, PLS) 多元统计分析表明: 在 3 种营养元素同时缺乏条件下, 胞内代谢物含量出现显著变化, 饱和脂肪酸所占比例上升, 不饱和脂肪酸所占比例下降。麦芽糖和蔗糖含量增加, 而具有细胞调节能力的肌醇和甘油含量均出现显著减少。碳代谢通路上的其他代谢物, 如氨基酸、尿素等含量降低, 表明胞内的 TCA 循环、尿素循环及氨基酸的合成受到影响。

关键词: 盐生杜氏藻; 营养饥饿胁迫; 代谢组学; 脂肪酸

中图分类号: Q945.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2018)06-0009-07

Metabolic Analysis of Response of *Dunaliella salina* to Nitrogen, Phosphorus and Sulfur Deprivation

LÜ Hexin, QI Bingbing, CUI Xianggan, JIA Shiru

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Dunaliella salina* TG is a unicellular halophilic microalga that can heavily accumulate carotenoids under nutrient stress. In order to understand the effect of nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation (-N-P-S) on *D. salina*, in this research, changes of small molecule metabolites of *D. salina* cells during the process of nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation were studied with gas chromatography-mass spectrometry. A total of 80 metabolites were identified, including 16 amino acids, 20 sugars, 12 fatty acids, 1 inorganic acid, 11 organic acids, 12 alcohols, 5 amines and 3 others that cannot be identified in the NIST database (2011). Principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) multivariate statistical analysis showed that nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation induced changes in saturation of fatty acids by increasing saturated fatty acids and decreasing polyunsaturated fatty acids in *D. salina*. The relative levels of metabolites such as sucrose and maltose, which act as carbon skeleton, were increased. In contrast, glycerol and myo-inositol which are related to the osmoregulatory mechanism, were reduced under the condition of nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation. Carbon metabolism in other metabolites, such as amino acids, urea and other content, were decreased, which indicated that intracellular TCA cycle, urea cycle and amino acid synthesis were affected.

Key words: *Dunaliella salina*; nutritional starvation stress; metabolomics; fatty acids

盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 是一种无壁具鞭毛的真核光合生物, 主要分布在海洋、盐湖等盐海水

收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31401029)

作者简介: 吕和鑫 (1980—), 男, 山东人, 讲师; 通信作者: 贾士儒, 教授, jiashiru@tust.edu.cn

体中^[1]. 盐生杜氏藻在高光照、高盐度、极端温度或者营养胁迫下,可在叶绿体的中性脂粒内积累大量类胡萝卜素^[2-4]. 当生长受到胁迫时,每个细胞中 β -胡萝卜素的含量可达 100 pg,占细胞干质量的 14% 左右^[5]. β -胡萝卜素是一种亲脂性的高价值代谢物^[6],作为着色剂、抗氧化剂和抗衰老剂被广泛应用于食品、化妆品和制药工业^[7-8]. β -胡萝卜素具有清除氧自由基的能力^[9],在抗癌、抗氧化、预防心血管疾病及白内障方面具有显著作用^[10-11]. 由于盐生杜氏藻具有在生长胁迫条件下积累大量 β -胡萝卜素的生物学特性,使其成为从新角度研究类胡萝卜素代谢的模式生物^[12]. 除了高光照外,营养胁迫是另一种诱导盐生杜氏藻大量积累 β -胡萝卜素的环境因素^[13]. 高光照或者营养胁迫条件下,盐藻中 β -胡萝卜素和总脂肪酸含量同时增加^[14-15]. 在氮源饥饿胁迫条件下,盐生杜氏藻大量积累类胡萝卜素^[2,16-18],对应的响应机制也有相关研究^[19-20]. 在先前的报道中,从生理学和代谢响应解释了磷源对盐生杜氏藻的影响^[18,21]. 在氮源、磷源、硫源饥饿胁迫条件时,每个细胞中类胡萝卜素的最高含量分别为 9.3、8.7、5.2 pg,氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下每个细胞中类胡萝卜素的含量为 11.0 pg,是这几种营养胁迫条件下类胡萝卜产量最高的胁迫形式^[18],但是细胞对氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下代谢响应机制尚无了解. 因此,本研究通过对盐生杜氏藻营养胁迫下的代谢组进行分析,研究盐生杜氏藻在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下的生理情况,旨在为盐生杜氏藻和其他藻类在积累生物燃料和类胡萝卜素等有价值代谢物的研究提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验藻株及培养基

本实验所使用盐生杜氏藻(*D. salina* TG)藻种由天津科技大学保存^[21]. 主体培养基参照改良的 Johnsons 培养基^[22-23]. 氮源、磷源、硫源同时缺乏培养基(未添加 KNO_3 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和完全培养基(CM 培养基),其中营养胁迫培养基配制过程中,未添加的 KNO_3 中 K^+ 以 KCl 中 K^+ 等物质的量代替,未添加的 KH_2PO_4 中 K^+ 以 KCl 中 K^+ 等物质的量代替,未添加的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 中 Mg^{2+} 以 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 中 Mg^{2+} 等物质的量代替.

1.2 细胞培养

细胞培养在 0.5 L 锥形烧瓶中,培养体系为

250 mL,每天摇动 3 次. 完全培养和营养胁迫培养条件均为:白色荧光灯,光照强度 4 500 lx,培养温度 $(30 \pm 0.1)^\circ\text{C}$,培养周期 15 d. 完全培养 *D. salina* 细胞生长进入对数期后,光/暗周期为 16 h/8 h,培养 3 d,使细胞的生长同步化. 2 500 r/min 离心 5 min 收集对数期细胞,并用 2.0 mol/L NaCl 溶液清洗细胞 3 次后,分别接种到不同培养基中,细胞密度为 $2.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,设置 3 个平行,24 h 连续光照培养. 2 500 r/min 离心 30 s,收集不同培养条件下自然沉降的 *D. salina* 细胞,立即加入 -40°C 预冷的 60% 甲醇溶液(甲醇与水体积比为 3 : 2),淬灭 5 min,使细胞停止新陈代谢; 4°C 、2 500 r/min 离心 2 min,再用 2 mol/L NaCl 溶液清洗细胞两次,将清洗后的细胞置于液氮中淬灭 30 min 后, -80°C 冰箱冷冻保存^[21].

1.3 *D. salina* 胞内脂肪酸的提取及分析

D. salina 细胞内脂肪酸的提取、甲酯化(FAMES)及 GC-MS 条件参照 Lee 等^[24]的方法. 真空冷冻干燥后的 *D. salina* 干粉放入含聚四氟乙烯的脂肪酸提取液中(三氯甲烷与甲醇体积比为 2 : 1),加入 80 $\mu\text{g/mL}$ 正十九烷酸甲醇溶液 10 μL ,涡旋 1 min,超声 30 min,加入 10% 盐酸甲醇溶液 1.2 mL, 80°C 水浴 1 h; 冷却至室温,加入 1.0 mL 正己烷及 1.0 mL NaCl 饱和水溶液,涡旋 1 min 后,10 000 r/min 离心 5 min,取正己烷层,0.22 μm 有机滤膜过滤后进行 GC-MS 检测分析.

1.4 *D. salina* 胞内代谢物提取及分析

D. salina 细胞代谢物的提取、衍生化及 GC-MS 条件参照 Weckwerth 等^[25]的方法并进行修改. 称取 50 mg 在液氮中磨碎的样品并加入 1 mL 预冷的提取液(甲醇与水体积比为 1 : 1)和 5 μL 内标物质(1.5 mg/mL 的氘标记的丁二酸),涡旋 3 min,置于液氮中 2 min,冰上溶解,重复 4 次. 10 000 r/min 离心 5 min,取 400 μL 上清液置于液氮中冷冻 30 min,真空冷冻干燥;加入 20 mg/mL 甲氧基铵盐酸盐/吡啶溶液 50 μL ,涡旋溶解, 40°C 反应 80 min;加入 80 μL N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA),混合, 40°C 反应 80 min; 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 GC-MS 检测分析.

1.5 数据处理

数据处理均采用 Origin 8.5 进行统计学分析. 脂肪酸与代谢物的鉴定使用 NIST 数据库(2011),采用每种物质的特征离子的单位质量色谱图的峰面积进行相对定量. 数据进行中心化预处理和均值尺度化

预处理, 代谢物数据归一化后导入 SIMCA (ver.11.5) 软件中进行 PCA 和 PLS 多元统计分析. 使用 HCE 3.5 软件对数据进行层次聚类分析.

2 结果与分析

2.1 胞内代谢物的 GC-MS 检测与分析

利用 GC-MS 同时对氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件及 CM 条件下 *D. salina* 细胞内的代谢物进行检测, 共检测到 80 种代谢物(表 1), 对部分代谢物进行了定量分析, 包括 16 种氨基酸、12 种脂肪酸、20 种糖类、1 种无机酸、11 种有机酸、12 种醇类物质、5 种胺类物质以及 NIST 数据库(2011)不能识别的 3 种代谢物.

表 1 完全培养与氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 胞内小分子代谢物的定性定量

Tab.1 Quantitative and qualitative analysis of intracellular metabolites in *D. salina* under complete nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

种类	成分	含量/%	
		-N-P-S	CM
氨基酸	N,N-二甲基甘氨酸	5.05 ± 0.53	26.4 ± 7.4
	缬氨酸	3.00 ± 0.27	9.26 ± 1.37
	丙氨酸	5.35 ± 0.53	27.4 ± 5.1
	亮氨酸	4.34 ± 0.07	4.74 ± 0.98
	异亮氨酸	ND	3.31 ± 0.30
	L-正缬氨酸	1.29 ± 0.09	7.19 ± 0.48
	丝氨酸	ND	34.4 ± 2.2
	苏氨酸	3.54 ± 1.17	17.5 ± 1.3
	丝氨酸	4.30 ± 0.46	16.7 ± 4.9
	N,O,O-三(三甲基甲硅烷基)-L-苏氨酸	2.04 ± 0.36	6.17 ± 1.00
	DL-鸟氨酸	125 ± 8	306 ± 56
	N-α-乙酰基-L-赖氨酸	6.34 ± 0.74	7.85 ± 0.73
	L-脯氨酸	24.3 ± 5.4	103 ± 22
	甘氨酸-L-谷氨酸	26.2 ± 0.2	117 ± 18
	谷氨酸	7.75 ± 1.02	24.0 ± 10.0
	L-赖氨酸	ND	37.4 ± 15.2
糖类	D-(-)-赤藓糖	7.38 ± 0.88	ND
	L-(-)-海藻糖	5.01 ± 0.55	13.3 ± 1.6
	D-(-)-核糖	5.33 ± 0.96	13.2 ± 2.1
	D-(-)-塔格糖	2.38 ± 0.21	ND
	L-(-)-山梨糖	2.36 ± 0.25	ND
	D-(-)-果糖	2.98 ± 0.35	ND
	D-半乳糖	9.45 ± 0.65	28.7 ± 3.34
	D-(+)-塔罗糖	6.45 ± 0.26	10.9 ± 0.3
	D-甘露糖	1.75 ± 0.11	ND
	D-葡萄糖	11.0 ± 3.1	7.80 ± 0.94
	2-脱氧-D-核糖	14.6 ± 0.8	ND
	D-赤藓糖	36.7 ± 3.6	53.9 ± 5.2
	D-核酮糖	68.2 ± 5.7	ND

糖类	D-乳糖	10.8 ± 2.9	ND
	麦芽糖	7.87 ± 2.18	ND
	乳糖	ND	43.0 ± 1.0
	D-果糖	13.8 ± 2.3	ND
	D-甘露糖	26.8 ± 3.1	26.4 ± 0.9
	蔗糖	282 ± 23	222 ± 15
	D-(+)-纤维二糖	2.47 ± 0.51	2.52 ± 0.46
脂肪酸	辛酸	3.71 ± 2.05	ND
	壬酸	5.09 ± 0.20	15.5 ± 2.0
	正十二烷酸	ND	4.37 ± 0.22
	十六烷酸	188 ± 10	629 ± 13
	反式-9-十八碳烯酸	178 ± 13	382 ± 37
	顺式-11-二十碳烯酸	ND	154 ± 8
	顺式-13-二十碳烯酸	55.3 ± 7.8	60.39 ± 4.1
	11-二十碳烯酸	22.1 ± 3.5	21.2 ± 2.3
	癸酸	1.45 ± 0.33	4.03 ± 0.29
	顺式-13-二十二碳烯酸	182 ± 18	554 ± 30
酸类	二十二烷酸	24.4 ± 6.3	54.1 ± 5.0
	十八烷酸	157 ± 4	558 ± 12
	L-乳酸	179 ± 4	142 ± 17
	乙酸	1.94 ± 0.17	5.04 ± 0.28
	乙二酸	112 ± 7	351 ± 15
	2,3,4-三羟丁酸	2.14 ± 0.17	7.48 ± 0.29
	戊二酸	6.51 ± 0.33	25.4 ± 0.7
	磷酸	28.4 ± 1.0	36.3 ± 1.2
	壬二酸	25.0 ± 5.3	56.6 ± 7.6
	丙酸	19.6 ± 4.6	90.7 ± 6.3
醇类	2-酮戊二酸	40.1 ± 2.3	45.2 ± 2.4
	癸二酸	ND	21.0 ± 0.7
	脱氧胆酸	1.76 ± 0.24	6.64 ± 1.14
	L-抗坏血酸	6.48 ± 0.55	10.8 ± 2.2
	丙三醇	962 ± 51	2 698 ± 249
	戊二醇	7.42 ± 1.04	18.2 ± 1.3
	D-赤式-戊糖醇	4.65 ± 0.41	13.5 ± 1.4
	D-(+)-阿拉伯醇	2.95 ± 0.18	15.7 ± 1.6
	L-(-)-阿拉伯醇	1.40 ± 0.08	4.53 ± 0.16
	木糖醇	7.96 ± 0.34	9.93 ± 0.15
胺类	核糖醇	17.7 ± 1.1	46.9 ± 8.7
	L-海藻糖醇	1.24 ± 0.09	ND
	D-甘露醇	ND	19.3 ± 0.5
	D-山梨醇	ND	4.91 ± 0.42
	肌醇	11.2 ± 1.8	28.1 ± 3.5
	丁四醇	16.9 ± 0.7	36.8 ± 0.3
	乙酰胺	23.9 ± 2.3	79.2 ± 16.5
	1,5-戊二胺	65.0 ± 3.5	161 ± 31
	3-羟甲基甲胺	7.97 ± 0.18	24.5 ± 0.3
	尿素	2.62 ± 0.22	5.98 ± 0.68
其他	L-天冬酰胺	13.1 ± 0.3	ND
	未知 1	71.4 ± 5.7	188 ± 45
	未知 2	8.91 ± 0.15	16.0 ± 0.9
	未知 3	24.4 ± 1.8	ND

注: ND 表示未检出.

对这些数据采用 PCA 和 PLS 进行多元统计分析. 通过主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 与偏最小二乘法 (partial least squares, PLS)

统计结果比较(表 2),可以看出建立的 PCA 模型的 $R^2 X$ 和 Q^2 及 PLS 模型的 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 和 Q^2 的值均在 0.8 以上,甚至 PLS 中 $R^2 Y$ 和 Q^2 的值为 1,由此看出各取样点数据 PLS 模型的拟合和预测能力都较好。

表 2 PCA 与 PLS 模型建立的主要统计学数据

Tab.2 Statistical data from PCA and PLS at different culture conditions

样品	PCA		PLS		
	$R^2 X$	Q^2	$R^2 X$	$R^2 Y$	Q^2
<i>D. salina</i> (-N-P-S)	0.999	0.851	0.999	1	1

2.2 胞内代谢物的多元化统计分析

2.2.1 PCA 分析

由两种培养条件下 *D. salina* 样本的主成分 PCA 得分图看出(图 1(a)),两组样品的 4 个平行中,虽然在第二主成分上有离散现象,但在第一主成分上能紧密结合,并且第一主成分的贡献率高达 99.6%,并且两种条件下的样品存在明显的离散分组现象.这也说明 *D. salina* 在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下细胞内代谢物和 CM 也是存在较大差异。

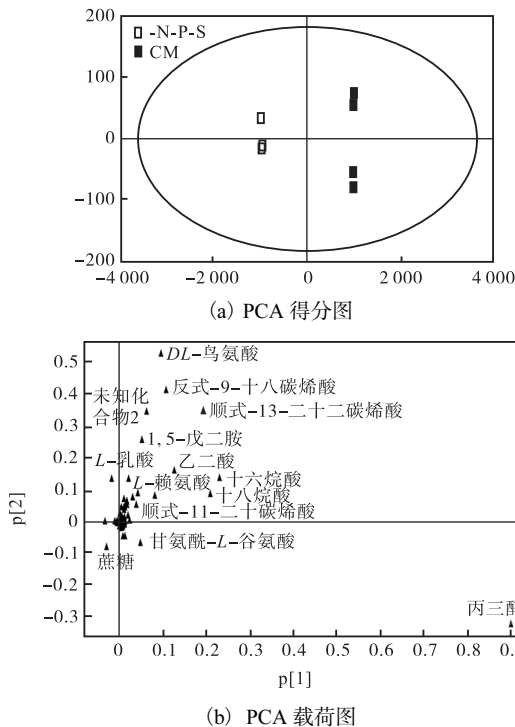


图 1 *D. salina* 在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 PCA 得分图和载荷图
Fig.1 PCA score plot and loading plot of samples from *D. salina* under nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

由两种培养条件下 *D. salina* 样本的 PCA 载荷图(图 1(b))可知,两种培养条件下出现的贡献率较大的代谢物有 *DL*-鸟氨酸、蔗糖、丙三醇、十六烷酸、

十八烷酸、顺式-13-二十二碳烯酸、反式-9-十八碳烯酸、顺式-11-二十碳烯酸、*L*-赖氨酸、*L*-乳酸、乙二酸、1,5-戊二胺等.这一结果仍需要 PLS 进行验证。

2.2.2 PLS 分析

由两种培养条件下 *D. salina* 样本的 PLS 得分图(图 2(a))显示氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下的代谢物和 CM 条件有明显的差异,并且两种主成分能代表大部分代谢物的变化.由两种培养条件下 *D. salina* 样本的 PLS 载荷图(图 2(b))可以得出,样品中贡献率较大的代谢物有蔗糖、丙三醇、*L*-乳酸、*DL*-鸟氨酸、十六烷酸、反式-9-十八碳烯酸、顺式-13-二十碳烯酸、顺式-11-二十碳烯酸、*L*-赖氨酸、壬二酸、*D*-核酮糖、*L*-脯氨酸。

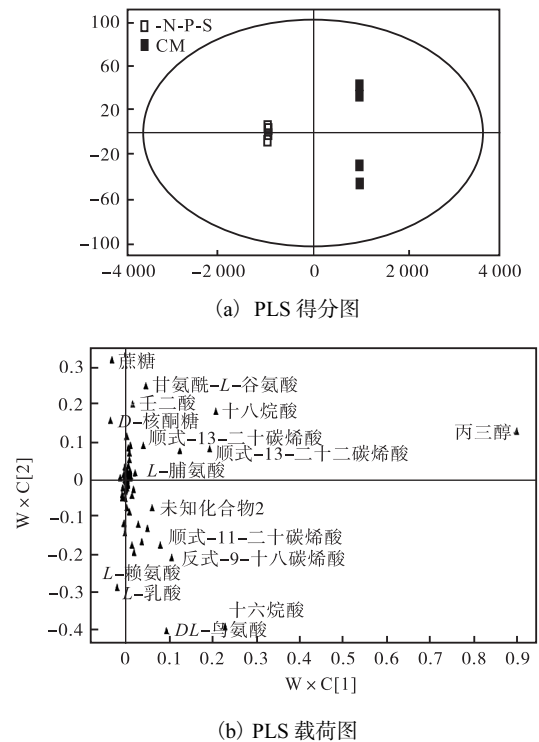


图 2 *D. salina* 在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 PLS 得分图和载荷图
Fig.2 PLS score plot and loading plot of samples from *D. salina* under nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

与 PCA 的载荷图相比,相同的代谢物有蔗糖、丙三醇、*L*-乳酸、*DL*-鸟氨酸、十六烷酸、反式-9-十八碳烯酸、顺式-13-二十碳烯酸、顺式-11-二十碳烯酸、*L*-赖氨酸,说明两种培养条件下这 9 种代谢物差异最为显著.通过截留 VIP 图(图 3)上数值大于 1.0 的代谢物,发现在 -N-P-S 条件下代谢物累计贡献率由大到小依次是:丙三醇、十六烷酸、十八烷酸、顺式-13-二十碳烯酸、乙二酸、反式-9-十八碳烯酸、

DL-鸟氨酸。

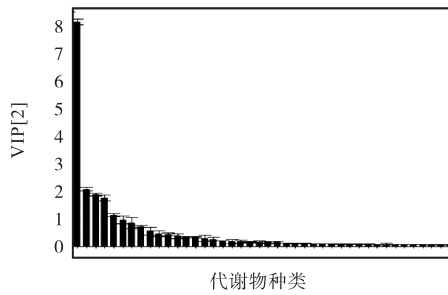


图3 氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 细胞 VIP 图
Fig. 3 VIP results of samples from *D. salina* under nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

2.2.3 HCA 分析

将实验中测定的氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下及 CM 条件下的 *D. salina* 的 GC-MS 数据经过归一化和标准化后进行层次聚类分析(图 4)。不同

实验组间的 4 个平行样本间分别划分为一类,说明样本平行性较好,并且通过 HCA 分析结果发现各种代谢物的差异比较明显,该结果与 PLS、PCA 的分析结果基本上一致。

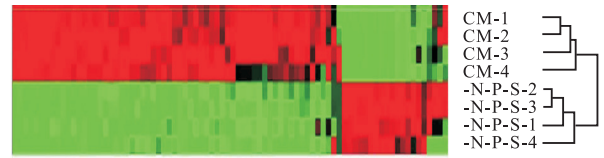
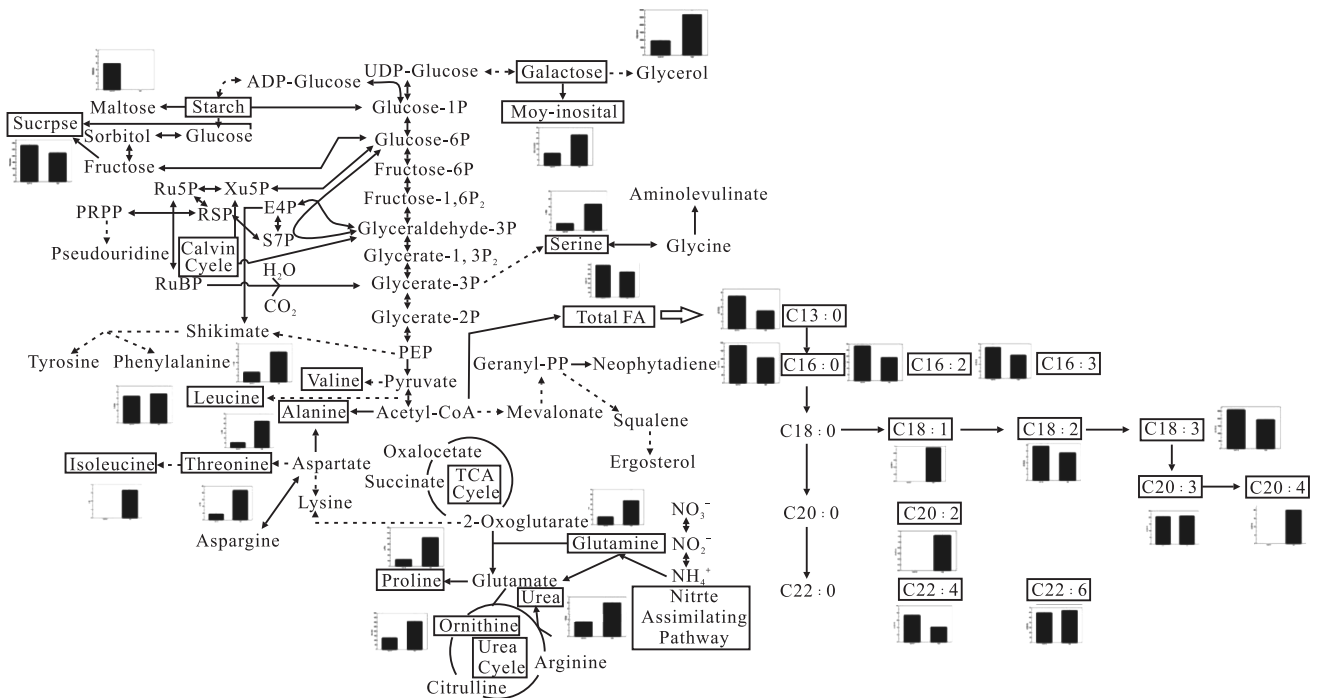


图4 氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 层次聚类分析
Fig. 4 HCA results of samples from *D. salina* under nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

2.2.4 与碳中心代谢相关的代谢物分析

图 5 为氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 细胞内卡尔文、TCA 循环、氨基酸和脂肪酸等代谢变化图。



柱形图中:左侧柱为氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件,右侧柱为 CM 条件

图5 氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 细胞内卡尔文、TCA 循环、氨基酸和脂肪酸等代谢变化图

Fig. 5 Changes in the metabolites from *D. salina* (Calvin, TCA cycle, amino acids and fatty acids) under nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

D. salina 细胞内与碳代谢相关的代谢物的变化如图 6 所示. 碳代谢通路上的其他代谢物,如氨基酸、尿素等的含量在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下均有不同程度的减少,脯氨酸、谷氨酸和 2-酮戊二酸也仅为 CM 条件下的 41.0%、23.6%和 88.7%,显示了胞内的 TCA 循环、尿素循环及氨基酸的合成

均受到严重影响,并且这些变化造成了蛋白质代谢受阻、抗氧化酶活力减弱、有机酸合成减少. 虽然氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下仍能检测到海藻糖、山梨糖,但是其含量相对较少,并且对于塔罗糖来说,其含量也仅为 CM 条件下的 59.2%。

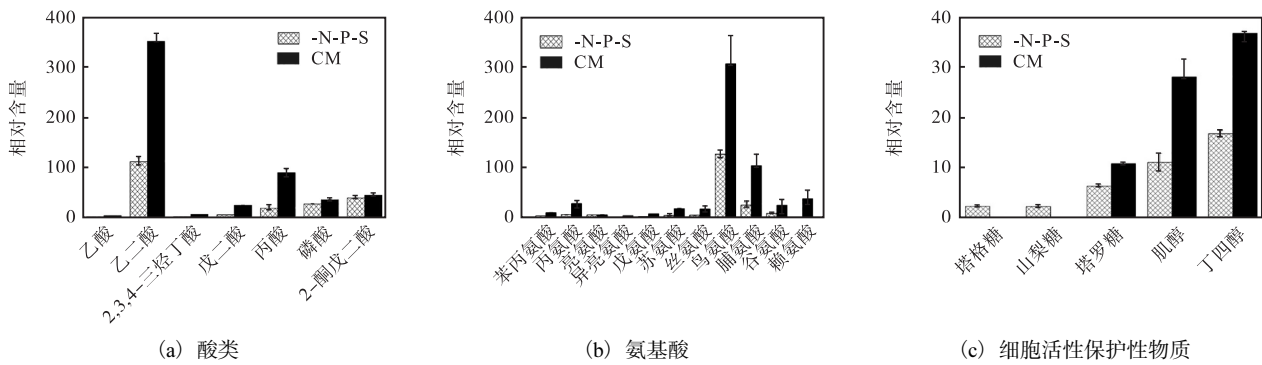


图 6 *D. salina* 细胞内与碳代谢相关的代谢物的变化

Fig. 6 Variations of metabolites associated with carbon metabolism in *D. salina*

2.2.5 细胞内脂肪酸的变化

在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下培养的细胞共检测到脂肪酸 12 种(表 3), 其中含量最多的脂肪酸, 在饱和脂肪中为十六烷酸; 在不饱和脂肪酸中为 9, 12, 15-十八碳三烯酸. 两种脂肪酸的含量占了总脂肪酸的 62.2% .

表 3 完全培养与氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下 *D. salina* 细胞内脂肪酸含量的变化

Tab. 3 Fatty acid composition of *D. salina* under complete nitrogen/phosphorus/sulfur co-deprivation

脂肪酸	CX:Y	含量/%	
		-N-P-S	CM
十三烷酸	(13 : 0)	0.62 ± 0.08	0.45 ± 0.02
十六烷酸	(16 : 0)	26.1 ± 0.7	23.0 ± 0.4
十七烷酸	(17 : 0)	1.02 ± 0.14	0.81 ± 0.09
Σ饱和脂肪酸		27.7 ± 0.9	24.2 ± 0.5
9-十六碳烯酸	(16 : 1)	1.71 ± 0.13	2.28 ± 0.04
10-十八碳烯酸	(18 : 1)	ND	0.17
7,10-十六碳二烯酸	(16 : 2)	3.95 ± 0.25	3.45 ± 0.09
7,10-十八碳二烯酸	(18 : 2)	0.80 ± 0.03	0.85
9,12-十八碳二烯酸	(18 : 2)	12.7 ± 0.5	11.5 ± 0.1
10,13-二十碳二烯酸	(20 : 2)	ND	0.22 ± 0.01
γ-亚麻酸	(16 : 3)	1.25 ± 0.09	1.22
9,12,15-十八碳三烯酸	(18 : 3)	36.1 ± 0.2	35.4 ± 0.4
cis-5,8,11-二十碳三烯酸	(20 : 3)	2.88 ± 0.13	3.87 ± 0.06
5,8,11,14-二十碳四烯酸	(20 : 4)	3.52 ± 0.21	3.65 ± 0.14
6,9,12,15-二十二碳四烯酸	(22 : 4)	1.03 ± 0.22	0.75 ± 0.04
4,7,10,13,16,19-二十碳六烯酸	(22 : 6)	8.30 ± 0.46	11.7 ± 0.2
Σ不饱和脂肪酸		72.3 ± 2.3	75.1 ± 1.0
总脂肪酸		691 ± 27	547 ± 14

注: ND 为未检出.

在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下与 CM 条件相比, 饱和脂肪酸所占比例上升, 不饱和脂肪酸所占比例下降, 其中十六烷酸及饱和脂肪酸所占的比例是 CM 条件下的 1.1 和 1.2 倍; 但是, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的含量总体上升, 总脂肪酸的含量是 CM 条件下的 1.3 倍, 这为类胡萝卜素的积累提供了

更多的靶点, 这也是胞内氮代谢及其他碳代谢途径受阻, 造成更多的还原力和碳骨架转向脂肪酸的合成^[26].

3 结 论

在氮源、磷源、硫源共同饥饿胁迫条件下, *D. salina* 胞内代谢物含量出现显著变化, 总脂肪酸增加, 其中饱和脂肪酸所占比例上升, 不饱和脂肪酸所占比例下降. 通过 GC-MS 检测出 80 种代谢产物, 相对水平下作为内含物的蔗糖和麦芽糖增加, 卡尔文循环、TCA 循环、尿素循环的一部分代谢中间体明显减少. 具有保护作用的脯氨酸、谷氨酸和 2-酮戊二酸含量也明显减少. 这对于盐生杜氏藻类胡萝卜素代谢途径调控机制的阐明与代谢工程构建盐生杜氏藻细胞工厂具有参考意义.

参考文献:

[1] Benamotz A, Avron M. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*[J]. Plant Physiology, 1973, 51 (5) : 875-878.

[2] Lamers P P, Janssen M, De Vos R C, et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162 (1) : 21-27.

[3] Coesel S N, Baumgartner A C, Teles L M, et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10(5) : 602-611.

[4] Tafreshi A H, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications[J]. Journal of Applied Micro-

- biology, 2009, 107(1): 14–35.
- [5] Tran D, Doan N, Louime C, et al. Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 317–322.
- [6] Leach G, Oliveira G, Morais R. Production of a carotenoid-rich products by alginate entrapment and fluid-bed drying of *Dunaliella salina*[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1998, 76(2): 298–302.
- [7] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(1): 217–232.
- [8] Harun R, Singh M, Forde G M, et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(3): 1037–1047.
- [9] Avron M. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation[J]. Plant Physiology, 1989, 91(3): 1040–1043.
- [10] Rao A V, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review[J]. Nutrition Research, 1999, 19(2): 305–323.
- [11] Törnwall M E, Virtamo J, Korhonen P A, et al. Effect of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study[J]. European Heart Journal, 2004, 25(13): 1171–1178.
- [12] Ye Z W, Jiang J G, Wu G H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(4): 352–360.
- [13] Lamers P P, Cc V D L, Kaasenbrood P S, et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 106(4): 638–648.
- [14] Rabbani S, Beyer P, Lintig J, et al. Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*[J]. Plant Physiology, 1998, 116(4): 1239–1248.
- [15] Mendoza H, Martel A, Río M J D, et al. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*[J]. Journal of Applied Phycology, 1999, 11(1): 15–19.
- [16] Pisal D S, Lele S S. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2005, 4(4): 476–483.
- [17] Ramos A, Coesel S, Marques A, et al. Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* Lcy- β gene encoding a functional lycopene β -cyclase[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 79(5): 819–828.
- [18] Lv H, Cui X, Wahid F, et al. Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation[J]. PloS One, 2016, 11(3): e0152226.
- [19] H L, X C. Metabolic profiling of *Dunaliella salina* shifting cultivation conditions to nitrogen deprivation [J]. Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development, 2016, 6(1): 1000170.
- [20] Salguero A, De L M B, Vigara J, et al. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(6): 249–253.
- [21] Lv H, Cui X, Tan Z, et al. Analysis of metabolic responses of *Dunaliella salina* to phosphorus deprivation [J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(3): 1251–1260.
- [22] Johnson M K, Johnson E J, Macelroy R D, et al. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*[J]. Journal of Bacteriology, 1968, 95(4): 1461–1468.
- [23] Borowitzka M A. Carotenoids, Vitamins and Fine Chemicals from Microalgae[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986: 398–401.
- [24] Lee S Y, Kim S H, Hyun S H, et al. Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(6): 996–1004.
- [25] Weckwerth W, Wenzel K, Fiehn O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks[J]. Proteomics, 2004, 4(1): 78–83.
- [26] Hockin N L, Mock T, Mulholland F, et al. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants[J]. Plant Physiology, 2011, 158(1): 299–312.