

# 亚硒酸钠对蛋白核小球藻生长及生物转化的影响

倪婕, 余炼, 唐亚倩, 林子楹, 白云霞, 刘小玲

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

**摘要:** 本文研究了亚硒酸钠对海水培养蛋白核小球藻的生长和有机硒转化能力的影响, 以及富硒蛋白核小球藻中的主要硒形态。通过分批等量添加 2  $\mu\text{g/mL}$  至 50  $\mu\text{g/mL}$  的亚硒酸钠, 确定最佳富硒培养浓度, 并采用高效液相色谱法检测藻体中亚硒酸钠、硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸三种主要硒形态的含量。结果表明: 亚硒酸钠浓度不宜过高, 否则蛋白核小球藻的生长受到抑制。硒浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$  时小球藻的生物量较高, 有机硒含量达到 301.40  $\mu\text{g/g}$ , 占总硒含量的 83.24%; 高效液相色谱分析表明在该培养条件下富硒小球藻中有机硒的主要形态为硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸; 在测定的三种主要硒形态中未转化的亚硒酸钠仅占 23.02%。上述结果说明在海水培养下, 小球藻富硒培养的适宜外加硒浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$ , 此条件下长势良好, 无机硒得到有效转化, 有机硒含量较高, 可达到富硒要求。

**关键词:** 蛋白核小球藻; 硒; 亚硒酸钠; 生物富集; 生物量

文章编号: 1673-9078(2019)11-176-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.025

## Effect of Sodium Selenite on the Growth and Biotransformation of *Chlorella pyrenoidosa*

NI Jie, YU Lian, TANG Ya-qian, LIN Zi-ying, BAI Yun-xia, LIU Xiao-ling

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** In this paper, the effects of sodium selenite on the growth of marine cultured *Chlorella pyrenoidosa* and the transformation ability of organic selenium, as well as the main selenium form in the selenoprotein-rich *Chlorella* were studied. The optimal selenium-enriched culture concentration was determined by adding 2  $\mu\text{g/mL}$  to 50  $\mu\text{g/mL}$  sodium selenite in batches, and the content of three main selenium forms in algae was determined by HPLC: sodium selenite, selenocysteine and selenomethionine. The results showed that the concentration of sodium selenite should not be too high, otherwise the growth of *Chlorella pyrenoidosa* was inhibited. When the concentration of selenium was 2  $\mu\text{g/mL}$ , the biomass of *Chlorella* was high, and the content of organic selenium reached 301.40  $\mu\text{g/g}$ , accounting for 83.24% of the total selenium content. HPLC analysis showed that the main forms of organic selenium in Selenium-enriched *Chlorella* were selenocysteine and selenomethionine under the culture conditions, and the unconverted sodium selenite accounted for only 23.02% of the three major selenium forms determined. The above results indicate that under seawater culture, the suitable selenium concentration for selenium-enriched culture of *Chlorella* is 2  $\mu\text{g/mL}$ . Under these conditions, the *Chlorella pyrenoidosa* grows well; the inorganic selenium is effectively converted, and the content of organic selenium is high, which can meet the requirement of selenium enrichment.

**Key words:** *Chlorella pyrenoidosa*; selenium; sodium selenite; bioaccumulation; biomass

硒 (Se) 是人体的必要微量元素, 是生命代谢中谷胱甘肽过氧化物酶系的组成成分, 缺硒会引发免疫缺陷、克山病、心脏病等疾病<sup>[1]</sup>。中国营养学会推荐成人的硒摄入量为 60  $\mu\text{g/d}$ , 可耐受最高摄入量为 400  $\mu\text{g/d}$ <sup>[2]</sup>。对硒的营养研究表明, 有机硒的安全性、生物利用度和抗癌作用优于无机硒<sup>[3]</sup>。人们可通过富硒

收稿日期: 2019-06-25

基金项目: 广西创新驱动发展重大专项 (桂科 AA17202010-3; 桂科 AA17204075)

作者简介: 倪婕 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养健康产品开发

通讯作者: 余炼 (1971-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

食用菌、茶叶、大米等<sup>[4]</sup>实现补硒, 这些富硒食品一般在培养介质中添加亚硒酸盐等无机硒, 通过生物体吸收转化为有机硒。由于无机硒在水体中的高溶解度, 使得水生生物能更好的利用无机硒, 其中微藻是硒的主要吸收者<sup>[5]</sup>。据报道, 至少有 33 种微藻的生长离不开硒<sup>[6]</sup>。Gojkovic Z<sup>[7]</sup>等人的研究表明绿藻可以稳定地吸收无机硒, 并通过硫同化代谢途径将无机硒结合到氨基酸中, 从而转化为有机形态。

海水培养的藻类营养成分高<sup>[8]</sup>、体积更大, 易自然沉降, 更利于藻体收集。已有报道指出经海水培养的螺旋藻生长速度快, 品质高, 目前已实现商业化生

产<sup>[9]</sup>；李嘉颖等<sup>[8]</sup>研究发现 3%盐度下培养的栅藻中蛋白质、虾青素等营养物质显著提高。由此可见，海水培养的微藻产业具有良好的前景。

目前国内外对小球藻的富硒研究主要集中在普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*)<sup>[10-13]</sup>，对可食用的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 的富硒研究较少。2012 年，蛋白核小球藻被卫生部公布为新资源食品，也是目前唯一公布的可食用小球藻。蛋白核小球藻的叶绿体含有特殊的类黄酮，使其对硒的富集能力不同于普通小球藻<sup>[14]</sup>。硒进入藻体后主要与蛋白质结合，形成硒蛋白，能够显著提高微藻的生物活性，而且蛋白核小球藻的蛋白质含量可高达 50%以上<sup>[15]</sup>，不仅是良好的有机硒转化载体，也是优质的蛋白质资源，因此本文选择蛋白核小球藻进行富硒培养研究。

硒浓度较高时，对小球藻会产生抑制作用<sup>[16]</sup>，甚至导致小球藻过早死亡沉淀。因此，本实验主要研究 2 mg/L 至 50 mg/L 亚硒酸钠对海水培养的蛋白核小球藻生长的影响，并采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 技术测定有机硒转化能力。研究表明，小球藻优先将亚硒酸盐代谢为硒蛋白和各种硒氨基酸，尤其是硒代半胱氨酸 (SeCys)、硒代蛋氨酸 (SeMet)<sup>[17]</sup>；除此以外，还有一些有机硒组分可能存在于多糖、脂肪中。本实验采用酶解法<sup>[18]</sup>对富硒小球藻硒化合物进行提取，采用高效液相色谱 (HPLC) 技术测定亚硒酸钠、硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸 3 种常见硒形态。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

蛋白核小球藻，北海生巴达生物科技有限公司；硝酸钠、磷酸氢二钠、维生素、硅酸钠、痕量金属、亚硒酸钠、乙酸铵、国产分析纯试剂；硝酸 (65%)、甲醇，色谱级，德国默克公司；多元素混合标准溶液，中国计量科学研究院；调谐液 (Ce、Co、Li、Mg、Tl、Y)，内标溶液 (Li、Sc、Ge、Rh、In、Tb、Lu、Bi)，美国 Agilent 公司；硒代蛋氨酸 (SeMet)、甲基硒代半胱氨酸 (SeCys)，标准品，美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪器设备

电感耦合等离子体质谱仪 (7700 ICP-MS 型)，美国安捷伦科技有限公司；人工气候箱 (RQH-150 型)，郑州生元仪器有限公司；紫外可见分光光度计 (Mapada UV-6100 Double Beam Spectrophotometer 型)，上海美谱达仪器有限公司；高效液相色谱仪 (Waters e2695 型，2998PDA 检测器)；智能微波消解

仪 (XT-9900A 型)，上海新拓科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 培养条件

采用人工海水配制 f/2 培养基<sup>[19]</sup>，按藻液与培养基以 1:1(V/V)的比例接种至 500 mL 三角瓶，对数期接种，调节初始藻密度 OD<sub>680 nm</sub> 为 0.20，置于人工气候箱中，培养条件为：温度 22 °C，湿度 60%，光照强度 5000 Lx，光暗比 14 h:10 h，每天定时摇动 3 次。

#### 1.3.2 富硒培养

待蛋白核小球藻生长至对数期 (OD<sub>680 nm</sub> 为 0.2) 后，连续 6 d 在同一时间于培养液中定量加入亚硒酸钠，使硒总加入量分别达 2、5、10、15、20、25、30、40、50 μg/mL 每个浓度设 3 个平行，以不添加硒的小球藻作空白对照，至第 8 d 收集藻体。

#### 1.3.3 富硒小球藻生长曲线的测定

参照吕蓉等<sup>[2]</sup>方法，每天在同一时间取藻液测其在 680 nm 处的吸光度。

#### 1.3.4 蛋白核小球藻的收集及生物量的测定

将藻液倒入砂芯抽滤装置收集藻体，并反复用水冲洗以去除附在上面的无机硒，将所得的藻体冷冻干燥，计算其生物量。

#### 1.3.5 硒的测定

##### 1.3.5.1 样品前处理

总硒：准确称取 0.2 g 干燥藻粉，加入 5 mL 浓硝酸后静置过夜进行预消解，加 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 并旋紧罐盖置于微波消解仪上，消解条件参照国标 GB 5009.268-2016，消解至混合液无色透明。冷却后用水定容至 10 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

无机硒<sup>[20]</sup>：准确称取 0.1 g 干燥藻粉，加入 10 mL 盐酸 (15%) 提取无机硒，在电热板上加热煮沸并及时补加直到混合液澄清，冷却后，离心数次至完全去除沉淀，将上清液用盐酸 (15%) 定容至 10 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

##### 1.3.5.2 ICP-MS 测硒含量

将空白试剂、硒系列标准液、样品溶液 (总硒、无机硒) 按顺序导入进样系统，测定待测元素和内标元素的信号响应值，由仪器得到标准曲线，根据回归方程测得试样中待测元素的浓度。

有机硒的含量 = 总硒含量 - 无机硒含量

$$\text{有机硒比率 (\%)} = \frac{\text{藻体有机硒含量}}{\text{藻体总硒含量}} \times 100\%$$

#### 1.3.6 富硒蛋白核小球藻中硒的形态测定

用超纯水配制质量浓度分别为 0、1、10、100、500、1000 μg/L 的一系列 3 种硒化合物的混合标准溶

液, 即亚硒酸钠、甲基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸, 过 0.22 μm 滤膜, 所得滤液为标品液。样品处理参考陈贵宇等<sup>[18]</sup>人的方法, 取富硒浓度为 2 μg/mL 的蛋白核小球藻样品 0.3 g, 加入 30 mL 浓度为 10 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液, 超声 30 min, 10000 r/min 离心 15 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 所得滤液为样品液。

色谱分离条件参考仲娜<sup>[21]</sup>等方法稍作改动:

项目	参数
色谱柱	Welch XB-C18 柱 (250×4.6 mm, 5 μm)
流动相	超纯水 (A); 甲醇 (B)
流速	1.00 mL/min
进样体积	10 μL
洗脱条件	97%/3% (V/V) 等度洗脱

### 1.3.7 实验处理与数据统计分析方法

实验图和表作图采用 Origin Pro 9.0 软件, 数据的统计与分析采用 SPSS 19.0 软件, 每组实验重复三次,  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 硒对蛋白核小球藻生长的影响

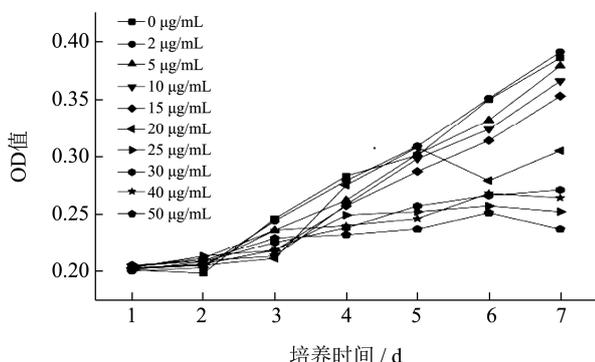


图 1 不同外加硒浓度下蛋白核小球藻的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *C. pyrenoidosa* exposed to selenium at different concentrations

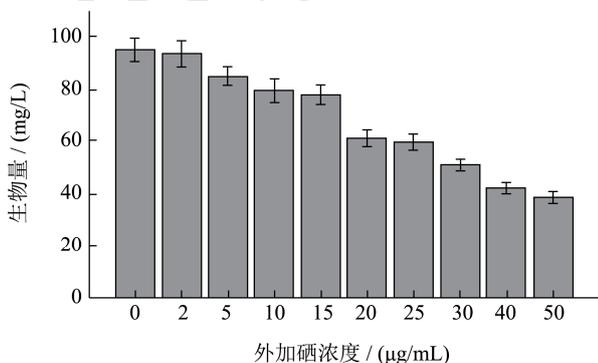


图 2 不同外加硒浓度下蛋白核小球藻的生物量

Fig.2 Biomass of *C. pyrenoidosa* exposed to selenium at different concentrations

第 6 d 起培养基中出现红硒, 藻体发黄继而死亡沉淀, 因此本实验培养时间定为 7 d。图 1 和图 2 为不同硒浓度下蛋白核小球藻的生长曲线和生物量, 从图 1 中可看出, 未加硒的对照组藻体长势良好, 在外加硒浓度为 2 μg/mL 时, 小球藻的生长曲线 OD 值与对照组无显著差异 ( $p > 0.05$ ), 生物量略低于对照组, 表明低浓度 (2 μg/mL) 对其生长不产生显著影响。随着加硒浓度的升高, 蛋白核小球藻的生物量逐渐减少, 说明高浓度硒对其产生抑制; 过高的硒环境导致生长速率降低, 光合作用被抑制和细胞超微结构受损<sup>[22]</sup>, 且抑制作用随着硒浓度的增长而变强。当硒浓度大于 20 μg/mL 时, 小球藻的生长缓慢并出现藻体死亡沉淀现象, 即该浓度产生了显著的致毒作用 ( $p < 0.05$ )。

吕蓉等<sup>[15]</sup>对海水培养的普通小球藻研究发现当硒浓度超过 1 mg/L 时产生抑制作用; 当硒浓度为 12 mg/L 时, 藻细胞停止生长; Yu Zhong 等<sup>[14]</sup>研究发现, 当  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度大于 40 mg/L 时对海水培养的蛋白核小球藻产生抑制作用; Yihong Zheng 等<sup>[23]</sup>对淡水雨生红球藻富硒培养发现, 低剂量亚硒酸盐 (3 mg/L) 对其细胞生长无显著影响, 但浓度高于 13 mg/L 时有一定的抑制作用; 周志刚等<sup>[24]</sup>对极大螺旋藻富硒培养发现超过 60 mg/L 硒浓度就产生抑制作用, 400 mg/L 浓度以上即引起藻死亡。本研究中蛋白核小球藻对亚硒酸钠较敏感, 当浓度大于 2 μg/mL 时受到抑制, 造成这种差异的原因是藻种, 硒添加方式, 培养基及培养条件的不同。有研究表明<sup>[25]</sup>, 藻细胞叶绿体中的叶绿素和硒结合后, 光合作用中电子传递的过程受到干扰影响了能量的转化, 造成细胞的营养供应不足, 进而导致死亡。而蛋白核小球藻中的叶绿素含量高于其他藻种<sup>[26]</sup>, 这可能是导致其对亚硒酸钠较敏感的原因之一。总体而言, 以上研究与本文对蛋白核小球藻的研究均表明高浓度硒对藻类的生长具有抑制作用。

此外, 随着富硒浓度的升高, 小球藻在加硒后期逐渐变黄, 这是由于藻体不能完全消化无机硒的毒性。本实验所有硒浓度培养下的小球藻在培养后期均产生红硒化现象, 生成了元素硒, 浓度越高, 红硒化越严重。文献资料表明, 元素硒的生成是由于生物体对体内未转化的无机硒产生解毒反应<sup>[27]</sup>。据此推测, 当浓度大于 2 μg/mL 时, 藻体过剩的无机硒对其产生了一定的毒性作用, 使 Se(IV) 转变为 Se(0), 进而聚集成元素硒析出。由于硒的潜在毒性, 综合不同加硒浓度下小球藻的生长情况及生物量变化, 低浓度硒处理 (2~20 μg/mL) 为最适合小球藻的富硒条件。

### 2.2 外加硒浓度对小球藻硒含量的影响

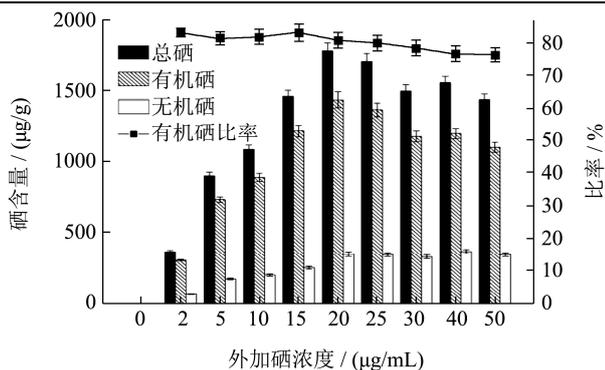


图3 不同外加硒浓度下小球藻总硒、有机硒和有机硒比率变化

Fig.3 Changes of total selenium, organic selenium and organic selenium ratio in *C. pyrenoidosa* exposed to selenium at different concentrations

在不影响藻类正常生长的前提下，提高培养液中无机硒的用量是为了获得高含量的生物硒。但图3的研究结果显示，小球藻的总硒不与添加的硒浓度成正比。随着富硒浓度的增加，小球藻总硒及有机硒含量呈上升趋势，在20 µg/mL浓度达到最大。不同外加硒浓度下有机硒的转化率在75%~85%之间，有机硒的转化率不随外加硒浓度的增加而上升，说明小球藻对亚硒酸钠的吸收和转化具有一定限度，过高的硒浓度不利于硒的吸收和积累。

Yu Zhong 等<sup>[28]</sup>研究发现淡水培养的蛋白核小球藻的有机硒水平在40 µg/mL条件下达到最大值337 µg/g；Xian Sun 等<sup>[29]</sup>研究显示淡水培养下的普通小球藻在75 mg/L亚硒酸钠培养下有机硒含量达到最大值316 µg/g。相比而言，本文海水培养的蛋白核小球藻对硒的富集和转化效果更好，在2 µg/mL条件下有机硒浓度即达到301.40 µg/g。李志勇等<sup>[30]</sup>研究表明硒主要与藻体中的蛋白质结合，而蛋白核小球藻属于高蛋白含量的微藻，是良好的富硒载体。

当硒添加浓度为20 µg/mL时，小球藻的总硒及有机硒含量达到最高，但其在停止加硒后，藻体逐渐变黄，且出现红硒沉淀，影响了小球藻的色泽及营养价值。而浓度为2 µg/mL时，小球藻长势良好，生物量较高，总硒含量达到362.09 µg/g，有机硒含量达到301.40 µg/g，有机硒转化率达到83.24%。按健康成人每天补硒60 µg计算，仅需要食用富硒藻粉约150 mg，即可达到补硒要求。因此在实际生产应用中选取浓度2 µg/mL为小球藻最佳富硒浓度，不仅可以获得较高的有机硒，而且从经济方面避免了过多地消耗亚硒酸钠的用量，对小球藻的生长也更加安全可靠。

### 2.3 富硒蛋白核小球藻中硒的形态分析

由表1可以看出，三种硒标准物质亚硒酸钠、甲

基硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸在0~1000 µg/L的质量浓度范围内线性良好。图4表明在2 µg/mL外加硒浓度下，蛋白核小球藻中亚硒酸钠含量为69.26 µg/g；硒代半胱氨酸含量为128.12 µg/g，硒代蛋氨酸含量为103.53 µg/g；在上述三种主要硒形态中有机硒占76.98%，未转化的亚硒酸钠仅占23.02%，进一步证明富硒蛋白核小球藻能将吸收的无机硒大部分转化为有机硒。根据上文有机硒含量为301.40 µg/g，可计算硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸共占总有机硒含量的76.85%，为富硒蛋白核小球藻中有机硒的主要形态。其他的有机硒可能存在于多糖和脂肪中。P. M. Neumann 等<sup>[31]</sup>通过硒酸盐的K-edge X射线吸收光谱研究表明，硒酸盐处理的小球藻在24 h内积累的87%的硒酸盐还原代谢物为SeMet、SeCys等中间有机化合物。Z. Gojkovic 等<sup>[17]</sup>研究表明小球藻在添加40 mg/L硒酸盐的培养基中，能够在120 h内积累高达140 mg/kg DW的硒代蛋氨酸。以上研究与本文结果说明小球藻能有效实现无机硒到有机硒的转化。本文测得的富硒蛋白核小球藻中的硒大部分属于有机硒，存在于蛋白质中的有机硒的主要形态为硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸，二者均是良好的营养补充剂，具有很高的生物可利用性。

表1 3种硒化合物的标准曲线线性参数

Table 1 Linear correlation coefficients of 3 selenium species

硒化合物	回归方程	相关系数 R <sup>2</sup>
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	y=385.9x+48734	0.9991
SeCys	y=7207.2x+2938.6	0.9997
SeMet	y=5966.9x+4664	0.9998

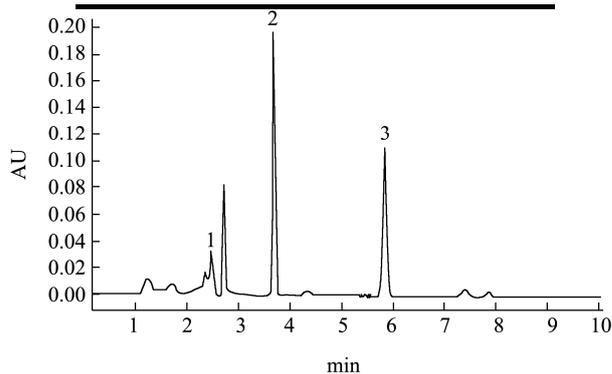


图4 2 µg/mL富硒蛋白核小球藻的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of *C. pyrenoidosa* exposed to selenium at 2 µg/mL

注：1. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>；2. SeCys；3. SeMet。

### 3 结论

本研究发现当外加亚硒酸钠浓度为2 µg/mL时，蛋白核小球藻长势良好，生物量较高，总硒含量达到

362.091  $\mu\text{g/g}$ , 有机硒含量达到301.404  $\mu\text{g/g}$ , 有机硒转化率达到83.24%; 外加亚硒酸钠浓度过高时, 海水培养的蛋白核小球藻的生长受到抑制。关于海水培养的蛋白核小球藻的研究较少, 本研究可在较低外加硒浓度下达到富硒要求, 这为工业化生产提供了一定的理论依据。富硒蛋白核小球藻能将吸收的无机硒大部分转化为有机硒, 高效液相色谱分析表明, 海水培养的蛋白核小球藻的硒代蛋氨酸含量达到103.53  $\mu\text{g/g}$ , 硒代半胱氨酸含量达到128.12  $\mu\text{g/g}$ 。本文通过研究不同浓度亚硒酸钠对海水培养的蛋白核小球藻生长量、细胞内硒含量及硒形态的影响, 有助于富硒食用藻的工业化生产及提高富硒小球藻的食用安全性; 采用ICP-MS技术系统及全面地检测富硒蛋白核小球藻中的总硒及有机硒含量, 并通过高效液相色谱对其中的主要硒形态及含量进行测定, 进一步验证了富硒小球藻中的无机硒得到了有效转化。

### 参考文献

- [1] 段亮亮. 硒的生理功能和富硒保健食品开发[J]. 现代食品, 2018, 1: 42-45  
DUAN Liang-liang. The physiological function of selenium and the development of selenium-rich health food [J]. Modern Food, 2018, 1: 42-45
- [2] 王张民, 袁林喜, 朱元元, 等. 我国富硒农产品与土壤标准研究[J]. 土壤, 2018, 50(6): 1080-1086  
WANG Zhang-min, YUAN Lin-xi, ZHU Yuan-yuan, et al. On standards of selenium enriched agricultural products and selenium-rich soil in China [J]. Soils, 2018, 50(6): 1080-1086
- [3] Rayman M P, Infante H G, Sargent M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation [J]. British journal of nutrition, 2008, 100(2): 238-253
- [4] 王光. 花生芽富硒的机理及有机硒的生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017  
WANG Guang. Mechanisms of organic selenium accumulating in peanut seedlings and the bioactivities of organic selenium [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [5] Saffari S, Keyvanshokoh S, Zakeri M, et al. Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquaculture nutrition, 2017, 23(3): 611-617
- [6] Araie H, Shiraiwa Y. Selenium utilization strategy by microalgae [J]. Molecules, 2009, 14(12): 4880-4891
- [7] Gojkovic Z, Garbayo I, Gomez Ariza J L, et al. Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae [J]. Algal research-biomass biofuels and bioproducts, 2015, 7: 106-116
- [8] 李嘉颖, 李涛, 谭丽, 等. 盐度对一株淡水栅藻 *Scenedesmus* sp. 生长及生化组成的影响[J]. 生物技术通报, 2017, 7: 155-161  
LI Jia-ying, LI Tao, TAN Li, et al. Effects of salinity on the growth and biochemical properties of a freshwater algae *Scenedesmus* sp. [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 7: 155-161
- [9] 向文洲, 李涛, 吴华莲, 等. 海水螺旋藻产业发展战略研究[J]. 广西科学, 2014, 6: 573-579  
XIANG Wen-zhou, LI Tao, WU Hua-lian, et al. The strategic studies on developing industry of seawater spirulina with efforts [J]. Guangxi Sciences, 2014, 6: 573-579
- [10] 刘少华, 蔡小宁, 陈舒泛, 等. 硒对异养小球藻生长及品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 9: 1805-1806  
LIU Shao-hua, CAI Xiao-ning, CHEN Shu-fan, et al. Effect of selenium (Se) on the growth and quality of *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 9: 1805-1806
- [11] 肖俊超, 郑丽丹, 李德立, 等. 硒胁迫对小球藻的生物学影响[J]. 水产学报, 2011, 3: 417-422  
XIAO Jun-chao, ZHENG Li-dan, LI De-li, et al. Biological effects of *Chlorella vulgaris* under the stress of selenium [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 3: 417-422
- [12] 吕蓉, 张波. 硒浓度对小球藻生长、生物富集的影响[J]. 盐业与化工, 2008, 4: 35-37  
LYU Rong, ZHANG Bo. Effects of selenium concentration on the growth and bioaccumulation of *Chlorella Pyrenoidosa* [J]. Journal of Salt Science and Chemical Industry, 2008, 4: 35-37
- [13] Babaei A, Ranglova K, Malapascua J R, et al. The synergistic effect of Selenium (selenite,  $-\text{SeO}_3^{2-}$ ) dose and irradiance intensity in *Chlorella* cultures [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 56
- [14] Zhong Y, Cheng J J. Effects of selenite on unicellular green microalga & IT *Chlorella pyrenoidosa* & IT: Bioaccumulation of selenium, enhancement of photosynthetic pigments, and amino acid production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(50): 10875-10883
- [15] 桂林, 史贤明, 李琳, 等. 蛋白核小球藻不同培养方式的比较[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 5: 55-58  
GUI Lin, SHI Xian-ming, LI Lin, et al. Comparison of the

- different cultivation systems for *Chlorella Pyrenoidosa*. [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2005, 5: 55-58
- [16] Araie H, Shiraiwa Y. Selenium utilization strategy by microalgae [J]. *Molecules*, 2009, 14(12): 4880-4891
- [17] Gojkovic Ž, Garbayo I, Ariza J L G, et al. Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae [J]. *Algal Research*, 2015, 7: 106-116
- [18] 陈贵宇,潘煜辰,李清清,等.高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法分析富硒茶叶中硒的形态[J].食品科学,2018,39(8): 155-159  
CHEN Gui-yu, PAN Yu-chen, LI Qing-qing, et al. Speciation analysis of selenium in selenium-enriched tea by HPLC-ICP-MS [J]. *Food Science*, 2018, 39(8): 155-159
- [19] 吕蓉.海洋微藻活性微量元素积累的研究[D].天津:天津科技大学,2008  
LYU Rong. Study on the accumulation of trace elements in marine microalgae [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2008
- [20] 孙显.富硒褶皱臂尾轮虫生理生化特征及抗衰老机制的初步研究[D].广州:暨南大学,2015  
SUN Xian. Preliminary study on physiological and biochemical characteristics and anti-aging mechanism of selenium-enriched brachionus [D]. Guangzhou: Jinan University, 2015
- [21] 仲娜,李新荣,仲丽,等.高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱分析几种富硒产品的硒总量及其形态[J].分析科学学报, 2013,29(3):435-438  
ZHONG Na, LI Xin-rong, ZHONG li, et al. Determination of total se and selenium speciation in enriched products by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Science*, 2013, 29(3): 435-438
- [22] Zhong Y, Chen T, Zheng W, et al. Selenium enhances antioxidant activity and photosynthesis in *Ulva fasciata* [J]. *Journal of applied phycology*, 2015, 27(1): 555-562
- [23] Zheng Y, Li Z, Tao M, et al. Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 183: 21-27
- [24] 周志刚,钟罡,刘志礼.硒对极大螺旋藻生长及含硒量的影响[J].海洋科学,1997,5:42-45  
ZHOU Zhi-gang, ZHONG Gang, LIU Zhi-li. Effects of selenium on the growth and selenium contents of *Spirulina maxima* [J]. *Marine Sciences*, 1997, 5: 42-45
- [25] Geoffroy L, Gilbin R, Simon O, et al. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 83(2): 149-158
- [26] 张继红,任丹丹,姜玉声,等.微藻营养价值及其在水产生物营养强化中的应用[J].食品工业科技,2016,37(20):371-376  
ZHANG Ji-hong, REN Dan-dan, JIANG Yu-sheng, et al. Microalgae in aquaculture: A review to nutritional value and rotifers enrichment [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(20): 371-376
- [27] 周永林,任璐艳,靳兴媛,等.钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)吸收转化亚硒酸钠生成纳米元素硒[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2012,33(3):300-304  
ZHOU Yong-lin, REN Lu-yan, JIN Xing-yuan, et al. *Spirulina platensis* absorbs and converts sodium selenite to form nano-element selenium [J]. *Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition)*, 2012, 33(3): 300-304
- [28] Zhong Y, Cheng J J. Effects of selenite on unicellular green microalga *Chlorella pyrenoidosa*: Bioaccumulation of selenium, enhancement of photosynthetic pigments, and amino acid production [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(50): 10875-10883
- [29] Sun X, Zhong Y, Huang Z, et al. Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments [J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e11227011
- [30] 李志勇,龚华斐.富硒螺旋藻中硒的有机化及其分布特性[J].水生生物学报,2003,4:440-442  
LI Zhi-yong, Gong Hua-fei. Bio-transformation and Distribution of the selenium in selenium-enriched *Spirulina* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 4: 440-442
- [31] Neumann P M, De Souza M P, Pickering I J, et al. Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2003, 26(6): 897-905