

优化营养方式强化蛋白核小球藻生物量及蛋白质和叶绿素生产

魏东, 张会贞, 陈娇敏

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文通过优化营养方式和培养条件, 提高了蛋白核小球藻生物量及细胞内蛋白质和叶绿素含量。结果表明, 葡萄糖浓度能显著影响蛋白核小球藻混养和异养生长的生物量浓度 ($p<0.05$), 但不同硝酸钠浓度影响不显著。在葡萄糖浓度 50 g/L、硝酸钠浓度 3.75 g/L 条件下, 小球藻异养培养 4 d, 即可达到最高生物量浓度为 21.31 g/L, 显著高于盐度 15‰条件下混养所得最高生物量浓度 (14.32 g/L) ($p<0.05$)。当葡萄糖耗尽, 将小球藻细胞经含氮且不含糖的培养基适当稀释后进行光诱导培养, 并优化硝酸钠浓度。发现在高异养细胞密度 (11.09 g/L) 下, 采用硝酸钠浓度 (3.75 g/L) 和低光强 ($6,411\pm 532$ Lux) 诱导培养藻细胞 48 h, 即可获得高蛋白质含量 (54.10%) 和高叶绿素含量 (3.14%) 的小球藻, 相对于光诱导培养前, 分别提高了 207.74% 和 342.25%, 蛋白质和叶绿素产率也显著高于单独混养或异养培养的最高值, 分别达到 1.32 g/(L·d) 和 0.09 g/(L·d)。

关键词: 营养方式; 蛋白核小球藻; 生物量浓度; 蛋白质; 叶绿素

文章编号: 1673-9078(2017)4-160-167

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.025

Optimization of Trophic Modes for Enhancing the Production of Biomass, Protein, and Chlorophyll from *Chlorella pyrenoidosa*

WEI Dong, ZHANG Hui-zhen, CHEN Jiao-min

(South China University of Technology, School of Food Science and Engineering, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The biomass of *Chlorella pyrenoidosa* and its cellular protein and chlorophyll contents were enhanced by optimizing trophic modes and culture conditions. The results showed that glucose concentration could significantly influence the biomass concentration of *C. pyrenoidosa* under mixotrophic and heterotrophic conditions ($p<0.05$), but no significant effect was found with different nitrate concentrations. The highest biomass concentration (21.31 g/L) was obtained when *C. pyrenoidosa* was cultivated in heterotrophic culture for four days with medium containing 50 g/L glucose and 3.75 g/L nitrate, and was significantly higher than the highest biomass concentration obtained in mixotrophic culture (14.32 g/L) with a salinity of 15‰ ($p<0.05$). After glucose depletion, the heterotrophic *C. pyrenoidosa* strain was diluted with a nitrate-containing medium without glucose for photon-induced cultivation, and the concentration of nitrate was optimized. The results showed that 48-hour photon-induced cultivation under a low light intensity ($6,411\pm 532$ Lux) in a medium containing 3.75 g/L nitrate produced high contents of protein (54.1%) and chlorophyll (3.14%) in *C. pyrenoidosa*; these values were increased by 207.74% and 342.25%, respectively, compared with those obtained before photon-induced cultivation. Additionally, the yields of protein and chlorophyll reached 1.32 g/(L·d) and 0.09 g/(L·d), respectively, significantly higher than the peak values from mixotrophic or heterotrophic culture ($p<0.05$).

Key words: trophic modes; *Chlorella pyrenoidosa*; biomass concentration; protein; chlorophyll

自上世纪 50 年代起, 科学家们开始探索新型可替代的蛋白质资源, 对酵母、真菌、细菌和微藻等进行了广泛研究, 以应对未来的蛋白质供应短缺危机。

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家 863 计划项目 (2013AA065802); 国家自然科学基金项目 (31370383); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201401C01); 广东省公益研究与能力建设基金项目 (2015A020216003、2016A010105001)

作者简介: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 工业生物技术研究开发

细胞绿藻-小球藻 (*Chlorella*) 在自养生长下可积累大量蛋白质和叶绿素, 含量可分别高达干重的 42~58% 和 3~5%, 其氨基酸组成高于世界卫生组织 (WHO) 和联合国粮农组织 (FAO) 颁布的用于人类营养的蛋白质标准, 是一种食用安全的优质蛋白质资源^[1]。目前已有大量小球藻食品和保健食品问世, 其中“小球藻生长因子”的促生长、排毒作用最引人关注^[2]。小球藻还能作为传统饲料蛋白 (大豆粉和鱼粉等) 的部分替代品, 以及畜禽和水产饲料添加剂。

蛋白质和叶绿素是小球藻最重要的品质体现,但其含量与营养方式和培养条件有重大关系。蛋白核小球藻具有高光合效率,能利用太阳能,CO₂或碳酸盐进行自养生长,蛋白质和叶绿素含量高,生物量品质好,但细胞生长慢且密度低^[3]。蛋白核小球藻还能利用有机碳源和氮源进行高密度混养或异养生长,在短时间内获得大量生物量,生产效率比自养高上百倍,但异养蛋白核小球藻内叶绿体解体、脂质含量上升,蛋白质合成受到抑制^[4],表现为高油脂、低蛋白和低叶绿素,其品质不符合新资源食品的标准。蛋白核小球藻能根据营养物质和培养条件可逆的转换营养方式,将异养与自养过程偶联起来获得双方优势,对强化蛋白核小球藻生物物质和高营养物的生产效率有重要作用^[5]。如何通过不同营养方式的优化和对比,建立有效的偶联技术提高产量和品质,对小球藻工业发展和应用至关重要,值得深入研究。

碳、氮和磷是蛋白核小球藻生长的主要元素,采用葡萄糖为碳源进行发酵时可获得最大比生长速率,但高碳氮比也会引起油脂过度积累^[1]。硝酸钠和尿素等多种氮源都可用于小球藻的生长,但不同氮源种类和浓度都会影响自养的光合作用和细胞内色素含量^[6]。以提高小球藻油脂产量为目的的研究目前有较多报道,主要通过利用不同碳源、氮源及不同培养方式获得高油脂含量的小球藻作为生物燃料原料^[1,7],鲜有如何利用碳源、氮源及不同营养方式偶联提高蛋白核小球藻的蛋白质和叶绿素含量的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* 15-2070)由北京大学陈峰教授惠赠;葡萄糖、硝酸钠、浓盐酸、浓硫酸和氢氧化钠等均为分析纯试剂;AL 104型电子天平和SevenEasy型pH计购自瑞士Mettler Toledo公司;Class II型生物安全柜购自新加坡ESCO公司;DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司;DHZ-DA型恒温摇床购自太仓实验设备厂;BFM-6BII型高压灭菌锅购自英国ASTELL公司;SBA-40D型生物传感分析仪购自山东省科学院;Modulyod型冷冻干燥器购自美国Thermor公司。

1.2 培养基

蛋白核小球藻培养采用Basal培养基^[5],培养基配方如下:NaNO₃ 1250 mg/L, KH₂PO₄ 1250 mg/L, MgSO₄·7H₂O 1000 mg/L, EDTA 500 mg/L, H₃BO₃

114.2 mg/L, CaCl₂·2H₂O 111 mg/L, FeSO₄·7H₂O 49.8 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 88.2 mg/L, MnCl₂·4H₂O 14.2 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 11.92 mg/L, CuSO₄·5H₂O 15.7 mg/L, Co(NO₃)₂·6H₂O 4.9 mg/L。调pH 6.1。

1.3 实验方法

1.3.1 藻种活化与种子液制备

从Basal培养基斜面挑取一小环蛋白核小球藻藻苔,在含有10 g/L葡萄糖的Basal固体培养基平板上划线,置于光照培养箱中,在28℃、2000 Lux下培养7 d。再从Basal培养基平板上挑取一个单藻落,接种到含10 g/L葡萄糖的Basal培养基中,在28℃、3000 Lux、140 r/min的恒温摇床中连续培养6 d。

1.3.2 混养培养方式下蛋白核小球藻生物量增长效果优化

1.3.2.1 盐度和葡萄糖浓度优化

以葡萄糖浓度10 g/L Basal培养基(盐度为4.3‰)为对照,加入NaCl分别调盐度至15‰、20‰和25‰,pH调至6.10,分装到250 mL三角瓶中,装液量为100 mL,121℃灭菌15 min。蛋白核小球藻细胞接种后置于温度为28℃、4000 Lux、160 r/min的恒温摇床进行培养,每24 h取样测定生物量干重浓度。

进一步在盐度15‰的Basal培养基中分别添加10、20、30、40、50 g/L葡萄糖,pH调节、分装、接种及培养方法同上,每24 h取样测定生物量干重浓度。

1.3.2.2 硝酸钠浓度优化

在含有30 g/L葡萄糖、15‰盐度的Basal培养基中,分别添加浓度为1.25、2.50、3.75和5.00 g/L硝酸钠,配置成不同含氮量的培养基,pH调节、分装、接种、培养方法同上。每24 h取样,测定生物量干重浓度和葡萄糖浓度。培养结束后收集藻液,离心、洗涤所得藻泥,经真空冷冻干燥后得到藻粉,用于测蛋白质和叶绿素含量。

1.3.3 异养培养方式下蛋白核小球藻生物量增长效果优化

1.3.3.1 葡萄糖浓度优化

在Basal培养基中分别添加10、20、30、40、50和60 g/L葡萄糖,分装到250 mL三角瓶中,装液量50 mL。在121℃灭菌15 min,然后在生物安全柜中接种,接种量为8%(V/V),在28℃和140 r/min的摇床中异养培养6 d。前两天每24 h取一次样,之后每12 h取一次样,每次取样2 mL。经离心、洗涤后测干重,上清用于测定葡萄糖浓度。

1.3.3.2 硝酸钠浓度优化

在含有50 g/L葡萄糖Basal培养基中,分别添加

浓度为 1.25、2.50、3.75 和 5.00 g/L 硝酸钠, 配置成不同含氮量培养基, 分装到 250 mL 三角瓶中, 装液量 50 mL, 在 121 °C 灭菌 15 min, 然后在生物安全柜中接种, 接种量为 8% (V/V), 在 28 °C 和 140 r/min 的摇床中异养培养 6 d。每 24 h 取样 2 mL, 经离心、洗涤后测生物量干重浓度。

1.3.4 不同起始细胞密度下光诱导异养蛋白核小球藻生物量增长效果优化

配制含 50 g/L 葡萄糖、3.75 g/L 硝酸钠的 Basal 培养基, 置于 250 mL 三角瓶中, 装液量为 50 mL, 在 121 °C 灭菌 15 min, 然后在生物安全柜中接种, 接种量为 8% (V/V), 于温度 28 °C 和转速 140 r/min 条件下异养培养 4 d, 在无菌条件下离心获得藻泥, 然后用含 5 g/L 硝酸钠、无糖 Basal 培养基重悬, 稀释至原浓度的 2/10、3/10、4/10 和 5/10 比例, 接种在 250 mL 三角瓶中(装液量 50 mL)。在温度 28 °C、转速 140 r/min、光强 3470±311 Lux、光暗周期 12 h/12 h 条件下培养 60 h。每 12 h 取样 2 mL, 经离心、洗涤后测生物量干重浓度, 上清在 -20 °C 下冻存备用。藻泥经真空冷冻干燥得到藻粉用于测蛋白质和叶绿素含量。

1.3.5 光诱导对异养小球藻细胞生物量、蛋白质和叶绿素含量的增长效果

按 1.3.4 所述方法培养得到异养小球藻种子液。配制硝酸钠浓度分别为 2.50、3.75、5.00、6.25 和 7.50 g/L、不含葡萄糖的 Basal 培养基, 分装于 250 mL 三角瓶中, 装液量为 50 mL。种子液在无菌条件下离心, 用上述培养基对离心后的藻泥稀释一倍进行重悬, 在温度 28 °C、140 r/min、6411±532 Lux、光暗周期 12 h/12 h 条件下光诱导培养 60 h。每 12 h 取一次样, 取样量为 2 mL, 经离心、洗涤后测生物量干重浓度。离心上清液在 -20 °C 下冻存备用, 冻存藻泥经真空冷冻干燥后得到藻粉, 用于测蛋白质和叶绿素含量。

1.4 分析测试

1.4.1 葡萄糖浓度

采用 SBA-40D 生物传感分析仪测定葡萄糖浓度, 校正范围为 0.5~1.0 g/L。测定前先用针筒过滤器(0.45 μm 滤膜)过滤样品, 用浓度为 1.0 g/L 葡萄糖标准液定标仪器, 然后将样品稀释到葡萄糖浓度校正范围内, 用微量注射器吸 25 μL 样品进行测定, 每个样品重复测量三次后取平均值并计算标准差。测定读数乘以稀释倍数, 即是样品的葡萄糖浓度。

1.4.2 生物量干重

小球藻生物量的测定采用干重法。吸取 2 mL 小球藻培养液, 装于已烘干称重的 2 mL 离心管中, 离

心、洗涤, 将所得藻泥放入 60 °C 恒温烘箱烘干至恒重。用电子天平称量并计算差值。每个样品设 3 个平行, 取平均值并计算标准差。

1.4.3 蛋白质含量

采用 FOSS 公司的半自动凯氏定氮仪测定蛋白质含量。由样品中氮含量, 换算得出藻粉中蛋白质含量。

1.4.4 叶绿素含量^[8]

称取藻粉 10 mg 于 10 mL 螺口管中, 加入 80% 丙酮 9 mL, 在 4 °C 冰箱中放置 24 h, 冰浴下超声波破碎细胞 90 s, 6000 g 离心 6 min, 吸取萃取液测 OD₄₁₂、OD₄₃₁、OD₄₆₀ 和 OD₄₈₀, 按下列公式计算:

$$\text{叶绿素 a 含量} = 1.709 \times \text{OD}_{412} + 11.97 \times \text{OD}_{431} - 2.998 \times \text{OD}_{460} - 5.708 \times \text{OD}_{480}$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = 0.171 \times \text{OD}_{412} - 0.230 \times \text{OD}_{431} + 11.871 \times \text{OD}_{460} - 13.248 \times \text{OD}_{480}$$

$$\text{叶绿素总量} = \text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b}.$$

1.5 数据分析

采用 Microcal Origin 8.0 Software 对数据进行处理和统计。

2 结果与讨论

2.1 混养培养方式下蛋白核小球藻生物量增长效果

2.1.1 盐度和葡萄糖浓度优化

盐度和葡萄糖浓度优化效果见图 1。由图 1a 可知, 蛋白核小球藻在较宽的盐度范围均能生长。盐度 15‰ 和 20‰ 条件下, 细胞生长较快, 高盐度 (25‰) 则对细胞生长有一定抑制, 该结果与王玮蔚等人的研究结论相一致^[9]。15‰ 盐度下培养 8 d, 生物量干重浓度可达 6.48 g/L, 与 Basal 培养基对照组相比显著增加, 提高了 12.11%。

由图 2b 可以看出, 在盐度 15‰、NaNO₃ 1.25 g/L 的 Basal 培养基中, 不同葡萄糖浓度条件下, 蛋白核小球藻生长曲线均为典型 S 型曲线。相对于 10 g/L 葡萄糖, 葡萄糖浓度增加可显著提高混养细胞的生物量浓度 ($p < 0.05$)。蛋白核小球藻在盐度 15‰ 下混养生长的最佳葡萄糖浓度为 30 g/L, 培养 10 d 后生物量干重浓度 10.62 g/L, 提高了 63.9%。高浓度葡萄糖 (40~50 g/L) 对生物量增长有一定抑制作用, 可能是氮源和微量元素等其他营养元素的限制。有研究表明, 低葡萄糖浓度会限制小球藻细胞生长^[10], 而高浓度葡萄糖对小球藻生长也有抑制作用, 与本实验观察结果一致。

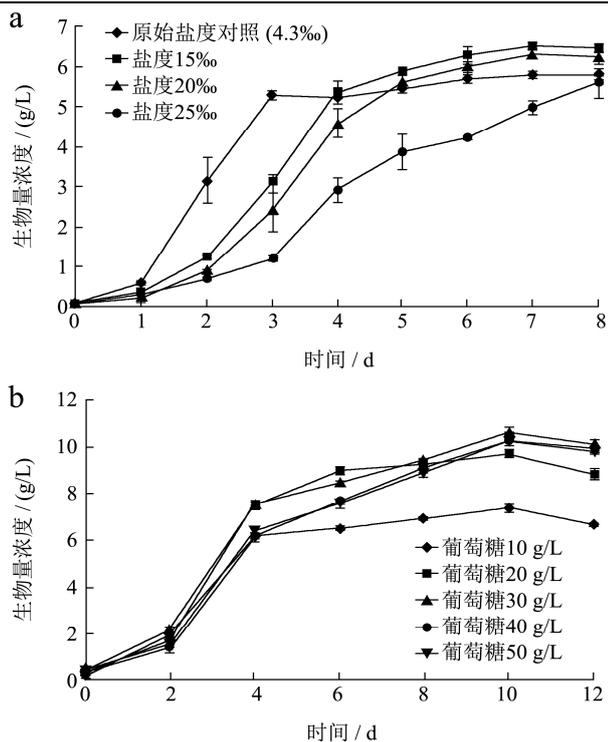


图1 不同盐度 (a) 和葡萄糖浓度 (b) 下混养蛋白核小球藻的生长曲线

Fig.1 Growth curves of mixotrophic *C. pyrenoidosa* under different salinities (a) and glucose concentrations (b)

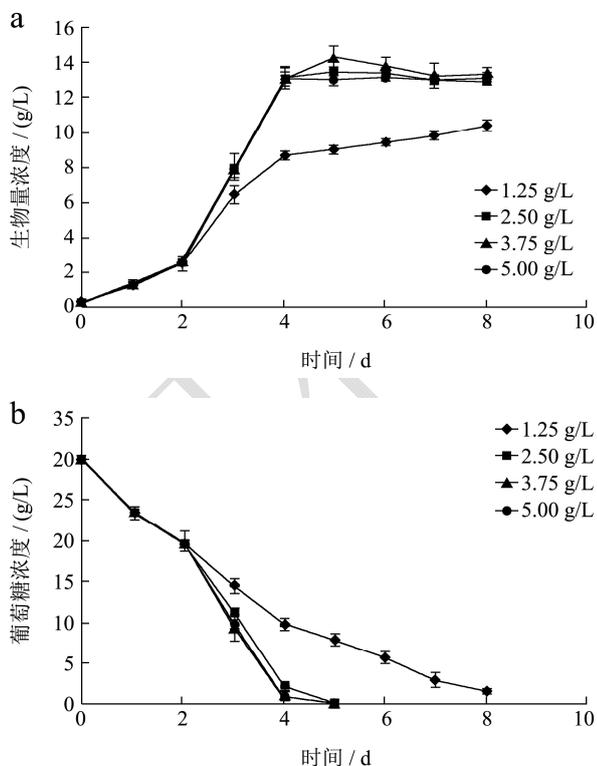


图2 不同硝酸钠浓度下混养蛋白核小球藻的生长和葡萄糖消耗

Fig.2 Growth curve and glucose consumption in mixotrophic *C. pyrenoidosa* culture under different nitrate concentrations

2.1.2 硝酸钠浓度优化

硝酸钠浓度优化效果见图2。由图2a可知,当葡萄糖浓度为30 g/L时,提高硝酸钠浓度可显著增加小球藻最高生物量干重浓度 ($p < 0.05$)。这说明提高氮源浓度可以显著促进小球藻生物量增长。当硝酸钠浓度较高(5.00 g/L)时,其对小球藻生长的促进作用有所下降,可能是碳氮比不合适。硝酸钠浓度3.75 g/L条件下,培养8 d后生物量浓度为13.47 g/L,与硝酸钠浓度1.25 g/L时相比,提高了26.8%。由图2b可知,当硝酸钠浓度为1.25 g/L时,细胞生长较慢,葡萄糖消耗也相对缓慢,此时限制小球藻生长的主要因素是氮源的缺乏;当硝酸钠浓度为2.50~5.00 g/L时,葡萄糖在第五天全部耗尽,此时细胞干重达到最大值,分别为13.52、14.32、13.02 g/L。由此可见,此时葡萄糖缺乏是限制小球藻生长的主要因素。

2.2 混养条件下细胞内蛋白质和叶绿素含量

增长规律

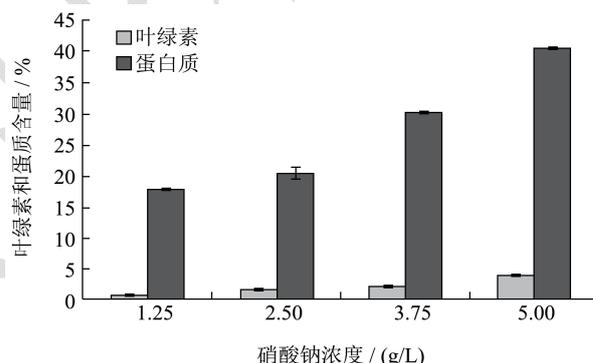


图3 硝酸钠浓度对混养蛋白核小球藻细胞内叶绿素和蛋白质含量的影响

Fig.3 Effect of nitrate concentration on the contents of chlorophyll and protein in the cells of mixotrophic *C. pyrenoidosa*

混养小球藻细胞内蛋白质和叶绿素含量增长规律如图3所示。提高硝酸钠浓度能够显著增加细胞内叶绿素含量 ($p < 0.05$),当硝酸钠浓度5.00 g/L时细胞内叶绿素含量最高,达到干重的3.79%。研究表明,在氮源充足的条件下,小球藻的生长明显提高,叶绿素含量基本稳定;而缺氮条件会显著抑制细胞生物量增长,同时细胞内叶绿素含量也会明显降低^[1]。这与本文的研究结果基本一致。

混养下,小球藻细胞内蛋白质与叶绿素含量的变化规律基本一致。当硝酸钠浓度5.00 g/L时蛋白质含量也达到最高,为干重的40.38%。该结果与之前文献报道蛋白核小球藻蛋白含量可高达50%以上相比,相

对偏低^[3]。不同营养方式会影响小球藻生长、代谢和生化组分，而混养是小球藻生长的最佳营养方式。有机碳源的供给直接影响小球藻的碳和氮的代谢途径，添加葡萄糖可显著促进小球藻细胞生长和生物量积累，刺激糖类、油脂等高碳生化组分的合成，而抑制蛋白质、叶绿素等含氮生化组分的生物合成^[4]。这说明添加有机碳源进行混养，高 C/N 比不利于蛋白质的合成。另外，有研究显示，淡水小球藻在 30 g/L NaCl 盐胁迫下，油脂含量增加，蛋白质含量显著下降^[12]。蛋白核小球藻是一种常见的淡水小球藻，提高盐度会对小球藻细胞生长形成胁迫条件，可能也是影响细胞内蛋白质合成的因素。

2.3 异养培养方式下蛋白核小球藻生物量增长效果

2.3.1 葡萄糖浓度优化

2.3.1.1 葡萄糖浓度优化

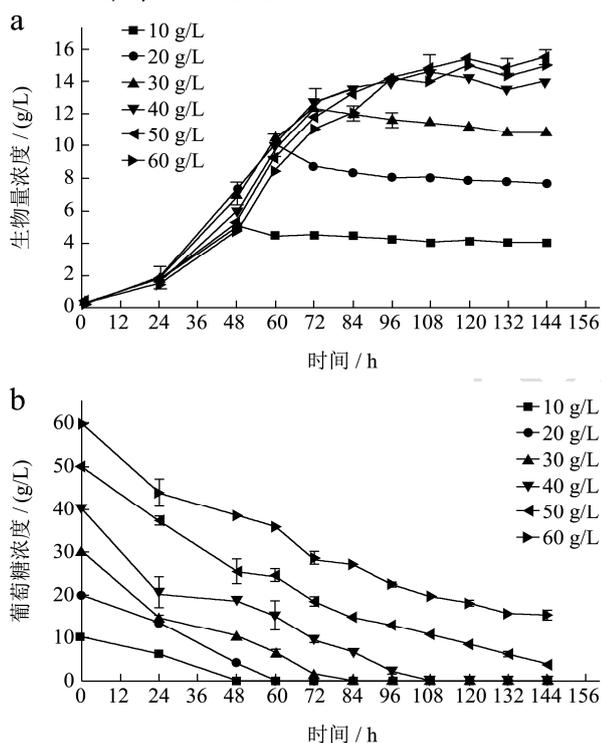


图4 不同葡萄糖浓度下异养蛋白核小球藻的生长和葡萄糖消耗

Fig.4 Growth curve and glucose consumption by heterotrophic *C. pyrenoidosa* under different glucose concentrations

葡萄糖浓度优化效果见图 4。接入对数期种子液后，小球藻细胞没有明显延滞期，直接进入对数生长期，呈典型的 S 型生长曲线。在 10~40 g/L 葡萄糖浓度下，小球藻分别培养 48、60、72 和 108 h 后进入稳定期。对照葡萄糖消耗曲线（图 4b）可知，当小球藻进入稳定期时，培养基中葡萄糖都完全耗尽。在 50~60

g/L 葡萄糖浓度下，小球藻细胞在 120 h 进入稳定期，此时葡萄糖尚有剩余。由此可见，当葡萄糖浓度在 50 g/L 以下时，葡萄糖是细胞的生长限制因素；当葡萄糖浓度在 50 g/L 以上时，氮源和微量元素等其他营养源是限制因素。统计检验可知，适当提高葡萄糖浓度能极显著增加异养细胞最高生物量 ($p < 0.01$)。用 50 g/L 葡萄糖可获得最高小球藻生物量为 15.55 g/L。

葡萄糖能调节糖酵解、呼吸作用、脂类合成、细胞周期和应激反应等许多基因的表达，而高浓度葡萄糖对小球藻生长有抑制作用。据报道，当葡萄糖浓度为 60 g/L 和 100 g/L 之间时，抑制小球藻的异养生长^[13]，这与本实验的研究结果基本一致。

2.3.2 硝酸钠浓度优化

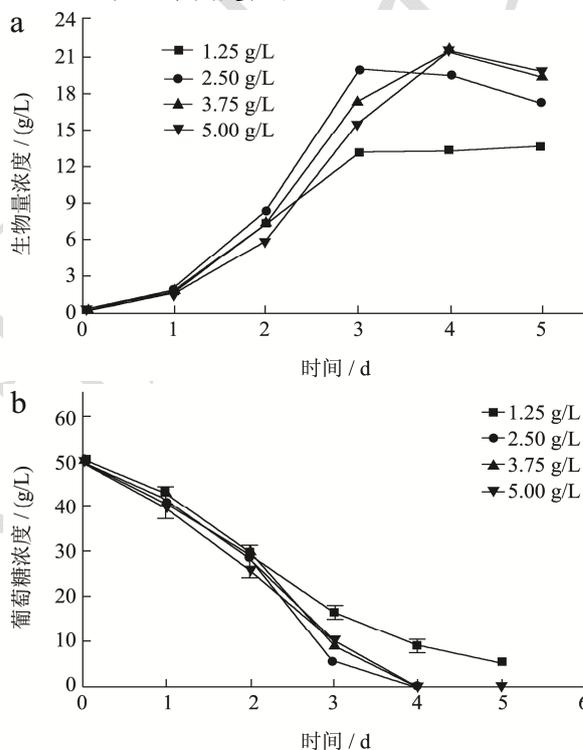


图5 不同硝酸钠浓度下异养蛋白核小球藻的生长和葡萄糖消耗

Fig.5 Growth curve and glucose consumption in heterotrophic *C. pyrenoidosa* culture under different nitrate concentrations

硝酸钠浓度优化效果见图 5。可以看出，采用 50 g/L 葡萄糖 Basal 培养基、硝酸钠浓度高于 1.25 g/L 时，小球藻进入稳定期的时间都推迟（图 5a），葡萄糖均在 96 h 全部耗尽（图 5b），且生物量浓度增加不显著，而硝酸钠浓度为 1.25 g/L 时，葡萄糖直到 120 h 还没有消耗完。当硝酸钠浓度为 3.75 g/L 时，小球藻培养 4 d 即可获得最高生物量为 21.31 g/L。这说明在低硝酸钠浓度下导致小球藻快速进入稳定期的主要因素是氮源缺乏，而高硝酸钠浓度下小球藻进入稳定期的原

因是葡萄糖缺乏。与上述葡萄糖浓度对细胞异养生长的影响类似，氮源或碳源的不足都能限制小球藻的持续生长，而使其生长进入稳定期。

上述研究表明，混养兼有自养和异养的特点，理论上混养条件下小球藻最高生物量大于异养，远大于自养。而本研究中，小球藻混养条件下所得最高生物量为 14.32 g/L，远不及异养条件下的最高生物量 21.31 g/L，这可能是由于培养基装液量和盐度等差异所致。为了在短时间获得高密度细胞，同时提高细胞蛋白质和叶绿素含量，后续实验主要采用异养培养方式培养种子液，进而进行光诱导自养培养研究。

2.4 细胞密度对光诱导条件下异养蛋白核小球藻生长的影响

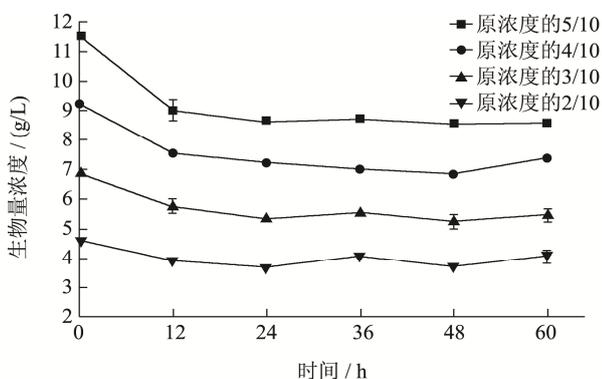


图 6 异养小球藻进入光自养下的生长曲线

Fig.6 Growth curve of heterotrophic *C. pyrenoidosa* in autotrophic growth

异养小球藻藻泥用含 5 g/L 硝酸钠、不含葡萄糖的 Basal 培养基重悬，用同一培养基分别稀释至原浓度的 2/10、3/10、4/10 和 5/10，在光暗周期下培养，其生长状况如图 6 所示。由图 6 可以看出，异养细胞在光照培养的 12 h 内，生物量浓度都有所下降，初始细胞浓度越高，生物量损失越大，最高损失率出现在稀释一倍 (5/10) 的培养物 (初始细胞浓度 11.5 g/L)，生物量损失都小于 10%。在随后的黑暗周期里小球藻生物量浓度微弱下降而光照周期里微弱上升，总体变化不显著。

据报道，James 等将异养培养的蛋白核小球藻细胞未经稀释直接进行连续光照，并通入 5% CO₂，研究发现当细胞从异养状态转变为光自养状态时，细胞生物量有一定程度的下降^[5]，这与本实验结果一致。这说明小球藻细胞从黑暗异养状态进入光自养状态时，小球藻会经历一个适应期用于调整细胞代谢，包括细胞内物质的相互转化。光暗周期中细胞密度越高，细胞之间的光遮蔽越严重，光合作用效率越低、呼吸

作用越强，将引起生物量更多损失。为了最大程度地建立高密度培养体系，本研究选用最高细胞密度进行后续研究。

2.5 光诱导下异养蛋白核小球藻生物量及胞内蛋白质和叶绿素含量的增长

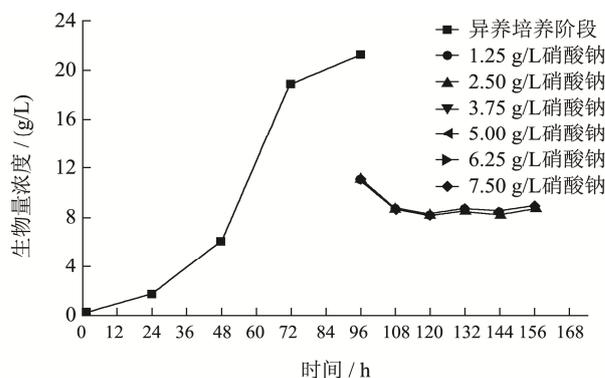


图 7 硝酸钠浓度对光自养下异养细胞生物量浓度的影响

Fig.7 Effect of nitrate concentrations on the biomass concentration of heterotrophic *C. pyrenoidosa* in autotrophic growth

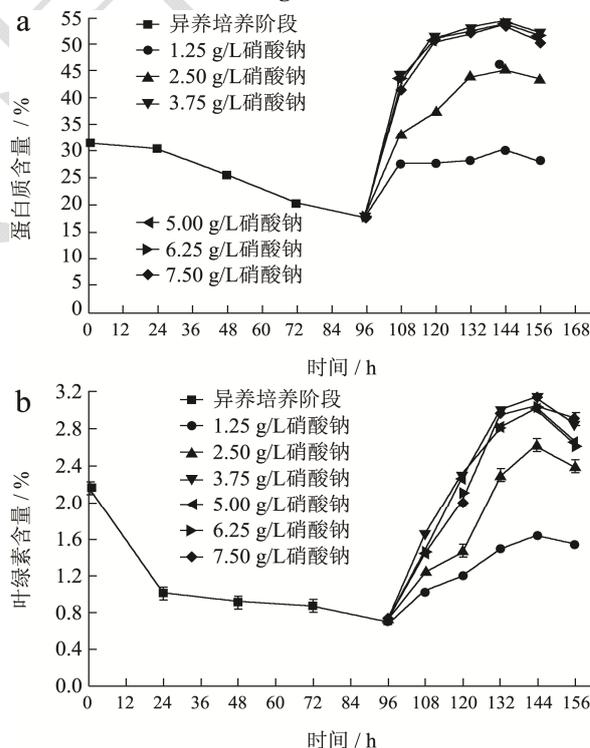


图 8 硝酸钠浓度对光自养下异养小球藻细胞的蛋白质 (a) 和叶绿素 (b) 含量的影响

Fig.8 Effect of nitrate concentrations on the protein (a) and chlorophyll (b) contents of heterotrophic *C. pyrenoidosa* during light/dark cycle

小球藻胞内蛋白质和叶绿素含量，是评价自养小球藻品质的重要指标。本研究发现硝酸钠浓度对光诱

导后的异养蛋白核小球藻生物量品质具有不同各程度的影响,如图7~8所示。由图7可见,异养蛋白核小球藻经4d培养生物量浓度即可达到22.2 g/L,随后无糖培养基稀释1倍后,加入不同浓度硝酸钠后开始光自养。如前所示,在光诱导12h内生物量损失较大,在随后的光黑暗周期内,提高硝酸钠浓度也未显著提高小球藻生物量浓度。这说明在高密度(初始细胞密度11.09 g/L)光自养培养下,碳源浓度和光照强度(6411 Lux)是生物量增长的主要限制因素。

从图8可以看出,异养培养过程中细胞内蛋白质和叶绿素含量随着培养时间延长而降低,培养4d后,其含量分别为17.58%和0.71%。小球藻进入自养光诱导后,蛋白质和叶绿素含量随诱导时间迅速上升。在3.75 g/L硝酸钠、光诱导48h时,蛋白质达到最大值54.10%,比光诱导前提高了207.74%(见图8a);同时,叶绿素含量也达到最大值3.14%,同样提高了342.25%(见图8b)。两者的含量都显著高于其他硝酸钠浓度下的结果($p < 0.05$)。当硝酸钠浓度大于3.75 g/L时,小球藻蛋白质和叶绿素含量没有显著性提高。

针对以上实验结果分析可知,在异养过程中,小球藻的细胞结构、细胞内物质组成以及生理代谢机制

会发生变化,叶绿体解体、脂质含量上升和蛋白质合成受到抑制^[4],并且葡萄糖能使小球藻色素合成系统发生很大变化^[14],因此小球藻细胞的蛋白质含量和叶绿素含量不断下降。而小球藻在光自养培养条件下,迅速启用光合作用,合成蛋白质和叶绿素,从而快速提高了小球藻的蛋白质含量和叶绿素含量。氮源是小球藻细胞合成蛋白质和叶绿素的重要物质,在一定范围内提高硝酸钠的浓度能有效增加小球藻细胞内的蛋白质和叶绿素含量。

综上所述,不同营养方式下蛋白核小球藻最高生物量干重浓度、细胞内蛋白质和叶绿素含量及产率见表1。由表1可见,小球藻的生物量浓度、细胞内蛋白质和叶绿素含量及产率与其营养方式和培养条件有很大关系。混养条件下,细胞内蛋白质和叶绿素最高含量分别为40.38%和3.79%,明显高于异养下的最高含量,但其最高生物量浓度远不及异养培养。在较高细胞密度下,通过异养-光自养偶联培养,小球藻细胞内蛋白质含量显著提高,最高可达54.10%,蛋白质和叶绿素的产率也显著高于单独混养或异养培养的最高产率,分别达到1.32 g/(L·d)和0.09 g/(L·d)。这对于蛋白核小球藻生物品质的改善和提高具有重要意义。

表1 不同营养方式下小球藻生物量浓度及细胞内蛋白质、叶绿素含量和产率

Table 1 Biomass concentration of *C. pyrenoidosa*, and its contents and yields of cellular protein and chlorophyll under different trophic modes

培养方式	最高含量及产率				
	生物量浓度/(g/L)	蛋白质/%	蛋白质产率/(g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	叶绿素/%	叶绿素产率/(g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
混养	14.32±0.68	40.38±0.06	0.66±0.01	3.79±0.24	0.06±0.01
异养	21.31±0.21	31.44±0.34	0.83±0.01	2.19±0.17	0.03±0.01
异养-光自养偶联培养	11.09±0.07	54.10±0.45	1.32±0.02	3.14±0.36	0.09±0.01

3 结论

本研究对比分析了蛋白核小球藻的异养和混养生长,优化了培养基中葡萄糖和硝酸钠浓度等条件,实现了小球藻在短时间内的低密度培养。本研究应用异养-光自养偶联培养技术,建立了小球藻在高细胞密度下生长方式的转换和品质改善方法,异养小球藻胞内蛋白质和叶绿素含量及产率提高2~3倍,显著高于单独异养或混养培养时的含量及产率,使得小球藻生物量品质得到迅速提高,这为蛋白核小球藻的高密度规模培养和品质改善提供了快速有效的诱导方法。

参考文献

[1] Carl Safi, Bachar Zebib, Othmane Merah, et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review [J]. Renewable and Sustainable

Energy Review, 2014, 35: 265-278

[2] 庄秀园,黄英明,张道敬,等.小球藻高附加值生物活性物质“小球藻热水提取物”的研究现状与展望[J].生物工程学报,2015,31(1):24-42
ZHUANG Xiu-yuan, HUANG Ying-ming, ZHANG Dao-jing, et al. Research status and prospect on hot water extract of *Chlorella*: the high value-added bioactive substance from *Chlorella* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(1): 24-42

[3] 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,2005,26(5):52-55
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, 2005, 26(5): 52-55

[4] 孔维宝,汪洋,杨红,等.不同营养方式对普通小球藻生长代

- 谢及生化组分的影响[J].微生物学报,2015,55(3):299-310
- KONG Wei-bao, WANG Yang, YANG Hong, et al. Effects of different trophic modes on growth characteristics, metabolism and cellular components of *Chlorella vulgaris* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(3): 299-310
- [5] James C Ogbonna, Hiroyuki Ma Sui, Hideo Tanaka. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation-An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed [J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9(4): 359-366
- [6] 赵华,董晓宇,夏媛媛,等.氮源对小球藻光合作用和色素积累的影响[J].现代食品科技,2012,28(4):367-370
- ZHAO Hua, DONG Xiao-yu, XIA Yuan-yuan, et al. Effects of nitrogen source on photosynthesis and pigment accumulation of *Chlorella* sp. [J]. Modern Food Science & Technology, 2012, 28(4): 367-370
- [7] Hyun Uk Cho, Young Mo Kim, Yun-Nam Chol, et al. Effect of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids [J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 245-250
- [8] Jafar Seyfabadi, Zohreh Ramezanpour, Zahra Amini Khoeyi. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes [J]. Journal of Applied Phycology, 2011, 23(4): 721-726
- [9] 王玮蔚,孙雪,王冬梅,等.盐度和无机碳对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及其基因表达的影响[J].水产学报,2014,38(7):920-928
- WANG Wei-wei, SUN Xue, WANG Dong-mei, et al. Effects of salinity and inorganic carbon on the growth, extracellular carbonic anhydrase activity and ca gene expression of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Journal of Fisheries, 2014, 38(7): 920-928
- [10] WEI Dong, LIU Long-jun. Optimization of culture medium for heterotrophic *Chlorella Protothecoids* producing total fatty acids [J]. Chemistry & Bioengineering, 2008, 3: 35-40
- [11] Shun-ni Zhu, Wei Huang, Jin Xu, et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis* [J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 292-298
- [12] Byung-Hyuk Kim, Rishiram Ramanan, Zion Kang, et al. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity [J]. Biomass and Bioenergy, 2016, 85(1): 300-305
- [13] 刘世名,孟海华,梁世中,等.生物反应器高密度异养培养小球藻[J].华南理工大学学报,2000,28(2):81-86
- LIU Shi-ming, MENG Hai-hua, LIANG Shi-zhong, et al. High density culture of heterotrophic *Chlorella* in bioreactor [J]. Journal of South China University of Technology, 2000, 28(2): 81-86
- [14] J Lalucat, J Imperial, R Pares. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp.VJ79 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1984, 26(7): 667-681