

嗜硫原始红藻 *Galdieria sulphuraria* 高产藻胆蛋白的混养条件优化

郑雅莉, 朱宝君, 魏东

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为提高混养条件下单细胞红藻-嗜硫原始红藻 (*G. sulphuraria*) 的藻胆蛋白生产, 本研究以细胞密度、藻胆蛋白含量为评价指标, 系统优化了培养温度、培养基碳氮比、初始细胞密度、光照强度等环境因素。结果表明, 适当降低培养温度和碳氮比有利于促进藻胆蛋白的积累, 提高光强和初始细胞密度也可促进细胞生长和藻胆蛋白合成。研究证实, *G. sulphuraria* 混养培养体系的最适条件为: 30 ℃、碳氮比 6.0、初始细胞密度为 1×10^8 cells/mL、光照强度为 $110 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。在优化后的培养体系中培养 8 d, 最大细胞密度可达 5.48×10^8 cells/mL; 同时最大生物量产量可达到 11.65 g/L, 是优化前的 1.46 倍; 藻胆蛋白含量占生物量干重的 13.63%, 对应产量为 1588.36 mg/L, 产量比优化前提高了 187.91%。因此, 混养培养条件系统优化是强化嗜硫原始红藻生物量和藻胆蛋白生产的有效手段。

关键词: *Galdieria sulphuraria*; 混合营养生长; 细胞密度; 光照强度; 藻胆蛋白

文章编号: 1673-9078(2020)09-54-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0931

Optimization of Mixotrophic Growth Conditions for High-yield Production of Phycobiliprotein by *Galdieria sulphuraria*

ZHENG Ya-li, ZHU Bao-jun, WEI Dong

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

Abstract: In order to improve the phycobiliprotein production in unicellular red algae *Galdieria sulphuraria* under mixotrophic conditions, systematic optimization of environmental factors including the culture temperature, C/N ratio, initial cell density and light intensity were performed by using cell density and PBP content as the evaluation indices. The results showed that moderate reduction of culture temperature and C/N ratio of medium was beneficial for improving the accumulation of phycobiliprotein. Increasing the light intensity and initial cell density could promote the cell growth and phycobiliprotein synthesis. The study indicated that the optimal conditions for cell mixotrophic culture were determined as 30 ℃, C/N ratio of 6, initial cell density of 1×10^8 cells/mL, light intensity of $110 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. In the optimized culture system, the maximum cell density (5.48×10^8 cells/mL) could be achieved after mixotrophic cultivation for 8 days, leading to the highest biomass yield of 11.65 g/L which was 1.46 times that before optimization. The content of phycobiliprotein was 13.63% of dry cell weight, with the corresponding yield of 1588.36 mg/L which was 187.91% higher than that before optimization. Therefore, the systematical optimization of mixotrophic culture conditions was the effective strategy to enhance the biomass and phycobiliprotein production in *G. sulphuraria*.

Key words: *Galdieria sulphuraria*; Mixotrophic growth; Cell density; Light intensity; Phycobiliprotein

引文格式:

郑雅莉,朱宝君,魏东.嗜硫原始红藻 *Galdieria sulphuraria* 高产藻胆蛋白的混养条件优化[J].现代食品科技,2020,36(9):54-61

ZHENG Ya-li, ZHU Bao-jun, WEI Dong. Optimization of mixotrophic growth conditions for high-yield production of phycobiliprotein by *Galdieria sulphuraria* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 54-61

藻胆蛋白 (Phycobiliprotein, PBP) 是一类主要存

收稿日期: 2019-09-23

基金项目: 中国石化催化剂有限公司科技项目 (36100002-19-FW2099-0035)

作者简介: 郑雅莉 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术

在于蓝藻、红藻、隐藻中的水溶性捕光色素蛋白复合体^[1]。根据光谱性质, PBP 可分为藻蓝蛋白 (Phycocyanin, PC)、别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 和藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 三类^[2]。藻胆蛋白具有抗氧化、抗炎、抗癌等多重生物活性, 可

作为天然着色剂、荧光探针、营养和功能食品的主要功能成分, 广泛应用在食品、医药、化妆品等领域^[1-3]。螺旋藻富含藻胆蛋白 (~23%), 为当前自养生产藻胆蛋白的主要工业化藻种^[1]。然而, 自养培养的方式受到光限制的影响, 导致其生物量和 PBP 产率低, 这成为了影响藻胆蛋白大规模商业化生产的瓶颈^[1,3,4]。因此, 筛选高效生产藻胆蛋白的替代藻种以及开发高效的培养体系为当前研究重点。

嗜硫原始红藻 *Galdieria sulphuraria* (以下简称 *G. sulphuraria*) 是一类存在于酸性热硫磺泉和火山口等环境的极端微藻^[5,6], 该藻可耐受高温 (高达 56 °C), 强酸 (pH 0~4.0), 高渗透压 (如 110 g/L (NH₄)₂SO₄ 和 9% 的盐度) 和高浓度重金属等多种环境胁迫条件^[4-6], 并含有丰富的对热稳定性高的藻胆蛋白^[7]。目前已有研究将 *G. sulphuraria* 应用于污水处理产业中, 并发现该藻可通过胞内光合作用和碳氮代谢等作用有效同化污水 (如餐厨废水、城市污水和金属废水) 中的营养物质, 并将其转化为高附加值的生物质, 同时可回收废水中的贵金属^[8-10]。目前已报道 *G. sulphuraria* 可利用 50 种碳源 (包括各种有机醇类) 进行自养、异养和混养生长^[6]。在自养条件下, *G. sulphuraria* 可积累多糖 (~22%), 蛋白质 (~58%), 脂肪酸 (~7%) 和丰富的藻蓝蛋白 (高达 14%)^[11]; 在异养条件下, 该藻可有效合成藻胆蛋白, 且其产量高达 1435 mg/L, 生产速率可达 861 mg/L/d, 远高于已发表的螺旋藻 PBP 生产力^[12]。因此, *G. sulphuraria* 是一种极具开发价值的新型极端环境微藻生物资源。本研究以 *G. sulphuraria* 为研究对象, 探究在混养条件下培养温度、培养基碳氮比、初始细胞密度和光照强度对该藻生长和藻胆蛋白高效积累的影响, 并建立优化培养体系, 为 *G. sulphuraria* 在藻胆蛋白的规模化生产和应用中提供一定研究基础。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养基

G. sulphuraria UTEX 2919 购于美国 UTEX 藻种库。培养该藻种所用的培养基为改良的 2MA 培养基, 改良培养基是在原 2MA 培养基配方^[13]中添加 0.057 g/L H₂BO₃, 并将原培养基中 0.016 g/L FeCl₃·6H₂O 替换为 0.0367 g/L EDTANaFe。从斜面挑取藻细胞接种于自养培养基中, 将接种后的液体培养基置于恒温摇床中, 在 40 °C、150 r/min 的条件下培养一段时间, 光源为冷白光, 光强为 5~10 μmol/(m²·s), 随后用平板划线法作分离纯化以获得无菌化纯藻种, 并分别用改

良 2MA 固体培养基平板和试管斜面保存藻种。

1.2 材料与仪器

硫酸铵、葡萄糖等试剂均为分析纯; 超净工作台 (Class II) 购于新加坡 ESCO 公司; 恒温摇床 (DHZ-DA) 购于太仓实验设备厂; 高速离心机 (HC-2514) 购于中国中科中佳公司; 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9123A) 购于上海一恒公司; 冻干机 (Modulyod-230) 购于美国 Thermo 公司; 分析天平 (AL104) 购于瑞士 Mettler Toledo 公司; pH 计 (InLab Micro) 购于瑞士 Mettler Toledo 公司; 组织破碎仪 (Tissuelyser-24) 购于上海净信公司; 生物传感分析仪 (SBA-40D) 购于山东省科学院生物研究所; 水质分析仪 (HI83200) 购于意大利 Hanna 公司; 流式细胞仪 (CytoFLEX) 购于美国 Beckman Coulter 公司; 紫外分光光度计 (UV2300II) 购于上海天美公司。

1.3 实验方法

1.3.1 种子液配制

配制含有 5.24 g/L (NH₄)₂SO₄ 和 20 g/L 葡萄糖的 2MA 混养培养基, 使用 10%(V/V)稀硫酸调节培养基初始 pH 值至 2.5。再将 2MA 混养培养基分装到 250 mL 锥形瓶中, 装液量为 100 mL, 并在 115 °C 下高压灭菌 20 min。从平板上挑取单藻落, 接种到灭菌后的 2MA 混养培养基中, 随后将接种后的培养基置于光强为 20~200 μmol/(m²·s), 温度为 35 °C, 转速为 150 r/min 的恒温摇床中培养 5~8 d, 作为本实验种子液。

1.3.2 混养培养条件的优化

1.3.2.1 培养温度

取一定体积的种子液于 4000 r/min 条件下离心 3 min, 弃上清, 使用新鲜培养基重悬细胞并接种, 接种密度为 1×10⁷ cells/mL, 以上离心接种操作均在无菌条件下进行。随即将接种后的培养基分别置于 26、30、35 和 40 °C 的恒温光照摇床中培养 7 d, 光照强度为 80 μmol/(m²·s), 每 24 小时取样, 测定样品的细胞密度、葡萄糖浓度以及 NH₄⁺ 浓度。所有实验结束后收集剩余藻液, 并于 4000 r/min 的条件下离心 3 min, 弃上清, 将藻泥进行真空冷冻干燥以获得藻粉, 藻粉于 -20 °C 冰箱中储存作后续分析检测使用。

1.3.2.2 培养基碳氮比

通过加入 10、20、30、40 和 50 g/L 葡萄糖于改良 2MA 培养基中, 将培养基碳氮比分别调节为 3、6、9、12 和 16。培养基分装、灭菌和接种操作同 1.3.2.1, 接种密度为 1×10⁷ cells/mL, 随后将接种后的培养基置于恒温光照摇床中培养 11 d, 培养温度为 30 °C, 光照

强度为 $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 每 24 h 进行取样测定, 培养结束后参照 1.3.2.1 操作步骤获得干燥藻粉。

1.3.2.3 初始细胞密度

参照 1.3.2.1 操作步骤, 将接种的初始细胞密度分别调节为 1×10^6 、 1×10^7 和 1×10^8 cells/mL, 随即将接种后的培养基置于恒温光照摇床中培养 8 d, 培养温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度为 $150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 在培养的第 0、1、3、5、7 和 8 d 各取一次样进行测定, 培养结束后参照 1.3.2.1 操作步骤获得干燥藻粉。

1.3.2.4 光照强度

对改良 2MA 培养基进行微藻接种, 接种密度为 1×10^8 cells/mL, 随即将接种后的培养基分别置于光照强度为 50、80、110、150、190 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的恒温光照摇床中培养 8 d, 培养温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 在培养的第 0、1、3、5、7 和 8 d 各取一次样进行测定, 培养结束后参照 1.3.2.1 操作步骤获得干燥藻粉。

1.3.3 分析测试

1.3.3.1 细胞密度

将样品进行稀释, 并用 300 目滤布过滤, 随后使用流式细胞仪测定细胞密度。流式细胞仪的激发光为 488 nm 的氩离子激光, 测定过程中对细胞的前向散射光信号 (Forward scatter, FSC) 和侧向散射光信号 (Side scatter, SSC) 进行采集, 流式细胞仪采集参数设置为: 样本流速为 $30 \mu\text{L}/\text{min}$, 记录时间为 30 s, 记录 10000 个以上的细胞数据, 并使用 CytExpert 1.2 软件分析数据。根据下列公式计算细胞生长到达稳定期前的平均比生长速率^[1]:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / \Delta t$$

式中: μ 为细胞生长到达稳定期前的平均比生长速率, 单位为 d^{-1} ; N_0 和 N_t 分别为第 0 d 和时间 t 对应的细胞密度, 单位为 cells/mL; Δt 为到达稳定期的时间, 单位为 d。

1.3.3.2 生物量干重

采用差量法测定样品干重。首先测量干燥离心管重量, 记为空管重量。先吸取一定体积的藻液于该离心管中, 并将其置于 $8000 \text{ r}/\text{min}$ 条件下离心 3 min, 弃上清, 随后使用去离子水重悬藻泥, 再次离心弃去上清获得藻泥。将藻泥置于烘箱中 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干至恒重, 测定并记录总重量, 总重量减去空管重量即为该体积下的微藻生物量干重。

1.3.3.3 葡萄糖浓度

将一定体积的样品置于 $8000 \text{ r}/\text{min}$ 条件下离心 3 min, 取上清并将其稀释至可测定范围 ($0.00 \sim 1.00 \text{ g}/\text{L}$), 随后采用生物传感分析仪测定上清液中葡萄糖浓度。首先使用葡萄糖标准液定标, 定标通过后吸取

$25 \mu\text{L}$ 样液进行测定, 记录读数。使用制作的标准曲线对测定读数进行换算, 换算结果乘以稀释倍数即为样品的实际葡萄糖浓度值。

1.3.3.4 NH_4^+ 浓度

将一定体积的样品置于 $8000 \text{ r}/\text{min}$ 条件下离心 3 min, 取上清并稀释至可测定的范围 ($0.00 \sim 10.00 \text{ mg}/\text{L}$), 稀释终体积为 10 mL。采用水质分析仪测定 NH_4^+ 浓度, 记录读数。根据制作的标准曲线对测定读数进行换算, 换算结果乘以稀释倍数即为样品的实际 NH_4^+ 浓度值。

1.3.3.5 藻胆蛋白含量

称取一定质量的藻粉于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 ($0.05 \text{ mol}/\text{L} \text{ Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0) 和适量研磨珠, 随后用液氮迅速冷冻并置于组织破碎机中破碎 2 min, 重复冷冻破碎操作直至细胞完全破碎 (直至显微镜下不能观察到完整的细胞)。将破碎后的细胞悬液置于 $13200 \text{ r}/\text{min}$ 条件下离心 30 min, 收集上清液于 15 mL 离心管中。随后加入缓冲液重悬沉淀物, 并重复上述操作直至多次提取后上清无明显蓝绿色。将色素提取液定容至一定体积, 测量稀释后的色素提取液在 562、615 和 652 nm 处吸光值, 再根据下列公式计算对应的 PBP 含量^[1]:

$$c(\text{PC}) = (A_{615} - 0.474 \times A_{615}) / 5.34$$

$$c(\text{APC}) = (A_{652} - 0.208 \times A_{615}) / 5.09$$

$$c(\text{PE}) = [A_{562} - 2.41 \times c(\text{PC}) - 0.849 \times c(\text{APC})] / 9.62$$

$$\text{PBP 含量}(\%) = [c(\text{PC}) + c(\text{APC}) + c(\text{PE})] \times V / m \times 100\%$$

式中: c 为相应藻胆蛋白的浓度, 单位为 mg/mL ; V 为定容体积, 单位为 mL; m 为藻粉质量, 单位为 g。

1.4 数据统计

采用 Microsoft Excel 2013 和 Origin 9.0 Software 对数据进行统计分析, 实验数据均采用平均值 \pm 标准误差 (mean \pm SD) 的形式表示。采用单因素分析法检验组间差异, $p < 0.05$ 为显著差异, 标记为 *; $p < 0.01$ 为极显著差异, 标记为 **。

2 结果与讨论

2.1 培养温度对 *G. sulphuraria* 生长及藻胆蛋白积累的影响

本研究就温度对 *G. sulphuraria* 生长和 PBP 积累的影响进行分析, 结果如图 1 所示。

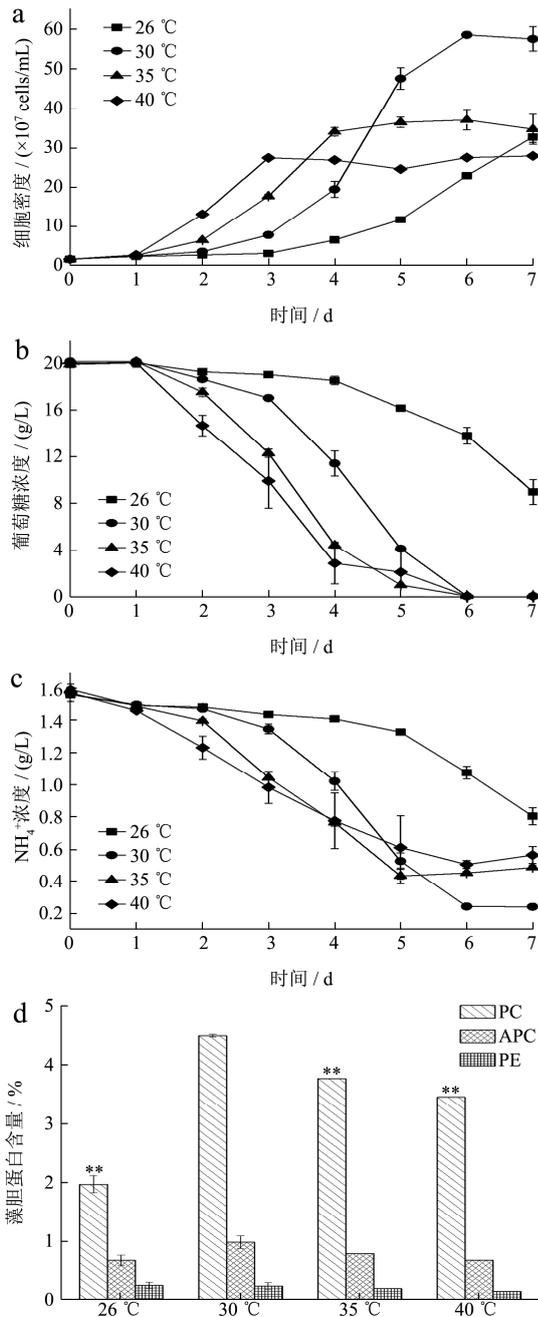


图1 不同温度对 *G. sulphuraria* 细胞生长 (a)、葡萄糖 (b) 和 NH_4^+ 消耗 (c) 以及 PBP 含量 (d) 的影响

Fig.1 The growth curve (a), glucose (b) and NH_4^+ consumption (c), and PBP content (d) of *G. sulphuraria* at different temperatures

注: 以培养温度为 30 °C 的实验组为对照组进行 PBP 含量的显著性分析。*表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$ 。

当培养温度为 30 °C 时, 细胞生长的延滞期为 48 h; 当培养温度为 40 °C 时, 细胞生长的延滞期缩短为 24 h; 而当温度从 30 °C 升高到 40 °C 时, 对数期由 96 h 缩短至 48 h。最终选择培养温度为 30 °C, 此时可获得最大细胞密度为 5.85×10^8 cells/mL, 显著高于其它实验组 ($p < 0.05$); 该温度下细胞生长到达稳定期前的

平均比生长速率为 0.60 d^{-1} , 这表明 30 °C 的培养温度更有利于 *G. sulphuraria* 细胞增殖。图 1b 和图 1c 显示葡萄糖和 NH_4^+ 的消耗趋势与细胞密度的增长以及 PBP 积累趋势相符; 在消耗等量葡萄糖的情况下 (图 1b 和 1c), *G. sulphuraria* 在 30 °C 的培养温度下可吸收更多的 NH_4^+ 以满足细胞的快速增殖和色素蛋白合成的需求。培养结束后对生物质 PBP 含量进行检测, 结果显示 (图 1d), 培养温度为 30 °C 条件下, PBP 在 *G. sulphuraria* 细胞中的积累量最大, 对应的 PBP、PC 含量分别为干重的 5.72% 和 4.50%, 该组别下获得的 PBP 含量显著高于其他实验组 ($p < 0.05$)。

温度可作用于胞内酶活性从而影响微藻的生长和代谢^[14]。*G. sulphuraria* 主要存活在高温和强酸等极端环境中, 其胞内多数酶在高温下具有较高活性。已有报道嗜热藻细胞中参与光合作用的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 在中低温环境下活性较低, 而在温度高于 40 °C 的条件下活性较高^[15]。另外, 有研究表明在培养温度为 25~45 °C 的条件下, *G. sulphuraria* 异养生长的延滞期随温度升高而缩短, 而 PC 含量却随着温度升高而降低^[8,16], 这与本实验结果相符。本研究结果显示嗜硫原始红藻 *G. sulphuraria* 在培养温度为 30 °C 条件下可获得最高的细胞密度和 PBP 积累量, 猜测是由于较低温度 (26 °C) 不利于胞内酶的高效催化; 而过高温度下细胞的光呼吸作用增强, 消耗更多能量, 不利于生物物质的高效积累。此外, 也有研究表明这种高温条件下 PBP 含量降低的现象可能是由藻胆体漂白导致^[14]。因此, 本研究筛选优化的培养温度为 30 °C, 该温度条件有利于促进嗜硫原始红藻 *G. sulphuraria* 细胞增殖和 PBP 的高效积累。

2.2 碳氮比对 *G. sulphuraria* 生长及藻胆蛋白

积累的影响

本研究通过添加不同浓度的葡萄糖调整培养基的碳氮比, 并分析了不同碳氮比条件下细胞生长、营养物质消耗和 PBP 的积累情况。经过统计学分析, 在碳氮比为 3~16 范围内, 葡萄糖消耗以及 PBP 含量呈现先升高后降低的趋势, 并均在碳氮比为 6 时达到峰值, 且该藻的平均比生长速率在碳氮比为 16 时显著降低到 0.53 d^{-1} 。在碳氮比为 6 (葡萄糖浓度为 20 g/L) 的培养条件下, *G. sulphuraria* 的平均比生长速率和最高细胞密度分别为 0.58 d^{-1} 和 5×10^8 cells/mL。培养结束后对生物质 PBP 含量进行检测, 结果表明 (图 2d), 当碳氮比为 6 时, 培养所获得的 PBP 含量为干重的 6.43%, 显著高于其它实验组 ($p < 0.05$), 其中 PC 在

PBP 中的占比为 76.57%，其含量为干重的 4.92%。该组获得的 PBP 和 PC 含量较碳氮比为 3 的实验组分别提高了 50.23%和 61.41%。

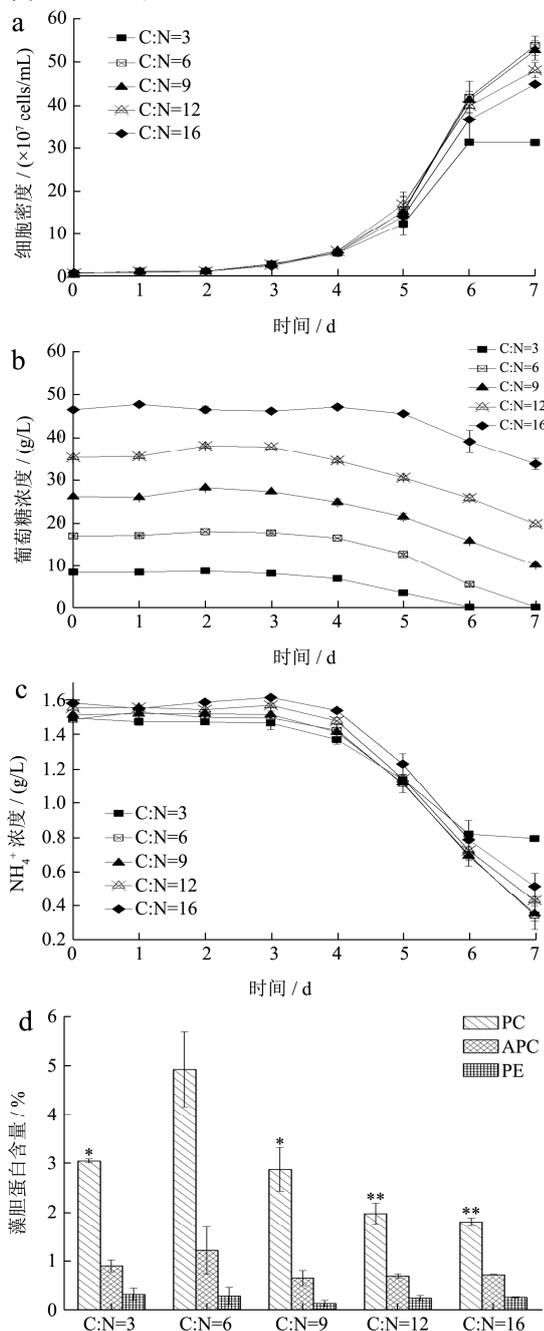


图2 不同碳氮比对下 *G. sulphuraria* 细胞生长 (a)、葡萄糖 (b) 和 NH_4^+ 消耗 (c) 以及 PBP 含量 (d) 的影响
Fig.2 The growth curve (a), glucose (b) and NH_4^+ consumption (c), and PBP content (d) of *G. sulphuraria* under different C/N ratios

注：以培养基碳氮比为 6 的实验组为对照组进行 PBP 含量的显著性分析。*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ 。

微藻对碳氮源的需求与其种类相关，最佳碳氮比可促进微藻的快速生长。碳氮比的变化不仅对微藻的正常生长产生影响，还会影响微藻胞内多糖、蛋白质

或脂肪酸等物质的合成与代谢流向^[17]。在该培养体系中葡萄糖作为 *G. sulphuraria* 混养的有机碳源，其对 *G. sulphuraria* 生长和 PBP 积累具有一定的影响。一方面，葡萄糖为 *G. sulphuraria* 的生长和代谢物的合成提供碳骨架以维持细胞正常的生长和代谢。因此，碳源供应的不足会导致细胞生长受抑制。本研究发现在碳氮比为 3 的条件下，*G. sulphuraria* 的细胞生长与葡萄糖消耗情况密切相关，主要表现在细胞的生长因葡萄糖的耗尽而受到抑制，即培养至第 6 d 时，培养基中葡萄糖耗尽，随即细胞的生长受到抑制。这表明充足碳源的供应决定着细胞的正常生长。另一方面，高浓度的葡萄糖可促进细胞的光呼吸作用，导致细胞能量损耗和含碳物质积累量减少，进而影响到蛋白质的聚合，且葡萄糖对参与 PBP 合成的血红素加氧酶的活性也具有一定的抑制作用^[18-20]。因此，过高碳氮比不利于 *G. sulphuraria* 的快速生长和 PBP 的高效积累。而有研究表明在低碳氮比条件下，细胞代谢流中更多的碳流向氨基酸合成，氨基酸的生物合成通量增加，最终蛋白质含量提高^[19]。Sloth 等^[21]的研究也证实了适当降低混养培养基的碳氮比有利于 *G. sulphuraria* 中 PBP 的高效积累。综上所述，本研究筛选优化的碳氮比为 6。在该碳氮比条件下，*G. sulphuraria* 生长较快，细胞内蛋白质合成和 PBP 积累量均得到提高。

2.3 初始细胞密度对 *G. sulphuraria* 生长及藻胆蛋白积累的影响

初始细胞密度不仅会影响培养体系中营养物质的分配以及细胞生长的微环境，而且会改变胞外分泌物和信号分子的释放，从而影响细胞的生长和 PBP 的积累^[22]。本研究针对初始细胞密度对细胞生长和 PBP 高效积累的影响进行研究，结果如图 3a 所示，在初始细胞密度为 1×10^8 cells/mL 的条件下，细胞生长的延滞期为 24 h，获得的最高细胞密度为 6.98×10^8 cells/mL，对应的 PBP 和 PC 含量分别为干重的 12.40%和 10.22%。该初始细胞密度条件下细胞生长的延滞期最短，葡萄糖消耗最快，在培养至第 5 d 时 *G. sulphuraria* 已耗尽培养基中的葡萄糖 (图 3b)，且其获得的 PBP 含量显著高于其它实验组 ($p < 0.05$)，表明该初始细胞密度有利于缩短 *G. sulphuraria* 培养周期以及促进 PBP 的高效积累。

自养生长的细胞在转移至含葡萄糖的混养培养条件后，会诱导其胞内葡萄糖摄取系统，不利于细胞快速生长，这也可能是培养初期细胞生长存在延滞期的重要原因之一^[16]。而高密度接种可以有效减少单个细

胞所分配到的葡萄糖等营养物质,从而有利于细胞更好地适应新环境^[23]。此外,高细胞密度培养会促使细胞释放更多信号分子,有利于启动细胞生长,缩短延滞期^[24]。因此,高初始细胞密度的培养体系有利于 *G. sulphuraria* 的快速生长。培养结束后对生物质 PBP 含量进行检测,结果发现在初始细胞密度为 1×10^8 cells/mL 的条件下 PBP 含量最高,猜测是由于在葡萄糖耗尽后,细胞营自养生长,葡萄糖对细胞光合色素合成的抑制作用减弱,因此有利于 PBP 的高效积累。综上所述,本研究筛选优化的初始细胞密度为 1×10^8 cells/mL,该初始细胞密度有利于 *G. sulphuraria* 的快速生长和 PBP 的高效积累。

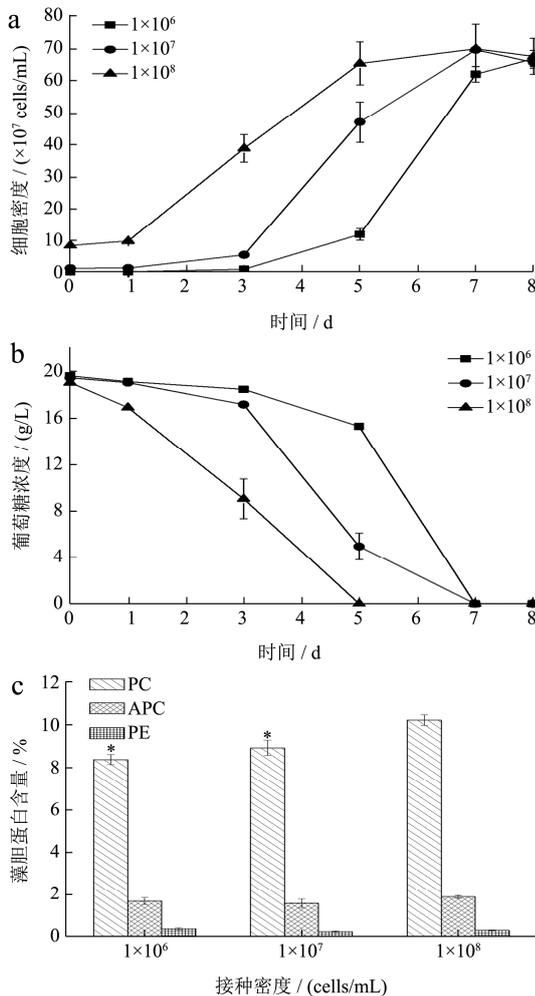


图3 不同初始细胞密度对 *G. sulphuraria* 细胞生长 (a)、葡萄糖消耗 (b) 以及 PBP 含量 (c) 的影响

Fig.3 The growth curve (a), glucose consumption (b), and PBP content (c) of *G. sulphuraria* at different initial cell densities

注:以初始细胞密度为 1×10^8 cells/mL 的实验组为对照组进行 PBP 含量的显著性分析。*表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$ 。

2.4 光照强度对 *G. sulphuraria* 生长及藻胆蛋白积累的影响

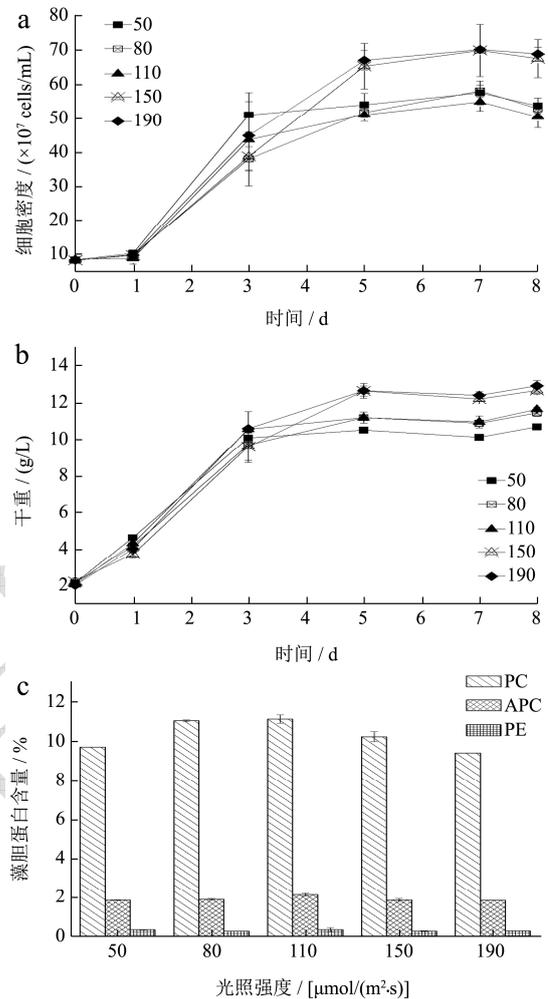


图4 不同光照强度对 *G. sulphuraria* 细胞生长 (a)、生物量积累 (b) 以及 PBP 含量 (c) 的影响

Fig.4 The growth curve (a), biomass accumulation (b), and PBP content (c) of *G. sulphuraria* under different light intensities

在混养体系中,光照强度对混养体系下 *G. sulphuraria* 的细胞生长具有重要的影响,主要是由于 *G. sulphuraria* 细胞在利用有机碳源进行生长之外,还可以利用 CO_2 进行光合作用而生长,而光强则会影响光合作用在细胞产能和 CO_2 固定方面的作用^[25,26]。因此,本研究对不同光照强度条件下的细胞生长和 PBP 含量的变化进行研究,结果显示(图4和表1),在光照强度为 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下培养可获得最大的 PBP 和 PC 含量,分别为干重的 13.63% 和 11.10%,显著高于其它组别 ($p < 0.05$); 且获得的最高 PBP 产量

1588.36 mg/L, 显著高于光强为 50 和 190 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的实验组 ($p<0.05$)。该组获得的最高细胞密度为 5.48×10^8 cells/mL, 最终生物量产量为 11.65 g/L, 平均比生长速率为 0.36 d^{-1} ; 而在光照强度为 190

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下可获得最大的生物量, 其干重为 12.92 g/L, 显著高于光强为 50~110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的实验组 ($p<0.05$)。

表 1 不同光照强度对 *G. sulphuraria* 生物量和藻胆蛋白积累的影响

Table 1 Effects of different light intensities on biomass and PBP accumulation of *G. sulphuraria*

| 光强/ $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ | 干重/(g/L) | 含量/(%干重) | | 产量/(mg/L) | |
|---|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| | | PBP | PC | PBP | PC |
| 50 | 10.70 \pm 0.17** | 11.95 \pm 0.01** | 9.70 \pm 0.01 | 1267.07 \pm 0.01** | 1027.63 \pm 0.01 |
| 80 | 11.45 \pm 0.18 | 13.24 \pm 0.01* | 11.02 \pm 0.05 | 1525.38 \pm 23.21 | 1270.34 \pm 24.99 |
| 110 | 11.65 \pm 0.10 | 13.63 \pm 0.03 | 11.10 \pm 0.21 | 1588.36 \pm 23.12 | 1293.66 \pm 39.67 |
| 150 | 12.67 \pm 0.20** | 12.40 \pm 0.20** | 10.22 \pm 0.25 | 1584.73 \pm 38.56 | 1305.72 \pm 42.94 |
| 190 | 12.92 \pm 0.28** | 11.59 \pm 0.01** | 9.40 \pm 0.01 | 1506.19 \pm 0.01* | 1222.64 \pm 0.01 |

注: 以光强为 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的实验组为对照组进行干重以及 PBP 产量的显著性分析; *表示 $p<0.05$; **表示 $p<0.01$ 。

值得注意的是, 细胞的生长在不同培养阶段所呈现的变化可归因于单个细胞实际接收到的光能的差异。在培养初期, 在光照强度为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 培养条件下细胞生长较快, 这主要是由于体系中藻细胞密度相对较低, 遮光效应较弱, 而在高光强条件下单个细胞接收的光能过高, 可能导致光损伤, 从而使细胞生长受到抑制; 在培养后期, 高光强 190 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 更有利于细胞增殖, 这是由于光在细胞悬浮液中会发生反射和散射, 从而造成光衰减, 因此最终单个细胞实际获得的光能低于预估值, 而在高细胞密度的情况下, 这种光遮蔽效应更显著^[21]。当体系中藻细胞密度大幅度增加, 遮光效应较强, 单个细胞接收到的光能削弱时, 较高光强更有利于细胞生长。

Sloth^[21]等研究表明, 在混养体系下, 低光照强度有利于 *G. sulphuraria* 光合色素的合成, 但过低的光照强度反而会导致 PBP 合成受阻, 这是由于藻胆蛋白的生物合成需要氧分子的参与, 而过低的光强会弱化微藻的光合作用从而影响微藻的放氧量, 进而间接影响到藻胆蛋白的合成^[26]。过高光强也不利于藻胆蛋白的合成, 这是因为它会诱导细胞的光损伤, 致使胞内产生活性氧, 从而抑制光合色素的合成^[14,27]。综上, 筛选合适的光照强度不仅有利于细胞的快速生长, 而且可促进 PBP 的高效积累。本研究筛选的优化光照强度为 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 该条件可促进细胞高效积累藻胆蛋白并提高 PBP 产量。

通过对 *G. sulphuraria* 混养体系中的环境因素进行优化, 可显著提高 *G. sulphuraria* 的生物量、PBP 含量和产量。优化前的培养条件为: 40 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、培养基碳氮比为 21、初始细胞密度为 3.79×10^6 cells/mL, 该体系最终可收获的生物量干重为 7.98 g/L, 生物质中 PBP 含量及产量分别为干重的

7.12%和 551.69 mg/L; 使用优化后的培养体系对 *G. sulphuraria* 进行培养, 所获得的干重比优化前提高了 45.99%, 而 PBP 含量则比优化前提高了 91.62%, 最终 PBP 产量约为优化前的 3 倍。目前螺旋藻工业化大规模培养产藻胆蛋白的生产周期多为 10 d 以上, 其 PC 含量可达干重的 16.10%, 但生物量干重仅为 6.78 g/L, 收获的 PC 产量为 1034.80 mg/L, 其产量和生产效率均低于优化后的 *G. sulphuraria* 混养体系^[28]。综上, 本研究系统优化了 *G. sulphuraria* 培养体系中的环境因素, 从而显著提高了 *G. sulphuraria* 胞内 PBP 的积累量, 这对于 *G. sulphuraria* 的工业化开发应用具有重要的意义, 可为微藻藻胆蛋白的规模化生产提供重要的理论基础和参考价值。

3 结论

本研究通过优化培养温度、碳氮比、初始细胞密度以及光照强度等环境因素, 建立了 *G. sulphuraria* 最优混养体系, 实现了高密度细胞生长和藻胆蛋白的高效积累, 这不仅提高了 *G. sulphuraria* 的生物品质, 同时也强化了该培养体系下 *G. sulphuraria* 的生产潜力以及应用价值, 为未来 *G. sulphuraria* 资源的开发利用以及规模化、工业化生产藻胆蛋白等提供了重要的技术支持。由于嗜硫原始红藻 *G. sulphuraria* 在富氮条件下可高效积累藻胆蛋白, 且对环境中的高氨氮、高盐、极低 pH 有超强耐受性, 可重点研究开发高氨氮-高盐废水的资源化利用技术, 以实现废水的变废为宝。目前国际上关于 *G. sulphuraria* 的最新研究也证实了该研究开发方向具有可行性。

参考文献

[1] Khazi M I, Demirel Z, Dalay M C. Evaluation of growth and

- phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(3): 1513-1523
- [2] Khattar J I S, Kaur S, Kaushal S, et al. Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions [J]. *Algal Research*, 2015, 12: 463-469
- [3] Sonani R R, Rastogi R P, Patel R, et al. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins [J]. *World Journal of Biological Chemistry*, 2016, 7(1): 100-109
- [4] Schmidt R A, Wiebe M G, Eriksen N T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 90(1): 77-84
- [5] Ternes C M. *Metabolic Evolution in Galdieria sulphuraria* [D]. Oklahoma: Oklahoma State University, 2015
- [6] Barbier G G, Hoover R B, Zimmermann M, et al. Genomics of the thermo-acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* [C]// Optics & Photonics. San Diego, CA: International Society for Optics and Photonics, 2005
- [7] Moon M, Mishra S K, Kim C W, et al. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from *Galdieria sulphuraria* [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2014, 31(3): 490-495
- [8] Sloth J K, Jensen H C, Pleissner D, et al. Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238: 296-305
- [9] Henkanatte-Gedera S M, Selvaratnam T, Caskan N, et al. Algal-based, single-step treatment of urban wastewaters [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 189: 273-278
- [10] JU Xiao-hui, Igarashi K, Miyashita S I, et al. Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfotermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 759-764
- [11] WAN Min-xi, WANG Zhen-yang, ZHANG Zhen, et al. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 272-278
- [12] Graverholt O S, Eriksen N T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1): 69-75
- [13] Minoda A, Sawada H, Suzuki S, et al. Recovery of rare earth elements from the sulfotermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1513-1519
- [14] Kumar M, Kulshreshtha J, Singh G P. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42(3): 1128-1135
- [15] Ford T W. Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from the thermophilic, acidophilic alga, *Cyanidium caldarium* (Geitler): purification, characterisation and thermostability of the enzyme [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, 569(2): 239-248
- [16] Oesterhelt C, Schnarrenberger C, Gross W. Characterization of a sugar/polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *European Journal of Phycology*, 1999, 34(3): 271-277
- [17] 鹿琳. 眼点微拟球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 和朱氏四片藻 (*Tetraselmis chuii*) 的异养与兼养研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015
- LU Lin. Studies on heterotrophy and mixotrophy of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015
- [18] HUANG Ai-you, LIU Li-xia, YANG Chen, et al. *Phaeodactylum tricorutum* photorespiration takes part in glycerol metabolism and is important for nitrogen-limited response [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 73
- [19] Allen D K, Young J D. Carbon and nitrogen provisions alter the metabolic flux in developing soybean embryos [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1458-1475
- [20] Rhie G, Beale S I. Regulation of heme oxygenase activity in *Cyanidium caldarium* by light, glucose, and phycobilin precursors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(13): 9620-9626
- [21] Sloth J K, Wiebe M G, Eriksen N T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(1-2): 168-175
- [22] 陆姝欢. 小球藻培养过程代谢机制的跨组学研究[D]. 天津: 天津大学, 2012
- LU Shu-huan. Trans-omics study of the cellular metabolism of *Chlorella sorokiniana* cultivation [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012