

## 混合营养模式下3种有机物对蛋白核小球藻生长及细胞组成的影响

穆亮亮, 黄旭雄

### Effects of three organic substances on the growth and cell composition of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic mode

MU Liangliang, HUANG Xuxiong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20220303758>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### [亚硒酸钠对蛋白核小球藻生长及抗氧化酶活性的影响](#)

Effects of sodium selenite on growth and antioxidant enzyme activity of green alga *Chlorella pyrenoidosa*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 838 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-279>

##### [酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼生长性能、肠道形态、免疫功能和抗病力的影响](#)

Effects of Dietary Yeast Culture Supplementation on Growth, Intestinal Morphology, Immunity, and Disease Resistance in *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 1 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.001>

##### [三种饵料对盾形陀螺珊瑚生长性能的影响](#)

Effect of Baits on the Growth of *Turbinaria peltata*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 44 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.006>

##### [碳源添加方式对海水生物絮凝系统启动效率的影响](#)

Effect of carbohydrates addition methods on start-up efficiency of seawater biofloc technology system

上海海洋大学学报. 2019, 28(2): 257 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180202222>

##### [微藻异养/兼养生产多不饱和脂肪酸以及向卤虫的传递](#)

Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for PUFA production and delivery to *Artemia* sp.

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1373 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503451>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0318-11

DOI:10.12024/jsou.20220303758

## 混合营养模式下 3 种有机物对蛋白核小球藻生长及细胞组成的影响

穆亮亮<sup>1</sup>, 黄旭雄<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 以一株新分离的蛋白核小球藻 SHOU-1002 (*Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002) 为试验材料, 分别设置添加葡萄糖、谷氨酸钠和酵母浸出物的 3 组混合营养组和光合自养组, 比较不同营养模式下蛋白核小球藻的生长及细胞组成的差异。结果表明: 在混合营养模式下蛋白核小球藻细胞密度始终显著高于光合自养组。接种后 6 d 内葡萄糖组的藻细胞密度显著高于谷氨酸钠组和酵母浸出物组; 第 10 天起, 3 个混合营养组藻细胞密度无显著性差异。培养第 12 天, 谷氨酸钠组和酵母浸出物组的叶绿素 a、类胡萝卜素、蛋白和总脂含量显著高于葡萄糖组, 碳水化合物含量则显著低于葡萄糖组。随培养时间的延长, 葡萄糖组的饱和脂肪酸 (SFAs) 含量不断升高, 多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 含量不断降低, 谷氨酸钠组和酵母浸出物组的 PUFAs 含量则先降低后升高, 培养第 12 天谷氨酸钠组和酵母浸出物组的 PUFAs 含量显著高于葡萄糖组。这表明该株蛋白核小球藻具有混合营养能力且混合营养模式下其生长效能显著提升, 混合营养模式下添加酵母浸出物或谷氨酸钠所培养的藻细胞较添加葡萄糖所培养的藻细胞具有更高的营养价值。

**关键词:** 混合营养; 蛋白核小球藻; 葡萄糖; 谷氨酸钠; 酵母浸出物; 生长; 细胞组成

**中图分类号:** S 968.4

**文献标志码:** A

微藻被认为是当今具有重要开发潜力的生物资源, 可用于高不饱和脂肪酸<sup>[1]</sup>、虾青素<sup>[2]</sup>、多糖<sup>[3]</sup>等生理活性物质的提取, 在化妆品<sup>[4]</sup>、生物柴油<sup>[5]</sup>、生物塑料<sup>[6]</sup>等领域具有广阔的应用前景。但多数光合自养型微藻生产过程中单位水体的生物量较低, 生产成本相对较高, 其高昂的生产成本成为微藻商业化生产的主要制约因子<sup>[7]</sup>。自然界中也存在部分微藻具有异养或混合营养的能力, 这些微藻在没有光照条件或光照不足条件下能利用有机物进行生长, 避免光合自养模式下因高细胞密度导致光照不足显著影响生长的缺陷, 从而能够实现生物量和高附加值产物的高效增加<sup>[8-10]</sup>。微藻异养培养常用的有机物为葡萄糖, 小球藻 (*Chlorella protothecoides*)<sup>[11]</sup>、斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)<sup>[12]</sup>、纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)<sup>[12]</sup>、平滑菱形藻 (*Nitzschia laevis*)<sup>[13]</sup>、尖胞栅藻 (*Scenedesmus acuminatus*)<sup>[14]</sup>

和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)<sup>[15]</sup>等微藻均已证实能够利用葡萄糖作为有机碳源实现高效异养或混合营养。此外, 三角褐指藻也被证实能够以甘油<sup>[12]</sup>、甘露醇<sup>[16]</sup>为有机碳源实现高效生长, 乙酸盐也可作为碳源促进微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 的生长和油脂积累<sup>[17]</sup>, 海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 则可以利用丙氨酸、谷氨酸等多种游离氨基酸快速生长<sup>[18]</sup>。在细菌等异养微生物的培养中, 酵母提取物是最常用的异养培养基成分。然而, 有关利用酵母提取物开展微藻异养或混合营养培养尚未见报道。

另一方面, 微藻的细胞营养组成及代谢产物与其营养方式、培养基营养物质形态等因素密切相关。刘晓娟等<sup>[19]</sup>对三角褐指藻, 王星宇等<sup>[20]</sup>对球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 的研究均表明混合营养不利于蛋白的积累, 但混合营养显著提

收稿日期: 2022-03-08

修回日期: 2022-05-18

基金项目: 沪科技兴农项目 (2021-02-08-00-12-F00761)

作者简介: 穆亮亮 (1991—), 男, 博士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 1173432686@qq.com

通信作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

升了三角褐指藻总脂和碳水化合物含量,降低了球等鞭金藻 PUFAs 含量。黄旭雄等<sup>[21]</sup>则指出相较于豚,以硝酸钠为氮源可显著提高微绿球藻的 PUFAs 含量。王玉萍等<sup>[22]</sup>以葡萄糖为碳源培养铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),其总可溶性蛋白含量比 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 培养的铜绿微囊藻提高了 93.60%。然而,在混合营养条件下,不同类型有机物能在多大程度上影响微藻的代谢途径并改变其细胞营养组成仍有待进一步探究。

本研究以一株具有混合营养能力的蛋白核小球藻 SHOU-1002 为材料,以光合自养模式为对照,探究 3 种不同有机物(葡萄糖、谷氨酸钠、酵母浸出物)对混合营养模式下蛋白核小球藻的生长性能及细胞营养组成的影响,为后续进一步探究该株蛋白核小球藻的代谢途径积累数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 微藻培养

实验藻株分离自上海祥欣东滩种猪场污水水样,保种于上海海洋大学藻种室,经形态学和

ITS 序列比对,鉴定为蛋白核小球藻,命名为蛋白核小球藻 SHOU-1002 (*C. pyrenoidosa* SHOU-1002)。共设置 4 个实验组(表 1)、1 个光合自养组、3 个混合营养组,按 D 组(酵母浸出物)的 C、N、P 质量浓度(C:464.73 mg/L, N:123.04 mg/L, P:18.30 mg/L)换算 A 组、B 组和 C 组中各物质的用量, N 源和 P 源分别选用 NH<sub>4</sub>Cl 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,同时按 f/2 配方<sup>[23]</sup>向各组补充微量元素,每组 3 个平行。培养基及营养盐母液经 121 °C 高温灭菌 20 min 后用于试验。藻种离心(4 025 × g, 3 min, 4 °C)去上清,无菌水清洗两遍后将藻泥接种到内含 2.5 L 无菌培养基的 3 L 三角烧瓶中,根据混合培养预实验筛选的接种密度,设定为 300 × 10<sup>4</sup> cells/mL,接种后实测密度为 296 × 10<sup>4</sup> cells/mL。在光照培养箱中培养,光周期 24:0(L:D),温度 28 °C,光照强度 70 μmol/(m<sup>2</sup>·s),静置培养,每天定时摇瓶 3 次,隔天取样测藻细胞密度和脂肪酸组成,试验进行 12 d。第 12 天取样测干质量、色素、蛋白质、碳水化合物和总脂肪。

表 1 各实验组培养液组分

Tab. 1 Components in the experimental culture medium

培养基质 Culture substrate	组别 Groups			
	A	B	C	D
酵母浸出物 Yeast extract/mg	0	0	0	3 750
葡萄糖 Glucose/mg	0	2 905	0	0
谷氨酸钠 Sodium glutamate/mg	0	0	3 272.5	0
氯化铵 NH <sub>4</sub> Cl/mg	1 175	1 175	143.6	0
磷酸二氢钠 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mg	187.1	187.1	187.1	0
f/2 微量元素溶液 Trace metal solution/mL	2.5	2.5	2.5	2.5
水 H <sub>2</sub> O/L	2.5	2.5	2.5	2.5

注:酵母浸出物的 C、N、P 含量分别为 309.82、82.02、12.20 mg/g 湿样。

Notes: The C, N, P contents in yeast extract are 309.82, 82.02 and 12.20 mg/g.

### 1.2 酵母浸出物 C、N、P 含量的测定

C、N 采用德国 Elementar vario MAX CNS 常量元素分析仪测定,总 P 采用钼酸铵分光光度法(GB 11893—1989)测定<sup>[24]</sup>。

### 1.3 生长性能测定

每天定时取样,鲁戈氏碘液固定后采用血球计数板法测定藻细胞密度,并计算其相对增长率 μ:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t \quad (1)$$

式中: N<sub>0</sub> 为培养初始藻细胞密度; N<sub>t</sub> 为经过 t 时间后培养液中的藻细胞密度; t 为培养时间。

每组取 40 mL 藻液经预先恒重过的 0.45 μm

微孔滤膜抽滤,置于鼓风干燥箱中 105 °C 烘至恒重,计算生物量干重 B:

$$B = (W_1 - W_0) / V \quad (2)$$

式中: W<sub>0</sub> 为预恒重过的 0.45 μm 微孔滤膜的质量, g; W<sub>1</sub> 为恒重过后 0.45 μm 微孔滤膜和抽滤下来的藻泥的总质量, g; V 为抽滤的藻液体积, L。

### 1.4 色素、总糖、蛋白、总脂和脂肪酸的测定

采用分光光度法测定藻细胞色素含量<sup>[25]</sup>。采用苯酚-硫酸法测定总糖含量<sup>[26]</sup>。采用福林酚测定蛋白质含量<sup>[27]</sup>。采用氯仿:甲醇(体积比为 2:1)法测定总脂肪含量<sup>[28]</sup>。

采用直接甲酯化法测定脂肪酸组成<sup>[29]</sup>。取

一定体积藻液 4 ℃ 离心 ( $2\ 569 \times g$ , 3 min) 获得藻泥 (50 ~ 100 mg), 将藻泥转入带硅胶衬里螺旋帽的 15 mL 棕色螺纹口顶空瓶中, 加 2 mL 甲醇钠 (NaOMe, 0.5 mol/L), 置于超声波清洗机中 80 ℃ 水浴混匀 20 min, 冷却至室温后, 加 2 mL BF<sub>3</sub>-甲醇溶液, 再置于超声波清洗机中 80 ℃ 水浴混匀 20 min, 冷却至室温后, 加 800 μL 去离子水和 1 200 μL 正己烷, 旋涡混匀后,  $1\ 644 \times g$  离心 3 min, 将上层含有脂肪酸甲酯的正己烷层经 0.22 μm 针式滤器过滤至 2 mL 进样瓶中, 于 GC-MS 上检测脂肪酸含量。参照 WEI 等<sup>[30]</sup> 的方法设置检测的色谱条件, 具体如下: 载气为高纯度氮, 流量为 1.9 mL/min; 毛细管柱为 30.0 mm × 0.32 mm × 0.25 μm (温度上限为 325 ℃), 型号为 Omegawax 320; 柱温采用程序升温的方式: 起始温度 60 ℃, 以 50 ℃/min 的速度提至 170 ℃, 再以 2.0 ℃/min 的速度提至 230 ℃, 保持 1 min, 然后以 1.0 ℃/min 的速度提至 240 ℃, 保持 1 min, 分析时间共计 46.2 min。氢气流量为 30 mL/min, 空气流量为 300 mL/min; FID 检测器进样口温度 260 ℃; 进样量 2 μL, 分流比为 10:1, 压力为 60 kPa。根据混合脂肪酸及单一脂肪酸标准品的分析图谱和保留时间对样品脂肪酸进行定性。利用峰面积归一化法确定各脂肪酸的相对百分含量。

### 1.5 数据统计

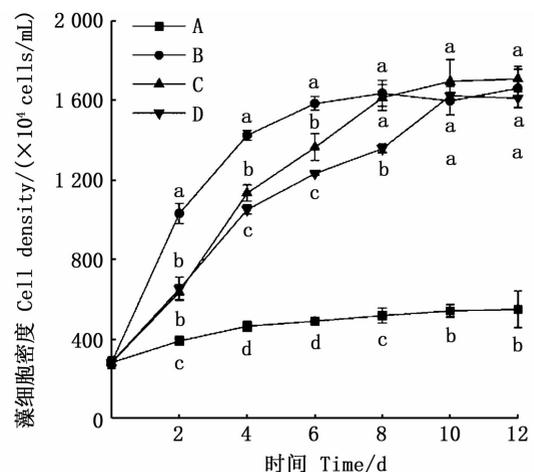
试验结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。数据采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因子方差分析 (One-way ANOVA), 并用 Duncan 氏检验进行多重比较,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同营养模式及有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 生长的影响

蛋白核小球藻 SHOU-1002 的生长性能在混

合营养模式下显著优于光合自养模式 (图 1)。接种后前 6 d, 混合营养葡萄糖 (B) 组藻细胞密度显著高于混合营养谷氨酸钠 (C) 组和混合营养酵母提取物 (D) 组 ( $P < 0.05$ ), 接种 10 d 后, B 组、C 组和 D 组的藻细胞密度无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。整个培养过程中, C 组和 D 组的生长趋势一致。混合营养组 (B、C 和 D 组) 的生物量显著高于光合自养组 (A), 培养第 12 天, B 组、C 组和 D 组之间生物量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 但均显著高于 A 组 ( $P < 0.05$ ), 其相对生长率较 A 组分别提高了 245%、254% 和 242% (表 2)。



同一时间节点上的不同字母表示同一时间点各试验组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different letters on the same time node mean significant differences among groups ( $P < 0.05$ ).

图 1 不同营养模式及有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 生长曲线的影响

Fig. 1 Growth curves of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 under different trophic modes and treated with different organic substrates

表 2 第 12 天不同营养模式及有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 生长特性的影响

Tab. 2 Growth characteristics of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 under different trophic modes and treated with different organic substrates on the 12th day

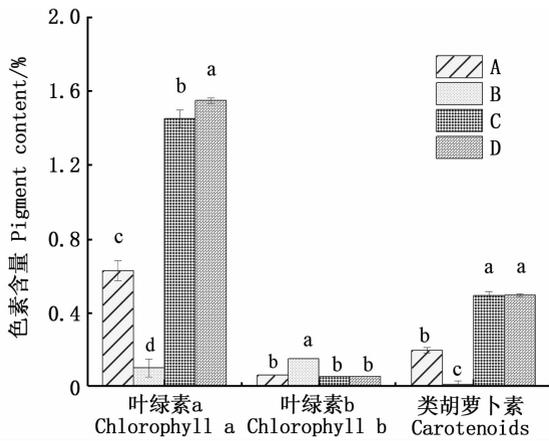
组别 Groups	A	B	C	D
相对生长率 Relative growth rate	0.054 ± 0.013 <sup>b</sup>	0.147 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.149 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.145 ± 0.003 <sup>a</sup>
生物量干质量 Biomass/(mg/L)	0.165 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.856 ± 0.030 <sup>a</sup>	0.809 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.855 ± 0.028 <sup>a</sup>

注: 同行数据含有不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Values in the same row with different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.2 不同营养模式及有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 胞内产物的影响

营养模式及混合营养有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 的胞内产物有巨大影响。细胞叶绿素 a 和类胡萝卜素含量 C 组和 D 组 > A 组 > B 组,叶绿素 b 含量 B 组 > A 组、C 组和 D 组(图 2)。D 组的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量最高(1.54%,0.49%),分别是 B 组的 14.89 倍和 35.78 倍。细胞蛋白质含量 C 组和 D 组 > A 组 > B 组,总脂肪含量 A 组、C 组和 D 组 > B 组,碳水化合物含量 B 组 > A 组 > C 组和 D 组。D 组的蛋白质含量最高(51.41%),较最低组 B 组(29.51%)提升了 74.20%;B 组的总脂肪含量最低(5.91%),较最高组 C 组(20.09%)降低了 70.60%;而碳水化合物含量则是 D 组最低(11.41%),较最高组 B 组(45.73%)降低了 75.04%(图 3)。经鲁哥氏碘液固定后,B 组藻细胞呈明显的深褐色(图版)。

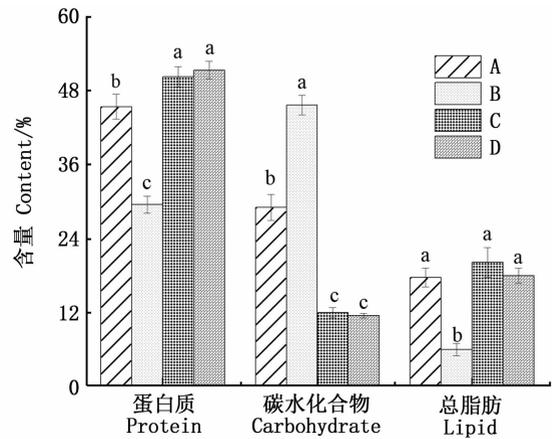


不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。  
Different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 2 第 12 d 不同营养模式及有机物下蛋白核小球藻 SHOU-1002 色素含量  
Fig. 2 Pigment content of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 under different trophic modes and treated with different organic substrates on the 12th day

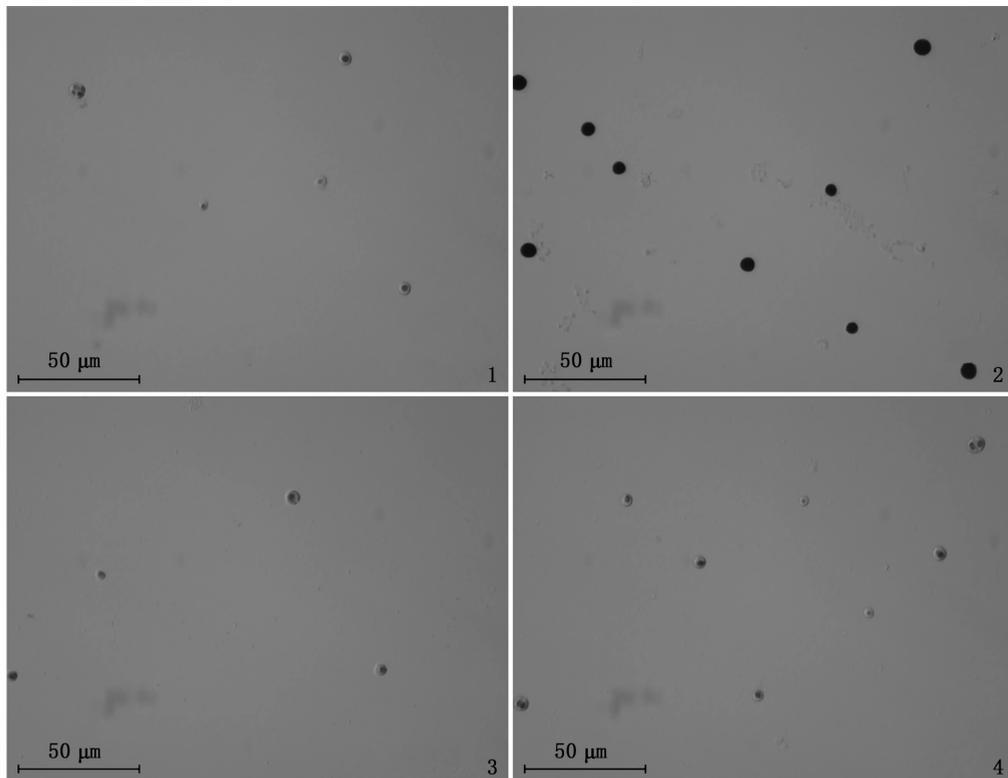
营养模式和有机物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 脂肪酸组成有显著影响。蛋白核小球藻

SHOU-1002 的主要脂肪酸为 16C 和 18C 脂肪酸,占总脂肪酸 99% 以上。培养第 12 天,细胞中饱和脂肪酸(SFAs)含量 B 组 > A 组 > C 组和 D 组, B 组较 A 组提高了 74.82%,C 组和 D 组较 A 组分别降低了 30.03% 和 35.68%。各处理组 C14:0, C16:0, C18:0 的变化规律和 SFAs 一致。多不饱和脂肪酸(PUFAs)含量 C 组和 D 组 > A 组 > B 组,C 组和 D 组较 A 组分别升高了 10.27% 和 14.16%,B 组较 A 组降低了 30.70%。培养过程中,A 组和 B 组的 SFAs 含量随培养时间的延长不断升高,且 B 组较 A 组增幅更大,C 组和 D 组则相对平稳。接种后前 2 d 混合营养组(B、C 和 D 组)的单不饱和脂肪酸(MUFAs)含量迅速升高,之后迅速下降,接种 6 d 后维持在相对稳定的水平;A 组的 MUFAs 前 6 d 则相对稳定,之后缓慢提升。接种后前 2 d 混合营养 C 组和 D 组的 PUFAs 含量迅速降低,之后迅速升高;接种 6 d 后,C 组和 D 组的 PUFAs 含量等于或高于 A 组, B 组的 PUFAs 含量则随培养时间的延长不断降低,且始终低于 A 组(图 4)。



不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。  
Different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 第 12 天不同营养模式及有机物下蛋白核小球藻 SHOU-1002 蛋白质、碳水化合物和总脂肪含量  
Fig. 3 Protein, carbohydrate and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 under different trophic modes and treated with different organic substrates on the 12th day



1. 光合自养组; 2. 混合营养组(葡萄糖); 3. 混合营养组(谷氨酸钠); 4. 混合营养组(酵母浸出物)。  
1. Phototrophic; 2 Mixotrophic (glucose); 3 Mixotrophic (sodium glutamate); 4 Mixotrophic (yeast extract).

图版 第 12 天不同营养模式及有机物下蛋白核小球藻 SHOU-1002 经鲁哥氏碘液固定后 40 倍镜下照片  
Plate Photos of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 fixed with Lugol's iodine solution  
under 40 × microscope in different groups on the 12th day

### 3 讨论

#### 3.1 葡萄糖、谷氨酸钠和酵母浸出物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 生长的影响

混合营养模式下,微藻既可以利用光能又可以利用有机物,是光合自养和化能异养的结合体<sup>[8]</sup>。混合营养模式下通常有最高的生物量。葡萄糖是微藻混合营养生长最常用的有机碳源,小球藻能够利用葡萄糖进行异养或混合营养生长。本研究中,3 组混合营养蛋白核小球藻 SHOU-1002 的生物量均高于光合自养组,与前人的研究结果一致(表 3)。在接种 6 d 后添加不同有机物的混合营养组间生物量无显著差异,表明单一的酵母浸出物或者补充了 N 源与 P 源的谷氨酸钠均可作为该株蛋白核小球藻的混合营养

培养基并表现出很好的促生长效果。

微藻对于利用何种有机碳以及利用的程度具有偏爱性。彭文琴<sup>[12]</sup>指出葡萄糖是斜生栅藻(*S. obliquus*)和纤细裸藻(*E. gracilis*)生长的最佳碳源,而甘油是三角褐指藻生长的最佳碳源。GRIFFITHS 等<sup>[31]</sup>指出相较于糖醇、有机酸等底物,普通小球藻(*C. vulgaris*)以葡萄糖为底物可获得更高的生长速率。前 6 d,葡萄糖组的藻细胞密度显著高于谷氨酸钠组和酵母浸出物组,这可能是由于相较于谷氨酸钠或者酵母浸出物,葡萄糖进入细胞后可直接被吸收利用生成葡萄糖-6-磷酸参与到藻细胞后续各项生命活动中<sup>[4]</sup>,因而更受该株蛋白核小球藻的偏爱,藻细胞生长也就更加迅速。

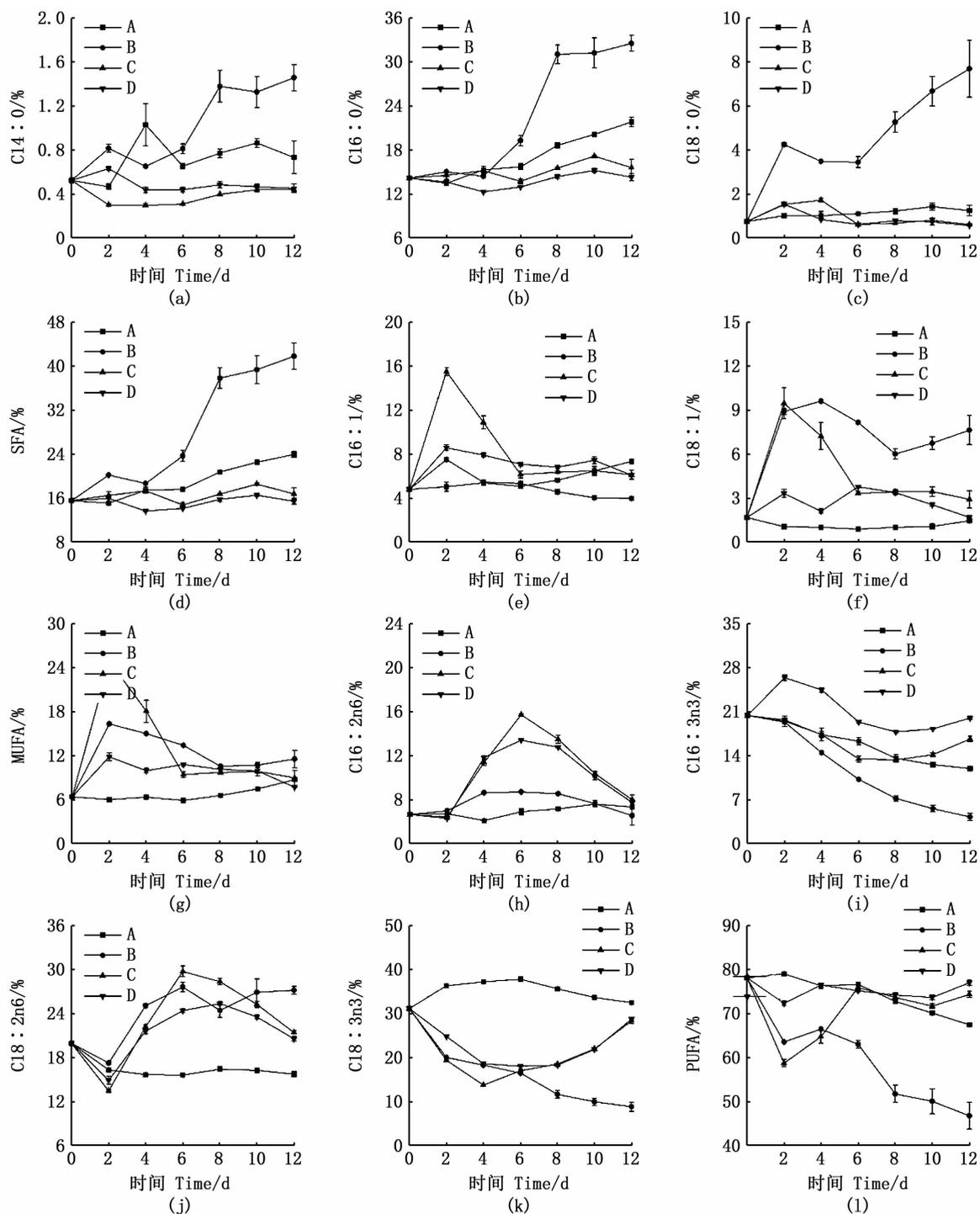


图4 不同营养模式及有机物下蛋白核小球藻 SHOU-1002 主要脂肪酸组成变化  
 Fig.4 Variations on main fatty acid profiles in *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 under different trophic modes and treated with different organic substrates

表 3 不同微藻在自养、混合营养和异养下的生物量

Tab. 3 Biomass of different microalgae under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions

微藻 Microalgae	生物量 Biomass			文献来源 Reference
	自养 Autotrophic	混合营养 Mixotrophic	异养 Heterotrophic	
单针藻 <i>Monoraphidium</i> sp. FXY-10	-	0.31 g/(L·d)	0.37 g/(L·d)	车绕琼等 <sup>[32]</sup>
湛江等鞭金藻 <i>Isochrysis zhanjiangensis</i>	1.76 g/L	2.20 g/L	0.97 g/L	董学卫等 <sup>[33]</sup>
普通小球藻 <i>C. vulgaris</i>	0.32 g/L	1.70 g/L	1.21 g/L	LIANG 等 <sup>[34]</sup>
发菜 <i>Nostoc flagelliforme</i>	0.34 g/L	1.67 g/L	0.74 g/L	YU 等 <sup>[35]</sup>
钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	1.77 g/L	2.52 g/L	0.83 g/L	MARQUEZ 等 <sup>[36]</sup>
三角褐指藻 <i>P. tricornutum</i>	0.46 g/L	0.71 g/L	-	LIU 等 <sup>[15]</sup>
栅藻 <i>Scenedesmus</i> sp.	0.12 g/L	-	0.51 g/L	KAMALANATHAN 等 <sup>[37]</sup>

### 3.2 葡萄糖、谷氨酸钠和酵母浸出物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 胞内产物的影响

孔维宝等<sup>[38]</sup>指出葡萄糖的添加会抑制光合色素的生物合成,使藻细胞更偏向异养生长。雷学青等<sup>[39]</sup>也发现叶绿素 a 和类胡萝卜素含量随葡萄糖含量的增加而下降,且叶绿素 a 下降趋势更明显。本研究中,葡萄糖组叶绿素 a 和类胡萝卜素含量最低,与前人的研究结果一致。但葡萄糖组叶绿素 b 的含量显著高于其他各实验组,具体原因有待进一步研究。

不同形态的氮源会对微藻蛋白等含氮代谢产物产生影响<sup>[40]</sup>。通常,浮游植物优先吸收氨氮,由细胞膜上的铵盐转运蛋白将氨氮由细胞外转运到细胞内,进入细胞内的铵盐,在谷氨酰氨合成酶的作用下,通过转氨基作用直接合成氨基酸,氨基酸再经过细胞代谢合成蛋白质<sup>[41-42]</sup>。但也有例外,如 BERG 等<sup>[43]</sup>报道了抑食金球藻 (*Aureococcus anophagefferens*) 可优先吸收利用有机氮。本研究中,谷氨酸钠组和酵母浸出物组的蛋白质含量显著高于葡萄糖组,可能是该株蛋白核小球藻更加偏爱谷氨酸钠和酵母浸出物中的有机氮(氨基酸),且相较于葡萄糖组的无机氮(NH<sub>4</sub>Cl),直接吸收利用有机氮(氨基酸)省去了从氨氮合成氨基酸的耗能过程,可直接用于蛋白质的合成,所以用谷氨酸钠和酵母浸出物可以获得更高的蛋白质含量。

甘油醛-3-磷酸是微藻中淀粉合成与脂肪合成共同的前体物质。在淀粉合成途径中,甘油醛-3-磷酸首先转化为葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸,再由 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶催化转化成 ADP-葡萄糖,最后生成淀粉<sup>[44]</sup>。在脂肪合成途径中,甘油醛-3-磷酸首先通过糖酵解途径生成丙酮酸,随后被乙酰辅酶 A 羧化酶催化生成丙二酰

辅酶 A,最后反应生成脂肪<sup>[44]</sup>。本研究中,接种后 12 d,酵母浸出物组和谷氨酸钠组的总脂肪含量显著高于葡萄糖组,而碳水化合物含量则是葡萄糖组显著高于酵母浸出物组和谷氨酸钠组,且葡萄糖组藻细胞经鲁哥氏碘液染色后呈明显的深褐色,表明该株蛋白核小球藻在以葡萄糖为培养底物时,其细胞合成代谢的碳储物质优选淀粉,因此其碳水化合物含量较高,而以酵母浸出物或谷氨酸钠为培养底物时,其碳储物质优选为脂肪,因此其总脂含量较高。这表明培养液中有有机底物会显著改变该株蛋白核小球藻合成代谢中碳储形式,但不同有机物下蛋白核小球藻 SHOU-1002 合成代谢中碳储机制仍有待进一步探究。

### 3.3 葡萄糖、谷氨酸钠和酵母浸出物对蛋白核小球藻 SHOU-1002 脂肪酸组成的影响

刘晓娟等<sup>[19]</sup>发现以葡萄糖、甘油和乙酸钠为碳源混合营养培养三角褐指藻,其 SFAs 和 MUFAs 的百分含量较光合自养条件下增高,而 PUFAs 的百分含量则降低。王星宇等<sup>[20]</sup>也指出以葡萄糖、碳酸氢钠、丙酸钠和乙酸钠为碳源混合营养培养球等鞭金藻,其 MUFAs 的百分含量较光合自养条件下增高,而 PUFAs 的百分含量则降低。这表明混合营养模式下微藻 SFAs 或 MUFAs 含量升高,PUFAs 含量降低,但不同的藻种或不同有机碳源的添加其变化趋势可能不同。本研究中,混合营养模式下 3 组有机物培养的蛋白核小球藻 SHOU-1002 的脂肪酸组成变化规律并不相同。培养 12 d 时,谷氨酸钠组和酵母浸出物组的 PUFAs 含量分别为 74.31% 和 76.93%,显著高于葡萄糖组的 46.70%。造成微藻 PUFAs 含量升高的原因主要可分为 3 类:(1)藻细胞为提高膜的流动性和渗透性以维持其正常的生理

功能而造成的 PUFAs 升高。如赵婷等<sup>[45]</sup>发现三角褐指藻为了应对低温胁迫,增加膜的流动性,设定 15、20 和 25 °C 等 3 个温度条件,15 °C 下 PUFAs 含量最高,而 25 °C 下 SFAs 含量最高。(2)藻细胞中性脂合成减少,极性脂合成增多,导致作为极性脂主要成分的 PUFAs 相应升高。WEI 等<sup>[30]</sup>指出微绿球藻在缺氮条件下会大量积累甘油三酯(中性脂),相应的极性脂含量降低,PUFAs 含量也随之降低。(3)藻细胞类囊体数量及膜面积增加导致的 PUFAs 升高。PUFAs 主要存在于极性脂中,而极性脂是类囊体膜的主要成分,藻细胞生长越好,其光和效率越高,对应的类囊体数量越多,极性脂含量越多,PUFAs 含量越高<sup>[46]</sup>。本研究中,谷氨酸钠组和酵母浸出物组的叶绿素 a 含量显著高于葡萄糖组,推测可能是以谷氨酸钠和酵母浸出物为有机物培养蛋白核小球藻 SHOU-1002 时,其类囊体数量较葡萄糖组增多,表面积增大,相应的 PUFAs 含量升高。

综上所述,蛋白核小球藻 SHOU-1002 在混合营养模式下的生物量显著高于光合自养模式,以单一的酵母浸出物或补充 N 源与 P 源的谷氨酸钠为有机物培养该株蛋白核小球藻,可以获得和以葡萄糖为有机碳源相同的生物量,且细胞中色素、蛋白质、总脂肪和 PUFAs 的含量较葡萄糖混合营养组更高,有效提升了该株蛋白核小球藻的营养价值。

## 参考文献:

- [1] LIANG Y, BEARDALL J, HERAUD P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006, 82(3): 161-172.
- [2] FAN F, WAN M X, HUANG J K, et al. Modeling of astaxanthin production in the two-stage cultivation of *Haematococcus pluvialis* and its application on the optimization of vertical multi-column airlift photobioreactor [J]. Algal Research, 2021, 58: 102301.
- [3] CASAS-ARROJO V, DECARA J, DE LOS ÁNGELES ARROJO-AGUDO M, et al. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S. F. Gray) Nägeli [J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 488.
- [4] PEREZ-GARCIA O, ESCALANTE F M E, DE-BASHAN L E, et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products[J]. Water Research, 2011, 45(1): 11-36.
- [5] SHUBA E S, KIFLE D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 81: 743-755.
- [6] MATHIOT C, PONGE P, GALLARD B, et al. Microalgae starch-based bioplastics: Screening of ten strains and plasticization of unfractionated microalgae by extrusion [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 208: 142-151.
- [7] PAHL S L, LEWIS D M, CHEN F, et al. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): Effect of some environmental factors [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(3): 235-239.
- [8] YANG C, HUA Q, SHIMIZU K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 6(2): 87-102.
- [9] 周文俊, 郑立, 郑明刚, 等. 海洋微藻的无菌化处理及其生长特性和生化组成的影响[J]. 海洋学报, 2012, 34(6): 177-186.
- [10] 祝棉棉, 赵亮, 张虎, 等. 索罗金小球藻异养转自养过程中基因表达的全局调控[J]. 水生生物学报, 2021, 45(3): 473-486.
- [11] ZHOU W J, ZHENG L, ZHENG M G, et al. Axenation of marine microalgae and effects of axenic cultivation on growth characteristics and biochemical compositions of marine microalgae[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(6): 177-186.
- [12] ZHU M M, ZHAO L, ZHANG H, et al. Global transcriptional regulation in *Chlorella sorokiniana* during trophic transition from heterotrophic conditions to photoautotrophic conditions[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 473-486.
- [13] SHI X M, ZHANG X W, CHEN F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3/5): 312-318.
- [14] 彭文琴. 不同碳源和光照周期对三种微藻生长及油脂积累的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- [15] PENG W Q. Effects of different carbon sources and photoperiod on the growth and the lipid accumulation of three kinds of microalgae [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.
- [16] WEN Z Y, CHEN F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(4): 218-224.
- [17] JIN H, ZHANG H, ZHOU Z W, et al. Ultra-high-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green microalga *Scenedesmus acuminatus* and application of the cells to

- photoautotrophic culture enhance biomass and lipid production [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(1): 96-108.
- [15] LIU X J, DUAN S S, LI A F, et al. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(2): 239-246.
- [16] 丁晓婷, 王丽娟, 范勇, 等. 甘露醇兼养三角褐指藻生产多不饱和脂肪酸和岩藻黄质[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 54-57.
- DING X T, WANG L J, FAN Y, et al. Mixotrophic cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* with mannitol to produce polyunsaturated fatty acids and fucoxanthin [J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 54-57.
- [17] 李朋非. 铵盐混养促进微拟球藻生长和油脂积累的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- LI P F. The research of the enhancement of growth and lipid production of *Nannochloropsis oculata* by mixotrophic cultivation with acetate and ammonium [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [18] 徐宁, 刘静雅, 赖海燕, 等. 海洋微藻对游离氨基酸的利用特性研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(4): 1058-1065.
- XU N, LIU J Y, LAI H Y, et al. Uptake and utilization characteristics of *Prorocentrum donghaiense*, *Phaeocystis globosa*, *Karenia mikimotoi* and *Skeletonema costatum* for dissolved free amino acids [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(4): 1058-1065.
- [19] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 有机碳源对三角褐指藻生长、胞内物质和脂肪酸组分的影响[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(1): 147-152.
- LIU X J, DUAN S S, LI A F. Effects of organic carbon source on growth, biochemical components and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(1): 147-152.
- [20] 王星宇, 黄旭雄. 不同碳源对球等鞭金藻生长和细胞组成的影响[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 47(4): 506-513.
- WANG X Y, HUANG X X. Effect of different carbon sources on growth and biochemical composition of *Isochrysis galbana* [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2016, 47(4): 506-513.
- [21] 黄旭雄, 周洪琪, 袁灿东, 等. 氮源及浓度对微绿球藻营养价值的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(2): 113-116.
- HUANG X X, ZHOU H Q, YUAN C D, et al. The effects of nitrogen source and concentration on the nutritional value of *Nannochloropsis oculata* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2003, 12(2): 113-116.
- [22] 王玉萍, 袁宪正, 师晓爽, 等. 碳源对铜绿微囊藻生理特性及微囊藻毒素产率的影响[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(7): 2714-2718.
- WANG Y P, YUAN X Z, SHI X S, et al. Effects of physiological characteristics and microcystin yield on *Microcystis aeruginosa* cultured with carbon sources [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(7): 2714-2718.
- [23] 成永旭. 生物饵料培养学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- CHENG Y X. *Live Food Cultivatology* [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [24] 国家环保局本书编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- State Environmental Protection Administration Book Editorial Board. *Analysis Methods for Water and Wastewater Monitoring* [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1989.
- [25] ITCHIE R J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents [J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89(1): 27-41.
- [26] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [27] LOWRY O H, ROSEBROUGH N, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [28] PRUVOST J, VAN VOOREN G, LE GOUIC B, et al. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 150-158.
- [29] GRIFFITHS M J, VAN HILLE R P, HARRISON S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae [J]. *Lipids*, 2010, 45(11): 1053-1060.
- [30] WEI L K, HUANG X X, HUANG Z Z, et al. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 534-538.
- [31] GRIFFITHS D J, THRESHER C L, STREET H E. The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon No. 1 Strain): with two figures in the text [J]. *Annals of Botany*, 1960, 24(1): 1-11.
- [32] 车绕琼, 黄力, 王琳, 等. 葡萄糖对单针藻异养、兼养生长及油脂合成的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(11): 46-51.
- CHE R Q, HUANG L, WANG L, et al. Effects of glucose on cell growth and lipid synthesis of *Monoraphidium* sp. FXY-10 under mixotrophic and heterotrophic cultivations [J]. *China Biotechnology*, 2015, 35(11): 46-51.
- [33] 董学卫, 李有志, 何庆芳, 等. 培养条件对湛江等鞭金藻生长和油脂产率的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(1): 54-61.
- DONG X W, LI Y Z, HE Q F, et al. Effects of cultivation

- conditions on cell growth and lipid productivity of microalgae *Isochrysis zhanjiangensis* [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(1): 54-61.
- [34] LIANG Y N, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(7): 1043-1049.
- [35] YU H F, JIA S R, DAI Y J. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(1): 127-133.
- [36] MARQUEZ F J, SASAKI K, KAKIZONO T, et al. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76(5): 408-410.
- [37] KAMALANATHAN M, CHAISUTYAKORN P, GLEADOW R, et al. A comparison of photoautotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth for biomass production by the green alga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) [J]. Phycologia, 2018, 57(3): 309-317.
- [38] 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 W B, WANG Y, YANG H, 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.
- [39] 雷学青,杨国远,高保燕,等. 光合自养和异养培养时斜生栅藻的生长和生化组成的变化[J]. 生物技术, 2014, 24(5): 90-95.
- LEI X Q, YANG G Y, GAO B Y, et al. Changes in the growth and biochemical components of *Scenedesmus obliquus* under photoautotrophic and heterotrophic conditions [J]. Biotechnology, 2014, 24(5): 90-95.
- [40] 骆小英,陈俊辉,魏东. 蛋白核小球藻高效同化硝态氮联产微藻蛋白[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1150-1161.
- LUO X Y, CHEN J H, WEI D. High efficient assimilation of NO<sub>3</sub>-N with coproduction of microalgal proteins by *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(6): 1150-1161.
- [41] DAVIDSON K, GILPIN L C, HART M C, et al. The influence of the balance of inorganic and organic nitrogen on the trophic dynamics of microbial food webs [J]. Limnology and Oceanography, 2007, 52(5): 2147-2163.
- [42] GLASS J B, WOLFE-SIMON F, ANBAR A D. Coevolution of metal availability and nitrogen assimilation in cyanobacteria and algae [J]. Geobiology, 2009, 7(2): 100-123.
- [43] BERG G M, REPETA D J, LAROCHE J. Dissolved organic nitrogen hydrolysis rates in axenic cultures of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae): comparison with heterotrophic bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 401-404.
- [44] 王亚杰,朱顺妮,王忠铭,等. 氮胁迫下小球藻淀粉与脂肪的合成关系[J]. 化工学报, 2015, 66(6): 2189-2195.
- WANG Y J, ZHU S N, WANG Z M, et al. Synthesis pathway relationship between starch and fat in *Chlorella* sp. under nitrogen starvation [J]. CIESC Journal, 2015, 66(6): 2189-2195.
- [45] 赵婷,韩笑天,詹天荣,等. 温度对四种产油微藻生长和油脂特性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1140-1148.
- ZHAO T, HAN X T, ZHAN T R, et al. Effect of temperature on growth and lipid properties of four oil-producing microalgae [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(6): 1140-1148.
- [46] MURATA N, ISHIZAKI-NISHIZAWA O, HIGASHI S, et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants [J]. Nature, 1992, 356(6371): 710-713.

## Effects of three organic substances on the growth and cell composition of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic mode

MU Liangliang<sup>1</sup>, HUANG Xuxiong<sup>1,2,3</sup>

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The growth and cell composition of a newly isolated strain of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 were compared in three mixotrophic groups (treated with glucose, sodium glutamate and yeast extract, respectively), and a photoautotrophic group. The results showed that, generally, the cell density of mixotrophic groups were significantly higher than that of the photoautotrophic group after inoculation. Moreover, the cell density of the glucose group was significantly higher than that of the sodium glutamate group and the yeast extract group within 6 days after inoculation. Additionally, there was no significant difference in the cell density of the three mixotrophic groups from the 10th day. On the 12th day, the contents of chlorophyll a, carotenoids, protein and total lipid in the sodium glutamate group and yeast extract group were significantly higher as compared to those in the glucose group; however, the carbohydrate content was significantly lower compared to the glucose group. Further, in the glucose group, SFAs increased while the PUFAs decreased with the prolongation of culture time. The PUFAs in the sodium glutamate group and the yeast extract group tended to decrease in the beginning, then they increased. The PUFAs of the sodium glutamate group and the yeast extract group were significantly higher than that of the glucose group on the 12th day. In conclusion, the results suggested that *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 had the ability of mixotrophy and its growth efficiency was significantly improved in mixotrophic mode. Besides, the algal cells cultured by yeast extract or sodium glutamate had higher nutritional value than those cultured by glucose.

**Key words:** mixotrophic; *Chlorella pyrenoidosa*; glucose; sodium glutamate; yeast extract; growth; cell composition