

· 生物育种与工艺优化 ·

定向驯化对异养蛋白核小球藻硒的耐受性及富集能力的影响

韩丽婕, 王伟良, 万民熙, 沈国敏, 俞涛, 李元广

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

韩丽婕, 王伟良, 万民熙, 沈国敏, 俞涛, 李元广. 定向驯化对异养蛋白核小球藻硒的耐受性及富集能力的影响. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4756-4764.

HAN LJ, WANG WL, WAN MX, SHEN GM, YU T, LI YG. Effects of directional adaptation on selenium tolerance and accumulation of heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4756-4764.

摘 要: 硒 (Se) 是生物体必不可少的微量元素, 硒缺乏会导致人产生克山病、大骨节病等疾病, 缺硒也会给畜牧业带来巨大损失。目前的补硒产品存在硒含量和生物利用度低、安全性差等问题, 而通过小球藻培养可获得生物利用度高、安全性好的有机硒, 因此是非常有应用前景的补硒产品。首先, 为了获得对硒的耐受性和富集能力更强的藻种, 研究通过定向驯化的方式逐步提高培养基中 Na_2SeO_3 浓度来驯化蛋白核小球藻, 并对驯化时间和驯化过程中 Na_2SeO_3 的浓度梯度进行了优化。结果表明, 驯化后的藻种对硒的耐受性和富集能力明显提高。在 5 L 发酵罐中, 驯化后的藻株可以耐受 40 mg/L 的 Na_2SeO_3 , 胞内有机硒合成速率提高了 175.6%。之后, 在 5 L 发酵罐中进一步优化了硒的补加方式, 在异养培养过程中分批补料添加 40 mg/L Na_2SeO_3 时, 最终获得的蛋白核小球藻细胞干重达 106.4 g/L, 有机硒含量为 1 227 mg/kg, 有机硒合成速率为 1.36 mg/(L·h)。研究结果与已有蛋白核小球藻异养富硒文献报道的最高细胞密度 75 g/L 和最高有机硒含量 560 mg/kg 相比分别提高了 41.9% 和 119.1%。上述结果表明, 通过定向驯化的方法, 可大大提高蛋白核小球藻对硒的耐受性和富集能力。

关键词: 蛋白核小球藻; 异养培养; 有机硒; 驯化

Received: June 4, 2021; Accepted: September 13, 2021

Corresponding authors: WANG Weiliang. Tel: +86-21-64252104; Fax: +86-21-64250964; E-mail: wlwang@ecust.edu.cn
LI Yuanguang. Tel: +86-21-64250964; Fax: +86-21-64250964; E-mail: ygli@ecust.edu.cn

Effects of directional adaptation on selenium tolerance and accumulation of heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa*

HAN Lijie, WANG Weiliang, WAN Minxi, SHEN Guomin, YU Tao, LI Yuanguang

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Selenium (Se) is an essential trace element for organisms. Se deficiency will cause diseases such as Keshan disease and Kashin-Beck in human being, and huge loss to animal husbandry. Currently available Se supplements have such problems as low Se content, poor bioavailability, and poor safety. *Chlorella pyrenoidosa* can produce bioavailable and safe organic Se under suitable conditions, which is thus a promising Se supplement. Therefore, in this study, we tried to improve the Se tolerance and accumulation of *C. pyrenoidosa* by directional adaptation. To be specific, we gradually increased the concentration of Na_2SeO_3 in medium to domesticate *C. pyrenoidosa* and optimized the adapting time and concentration gradient of Na_2SeO_3 during the adaptation. The results showed that the adapted *C. pyrenoidosa* was more tolerant to Se and had stronger Se enrichment ability. In 5 L fermenter, the adapted strains could tolerate 40 mg/L Na_2SeO_3 and the synthesis rate of organic Se was 175.6% higher. Then, Se addition method in the 5 L fermenter was optimized. The result demonstrated that addition of Na_2SeO_3 at 40 mg/L during heterotrophic culture achieved the final dry weight of *C. pyrenoidosa* cells at 106.4 g/L, content of organic Se at 1 227 mg/kg, and synthesis rate of organic Se at 1.36 mg/(L·h). Compared with the reported highest cell density of 75 g/L and the highest organic Se content of 560 mg/kg, the corresponding figures in this study were 41.9% and 119.1% higher, respectively. In conclusion, directional adaptation can remarkably improve the Se tolerance and enrichment of *C. pyrenoidosa*.

Keywords: *Chlorella pyrenoidosa*; heterotrophic culture; organic selenium; adaptation

硒 (Se) 是生物体必不可少的微量元素。硒缺乏会导致人产生克山病、大骨节病等疾病; 缺硒也会造成动物免疫力降低, 导致发育迟缓、繁殖力减退, 给畜牧业带来巨大损失。因此补硒是十分必要的。

目前, 通常以无机硒或者有机硒进行补硒。与无机硒相比, 有机硒不仅生物利用度高, 而且毒副作用小^[1-3]。因此, 只有把无机硒转化为有机硒, 才能更好地被生物体吸收和利用, 也才具有更高的应用价值。目前应用较多的含有机硒的产品主要有富硒动植物产品、富硒酵母

和富硒小球藻 3 类。

目前, 富硒动植物产品存在硒含量很低且生产周期长的问题^[4-5]。酵母对硒的富集能力强, 但所含硒化合物的组成不确定, 2002 年欧盟将富硒酵母从允许的食品补充剂列表中排除。同时, 硒小球藻中硒的生物利用率为 49%, 而硒酵母中硒的利用率仅为 21%^[6-10]。因此, 利用小球藻培养获得生物利用度高、安全性好的有机硒产品的相关研究受到广泛关注^[11-15]。

由表 1 可知, 与光自养生长相比, 异养培养可获得高密度的蛋白核小球藻, 进而可以耐

表 1 富硒蛋白核小球藻不同培养模式的结果比较

Table 1 Results of different culture modes of *Chlorella pyrenoidosa* rich in selenium

Culture models	Dry cell weight (g/L)	Selenium addition (mg/L)	Total selenium content (mg/kg)	Organic selenium content (mg/kg)	References
Photoautotrophic	18.0	45.0	530.0	318.0	[16]
	0.1	2.0	362.0	301.4	[18]
		3.0	84.0		[19]
Heterotrophic	70.0	378.0	240.0	151.2	[20]
	25.0	111.0	2 000.0	560.0	[16]

受更高的 Na_2SeO_3 浓度^[16]。但光自养培养获得的细胞密度较低, 较低的细胞密度不利于采收, 并且大规模培养易被杂藻和原生动物污染^[20]。因此, 采用异养方式生产富硒蛋白核小球藻成为重要的发展方向。

蛋白核小球藻具有适应性强的优势, 经驯化可在高盐、低温等恶劣环境下生存^[21-23]; 也可以在重金属浓度较高的工业废水中生存并吸附铁、锌、锰等重金属^[24-27]。因此, 提高小球藻对 Na_2SeO_3 的耐受性, 有望使小球藻在含有更高浓度 Na_2SeO_3 的培养基中生长, 从而富集更多的硒。本研究拟通过定向驯化的方法提高藻细胞对 Na_2SeO_3 的耐受性, 使藻细胞在培养过程中富集和转化更多的无机硒成为有机硒, 从而为小球藻富硒产品的开发提供实验依据。迄今为止, 通过定向驯化提高小球藻对硒耐受性的研究还未见报道。

本研究为获得高密度、高有机硒含量的蛋白核小球藻, 首先通过定向驯化并对驯化时间、驯化过程中 Na_2SeO_3 浓度梯度等条件进行了优化, 获得了对 Na_2SeO_3 耐受性高、富集能力强的藻种。之后, 在实验室研发的“异养细胞-非光诱导培养”技术基础上, 在 5 L 发酵罐中对驯化后的藻种进行异养培养, 并进一步优化硒的添加方式。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养基

所用初始藻种为蛋白核小球藻 (*Chlorella*

pyrenoidosa) FACHB 9, 由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室海洋生化工程研究室保藏和提供。蛋白核小球藻的异养藻种培养基和发酵培养基采用优化后的 Endo 培养基^[28]。

1.2 仪器设备

5 L 发酵罐 (BIOTECH-5BGG) 购自上海保兴生物设备工程有限公司; 台式恒温摇床 (BDY-100B) 购自上海量壹科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 接种密度对异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

实验共设置 4 个接种密度, 分别为 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L。培养装置为 500 mL 摇瓶, 放入 200 mL 异养培养基, 培养基中 Na_2SeO_3 浓度共设置 4 个梯度 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L 和 80 mg/L, 将 4 个接种密度的藻种分别接入上述培养基中, 并置于恒温摇床中培养, 转速 150 r/min, 温度 30 °C, 避光异养培养 3 d。

1.3.2 藻种驯化时间对异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

500 mL 摇瓶中放入 200 mL 异养培养基, 接种密度为 0.5 g/L, 在含 10 mg/L Na_2SeO_3 的培养基中分别驯化 3 d、6 d 和 9 d。驯化结束后将上述藻种分别接入含 22.5 mg/L、25.0 mg/L、27.5 mg/L、30.0 mg/L、35.0 mg/L 和 40.0 mg/L 的 Na_2SeO_3 培养基。驯化流程见图 1。

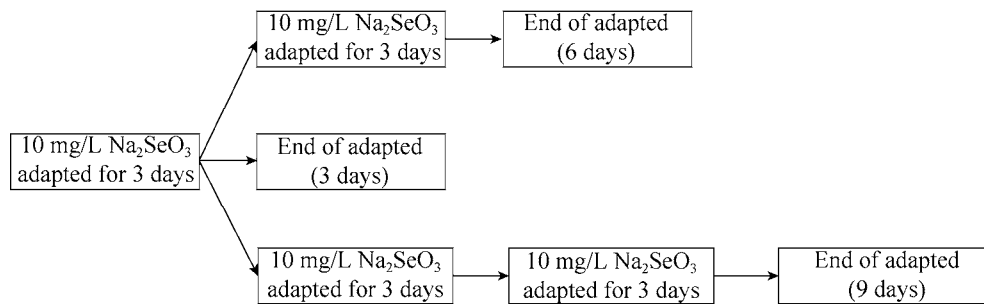


图 1 不同驯化时间驯化异养蛋白核小球藻的驯化流程

Figure 1 Adaptation of heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa* for different time.

按照上述驯化路径, 本实验将考察驯化时间分别为 3 d、6 d 和 9 d 的藻种对硒的耐受性及富集能力的差异, 以找出最适的藻种驯化时间。

1.3.3 不同 Na_2SeO_3 浓度梯度对驯化的异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

首先在 10 mg/L Na_2SeO_3 的培养基中驯化 6 d, 以细胞密度达到正常培养的 6 g/L 为该 Na_2SeO_3 浓度下驯化完成标志。之后, 培养基中 Na_2SeO_3 浓度以 10 mg/L 为单位递增, 在驯化至 Na_2SeO_3 的浓度 30 mg/L 时出现严重抑制细胞生长的现象。因此分别设计 Na_2SeO_3 浓度以 2.5 mg/L、5 mg/L 为单位递增。上一级 Na_2SeO_3 浓度驯化完成后, 再进行下一级 Na_2SeO_3 浓度驯化, 一直驯化至 Na_2SeO_3 浓度 40 mg/L。为保证在相同的驯化时间下进行驯化效果的对比, 3 条驯化路径的驯化时间都为 48 d, 最终获得 3 株驯化藻株(EG1、EG2、EG3)。驯化结束后, 将 EG1、

EG2、EG3 按接种密度 0.5 g/L 分别接入含 35 mg/L、40 mg/L、45 mg/L、50 mg/L、55 mg/L、60 mg/L 的 Na_2SeO_3 培养基中, 培养 3 d。以上驯化过程及驯化藻种硒耐受性考察均在恒温摇床中培养, 转速为 150 r/min, 温度为 30 °C。 Na_2SeO_3 浓度梯度驯化流程见图 2。

1.3.4 5 L 发酵罐异养培养中驯化和未驯化藻种对硒的耐受性及富集能力比较

在 5 L 发酵罐培养中, 初始含 40 mg/L Na_2SeO_3 培养基中接入 1.3.3 中驯化藻种, 初始含 20 mg/L、30 mg/L Na_2SeO_3 培养基中接入未驯化的藻种, 接种密度 0.5 g/L。在对数生长期开始 (40 h) 和对数生长期中期 (60 h) 时分别补加 2 次 Na_2SeO_3 , 与初始 Na_2SeO_3 浓度一致。培养温度 30 °C, 初始转速 150 r/min, 在进入稳定期后停止正常培养基的补料。待碳源耗完, 诱导 24 h。

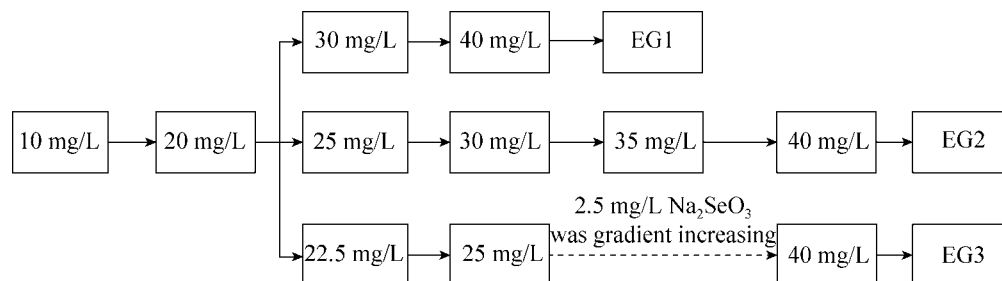


图 2 不同 Na_2SeO_3 浓度梯度驯化过程

Figure 2 Adaptation of *Chlorella pyrenoidosa* with sodium selenite of different concentration gradients.

1.3.5 5 L 发酵罐中异养培养驯化藻种时硒补加方式的优化

在 5 L 发酵罐培养中, 按接种密度 0.5 g/L 接入 1.3.3 中的驯化藻种。采用两种加硒方式, 一种是在对数生长期时, 分 5 次补加 Na_2SeO_3 , 每次补加 80 mg/L; 另一种在对数生长期时, 分 10 次补加 Na_2SeO_3 , 每次 40 mg/L。待碳源耗完, 诱导 24 h。

1.4 分析方法

无机硒含量的测定采用盐酸萃取法^[2], 采用 ICP-MS 方法测定总硒含量^[29], 采用总硒与无机硒的差值测定有机硒含量^[29], 采用干重法测定细胞密度^[20], 采用凯氏定氮法测定藻细胞中蛋白质含量^[30], 采用甲醇提取法测定藻体叶绿素含量^[31], 采用尿素氮试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定尿素, 采用葡萄糖试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司) 测定葡萄糖, 有机硒合成速率根据单位体积藻液中有机硒含量与培养时间比值计算。用 Origin 软件统计实验数据, 用 SPSS 软件分析数据的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 接种密度对异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

由表 2 可知, 提高接种密度可以提高细胞

对 Na_2SeO_3 的耐受能力和富集能力。当接种密度为 2.0 g/L 时, 小球藻可以耐受 60 mg/L Na_2SeO_3 。由表 2 可知, 在 40 mg/L Na_2SeO_3 时, 接种密度 2.0 g/L 的实验组培养结束时有有机硒的合成速率较接种密度 1.5 g/L 提高了 133.5%。与 Sun 等^[29]报道的摇瓶水平富硒光自养小球藻最高细胞密度 1.8 g/L 及最高有机硒含量 316 mg/kg 比较, 优化后的细胞密度和有机硒含量分别提高了 1.9 倍和 3.9 倍。表 2 中接种密度 1.0 g/L 的藻细胞在 40 mg/L 和 60 mg/L Na_2SeO_3 浓度下的数据未列出, 是因为在以上浓度下, 藻细胞因无法耐受而死亡, 导致细胞密度过低, 无法检测硒含量。

综上所述, 提高小球藻对 Na_2SeO_3 的耐受性, 可以使小球藻在含有更高浓度的 Na_2SeO_3 培养基中富集更多的硒。但提高接种密度并不能从根本上解决藻细胞对硒耐受性提高的问题, 因此本研究进一步开展了小球藻对硒耐受性的定向驯化实验。

2.2 藻种驯化时间对异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

驯化 6 d 的小球藻, 对提高藻细胞 Na_2SeO_3 的耐受性和富集能力是最优的。由表 3 可知, 驯化 6 d 的小球藻对 Na_2SeO_3 的耐受性最强, 可在含 30 mg/L Na_2SeO_3 的培养基中正常生长。

表 2 接种密度对藻细胞富硒的影响

Table 2 Effect of inoculum density on selenium enrichment of algae cells

Inoculation density (g/L)	Na_2SeO_3 concentration (mg/L)	Dry cell weight (g/L)	Organic selenium content (mg/kg)	Synthesis rate of organic selenium (mg/(L·d))
1.0	20.0	6.6	446.4	1.0
1.5	20.0	6.8	472.2	1.0
	40.0	3.3	1 383.4	1.5
	60.0	1.1	3 301.2	1.1
2.0	20.0	6.9	485.4	1.0
	40.0	5.2	1 559.3	2.7
	60.0	2.6	3 933.0	3.4

由表 3 可知, Na_2SeO_3 浓度为 30 mg/L 时, 驯化时间为 6 d 的实验组有机硒合成速率为 1.15 mg/(L·d), 分别是 3 d、9 d 实验组有机硒合成速率的 12.8 倍和 2.0 倍。表 3 中驯化 3 d 的小球藻在 35 mg/L Na_2SeO_3 浓度下的数据未列出, 是因为在该浓度下藻细胞因无法耐受而死亡, 导致细胞密度过低, 无法检测硒含量。

驯化周期对小球藻 Na_2SeO_3 耐受性和富集能力有明显影响, 究其原因可能是: 驯化时间短, 耐受性无法保持; 驯化时间长, 随细胞传代次数的增加, 小球藻细胞活性下降, 进而影响对 Na_2SeO_3 的耐受性。因此, 本实验中驯化周期为 6 d 时对藻细胞 Na_2SeO_3 的耐受性保持和提高富硒能力是最优的。

2.3 不同 Na_2SeO_3 浓度梯度对驯化的异养蛋白核小球藻硒耐受性及富集能力的影响

从图 2 的驯化过程可知, 驯化梯度 $\text{EG1} > \text{EG2} > \text{EG3}$ 。由表 4 可见, 驯化梯度越小, 藻细胞对 Na_2SeO_3 的耐受性越好。驯化藻株 EG3 对 Na_2SeO_3 的耐受性最强, 可在 50 mg/L Na_2SeO_3 浓度下正常生长。由表 4 可知, 驯化梯度越小, 驯化后的藻细胞对 Na_2SeO_3 的富集量越高。在 50 mg/L Na_2SeO_3 时, 驯化藻株 EG3 有机硒合成速率是驯化藻株 EG2 有机硒合成速率的 2.8 倍。表 4 中 EG1 在 50 mg/L Na_2SeO_3 浓度下的数据未列出, 是因为在该浓度下, EG1 的藻细胞因无法耐受而死亡, 导致细胞密度过低, 无法检测硒含量。

表 3 不同驯化时间对异养蛋白核小球藻富硒的影响

Table 3 Effect of adapting time on selenium enrichment of heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa*

Adapting time (d)	Na_2SeO_3 concentration (mg/L)	Dry cell weight (g/L)	Organic selenium content (mg/kg)	Synthesis rate of organic selenium (mg/(L·d))
3	27.5	3.1	460.2	0.5
	30.0	0.7	398.2	0.1
6	27.5	5.7	518.5	1.0
	30.0	4.4	786.9	1.2
	35.0	3.6	1 637.2	2.0
9	27.5	5.6	436.0	0.8
	30.0	3.1	560.8	0.6
	35.0	2.4	1 191.6	1.0

表 4 不同驯化梯度驯化的异养蛋白核小球藻的富硒情况

Table 4 Selenium enrichment of heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa* acclimated at different adapting gradients

Adapted species	Na_2SeO_3 concentration (mg/L)	Dry cell weight (g/L)	Organic selenium content (mg/kg)	Synthesis rate of organic selenium (mg/(L·d))
EG1	40.0	3.8	3 260.2	4.1
	45.0	0.7	2 898.2	0.7
	40.0	5.2	3 153.4	6.4
EG2	45.0	5.1	3 621.8	6.2
	50.0	2.6	5 291.6	4.6
	40.0	6.4	3 798.0	8.1
EG3	45.0	6.7	4 375.6	9.8
	50.0	5.2	7 507.2	13.0

2.4 5 L 发酵罐异养培养中驯化和未驯化藻种对硒的耐受性及富集能力比较

驯化后的藻细胞对 Na_2SeO_3 的耐受性及富集能力均明显提高。由图 3 可知, 驯化后的藻株在两次添加 40 mg/L Na_2SeO_3 时的生长密度与未驯化的藻株在两次添加 20 mg/L Na_2SeO_3 下的生长密度相差不大。但是, 未驯化的藻株在两次添加 30 mg/L Na_2SeO_3 下出现藻液颜色发黄、细胞大量死亡现象。

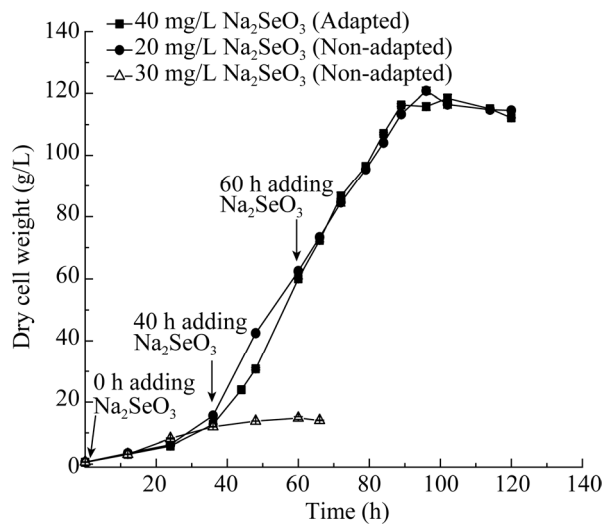


图 3 5 L 发酵罐中驯化后藻种与未驯化藻种的生长曲线

Figure 3 Growth curves of adapted *Chlorella pyrenoidosa* and non-adapted *C. pyrenoidosa* in 5 L fermenter.

由图 4 可知, 培养至 96 h, 驯化后的藻株细胞有机硒合成速率达 0.36 mg/(L·h), 比未驯化藻株细胞中的有机硒合成速率提高 89.5%。

2.5 5 L 发酵罐中异养培养驯化藻种时硒补加方式的优化

本实验在对数生长期比较了 2 种不同补硒方式对藻细胞生长及富硒情况的影响, 一种是分 5 次补加 Na_2SeO_3 , 每次补加 80 mg/L; 另一种为分 10 次补加 Na_2SeO_3 , 每次 40 mg/L。

由图 5 可知, 分批补料添加 40 mg/L Na_2SeO_3 与分批补料添加 80 mg/L Na_2SeO_3 , 均可提高藻细胞有机硒含量, 但分批补料添加 40 mg/L

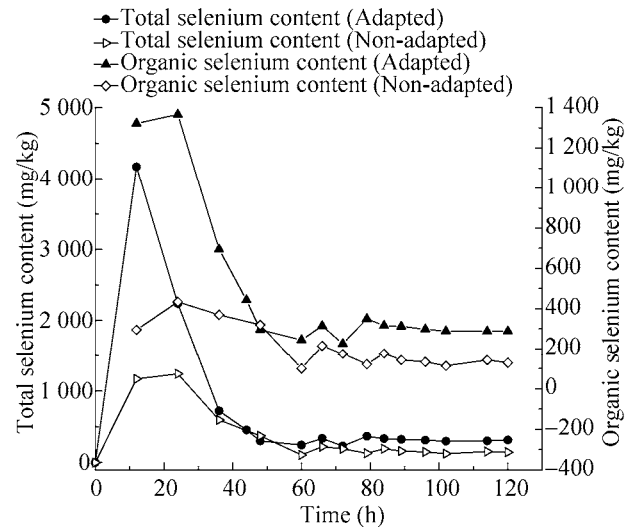


图 4 5 L 发酵罐中驯化后藻种与未驯化藻种培养过程中总硒和有机硒的变化曲线

Figure 4 Variation of total selenium and organic selenium of adapted *Chlorella pyrenoidosa* and non-adapted *C. pyrenoidosa* during culture in 5 L fermenter.

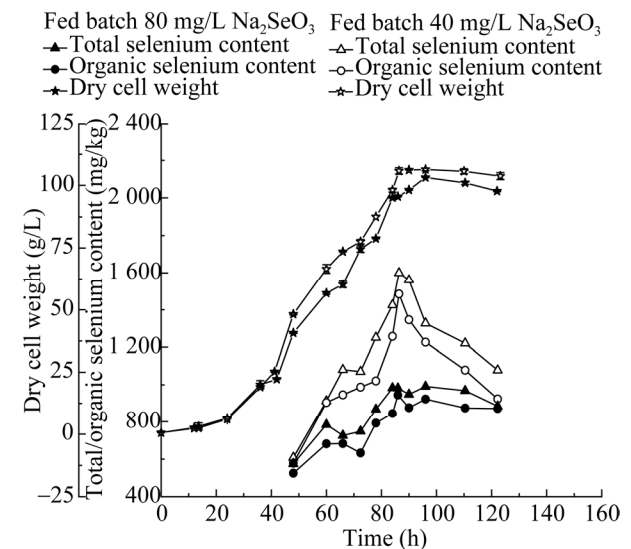


图 5 分批补料添加不同浓度 Na_2SeO_3 时蛋白核小球藻细胞中总硒和有机硒的变化曲线

Figure 5 Variation of total selenium and organic selenium in *Chlorella pyrenoidosa* at different concentration of Na_2SeO_3 in fed batch.

Na_2SeO_3 效果更显著。10 次添加 40 mg/L Na_2SeO_3 后, 在 96 h 时, 干重和有机硒合成速率与分批补料添加 80 mg/L Na_2SeO_3 相比, 分别增加了 3.1% 和 37.4%。

由图 6 分批添加 Na_2SeO_3 过程可知, 培养结束时, 分批补料添加 40 mg/L Na_2SeO_3 与分批补料添加 80 mg/L Na_2SeO_3 相比, 硒的利用率增加了 6.6%。因此, 分批补料添加 40 mg/L Na_2SeO_3 的方式更好。10 次添加 40 mg/L Na_2SeO_3 后, 比 Douch^[11] 报道的富硒蛋白核小球藻最高细胞密度 (75 g/L) 提高了 41.9%, 比 Mylenko 等^[16] 报道的富硒蛋白核小球藻最高有机硒含量 (560 mg/kg) 提高了 119.1%。

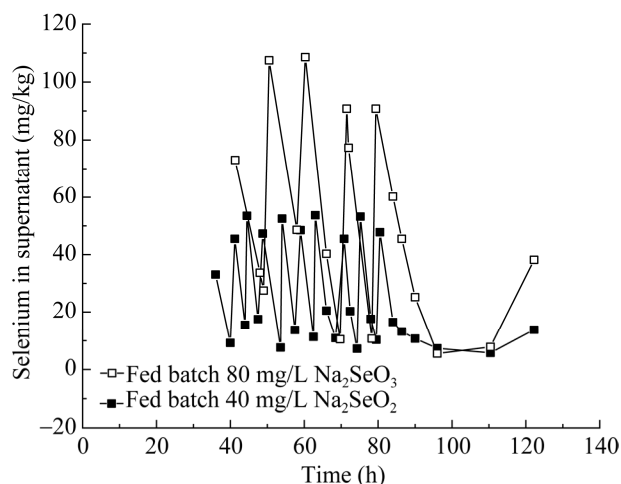


图 6 分批补料加入不同浓度 Na_2SeO_3 时培养基中 Na_2SeO_3 浓度的变化曲线

Figure 6 Variation of Na_2SeO_3 concentration in medium with different concentration of Na_2SeO_3 in fed batch.

3 结论

本文首次将定向驯化应用到异养蛋白核小球藻富硒过程中, 获得了对硒的耐受性较高和富集能力较强的藻细胞。同时, 实验结果也表明驯化时间、驯化梯度和硒的添加方式对异养

蛋白核小球藻硒的耐受性及富集能力有较大影响。在本团队研发的“异养细胞-非光诱导培养”技术基础上, 优化了驯化藻株培养过程中 Na_2SeO_3 的添加方式, 最终小球藻细胞密度达 106.4 g/L, 有机硒合成速率达 1.36 mg/(L·h)。本研究结果与已有异养蛋白核小球藻富硒文献报道的最高细胞密度 75 g/L^[11] 相比提高了 41.9%; 比报道的最高有机硒含量 (560 mg/kg)^[16] 提高了 119.1%。

REFERENCES

- [1] Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1256-1268.
- [2] Schiavon M, Ertani A, Parrasia S, et al. Selenium accumulation and metabolism in algae. *Aquat Toxicol*, 2017, 189: 1-8.
- [3] Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, et al. A summary of new findings on the biological effects of selenium in selected animal species-a critical review. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2209.
- [4] Vu DL, Saurav K, Mylenko M, et al. *In vitro* bioaccessibility of selenoamino acids from selenium (Se)-enriched *Chlorella vulgaris* biomass in comparison to selenized yeast; a Se-enriched food supplement; and Se-rich foods. *Food Chem*, 2019, 279: 12-19.
- [5] Johnson CC, Fordyce FM, Rayman MP. Symposium on geographical and geological influences on nutrition: factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(1): 119-132.
- [6] Larsen EH, Hansen M, Fan T, et al. Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae. *J Anal At Spectrom*, 2001, 16(12): 1403-1408.
- [7] Bird SM, Uden PC, Tyson JF, et al. Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 1997, 12(7): 785-788.
- [8] Upton JR, Edens FW, Ferket PR. Selenium yeast effect on broiler performance. *Int J Poult Sci*, 2008, 7(8): 798-805.
- [9] Schrauzer GN. Selenium yeast: composition, quality,

- analysis, and safety. *Pure Appl Chem*, 2006, 78(1): 105-109.
- [10] Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr*, 2004, 92(4): 557-573.
- [11] Doucha J. Production strain of the alga *Chlorella vulgaris* BEIJ. Strain: Czech Patent 299352. 2008-08-08.
- [12] Skrivan M, Marounek M, Dlouhá G, et al. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *Br Poult Sci*, 2008, 49(4): 482-486.
- [13] Skrivan M, Šimáně J, Dlouhá G, et al. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched *Chlorella* on egg Se concentration, physical parameters of eggs and laying hen production. *Czech J Anim Sci*, 2011, 51(4): 163-167.
- [14] Trávníček J, Racek J, Trefil L, et al. Activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) in the blood of ewes and their lambs receiving the selenium-enriched unicellular alga *Chlorella*. *Czech J Anim Sci*, 2008, 53(7): 292-298.
- [15] Doucha J, Lívanský K, Kotrbáček V, et al. Production of *Chlorella* (Chlorophyta) biomass enriched by selenium and its use as a feed supplement//Proceedings of the 6th Asia-Pacific Conference of Algal Biotechnology, 2006.
- [16] Mylenko M, Vu DL, Kuta J, et al. Selenium incorporation to amino acids in *Chlorella* cultures grown in phototrophic and heterotrophic regimes. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(6): 1654-1665.
- [17] 倪婕, 余炼, 唐亚倩, 等. 亚硒酸钠对蛋白核小球藻生长及生物转化的影响. *现代食品科技*, 2019, 35(11): 176-181.
Ni J, Yu L, Tang YQ, et al. Effect of sodium selenite on the growth and biotransformation of *Chlorella pyrenoidosa*. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(11): 176-181 (in Chinese).
- [18] 吕蓉, 张波. 硒浓度对小球藻生长、生物富集的影响. *盐业与化工*, 2008, 37(4): 35-37.
Lv R, Zhang B. Effects of selenium concentration on the growth and bioaccumulation of *Chlorella pyrenoidosa*. *J Salt Chem Ind*, 2008, 37(4): 35-37 (in Chinese).
- [19] Doucha J, Lívanský K, Kotrbáček V, et al. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(6): 1001-1008.
- [20] 韩菲菲. 以高油脂产率为目标的小球藻光自养培养工艺优化与初步放大[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
Han FF. Optimization and scale up of *Chlorella* photoautotrophic cultivation for high lipid productivity[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [21] Ayre JM, Moheimani NR, Borowitzka MA. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Res*, 2017, 24: 218-226.
- [22] Li TP, Xu G, Rong JF, et al. The acclimation of *Chlorella* to high-level nitrite for potential application in biological NO_x removal from industrial flue gases. *J Plant Physiol*, 2016, 195: 73-79.
- [23] Zhou L, Cheng DJ, Wang L, et al. Comparative transcriptomic analysis reveals phenol tolerance mechanism of evolved *Chlorella* strain. *Bioresour Technol*, 2017, 227: 266-272.
- [24] Zhou GJ, Peng FQ, Zhang LJ, et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011, 19(7): 2918-2929.
- [25] 姜晶. 蛋白核小球藻对重金属的吸附及其机理的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2012.
Jiang J. Biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Chlorella pyrenoidosa* and its reaction mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2012 (in Chinese).
- [26] 黄飞. 蛋白核小球藻对无机砷的吸附吸收及作用机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
Huang F. The adsorption and uptake of inorganic arsenic by *Chlorella pyrenoidosa* and the interaction mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018 (in Chinese).
- [27] V R M, Y A R L, Lange LC, et al. Simultaneous biosorption of Cd(II), Ni(II) and Pb(II) onto a brown macroalgae *Fucus vesiculosus*: mono- and multi-component isotherms, kinetics and thermodynamics. *J Environ Manag*, 2019, 251: 109587.
- [28] Endo H, Nakajima K, Chino R, et al. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. *Agric Biol Chem*, 1974, 38(1): 9-18.
- [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. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112270.
- [30] 宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
Ning ZX. Food Composition Analysis Handbook. Beijing: China Light Industry Press, 1998 (in Chinese).
- [31] Ogbonna JC, Masui H, Tanaka H. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation—an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *J Appl Phycol*, 1997, 9(4): 359-366.

(本文责编 陈宏宇)