

# 叶绿素合成缺陷型小球藻突变株的选育及其蛋白产能和品质评价

陈霄, 王百龙, 魏东\*

华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640

陈霄, 王百龙, 魏东. 叶绿素合成缺陷型小球藻突变株的选育及其蛋白产能和品质评价[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1247-1259.

CHEN Xiao, WANG Bailong, WEI Dong. Breeding of *Chlorella* mutants deficient in chlorophyll synthesis and evaluation of its protein yield and quality[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1247-1259.

**摘要:** 本研究旨在利用常压室温等离子体(atmospheric pressure room temperature plasma, ARTP)诱变技术构建叶绿素合成缺陷型凯氏小球藻突变株, 筛选出极低叶绿素、适用于发酵生产蛋白质的新藻种。首先经优化诱变处理时间后建立了野生型兼养细胞的致死率曲线, 在高于95%致死率条件下处理对数早期兼养细胞, 基于可视化藻落颜色变化初筛获得4株突变株。随后在摇瓶中异养培养突变株, 系统评价了蛋白生产性能, 发现在含有30 g/L葡萄糖和5 g/L NaNO<sub>3</sub>的Basal培养基中, 突变株P. ks 4表现最优, 蛋白含量及产率分别为39.25%干重及1.15 g/(L·d), 氨基酸评分达101.34, 叶绿素a含量下降98.78%且不含叶绿素b, 含有叶黄素0.62 mg/g而使藻体呈金黄色。本研究为微藻替代蛋白的发酵生产提供了高性能、高品质的新种质P. ks 4。

**关键词:** 凯氏小球藻; 常压室温等离子体; 叶绿素; 蛋白质; 氨基酸

## Breeding of *Chlorella* mutants deficient in chlorophyll synthesis and evaluation of its protein yield and quality

CHEN Xiao, WANG Bailong, WEI Dong\*

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

**Abstract:** The aim of this study was to construct *Chlorella* mutants deficient in chlorophyll synthesis by atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, and screen

资助项目: 谷孚科研基金(GFICRG202102); 广东省基础与应用基础研究重点项目(2019B1515120002)

This work was supported by the GFIC Research Grant (GFICRG202102) and the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019B1515120002).

Corresponding author. E-mail: fewd304@scut.edu.cn

Received: 2022-08-24; Accepted: 2022-09-26

novel algal species with very low chlorophyll content which is suitable for protein production by fermentation. Firstly, the lethal rate curve of mixotrophic wild type cells was established by optimizing the mutagenesis treatment time. The mixotrophic cells in early exponential phase were treated by the condition of over 95% lethal rate, and 4 mutants with the visual change of colony color were isolated. Subsequently, the mutants were cultured in shaking flasks heterotrophically for evaluation of their protein production performance. P. ks 4 mutant showed the best performance in Basal medium containing 30 g/L glucose and 5 g/L NaNO<sub>3</sub>. The protein content and productivity reached 39.25% dry weight and 1.15 g/(L·d), with an amino acid score of 101.34. The chlorophyll *a* content decreased 98.78%, whereas chlorophyll *b* was not detected, and 0.62 mg/g of lutein content made the algal biomass appear golden yellow. This work provides a novel germplasm, the mutant P. ks 4 with high yield and high quality, for alternative protein production by microalgal fermentation.

**Keywords:** *Chlorella kessleri*; atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP); chlorophyll; protein; amino acid

近年来,环境保护、动物福利及健康饮食观念日益深入人心,推进了替代蛋白在人类饮食中的市场化应用<sup>[1]</sup>,基于生产可持续、营养、健康、环保理念的替代蛋白新食品的开发得到了高速发展。小球藻(*Chlorella*)是一大类单细胞绿藻,蛋白含量高达干重的 50%–65%,富含多种生物活性物质,作为优质蛋白的可持续食物资源,在美国、日本及欧盟已有 30 多年的食用历史<sup>[2]</sup>,我国在 2012 年也批准了蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)作为新资源食品<sup>[3]</sup>。小球藻既可进行光合自养生产,也可进行高细胞密度异养发酵,生产潜力巨大<sup>[4]</sup>,在替代蛋白领域被视作重要的植物(或微生物)蛋白新资源。虽然近年来部分小球藻种质命名在分类学上有所改变,至少在欧洲有越来越多的小球藻种类应用于食品领域,未受到新资源食品法规限制<sup>[5]</sup>。

然而,由于野生型小球藻的干粉具有浓重的藻腥味且呈深墨绿色,导致其干粉气味和感官不佳,限制了在食品领域的多元化应用<sup>[6]</sup>。为解决颜色和气味干扰,脱腥脱色是目前主要的技术手段。通过优化提取方法,如超临界 CO<sub>2</sub> 萃取、有机溶剂浸提等,虽然在一定程度上改善了腥味

和色泽,但叶绿素和腥味物质的脱除不完全,且会造成高成本、环境污染和营养成分损失<sup>[7]</sup>;采用基因操作、诱变等手段,对生产藻种进行遗传改造<sup>[6]</sup>,从根本上抑制或阻断细胞内叶绿素的生物合成途径可能是更为有效的途径。其中,随机诱变因不会引入外源基因,作为非转基因(non-genetically modified organism, non-GMO)技术手段在食品领域有广泛应用<sup>[8]</sup>。例如,利用物理诱变紫外线(ultraviolet, UV<sup>[9]</sup>)、化学诱变甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS<sup>[10]</sup>)已成功获得了非绿色颜色表征的小球藻和莱茵衣藻的突变株。小球藻被联合国世界粮农组织推荐为“21 世纪最理想食品”,而通过上述手段获得的“黄金小球藻”不仅保留了小球藻的高营养价值及高生产效率,同时解决了传统小球藻脱色难、腥味重的难题,提高了消费者感官接受度,拓宽了食品应用场景。

常压室温等离子体(atmospheric pressure room temperature plasma, ARTP)诱变是一种新型的物理诱变育种技术,操作简易、正向突变率高、对人体和环境无危害<sup>[11]</sup>,主要应用于真菌、细菌育种。在微藻领域,ARTP 对提高微藻的虾青素

积累<sup>[12]</sup>、脂质合成<sup>[13]</sup>等都有正向效果。Ban 等<sup>[14]</sup>通过 ARTP 诱变,得到了单位细胞体积叶绿素含量降低 5.3–6.1 倍的浅绿色莱茵衣藻突变株。由此可见,ARTP 为降低或消除单细胞绿藻中叶绿素合成提供了可行的新途径。

本研究旨在应用 ARTP 诱变技术获得凯氏小球藻叶绿素合成缺陷型突变株。在此基础上进一步探究了不同营养模式、补糖模式、氮源浓度等因素对野生型和突变株生产性能及品质特征的影响规律,确定了产蛋白性能和氨基酸评分突出的突变株和优化发酵条件,研究结果将为高蛋白微藻的生物物质发酵生产提供创新的微藻种质资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 藻种

凯氏小球藻(*Chlorella kessleri*, 现系统命名为凯氏拟小球藻 *Parachlorella kessleri*, 简称 P. ks)系本实验室保存。采用 Basal 固体培养基<sup>[15]</sup>在 4 °C 下进行斜面保藏。

#### 1.1.2 主要试剂

葡萄糖、硝酸钠、甘油、浓硫酸、甲醇、丙酮、Basal 培养基配制试剂等均为分析纯试剂。

#### 1.1.3 主要仪器

ARTP 育种机购自无锡源清天木生物有限公司;AL104 型电子天平购自瑞士 Mettler Toledo 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 型恒温光照摇床购自太仓实验设备厂;AMA240 型高压蒸汽灭菌锅购自 ASTELL 公司;AW442P4 流式细胞仪购自贝克曼-库尔特公司;Modulyod 型冷冻干燥机购自 Thermo Fisher 公司;K9840 半自动凯氏定氮仪购自山东海能未来技术集团股份有限公司;安捷伦 HPLC 1260 高效液相色谱仪购自 Agilent Technologies Inc 公司;L-8900 氨

基酸全自动分析仪购自 HITACHI 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 种子液制备

从 Basal 培养基斜面挑取一环野生型藻苔,在含有 10 g/L 葡萄糖的 Basal 固体平板培养基上划线,在 28 °C、10 μmol/(m<sup>2</sup>·s)的光照培养箱中培养 7 d 得到活化单克隆。随后挑取一个单藻落,接种到 20 mL 含 10 g/L 葡萄糖的无菌 Basal 培养基中,分别在兼养(LED 暖白光, 120 μmol/(m<sup>2</sup>·s))和异养模式下,于 30 °C、160 r/min 的恒温摇床中连续培养 4 d 制备种子液。

### 1.2.2 ARTP 诱变及初筛

分别取对数生长早、中、末期的上述兼养种子液,用无菌水稀释至 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> cells/mL,将稀释液与 10% (体积分数)甘油溶液等体积混合形成藻悬液,使甘油终浓度为 5% (体积分数)作为诱变保护剂。取 10 μL 上述藻悬液,滴在无菌金属载片中央,置于 ARTP 育种机中进行诱变处理,诱变条件设置见表 1<sup>[14]</sup>。处理后的金属载片置于装有 1 mL 无菌水的离心管中漩涡振荡洗脱 1 min。将洗脱液梯度稀释,取 100 μL 涂布于 Basal 平板培养基,置于 28 °C 光照培养箱中培养 10 d。以未诱变处理的藻液为对照,对各诱变组及对照组进行藻落计数,按以下公式(1)计算致死率,绘制致死率曲线。

$$\text{致死率}(\%) = (1 - \text{处理组藻落数} / \text{对照组藻落数}) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 ARTP 处理条件

Table 1 Treatment conditions of ARTP

Parameters	Treatment condition
Output power (W)	120
Irradiation distance (mm)	2
Flow rate (SLM)	10
Irradiation time (s)	0, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 30
Carrier gas	He

将致死率高于 95% 的处理条件确定为最优诱变条件。随后以 *P. ks* 为出发藻株, 选择合适的生长时期细胞进行多批次诱变后涂平板培养, 以长出的单藻落颜色为指标进行初筛, 与野生型深墨绿色的藻落相比, 选择肉眼可见的绿色变浅(浅绿、黄色等)的藻落作为初筛突变株, 收集并保藏。

### 1.2.3 不同营养模式下初筛突变株的系统评价

按 1.2.1 方法制备野生型和突变株的种子液。在摇瓶中进行兼养[光强  $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]和异养两种模式下的细胞培养, 系统评价其差异性。接种种子液于 100 mL 含 30 g/L 葡萄糖、3.75 g/L  $\text{NaNO}_3$  的无菌 Basal 培养基中, 起始密度为  $5 \times 10^6$  CFU/mL。随后置于  $30^\circ\text{C}$ 、160 r/min 的恒温光照摇床中培养 4 d。每 24 h 取样测定生物量干重浓度及细胞密度。培养结束后收集藻液, 离心、洗涤、冻干后获得藻粉并置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中避光储存, 用于分析色素组成和蛋白含量, 计算产量和产率。

### 1.2.4 不同碳、氮源浓度下初筛突变株的系统评价

按 1.2.1 方法制备野生型和突变株的种子液。在摇瓶中采用不同补糖模式和氮源浓度培养细胞, 对野生型和初筛突变株的差异进行系统评价。

设置两种补糖模式: (1) Basal 培养基中初始葡萄糖浓度为 30 g/L (简称 G30), 一次性加入(下文统称一次性加入葡萄糖); (2) 初始葡萄糖浓度为 10 g/L (简称 G10), 每天监测葡萄糖浓度, 当耗尽时补加葡萄糖浓度至 10 g/L, 共补加 2 次(下文统称分批补糖)。

设置 3 个初始  $\text{NaNO}_3$  浓度分别为 2.5、3.75、5 g/L (简称 N2.5、N3.75、N5), 并与两种补糖模式进行组合, 分别为 G10-N2.5、G10-N3.75、G10-N5、G30-N2.5、G30-N3.75 和 G30-N5。接种种子液于 100 mL 上述无菌培养基中, 初始密

度为  $5 \times 10^6$  CFU/mL。随后置于  $30^\circ\text{C}$ 、160 r/min 的恒温光照摇床中异养培养 4 d, 每隔 24 h 取样测定生物量干重浓度及细胞密度、培养基中葡萄糖浓度, 第 3 天起测  $\text{NaNO}_3$  浓度。培养结束后收集藻液, 离心、洗涤、冻干后获得藻粉并置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中避光储存, 用于分析蛋白含量及色素和氨基酸组成, 计算产量和产率。综合上述数据进行排序, 以筛选出最优初筛突变株和最适的培养条件。

### 1.2.5 突变株的色素合成稳定性分析

将初筛突变株涂布于 Basal 培养基平板上进行 8 次传代培养, 观察其颜色稳定性。

## 1.3 分析与测试

### 1.3.1 生物量浓度及细胞密度测定<sup>[16]</sup>

$$\text{生物量产率}[\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})] = \frac{DW_2 - DW_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

式(2)中,  $DW_1$ 、 $DW_2$  分别代表  $t_1$  和  $t_2$  时间点的生物量干重浓度。

$$\text{比生长速率} = \frac{\ln C_{t_2} - \ln C_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

式(3)中,  $C_{t_1}$ 、 $C_{t_2}$  分别代表  $t_1$  和  $t_2$  时间点的细胞密度。

### 1.3.2 蛋白质含量测定<sup>[16]</sup>

采用半自动凯氏定氮仪测定, 试样中粗蛋白含量以质量分数  $\omega$  计, 数值以质量分数(%)表示, 按公式(4)计算:

$$\omega = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times \frac{14}{1000} \times 6.25}{m \times \frac{V'}{V}} \times 100 \quad (4)$$

式(4)中,  $V_2$  为滴定试样所消耗盐酸标准滴定溶液的体积, 单位为毫升(mL);

$V_1$  为滴定空白所消耗盐酸标准滴定溶液的体积, 单位为毫升(mL);

$C$  为盐酸标准滴定溶液的浓度, 单位为摩尔每升(mol/L);  $m$  为试样质量, 单位为克(g);  $V$  为试样消煮液总体积, 单位为毫升(mL);  $V'$  为蒸

馏用消煮液体积, 单位为毫升(mL); 14 为氮的摩尔质量, 单位为克每摩尔(g/mol); 6.25 为氮换算成粗蛋白的平均系数。

### 1.3.3 叶黄素含量及叶绿素相对含量测定<sup>[17]</sup>

HPLC 法测定叶黄素含量及叶绿素相对含量。

其中, 叶黄素标准曲线如下:

$$C = 0.3699 \times M_{445} - 0.0523 \quad (5)$$

$$L = \frac{C \times V}{m} \quad (6)$$

式(5, 6)中,  $C$  为叶黄素浓度, 单位为 mg/L;  $M_{445}$  为 445 nm 下藻粉中叶黄素对应的峰面积;  $L$  为叶黄素含量, 单位为 mg/g;  $V$  为定容剂体积, 单位为 L;  $m$  为藻粉质量, 单位为 g;

叶绿素相对含量计算公式如下:

$$A = \frac{M_{663} \times m_2}{W_{663} \times m_1} \times 100\% \quad (7)$$

$$B = \frac{M_{645} \times m_2}{W_{645} \times m_1} \times 100\% \quad (8)$$

式(7, 8)中,  $A$  为突变株叶绿素  $a$  相对含量;  $m_1$  为野生型藻粉质量, 单位为 g;  $m_2$  为突变株藻粉质量, 单位为 g;  $M_{663}$  为 663 nm 下突变株藻粉中叶绿素  $a$  对应的峰面积;  $W_{663}$  为 663 nm 下野生型藻粉中叶绿素  $a$  对应的峰面积;  $B$  为突变型叶绿素  $b$  相对含量;  $M_{645}$  为 645 nm 下突变型藻粉中叶绿素  $b$  对应的峰面积;  $W_{645}$  为 645 nm 下野生型藻粉中叶绿素  $b$  对应的峰面积。

### 1.3.4 氨基酸分析<sup>[18]</sup>

采用氨基酸自动分析仪进行分析, 按以下公式计算:

$$\omega = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_i}{A_{st} \times m \times V_{st} \times 10^6} \times 100 \quad (9)$$

式(9)中,  $n$  为试样水解溶液的稀释倍数;  $A_i$  为试样中对应氨基酸的峰面积;  $V$  为试样中水解溶液体积(单位 mL);  $c$  为标准工作液中对应氨基酸的浓度单位 nmol/mL;  $M$  为氨基酸摩尔质量

(单位 g/mol);  $V_i$  为试样进样体积(单位  $\mu$ L);  $A_{st}$  为氨基酸标准溶液的峰面积;  $m$  为试样质量(单位 mg);  $V_{st}$  为氨基酸标准溶液进样体积(单位  $\mu$ L)。

每一种氨基酸评分按以下公式(10)计算, 蛋白整体评分取最低的一项评分(即第一限制性氨基酸评分)。

$$AAS = \frac{\text{被测蛋白每克蛋白质中AA量}}{\text{理想模式或参考蛋白每克蛋白质中AA量}} \times 100 \quad (10)$$

## 1.4 数据分析

采用 Microsoft Origin V8.5 Software 和 SPSS Statistics 25 对数据进行方差分析和显著性检验, 实验设置 3 个平行样, 结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 ARTP 诱变致死率曲线

首先优化了 ARTP 诱变处理时间, P. ks 兼养生长曲线和诱变致死率曲线如图 1 所示。随着 ARTP 处理时间的延长, 细胞致死率显著提高, 还发现对数早期和对数末期对 ARTP 处理的致死敏感度显著高于对数中期( $P < 0.05$ )。有研究表明, 在致死率高于 95% 的条件下突变率最高, 诱变效果最佳<sup>[19]</sup>。在保证突变株存活能力的基础上, 本研究确定兼养 P. ks 不同生长时期的最佳诱变时间为: 对数早期 15 s、对数中期 19 s、对数末期 15 s, 致死率分别为 98.91%、97.17% 和 96.36%。为缩短培养时间及节约 ARTP 工作载气, 最终确定对数早期及 15 s 处理时间为最佳诱变条件, 以此进行后续诱变。

如图 2 所示, 以 P. ks 对数早期兼养细胞为出

发藻株，经多批次分别诱变 15 s，初筛得到了 4 株颜色突变株 P. ks 1-P. ks 4，在兼养平板上呈现浅绿色藻落；异养平板上 P. ks 1 呈现浅绿色，P. ks 2-4 呈现金黄色。经过 8 次传代固体培养，颜色特征非常稳定。目前尚未有利用 ARTP 诱变获得黄

色小球藻、莱茵衣藻叶绿素合成缺陷型突变株的报道，现有研究多是利用基因编辑<sup>[20]</sup>、UV 或化学诱变<sup>[10]</sup>获得，前者操作复杂且会引入新的基因并涉及法规问题；后者易对操作者造成伤害，且正突变率低。

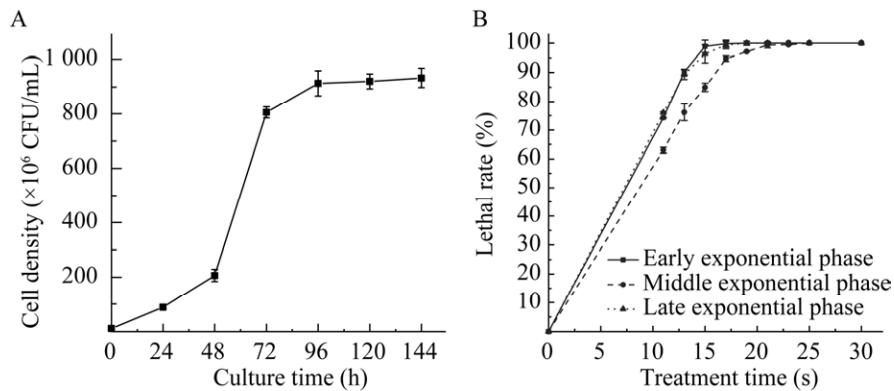


图 1 野生型兼养细胞的生长曲线(A)和 ARTP 诱变处理的致死率曲线(B)

Figure 1 Growth curve (A) of mixotrophic wild type cells and lethal rate curve (B) of ARTP mutagenesis.

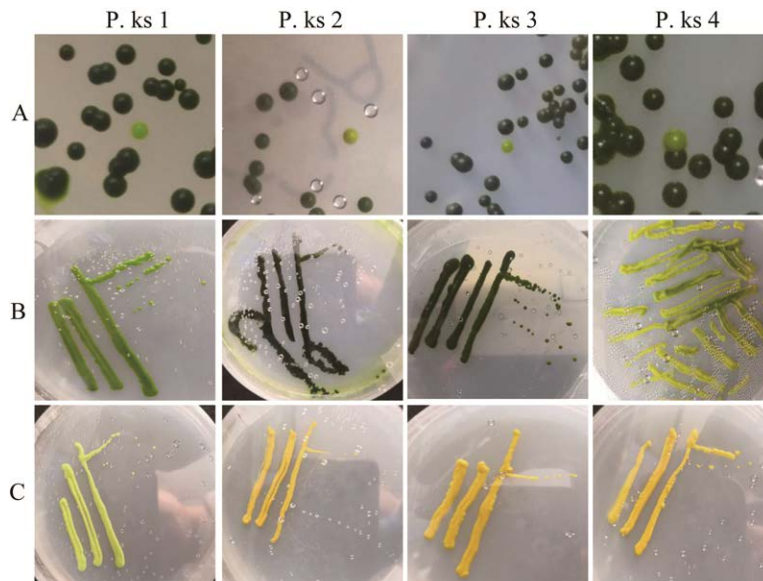


图 2 筛选兼养平板(A)、纯化兼养平板(B)及纯化异养平板(C)上的突变株单克隆和培养物

Figure 2 Single colonies and cultures of the mutants on primary mixotrophic screening plates (A), mixotrophic purification plates (B) and heterotrophic purification plates (C).

## 2.2 不同营养模式下初筛突变株的系统评价

在异养和兼养两种营养模式下,野生型和4株初筛突变株的细胞密度及生物量浓度曲线见图3。由图3可知,所有藻株的生长变化趋势相近,兼养比生长速率均值为 $1.25\text{ d}^{-1}$ ,生物量浓度均值为 $15.51\text{ g/L}$ ,均显著高于异养下的 $1.00\text{ d}^{-1}$ 和 $13.27\text{ g/L}$  ( $P<0.05$ )。说明与异养相比,兼养模式可显著提高所有藻株的生长速率和生物量产量。其中,突变株P. ks 3兼养下生物量浓度和产率最高,达到 $17.0\text{ g/L}$ 和 $3.75\text{ g/(L}\cdot\text{d)}$ ,比野生型分别提高了 $11.38\%$ 和 $14.46\%$ ;异养下达到 $14.42\text{ g/L}$ 和 $3.24\text{ g/(L}\cdot\text{d)}$ ,比野生型分别提高了 $7.46\%$ 和 $4.85\%$ 。突变株在光照下生长优势更显著,推测ARTP诱变处理可能使突变株具有更小的叶绿素天线尺寸和较低的单位细胞体积叶绿素

含量,从而实现更高的光合效率<sup>[21]</sup>。Ban等<sup>[14]</sup>通过诱变得到的浅绿色莱茵衣藻突变株,较出发藻株具有更高的光合效率和生物量产率,与本研究结果一致。

异养和兼养两种营养模式下,野生型及4株初筛突变株的蛋白含量、产量和产率见图4。由图4可知,P. ks、P. ks 1、P. ks 2和P. ks 4四株藻株在兼养条件下蛋白产量和产率均显著高于异养条件( $P<0.05$ )。其中,兼养条件下P. ks 1的蛋白含量和产率均为最高,达到 $28.04\%$  DW (dry weight, 干重)和 $1.07\text{ g/(L}\cdot\text{d)}$ ,比野生型兼养培养分别提高了 $8.85\%$ 和 $8.88\%$ ;异养条件下P. ks 4和P. ks 3的蛋白含量、产率最高分别为 $29.97\%$  DW和 $0.95\text{ g/(L}\cdot\text{d)}$ ,比野生株在异养下分别提高了 $3.38\%$ 和 $6.74\%$ 。

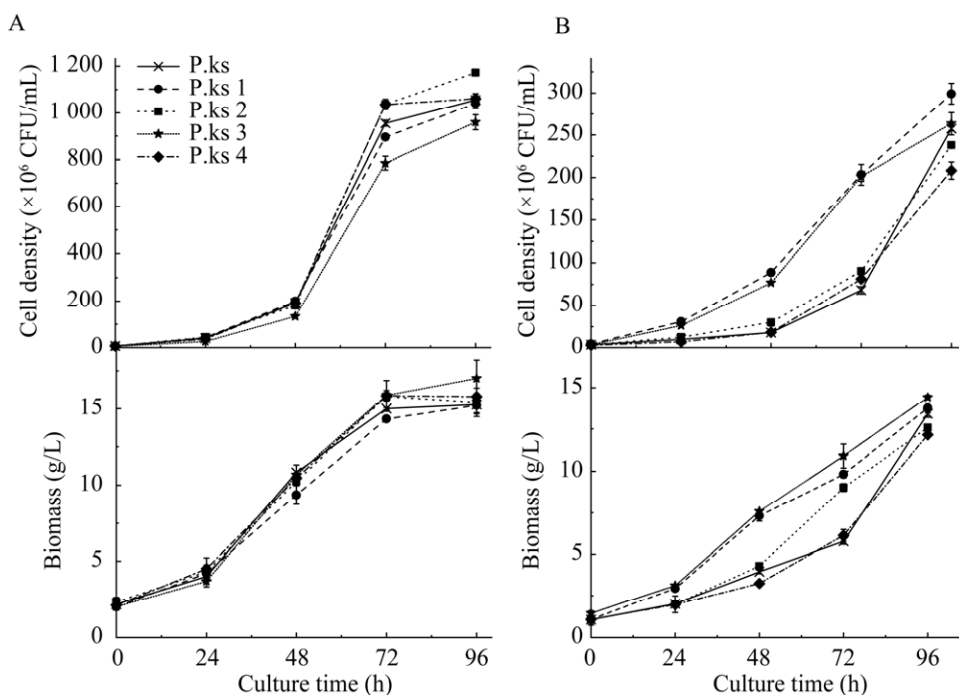


图3 兼养(A)和异养(B)生长模式下野生型和突变株的细胞密度及生物量浓度

Figure 3 Cell density and biomass concentration of wild type and mutants under mixotrophic (A) and heterotrophic growth (B).

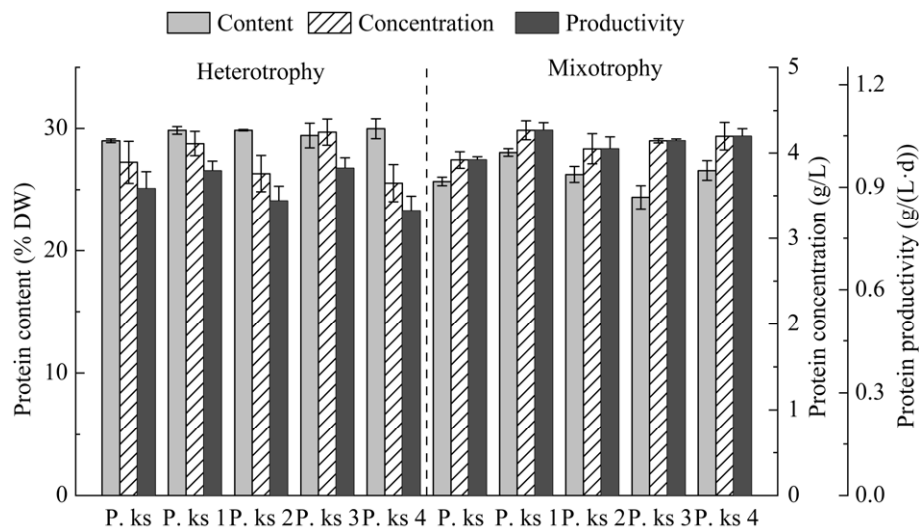


图4 兼养和异养生长模式下野生型和突变株的蛋白含量、产量及产率

Figure 4 Protein content, yield and productivity of wild type and mutants under mixotrophic and heterotrophic growth.

异养和兼养两种营养模式下，野生型和4株初筛突变株的叶黄素含量、叶绿素相对含量见图5。由图5可知，光照显著影响叶黄素合成，异养下其含量显著低于兼养( $P < 0.01$ )。作为初级类胡萝卜素，叶黄素参与了天线复合体的光捕集，其合成相关基因在光刺激下可快速响应，较低的光照就能显著促进叶黄素的积累<sup>[22]</sup>。兼养下4株突变株叶绿素可正常合成，其中突变株P. ks 2和P. ks 3的叶绿素a含量比野生型分别提高了18.9%和3.6%；而异养下其含量大幅降低，其中突变株P. ks 4的叶绿素a最低，仅为野生型的0.46%且无叶绿素b。这与图2显示的菌落颜色一致。Schüler等通过化学诱变得到了类似的低叶绿素普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)突变株颜色表型<sup>[10]</sup>。推测ARTP诱变可能使野生型细胞中原叶绿素酸酯还原酶等关键酶的基因受到破坏而导致酶表达或活性受到抑制，从而抑制了非光依赖型的叶绿素合成途径，导致异养条件下无法正常合成叶绿素<sup>[23]</sup>。

因此，突变株在兼养条件下虽然细胞生长较

快、蛋白产率较高，但色素组成不符合选育目标，故后续培养都选择异养模式。

### 2.3 不同补糖模式和氮源浓度下初筛突变株的系统评价

不同补糖模式和氮源浓度下，野生型及4株

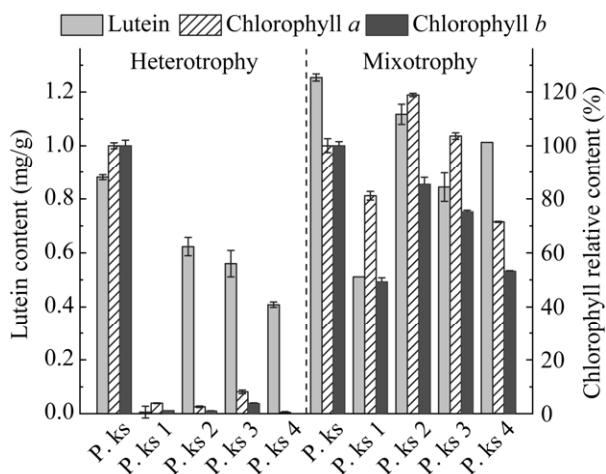


图5 兼养和异养生长模式下野生型和突变株叶黄素含量和叶绿素相对含量

Figure 5 Lutein content and relative content of chlorophyll in wild type and mutants under mixotrophic and heterotrophic growth.



初筛突变株的生物量产率见图 6。如图 6 所示, 所有藻株的生物量产率在一次性加入葡萄糖模式下均取得较大值, 且随着初始氮源浓度的上升呈下降趋势。文献研究表明, 低葡萄糖浓度会限制小球藻细胞生长, 适当提高葡萄糖浓度能显著提高生物量浓度, 而高浓度  $\text{NaNO}_3$  形成的渗透压及底物抑制作用会抑制细胞生长<sup>[24]</sup>。其中, P. ks 3 在 G30-N2.5 组合中可获得最大生物量浓度和生物量产率, 分别为 14.92 g/L 及 3.42 g/(L·d)。Schüler 等<sup>[10]</sup>获得的黄色普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)突变株在摇瓶中的生物量浓度仅为 6.06 g/L, 莱茵衣藻<sup>[25]</sup>在摇瓶中最优条件下生物量浓度仅为 1.32 g/L, 故本研究获得的突变株 P. ks 3 在生物量产量和产率方面具有绝对优势。

不同补糖模式和氮源浓度下, 野生型及 4 株突变株的叶黄素含量及叶绿素相对含量见图 7。

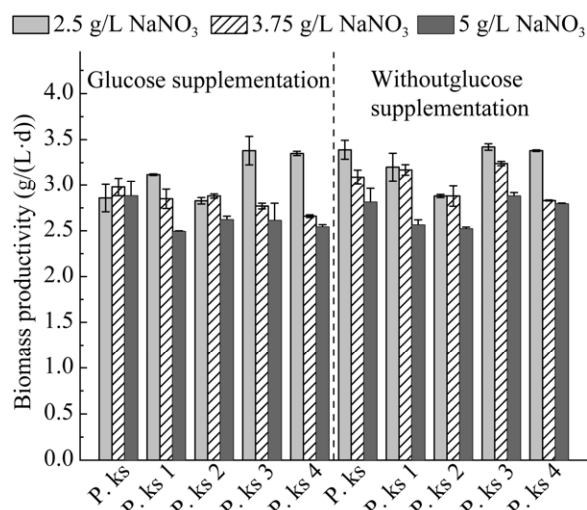


图 6 不同补糖模式和氮源浓度下野生型和突变株异养培养的生物量产率

Figure 6 Biomass productivity in heterotrophic culture of wild type and mutants under various glucose supplementation modes and nitrogen concentrations.

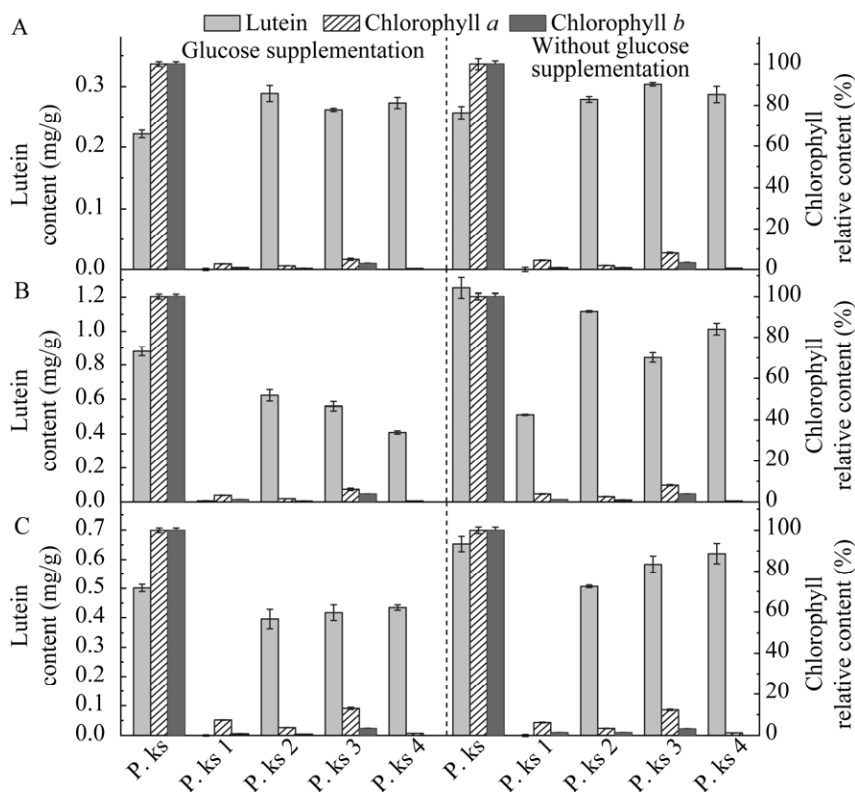


图 7 不同补糖模式和氮源浓度下野生型和突变株异养培养中叶黄素含量及叶绿素相对含量

Figure 7 Lutein content and relative content of chlorophyll in heterotrophic culture of wild type and mutants under various glucose supplementation modes and nitrogen concentrations. A: 2.5 g/L  $\text{NaNO}_3$ . B: 3.75 g/L  $\text{NaNO}_3$ . C: 5 g/L  $\text{NaNO}_3$ .

如图 7 所示, 叶绿素含量与碳氮源浓度成正相关; 叶黄素含量与碳源浓度正相关, 而随着氮源浓度的升高呈现先上升后下降的趋势。研究表明, 氮饥饿会严重限制叶绿素的合成<sup>[26]</sup>; 高硝酸盐水平会导致更高的叶黄素浓度<sup>[27]</sup>, 而过高则会抑制叶黄素的积累。在不同碳氮源浓度下, 突变株 *P. ks 4* 叶绿素相对含量是所有突变株中最低的, 叶绿素 *a* 仅为野生型的 1.22% 且不含叶绿素 *b*, 显著低于其他突变株 ( $P < 0.05$ )。在 G30-N5 组合中 *P. ks 4* 的叶黄素含量为 0.62 mg/g, 相较于 G30-N2.5 提高了 115.9% 且优于其他突变株, 在 6 组碳氮源浓度组合中, 色素表型优选排序为 *P. ks 4* > *P. ks 2* > *P. ks 3* > *P. ks 1*, 故突变株 *P. ks 4* 的色素组成最符合筛选目标。

不同补糖模式及氮源浓度下, 野生型及 4 株突变株的蛋白质含量、产量和产率见图 8。由图可知, 随着碳氮源浓度的提高, 胞内蛋白含量和产率均显著提高 ( $P < 0.05$ )。研究表明, 氮素作为构成蛋白质的主要元素, 低浓度氮素下微藻细胞通常积累淀粉或脂类; 而提高氮源浓度可提高氮源同化速率, 使更多氮素用于蛋白质合成<sup>[24]</sup>。本研究发现, 最适合蛋白积累的碳氮源浓度为: 30 g/L 葡萄糖和 5 g/L  $\text{NaNO}_3$  (即 G30-N5 组合)。在此条件下, 突变株 *P. ks 4* 表现最优, 蛋白含量和产率分别达到 39.25% DW 和 1.15 g/(L·d), 相较于 G30-N2.5 分别提高了 96.34% 及 86.75%。

对 G30-N5 组合条件下的藻粉进行氨基酸组成分析, 结果见表 2。全部藻株都含有 18 种氨基酸, 且 Glu、Leu、Ala 含量较高, His、Met 和 Cys 含量较低。8 种人体必需氨基酸 (essential amino acid, EAA) 对人体生长发育至关重要, 是评价蛋白品质的一项重要指标, 如支链氨基酸

(branched chain amino acid, BCAA, Val, Ile, Leu) 对人体增肌、抗疲劳<sup>[28]</sup> 等都有突出效果。非必需氨基酸 (nonessential amino acid, NEAA) 也被认为具有很重要的生理功能<sup>[29]</sup>。由表 2 可知, *P. ks 4* 中氨基酸总量 (total amino acid, TAA) (34.04% DW)、EAA 含量 (13.56% DW)、BCAA 含量 (6.40% DW) 均最高, 分别比野生型提高了 6.28%、14.81% 和 17.86%。*P. ks 4* 中 EAA/TAA=39.84%, EAA/NEAA=66.23%, 达到或超过 FAO/WHO 推荐的理想蛋白质模式 (EAA/TAA 在 40% 左右, EAA/NEAA 在 60% 以上) 标准。

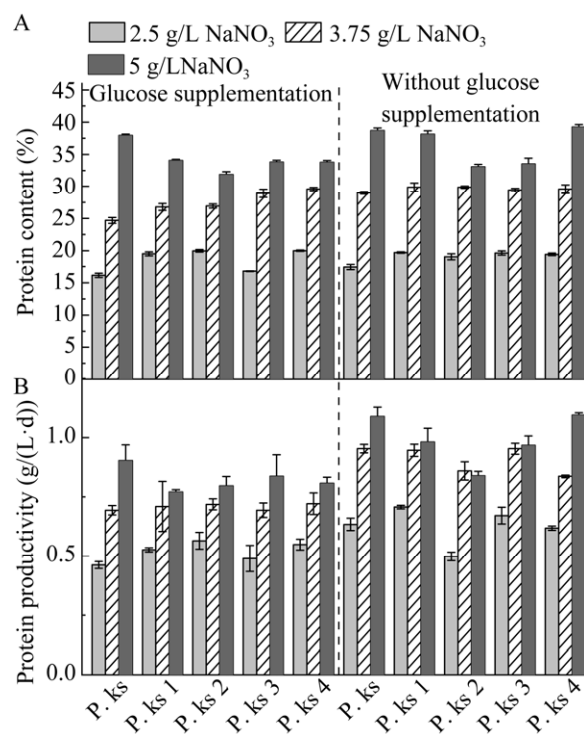


图 8 不同补糖模式和氮源浓度下野生型和突变株细胞中蛋白含量(A)和产率(B)

Figure 8 Protein content (A) and productivity (B) of wild type and mutants under various glucose supplementation modes and nitrogen concentrations.

将表 2 中 EAA 含量与 FAO/WHO 建议模式对比, 得到的氨基酸评分表如表 3 所示。其中, 异养野生型 *P. ks* 和突变株 *P. ks 1* 的氨基酸组成较不均衡, 有蛋氨酸+胱氨酸、异亮氨酸两类限制性氨基酸, 氨基酸评分较低, 分别为 49.05 和 51.94。异养突变株 *P. ks 2*、*P. ks 3* 的氨基酸组成

与 FAO/WHO 建议模式相近, 第一限制性氨基酸为含硫氨基酸, 评分分别为 94.51 和 78.74。突变株 *P. ks 4* 无限制性氨基酸, 评分为 101.34, 比野生型有了极大幅度地改善, 达到优质蛋白的标准, 且高于现有报道的植物蛋白和微藻蛋白。综上所述, 确定突变株 *P. ks 4* 为最优突变株。

表 2 G30-N5 组野生型和突变株异养细胞中的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition in heterotrophic cells of wild type and mutants in G30-N5 group

Amino acids (AA, % DW)	<i>P. ks</i>	<i>P. ks 1</i>	<i>P. ks 2</i>	<i>P. ks 3</i>	<i>P. ks 4</i>
Total AA	32.03±0.94	29.13±1.24	29.37±1.08	30.26±1.13	34.04±0.92
EAAs					
Lys	2.32±0.02	1.95±0.11	1.93±0.09	1.92±0.10	1.96±0.05
Trp	0.54±0.06	1.19±0.14	1.12±0.02	1.14±0.07	1.16±0.02
Phe	1.58±0.13	1.36±0.05	1.42±0.12	1.46±0.19	1.55±0.08
Met	0.45±0.02	0.50±0.04	0.79±0.02	0.56±0.02	0.78±0.01
Thr	1.49±0.03	1.34±0.12	1.35±0.06	1.46±0.09	1.71±0.11
Val (BCAA)	1.90±0.09	1.74±0.09	1.72±0.10	1.69±0.13	2.03±0.13
Ile (BCAA)	1.04±0.01	0.94±0.02	1.16±0.09	1.30±0.06	1.54±0.02
Leu (BCAA)	2.49±0.01	2.21±0.08	2.34±0.11	2.48±0.12	2.83±0.06
Total BCAA	5.43±0.11	4.89±0.19	5.22±0.30	5.47±0.31	6.40±0.21
Total EAAs	11.81±0.37	11.23±0.65	11.83±0.58	12.01±0.71	13.56±0.47
NEAAs					
His	0.74±0.03	0.64±0.02	0.77±0.01	1.05±0.00	0.85±0.03
Asp	2.92±0.12	2.55±0.07	2.42±0.03	2.49±0.08	2.65±0.02
Ser	1.44±0.03	1.30±0.03	1.26±0.04	1.37±0.03	1.57±0.11
Glu	4.19±0.12	3.60±0.11	3.42±0.09	3.63±0.11	4.02±0.09
Gly	1.85±0.06	1.63±0.01	1.54±0.07	1.51±0.03	1.92±0.02
Ala	2.52±0.09	2.33±0.22	2.29±0.11	2.37±0.01	2.77±0.05
Cys	0.10±0.00	0.07±0.00	0.19±0.01	0.27±0.00	0.42±0.01
Tyr	1.30±0.10	1.19±0.01	1.38±0.01	1.49±0.09	1.66±0.06
Arg	1.90±0.02	1.76±0.06	1.77±0.10	1.76±0.01	2.00±0.02
Pro	3.26±0.03	2.83±0.09	2.50±0.09	2.31±0.07	2.62±0.05
Total NEAA	20.22±0.59	17.90±0.60	17.54±0.52	18.25±0.42	20.48±0.45
EAA/NEAAs	0.58±0.03	0.63±0.02	0.67±0.03	0.66±0.01	0.66±0.02

表 3 G30-N5 组野生型和突变株异养细胞的氨基酸评分

Table 3 Amino acid score in heterotrophic cells of wild type and mutants in G30-N5 group

Strains	Thr	Val	Met+Cys	Ile	Leu	Phe+Tyr	Lys	Trp	Amino acid score (AAS)
FAO/WHO recommend ed model	40.00	50.00	35.00	40.00	70.00	60.00	55.00	10.00	100.00
<i>P. ks</i>	47.45±0.23	60.44±0.29	17.17±0.12	33.12±0.14	78.92±0.56	121.65±1.01	73.65±0.12	16.83±0.11	49.05±0.25
<i>P. ks 1</i>	47.90±0.45	62.33±0.22	18.18±0.14	33.64±0.22	79.27±0.79	81.66±0.96	69.71±0.29	38.02±0.34	51.94±0.30
<i>P. ks 2</i>	47.80±0.30	61.08±0.45	33.08±0.21	40.99±0.16	83.01±0.29	95.24±0.76	68.41±0.25	38.23±0.03	94.51±0.43
<i>P. ks 3</i>	50.07±0.21	58.00±0.32	27.56±0.26	44.54±0.26	85.27±0.20	97.19±0.89	65.9±0.22	37.58±0.11	78.74±0.55
<i>P. ks 4</i>	52.05±0.34	61.59±0.26	35.47±0.33	46.82±0.21	86.04±0.16	94.46±0.79	59.65±0.16	34.11±0.09	101.34±0.69

### 3 结论

本研究以欧洲新资源食品许可的凯式小球藻(现用名凯式拟小球藻)野生型为出发藻株,采用 ARTP 进行了诱变和系统评价,筛选获得了系列叶绿素合成缺陷型突变株。在异养生长条件下,证实了突变株 P. ks 4 性能最优,蛋白含量和产率高,氨基酸评分高,富含叶黄素,几乎不含有叶绿素,具有高蛋白“黄金小球藻”的鲜明特征。说明 ARTP 诱变技术能为小球藻带来色彩感官的重大改善,也使突变株 P. ks 4 获得了独特的营养价值,较现有叶绿素合成缺陷型藻株有明显的优势,在微藻发酵替代蛋白领域具有巨大的应用潜力与广阔的市场前景。

### REFERENCES

- [1] THAVAMANI A, SFERRA TJ, SANKARARAMAN S. Meet the meat alternatives: the value of alternative protein sources[J]. *Current Nutrition Reports*, 2020, 9(4): 346-355.
- [2] TANG DYY, KHOO KS, CHEW KW, TAO Y, HO SH, SHOW PL. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 2139-2156.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 关于批准蛋白核小球藻等 4 种新资源食品的公告[J]. *中国食品添加剂*, 2013(1): 227-228.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Announcement on the approval of four new resource foods such as *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *China Food Additives*, 2013(1): 227-228 (in Chinese).
- [4] JIN H, CHUAI WH, LI KP, HOU GL, WU MC, CHEN JP, WANG HX, JIA J, HAN DX, HU Q. Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* for biomass production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 4138-4151.
- [5] CHAMPENOIS J, MARFAING H, PIERRE R. Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(5): 1845-1851.
- [6] FU YL, CHEN TP, CHEN SHY, LIU B, SUN PP, SUN H, CHEN F. The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 112: 188-200.
- [7] LI T, XU J, WU HL, WANG GH, DAI SK, FAN JW, HE H, XIANG WZ. A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(9): 162-164.
- [8] ZIMNY T, SOWA S, TYCZEWSKA A, TWARDOWSKI, T. Certain new plant breeding techniques and their marketability in the context of EU GMO legislation-recent developments[J]. *New Biotechnology*, 2019, 51: 49-56.
- [9] MEINECKE L, ALAWADY A, SCHRODA M, WILLOWS R, KOBAYASHI MC, NIYOGE KK, GRIMM B, BECK CF, BECK CF. Chlorophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that accumulate magnesium protoporphyrin IX[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(6): 643-658.
- [10] SCHULER L, DE MORAIS EG, TROVAO M, MACHADO A, CARVALHO B, CARNEIRO M, MAIA I, SOARES M, DUARTE P, BARRORS A, PEREIRA H, SILVA J, VARELA J. Isolation and characterization of novel *Chlorella vulgaris* mutants with low chlorophyll and improved protein contents for food applications[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 469-479.
- [11] WANG LY, HUANG ZL, LI G, ZHAO HX, XING XH, SUN WT, LI HP, GOU ZX, BAO CY. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 851-858.
- [12] AN J, GAO FL, MA QY, XIANG Y, REN DF, LU J. Screening for enhanced astaxanthin accumulation among *Spirulina platensis* mutants generated by atmospheric and room temperature plasmas[J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2017, 25: 464-472.
- [13] SUN X, LI PF, LIU XS, WANG X, LIU YJ, TURAIB A, CHENG ZW. Strategies for enhanced lipid production of *Desmodesmus* sp. mutated by atmospheric and room temperature plasma with a new efficient screening method[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 250: 268-275.
- [14] BAN SD, LIN WT, LUO ZW, LUO JF. Improving hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by reducing chlorophyll content via atmospheric and room temperature plasma[J]. *Bioresource Technology*, 2019,

- 275: 425-429.
- [15] OGBONNA JC, MASUI H, TANAKA H. 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.
- [16] 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 XY, CHEN JH, 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 (in Chinese).
- [17] 吴耀庭, 魏东, 陈俊辉. 五种添加剂对异养小球藻生产叶黄素的影响[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 266-269+227.
- WU YT, WEI D, CHEN JH. Effects of five additives on lutein production by heterotrophic *Chlorella*[J]. Modern Food Technology, 2009, 25(3): 266-269, 227 (in Chinese).
- [18] 董黎明, 汪莘, 李金穗, 孙阳. 异养小球藻主要营养成分及氨基酸组成分析[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 232-237.
- DONG LM, WANG P, LI JS, SUN Y. Analysis of main nutritional components and amino acid composition of heterotrophic *Chlorella*[J]. Food Science, 2012, 33(3): 232-237 (in Chinese).
- [19] CAO S, ZHOU X, JIN WB, WANG F, TU RJ, HAN SF, CHEN HY, CHEN C, XIE GJ, MA F. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 1400-1406.
- [20] GROVENSTEIN PB, WILSON DA, LENNOX CG, SMITH KATHERINE P, CONTRACTOR ALISHA A, MINCEY JONATHAN L, LANKFORD KATHRYN D, SMITH JACQUELINE M, HAYE TASHANA C, MITRA MAUTUSI. Identification and molecular characterization of a novel *Chlamydomonas reinhardtii* mutant defective in chlorophyll biosynthesis[J]. F1000Research, 2013, 2: 236-245.
- [21] JEONG J, BAEK K, KIRST H, ANASTASIOS MELIS, EONSEON JIN. Loss of CpSRP54 function leads to a truncated light-harvesting antenna size in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2017, 1858(1): 45-55.
- [22] XIE YP, HO SH, CHEN CNN, CHEN CY, NG IS, JING KJ, CHANG JS, LU YH. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus sp* for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation[J]. Bioresource Technology, 2013, 144: 435-444.
- [23] WAKASUGI T, NAGAI T, KAPOOR M, ITO M, ITO S, TSUDZUKI J, NAKASHIMA K, TSUDZUKI T, SUZUKI Y, HAMADA A, OHTA T, INAMURA A, YOSHINAGA K, SUGIURA M. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(11): 5967-5972.
- [24] XIE TH, XIA Y, ZENG Y, XING RL, YONG KF. Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: over-compensation strategy[J]. Bioresource Technology, 2017, 233: 247-255.
- [25] ZHANG Z, TAN Y, WANG W, WEN MB, JIAN HF, JIAN KH, MIN XW, YUAN GL. Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(3): 29-35.
- [26] ZHU SN, HUANG W, XU J, ZHONG MW, JING LX, ZHEN HY. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. Bioresource Technology, 2014, 152: 292-298.
- [27] MCCLURE DD, NIGHTINGALE JK, LUIZ A, BLACK S, ZHU JY, KAVANAGH JM. Pilot-scale production of lutein using *Chlorella vulgaris*[J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2019, 44(C): 236-245.
- [28] CHOI S, DISILVIO B, FERNSTROM MH, FERNSTROM JD. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines[J]. Amino Acids, 2013, 45(5): 1133-1142.
- [29] HERTZLER SR, LIEBLEIN-BOFF JC, WEILER M, ALLGEIER C. Plant proteins: assessing their nutritional quality and effects on health and physical function[J]. Nutrients, 2020, 12(12): 446-459.

(本文责编 陈宏宇)