



自养和兼养条件下蛋白核小球藻昼夜节律的响应

汪成, 赵艳*

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要:【目的】研究自养和兼养两种培养方式对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长、细胞分裂和生化组分积累的影响, 探讨人工培养蛋白核小球藻的昼夜节律响应机制和优化技术。【方法】小球藻自养培养采用 BG11 培养基, 兼养培养基在 BG11 培养基中添加 4 种不同浓度(1、5、10、20 g/L)的葡萄糖, 培养周期为 10 d。血球板计数法测定藻细胞浓度, 干重法测定藻细胞生物量。显微观察藻细胞大小和分裂情况。脂染色法测定小球藻总脂的含量, 藻细胞的叶绿素、蛋白和淀粉分别采用甲醇、氢氧化钠、硝酸钙浸提后通过紫外分光光度法定量测定。【结果】葡萄糖兼养培养对蛋白核小球藻具有显著的促生长效应, 最适浓度为 10 g/L。10 d 收获时, 兼养组(10 g/L 葡萄糖)藻细胞浓度和干重分别是自养组的 2.57 倍和 6.73 倍。分析一昼夜中的藻细胞增殖规律可知, 第 2 天和第 5 天时自养组中增殖的新生子细胞约有 76.00% 在黑暗期分裂产生, 而兼养组中第 2 天和第 5 天光照期的新细胞增殖量占比分别达到 40.90% 和 67.50%。一昼夜内藻细胞大小的迁移动态监测表明, 第 2 天自养组藻细胞的体积变化静息期为 8 h, 兼养组只有 4 h; 第 5 天两组藻细胞大小迁移动态的昼夜节律明显, 但兼养组黑暗结束后较大细胞($D > 6 \mu\text{m}$)占比显著高于自养组。第 8 天时, 兼养组藻细胞已处于稳定期, 总脂和蛋白含量均显著高于自养组, 藻细胞总脂和色素含量在一昼夜中相对稳定, 但蛋白和淀粉含量分别在光照 8 h 和 12 h 左右达到峰值。从第 2 天开始, 对兼养组细胞每天进行 2 h 光延长, 收获时藻细胞浓度和干重分别比对照组提高 13% 和 11%。【结论】葡萄糖兼养培养能大幅提高蛋白核小球藻的生物量。蛋白核小球藻生长增殖与生化组分积累均受昼夜节律调控, 自养条件下藻细胞以光照期生长黑暗期增殖为主。兼养培养提高藻细胞生物量的机制在于缩短藻细胞生长静息期, 在昼夜节律中加速藻细胞生长并显著提高通过细胞周期检查点的细胞比例, 光照期效应尤其明显。藻细胞蛋白和淀粉含量昼夜节律明显, 最佳收获时间分别在光照 8 h 和 12 h 后。

关键词: 蛋白核小球藻, 自养培养, 兼养培养, 昼夜节律, 检查点

基金项目: 浙江省一流学科建设经费(食品科学与工程)(1110JYN6517001G); 国家自然科学基金(31772100)

*通信作者。Tel: +86-571-28008970; E-mail: yanzhao9918@163.com

收稿日期: 2017-10-10; 修回日期: 2017-12-30; 网络出版日期: 2018-01-24

以小球藻(*Chlorella*)为主的微藻开发应用是当前国内外研究热点,常见的小球藻经济藻种包括普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)。小球藻易于培养且生长迅速,富含蛋白、油脂、维生素、矿物质及多种生理活性成分,是功能食品和生物柴油新能源开发的优质生物资源^[1],高密度培养技术是提高小球藻生物量的关键。目前小球藻的生产技术常采用光合自养培养方式,优点是操作方便、不易染菌,但藻细胞的生长受到很大的限制,尤其是随着细胞浓度增大,藻细胞本身的遮蔽效应会降低光合效率,使稳定期藻细胞收获量相对较低^[2]。添加有机碳源使藻细胞处于自养和异养共存的兼养状态,能显著提高小球藻的生物量和细胞油脂含量,甚至兼养效果优于光合自养及异养培养^[3-6]。前人研究表明,绿藻细胞白天进行光合自养生长,夜间进行DNA复制和核分裂,这种昼夜节律循环是藻细胞分裂和生物量倍增的机制。通过光暗周期的精确调控以保障藻细胞生长和分裂行为与昼夜节律的同步适应是培养技术优化设计的基础,这种优化策略能保证获得最大生物量,并且几乎可以无限维持^[7]。探究兼养培养条件下微藻细胞对昼夜节律的响应机制是构建藻细胞高密度培养优化技术的重要前提。

迄今对小球藻兼养培养研究集中于提高生物量和生化组分含量方面^[8],对藻细胞生长与昼夜节律的研究有限,尚缺乏对兼养条件下藻细胞生长增殖规律的探索。个别学者从细胞分裂角度探讨了激素、光照对微藻细胞生长的影响,如Park等发现IAA等激素提高衣藻生物量的可能原因是显著增加体积较大(直径大于10 μm)藻细胞的比例和细胞分裂指数^[9]。Oldenhof等^[10]报道光谱影响

衣藻细胞大小和细胞周期进程,较红光而言,蓝光下细胞体积变大,细胞分裂循环次数增多。Spudich和Matsumura等用初始临界点(primary arrest point, A点)和过渡点(transition point, T点)来描述微藻细胞周期中的两个关键调控点, A点处于细胞周期的G₁期早期,监控新生细胞初始体积大小,只有体积较大能通过A点检验的新生细胞才具备光合自养生长的能力。T点处于G₁期晚期,负责监控细胞能够进行分裂的最小单元尺寸,该尺寸约是A点时细胞体积大小的2倍^[11-12]。T点如今统称为检查点(commitment point, CP点)^[7],相当于酵母在G₁晚期的起始点(start point)和高等真核生物中的R点(restriction point)^[13],这为兼养条件下藻细胞体积变化规律、细胞分裂周期改变及其与藻细胞昼夜节律响应机制探究提供了理论基础。迄今国内外未见有关蛋白核小球藻人工培养过程中藻细胞生长分裂规律以及昼夜节律响应机制的研究。

蛋白核小球藻蛋白含量高,富含各种必需氨基酸和营养保健因子,在医药、化妆品与食品饲料行业应用前景广阔^[14],2012年被我国卫生部批准为新食品资源^[15],其高效的人工培养技术构建是当前国内外研究的热点。研究表明,光质^[16]和通气状态^[17]影响蛋白核小球藻的生长速率和生物量。培养基中适当添加葡萄糖、甘油等有机碳源进行兼养培养对蛋白核小球藻的生物量和生化组分的影响尤为显著^[18-19]。Zhang等^[18]比较了6种有机碳源对蛋白核小球藻的培养效果,发现葡萄糖效果最佳。本文比较自养和葡萄糖兼养两种营养方式对蛋白核小球藻生长速率和生物量积累的影响,从细胞周期调控新角度探究藻细胞的昼夜节律机制,分析藻细胞生化组分的昼夜节律变化,为蛋白核小球藻的高密度培养技术优化设计提供

理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

蛋白核小球藻藻种, 购自中国科学院武汉水生生物研究所, 藻种编号为 FACHB-1222。

1.2 主要仪器与试剂

电热鼓风干燥箱 101-3 购自上海申光制造仪器有限公司; 智能人工气候箱 safe PRX-600B 购自宁波赛福实验仪器有限公司; 台式冷冻恒温振荡器 THZ-C-1 购自苏州培英实验设备有限公司; 电热恒温水浴锅 XMTD-8222 购自上海精宏实验设备有限公司; 台式高速离心机 H1650 购自湘仪仪器有限公司; 超速冷冻离心机 Centrifuge 5417R 购自北京伯乐有限公司; 显微镜 BM1000 购自江南永新。

葡萄糖、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 Na_2CO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸、柠檬酸铁铵、EDTA-2Na、NaCl、蛋白胨、酵母浸膏、琼脂粉、甲醇、苏丹黑 B、硝酸钙、戊二醛(购自上海生工)。

1.3 小球藻的培养

以 BG11 培养基^[20]为自养培养基, 在 BG11 培养基中添加 4 种不同初始浓度(1、5、10、20 g/L)的葡萄糖作为兼养培养基, 分装到 250 mL 三角瓶中, 装液量为 100 mL。取挑单藻落纯化后自养扩培至对数生长期的蛋白核小球藻作为种子细胞, 藻细胞接种后初始浓度均为 2×10^6 cell/mL, 置于人工气候箱内。培养条件为: 25 °C, 光强 2000 Lux, 光周期中光暗比 L : D 为 12 h : 12 h, 每天早晚各摇动 1 次。每组设置 3 个平行, 培养周期为 10 d。昼夜节律的研究中设置 2 种不同的光暗比(L : D 分别为 12 h : 12 h、14 h : 10 h), 其他培养条件同上。

1.4 自养和兼养培养对小球藻生长的影响

每 2 d 取样 1 次, 取样时间为光照 10 h 后, 离心洗涤后保存于 0.2% 的戊二醛溶液中并避光, 以固定所在时间点的生长性状。10 d 培养周期结束后, 离心收集藻细胞并烘干至恒重, 计算干重生物量(DW)和干重产率。藻细胞浓度的测定采用血球计数法。参照 Zhao 等^[21]的方法公式(1)计算藻细胞的比生长速率。

$$\mu = \ln(x_2/x_1)/(t_2 - t_1) \quad \text{公式(1)}$$

式中, x_1 为 t_1 时的生物量, x_2 为 t_2 时的生物量, 此处均为藻细胞浓度(cell/mL)。

1.5 小球藻细胞形态学观察和昼夜节律响应的指标测定

取自养与兼养培养的藻液, 取样时间与处理方式同上。适当稀释后显微镜下观察记录视野内藻细胞的形态大小、分裂情况, 计算细胞分裂指数公式(2)并拍照记录。

$$\text{细胞分裂指数}(\%) = \frac{\text{细胞分裂相数}}{\text{细胞总数}} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

分别以接种后第 2 天和第 5 天的藻细胞为样本, 在一个 24 h 光暗周期内的不同时间段对藻细胞进行显微观察和体积大小分级统计, 研究其细胞体积大小的迁移变化规律和昼夜节律表现。因蛋白核小球藻呈圆球状, 参照 Park 等^[9]的方法用细胞直径表示细胞体积大小。人工培养的蛋白核小球藻细胞大小不一, 根据实测结果本文按细胞直径(diameter, D)大小分为 5 个级别: $D \leq 2 \mu\text{m}$ 、 $2 \mu\text{m} < D \leq 4 \mu\text{m}$ 、 $4 \mu\text{m} < D \leq 6 \mu\text{m}$ 、 $6 \mu\text{m} < D \leq 8 \mu\text{m}$ 、 $D > 8 \mu\text{m}$ 。

1.6 小球藻生化组分含量的测定和昼夜变化动态分析

以接种后第 8 天的藻细胞为样本。在一个 24 h

光暗周期内的不同时间段取样,离心收集藻细胞,测定色素、油脂、蛋白和淀粉含量,描述其生化组分含量的动态变化。

1.6.1 小球藻色素的提取和测定:采用分光光度法。叶绿素 a、b 的提取和含量测定参照 Wellburn^[22]的方法,以甲醇为参比,分别在波长 666 nm 和 653 nm 处测定吸光度值。对小球藻叶绿素 a、b 的计算分别采用公式(3)和(4)。

$$C_a=15.65A_{666}-7.34A_{653} \quad \text{公式(3)}$$

$$C_b=27.05A_{653}-11.21A_{666} \quad \text{公式(4)}$$

根据公式(5),计算出原藻液中各色素的含量(mg/L),合并即叶绿素总量。

$$C^*(\text{mg/L})=C(\text{mg/L})\times\text{提取液总量(L)}/\text{初始体积(L)} \quad \text{公式(5)}$$

1.6.2 小球藻油脂含量的测定:采用溶剂提取法和脂染色法对蛋白核小球藻油脂含量进行测定,建立蛋白核小球藻油脂含量与脂染色后吸光度在 A_{645} 的线性回归方程,采用脂染色法测定培养过程中的油脂。溶剂提取法具体操作参考 Zhao 等的方法^[21],脂染色法具体操作参照任洁等^[23]的方法。

1.6.3 小球藻蛋白的提取和测定:在 PBS 缓冲液中(冰浴)以超声波破碎藻细胞后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 处理样品,振荡提取 2 h,8000 r/min 离心 15 min,收集上清,即为可溶性蛋白。采用 Bradford^[24]的方法以牛血清白蛋白作标准曲线,测定蛋白质浓度,换算出每克干重藻细胞可溶性蛋白质含量(公式 6)。

$$\text{蛋白含量}(\text{mg/g 藻细胞})=\text{蛋白浓度}(\text{mg/mL})\times\text{提取液体积}(\text{mL})/\text{藻细胞干重}(\text{g}) \quad \text{公式(6)}$$

1.6.4 小球藻淀粉的提取和测定:参照徐嫔等^[25]的方法,以淀粉标准溶液测定绘制的标准曲线,计算样品中淀粉含量。

1.7 数据处理与统计分析

每个实验处理设 3 次重复,各指标测定结果以 $x\pm s$ (平均数 \pm 标准误)表示,应用 SPSS 22.0 软件对自养、兼养培养组数据进行方差分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。采集数据利用 Origin 9.0 软件进行分析作图。

2 结果和分析

2.1 自养和兼养培养对小球藻生长的影响

与自养组相比,兼养组中葡萄糖浓度在 1–20 g/L 范围内对蛋白核小球藻均表现出较强的生长促进效应(图 1-A)。培养 6–8 d,添加 5–20 g/L 葡萄糖培养组藻细胞生长出现短暂的平台期,与自养组相似;10 d 培养期结束时,所有兼养组藻细胞浓度均显著高于自养组,其中 10 g/L 和 20 g/L 葡萄糖兼养组藻细胞浓度较大,分别达到 $5.05\text{E}+07$ cell/mL 和 $5.33\text{E}+07$ cell/mL,二者差异不显著。

第 10 天收获藻细胞,以干重和干重产率对生物量进行表征(图 1-B)。自养组干重和干重产率分别为 0.33 g/L 和 32.92 mg/(L·d),兼养组藻细胞干重和干重产率均显著高于自养组,其中 10 g/L 葡萄糖兼养组藻细胞干重 2.22 g/L,是自养组的 6.73 倍,对比藻细胞浓度增幅(2.58 倍)可知,兼养培养促进藻细胞干物质积累效应更显著。综合藻细胞浓度与干重两个指标,选择 10 g/L 葡萄糖作为兼养培养试验组的优化碳源,此后所述兼养组均指此浓度。

培养期内,兼养组藻细胞比生长速率均在 2–4 d 达到峰值,其中 10 g/L 葡萄糖兼养组比生长速率最大,达到 0.85/d;自养组最大比生长速率出现在 8–10 d,为 0.24/d。可见,兼养培养使藻细胞快速生长期提前并且比生长速率显著提高。

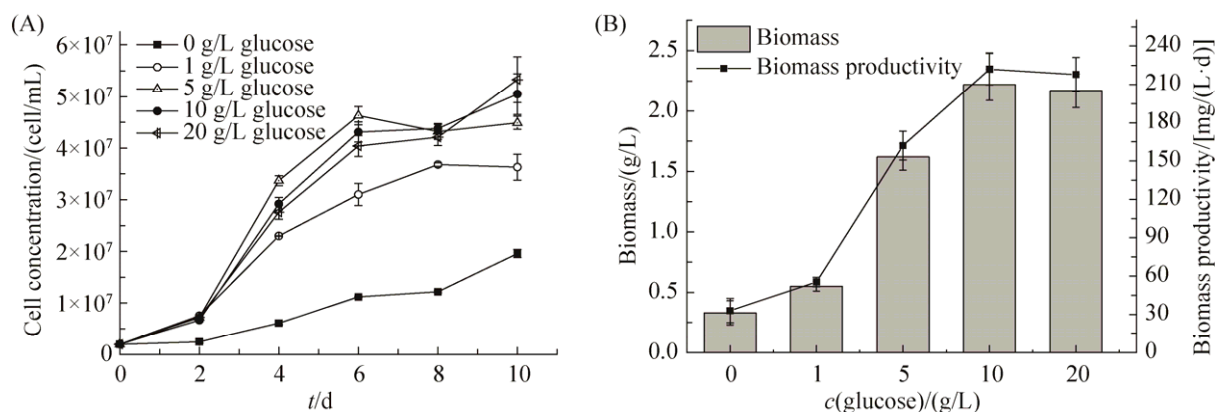


图 1. 自养与兼养培养对蛋白核小球藻生长(A)、生物量与生物量产率(B)的影响

Figure 1. Growth (A), biomass and biomass productivity (B) of *Chlorella pyrenoidosa* in culture under autotrophic and mixotrophic conditions.

2.2 自养和兼养培养对小球藻细胞形态和分裂指数的影响

由于蛋白核小球藻细胞接近圆球形, 本文按细胞直径(D)将藻细胞体积大小分为 5 个级别: $D \leq 2 \mu\text{m}$ 、 $2 \mu\text{m} < D \leq 4 \mu\text{m}$ 、 $4 \mu\text{m} < D \leq 6 \mu\text{m}$ 、 $6 \mu\text{m} < D \leq 8 \mu\text{m}$ 、 $D > 8 \mu\text{m}$ (图 2-A)。蛋白核小球藻细胞的分裂方式为典型的二分裂, 但存在两个子细胞大小相等的均等分裂和不同的非均等分裂两种情况(图 2-B)。

在培养期内于光照 10 h 后定时取样观察发

现, 兼养组(10 g/L 葡萄糖)中较大细胞($D > 6 \mu\text{m}$)占比较多, 且细胞分裂相远多于自养组。统计自养和兼养组在第 2 天和第 5 天的较大细胞占比和细胞分裂指数(表 1)可知, 二者差异显著, 兼养组直径较大($D > 6 \mu\text{m}$)的细胞比例在第 2 天和第 5 天同比分别是自养组的 2.80 倍和 1.75 倍, 分裂指数同比分别是自养组的 2.52 倍和 1.75 倍。可见兼养组藻细胞在培养初期生长分裂优势明显, 这可能是藻细胞生物量增多的直接原因。

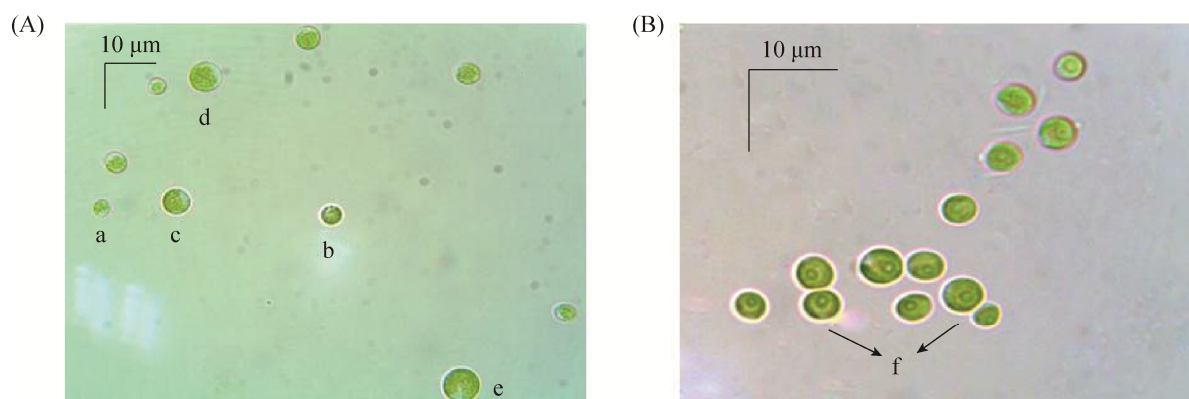


图 2. 蛋白核小球藻细胞生长状态(A)和分裂方式(B)

Figure 2. Cell growth status and division modes of *Chlorella pyrenoidosa*. A: cell size; a: $D \leq 2 \mu\text{m}$. b: $2 < D \leq 4 \mu\text{m}$; c: $4 < D \leq 6 \mu\text{m}$; d: $6 < D \leq 8 \mu\text{m}$; e: $D > 8 \mu\text{m}$. B: division mode. f: equal division and non-equal division.

表 1. 自养与兼养培养对蛋白核小球藻较大藻细胞占比和细胞分裂指数的影响

Table 1. The percentages of enlarged cells and mitotic index in culture under autotrophic and mixotrophic conditions

t/d	Group	The percentages of enlarged cells/%	Cell mitotic index/%
2	Autotrophic	4.07±0.33	4.04±0.26
	Mixotrophic	11.50±0.89	10.18±0.48
5	Autotrophic	7.44±0.72	2.98±0.26
	Mixotrophic	12.99±0.59	5.23±0.31

2.3 自养和兼养培养的小球藻细胞增殖的昼夜节律响应

Voigt 等^[26]发现微藻存在“光暗应答”机制,且昼夜节律有效区间位于藻细胞经历一次细胞分裂循环之后和培养体系中藻细胞浓度到达最大值之前。以接种后第 2 天和第 5 天为例,以光照开始为 0 h 起点,比较自养和兼养组藻细胞在一昼夜(24 h)内的细胞分裂增殖情况,结果(图 3)表明:接种第 2 天(图 3-A),0 h 兼养组和自养组藻细胞起始浓度已差异显著,说明接种第 1 天兼养组藻

细胞已进入生长分裂期,自养组仍处于静息期。第 2 天一昼夜,自养组藻细胞仅增长了 15.00%,且 75.80%的新生子细胞在黑暗期产生,这与前人^[7]对藻细胞白天生长、夜间分裂增殖规律的研究结论一致;而兼养组藻细胞增长了 110.00%,其中黑暗期产生的新生子细胞比例只占 59.10%,显示其增殖的昼夜节律发生了改变。第 5 天(图 3-B),自养组和兼养组藻细胞均处于对数生长期,一昼夜内藻细胞浓度分别增长了 16.00%和 19.00%,其中自养组藻细胞增殖的昼夜节律表现与第 2 天基本一致,但兼养组光照期和黑暗期藻细胞增殖比例分别占 67.30%和 32.70%,表明兼养培养改变了蛋白核小球藻的昼夜节律,使其光照期细胞增殖比例超过了黑暗期。

为了进一步验证兼养时光照对藻细胞分裂增殖的促进效应,第 2 天开始,将兼养组部分藻细胞的光照时间延长 2 h,即光暗周期调整 L:D 为 14 h:10 h,简称光延长组。结果显示(图 3-A),光延长处理确实能提高藻细胞浓度,第 2 天光延

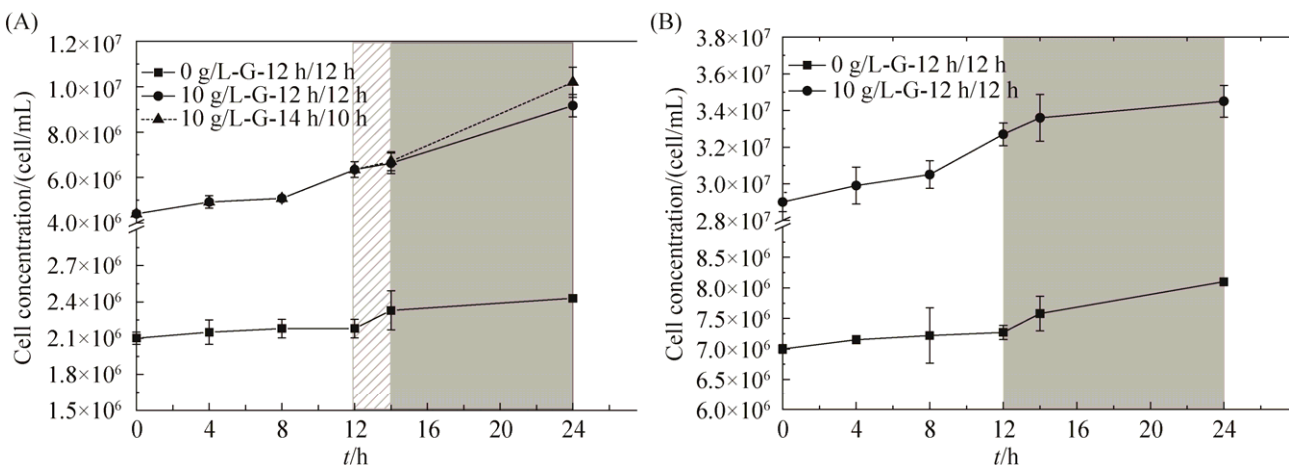


图 3. 自养与兼养条件下蛋白核小球藻在一昼夜下的生长动态

Figure 3. Growth dynamics of *Chlorella pyrenoidosa* on a circadian rhythm under autotrophic and mixotrophic conditions. A: The second day; B: The fifth day. White background for the light period, gray for the dark period, twill filled indicates the part of algae under mixotrophic condition for 2 h light prolonged.

长组藻细胞浓度比正常兼养组(L:D 为 12 h:12 h)增加了 11.20%, 至第 10 天培养周期结束时, 光延长组藻细胞浓度和干重分别为 $5.69\text{E}+07$ cell/mL 和 2.46 g/L, 比兼养对照组提高了 13% 和 11%, 差异显著。

2.4 自养和兼养培养的小球藻细胞大小动态迁移的昼夜节律响应

以第 2 天和第 5 天为例, 观察一昼夜(24 h)内小球藻细胞的体积变化迁移动态, 从细胞生长体积变化角度比较自养和兼养条件下藻细胞的昼夜节律响应机制, 结果如图 4。第 2 天(图 4-A), 自养组在 0-8 h 内细胞处于相对静息状态, 体积变化较小, 群体中 $D < 2 \mu\text{m}$ 的细胞占比较高, 之后 $D > 6 \mu\text{m}$ (较大细胞)开始增多, 12 h 光照结束时达到 6.87%, 再经 12 h 黑暗到 24 h 时达到其峰值 13.70%; 兼养组藻细胞在 0-4 h 内处于相对静息状态, 12 h 较大细胞占比已达到 9.98%, 24 h 达

到峰值 18.73%, 同比分别是自养组的 1.45 和 1.36 倍。可知, 光照条件下兼养培养组藻细胞由小往大的迁移时间比自养组提前, 且速率显著高于自养组。

第 5 天(图 4-B), 自养组较大细胞($D > 6 \mu\text{m}$)所占比例由 0 h 的 10.00% 经 12 h 的光照后达到 20.20%, 再经 12 h 黑暗后下降为 12.90%, 这与自养条件下藻细胞光照期生长, 黑暗期分裂增殖的规律相符。兼养组 12 h 和 24 h 的较大细胞占比分别为 21.00% 和 18.60%, 可见经历黑暗期后较大细胞占比仍维持在较高水平, 说明兼养组细胞在黑暗条件下仍能持续生长。与第 2 天相比, 第 5 天的自养和兼养组藻细胞大小呈现明显的昼夜节律变化, 且光照期较大细胞占比增多, 说明此时已处于对数生长期。

光延长组的藻细胞(图 4-A)在 2 h 的光照延长后, $D > 6 \mu\text{m}$ 的大细胞占比进一步增多, 14 h 到达

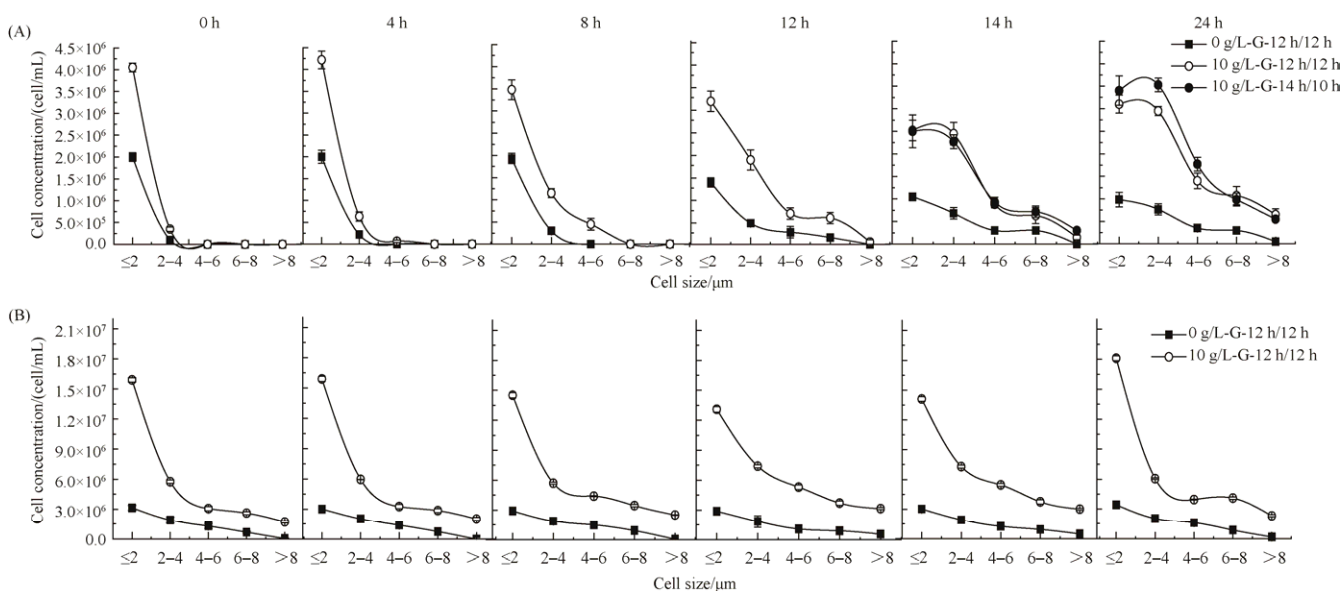


图 4. 自养与兼养条件下蛋白核小球藻在一昼夜节律下的大小变化

Figure 4. Cell size of *Chlorella pyrenoidosa* on a circadian rhythm under autotrophic and mixotrophic conditions. A: The second day; B: The fifth day. The part of algae under mixotrophic condition for 2 h light prolonged.

15.14%；比正常光照组高出 28%，说明兼养中光照延长能加速藻细胞生长并显著提高大细胞比例。到 24 h， $D \leq 6 \mu\text{m}$ 的细胞数目比正常光照组多出 20%。由此推测，细胞直径在达到 $6 \mu\text{m}$ 之后，多数大细胞已经具有分裂能力，是黑暗中新生细胞增长的来源。

2.5 自养和兼养条件下小球藻的生化组分对昼夜节律的响应

兼养组藻细胞在第 8 天已进入稳定期，自养组细胞仍处于生长对数期。分析了第 8 天一昼夜内藻细胞生化组分积累量的变化动态，结果(图 5)发现藻细胞淀粉含量随昼夜节律的变化幅度最大，在光照 8–12 h 内，淀粉含量出现了较大幅度的提升，12 h 自养组和兼养组藻细胞淀粉含量分别达到其峰值 20.80% 和 18.90%，进入黑暗期后淀

粉含量逐渐下降至低值。藻细胞蛋白含量也呈现明显的昼夜节律变化，自养组和兼养组藻细胞蛋白含量均在光照下 8 h 时分别达到其峰值 11.29% 和 17.16%，同比 0 h 分别增加 27.40% 和 15.20%，且两组间差异显著。

藻细胞叶绿素含量和总脂含量随昼夜节律的变化较小，其中叶绿素含量虽然在光照期缓慢下降，黑暗期又回升，但变化幅度未达到显著差异水平。藻细胞总脂含量在一昼夜内基本维持恒定，其中自养组处于生长对数期，一昼夜内藻细胞总脂由 10.82% 提升至 11.85%；而处于稳定期的兼养组总脂含量稳定在 49.00% 左右。推测藻细胞总脂的累积可能是个过程变化。兼养组同比自养组总脂含量增幅明显，原因可能是碳源的额外补充促进了脂肪的合成和积累。

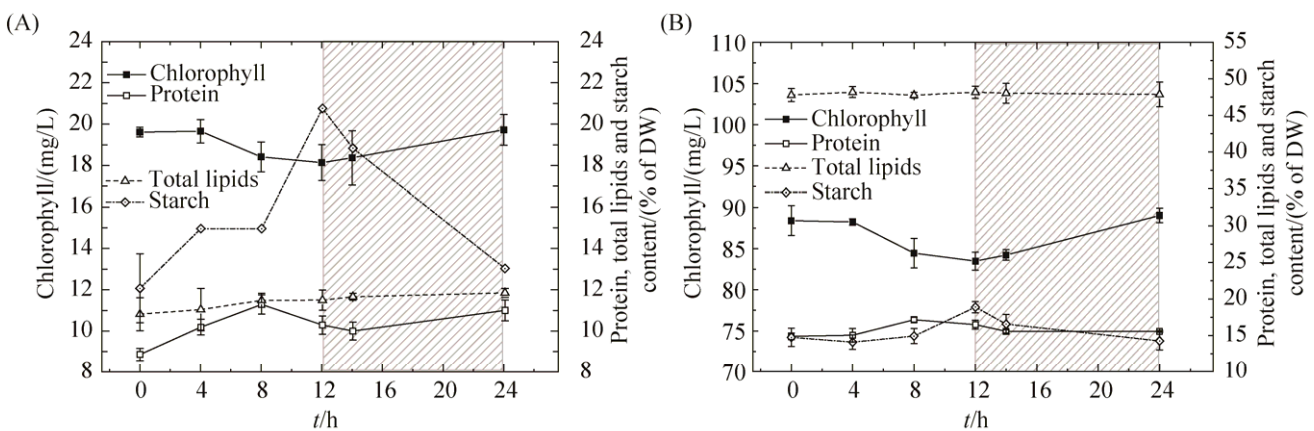


图 5. 自养和兼养条件下蛋白核小球藻的生化组分对昼夜节律的响应

Figure 5. Biochemical components of *Chlorella pyrenoidosa* on a circadian rhythm under autotrophic and mixotrophic conditions. A: Autotrophic; B: Mixotrophic.

3 讨论

蛋白核小球藻具有光合自养与兼养生长的能力。本文研究表明，葡萄糖对蛋白核小球藻生长促进效应显著，使其生物量提高，培养周期缩短。

不同蛋白核小球藻品系兼养培养的最适葡萄糖浓度不同，生物量增加幅度也存在差异。Amit 等^[19]报道在添加 1.25 g/L 葡萄糖兼养 14 d 后，蛋白核小球藻细胞干重约为自养组的 1.40 倍。魏东等^[27]的研究表明 30 g/L 葡萄糖是蛋白核小球藻品系 15-2070

的最适浓度, 兼养 10 d 后的干重比自养组提高了 63.9%。本文添加 10 g/L 葡萄糖兼养培养 10 d 后, 蛋白核小球藻品系 FACHB-1222 的细胞干重为自养组的 6.73 倍(图 1-B), 生物量增幅显著高于前人^[19,27]的结果。与光质优化^[16]、通气改善^[17]和添加乙酸钠^[28]等培养技术改进条件下 2–4 倍的生物量增幅而言, 本文葡萄糖兼养增效优势明显。

对葡萄糖兼养培养提高藻细胞生物量的机制研究主要涉及光合作用、糖代谢、呼吸作用等。Woodworth 等^[29]研究表明藻细胞能消耗光合作用中的 ATP 和 NADPH, 并产生额外的蛋白帮助细胞利用外界碳源进行分裂。郎筱宇等^[30]推测兼养培养时细胞生长迅速的主要原因是光合作用与葡萄糖氧化作用的协同运转。此外, 葡萄糖等外加碳源还会抑制微藻光合碳反应中 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(rubisco)和碳酸酐酶(CA)的含量和活性, 降低了藻蓝蛋白含量, 减少对无机碳源的利用^[31–32]。本文结果显示, 蛋白核小球藻在自养与兼养条件下, 细胞增殖对昼夜节律的响应存在较大差异。自养的藻细胞以光照期生长黑暗期增殖为主, 而兼养的蛋白核小球藻从第 2 天到第 5 天, 光照期新生子细胞的增殖量占比从 40.90% 增加到 67.50%, 呈现出藻细胞分裂增殖以光照期为主的昼夜节律转换。此外, 兼养组藻细胞在培养初期(第 1 天)较早启动了分裂增殖, 第 2 天 0 h 藻细胞浓度约为初始接种浓度的 2 倍, 而自养组藻细胞浓度增长不明显(图 3-A), 原因可能在于光合作用的物质合成和外加葡萄糖碳源的双重叠加效应加快了细胞生长, 并促使更多的藻细胞体积变大而迅速通过了细胞周期检查点调控, 进入分裂增殖期。本文兼养组蛋白核小球藻在第 2 天和第 5 天的较大细胞($D > 6 \mu\text{m}$)占比和细胞分裂指数同比达

到了自养组的 1.75–2.80 倍(表 1), 而且光照条件下, 兼养组藻细胞体积在培养初期(第 2 天)由小往大的迁移时间比自养组提前 4 h, 且在一个 24 h 昼夜节律中较大藻细胞占比始终显著高于自养组(图 4), 这为葡萄糖兼养提高藻细胞生物量的机制阐述提供了有效的昼夜节律响应和细胞学证据。

藻细胞的增殖以细胞分裂为基础, 而细胞体积大小的检查点调控决定了藻细胞是否启动分裂。通常情况藻细胞生长依次经历 G_1 、 S 、 G_2 、 M 和 C 期, G_1 期细胞体积大约增大 1 倍, 才可能通过检查点的“大小筛选调控”而进入分裂期^[7,33]。综合分析本文自养与兼养组细胞直径大小分级及占比、细胞分裂指数及一昼夜内藻细胞增殖动态等数据, 对昼夜节律响应初期(第 2 天, 图 3-A) $D > 6 \mu\text{m}$ 的细胞所占比例与细胞分裂指数两项指标对藻细胞浓度表征的生物量增长比例按如下公式(7)进行拟合计算。

$$x_2 = x_1 \times (\text{大细胞占比} + \text{分裂指数}) + x_1 \quad \text{公式(7)}$$

其中 x_1 为 t_1 时的生物量, x_2 为 t_2 时的生物量。结果发现, 在 12–14 h 光暗转化的短时间内, $D > 6 \mu\text{m}$ 的细胞与分裂期的细胞大约进行了 1 次细胞分裂, 按此推算自养与兼养组 14 h 藻细胞浓度的理论预测值分别为 $2.35\text{E}+06 \text{ cell/mL}$ 和 $6.83\text{E}+06 \text{ cell/mL}$, 实测值为 $2.33\text{E}+06 \text{ cell/mL}$ 和 $6.63\text{E}+06 \text{ cell/mL}$, 二者拟合程度高, 据此推测该蛋白核小球藻检查点的细胞直径约为 $6 \mu\text{m}$ 。

迄今有关微藻细胞营养方式、分裂增殖的细胞周期检查点调控和昼夜节律之间的相互关联机制仍未阐明。Oldenhof 等^[33]研究表明, 莱茵衣藻的细胞分裂启动不受光暗周期限制, 主要取决于细胞生长体积大小是否达到检查点阈值, 而细胞

生长速率又与光照强度、温度等条件相关。本文发现葡萄糖兼养培养使蛋白核小球藻突破了自养条件下光照期生长黑暗期分裂的固有模式, 逐渐转换为以光照期细胞分裂增殖为主的新型逆向昼夜节律, 这说明培养基组分和营养方式的改变也能显著影响藻细胞的昼夜节律调控模式。Tulin 等^[34]报道莱茵衣藻的细胞周期蛋白依赖性激酶能响应光照与代谢信号并影响细胞周期, 参与昼夜节律的调控。Zehring 等^[35]和 Hardin 等^[36]在果蝇的生物钟研究中发现 *period* 基因及其编码的 PER 蛋白是昼夜节律分子调控机制的基础, PER 蛋白在夜间积累而在随后的白天降解。本文初步结果发现, 自养和兼养培养的蛋白核小球藻的细胞总蛋白含量均呈现明显的昼夜节律波动(图 5), 是否涉及细胞周期蛋白的基因表达合成与降解调控有待深入研究。

本文在发现兼养的蛋白核小球藻以光照期分裂增殖为主的昼夜节律基础上, 第 2 天开始调整光暗周期, 将兼养组部分藻细胞延长光照 2 h, 结果(图 3-A)藻细胞浓度和干重最终分别提高了 13% 和 11%, 可见兼养与光照延长的协同能进一步优化蛋白核小球藻的高密度培养技术。另一方面, 蛋白核小球藻的生化组分含量的昼夜节律波动性明显。如一昼夜中藻细胞蛋白含量和淀粉含量分别在光照 8 h 和 12 h 达到峰值(图 5), 特别是自养和兼养组藻细胞蛋白含量的昼夜峰值(光照 8 h)分别比 0 h 增加了 27.40% 和 15.20%, 这意味着只要根据昼夜节律简单调整藻细胞收获当天的作业时间, 就能轻松实现工业增效。因此, 细胞生长增殖调控机理和昼夜节律响应机制的探究能为微藻高密度培养技术的优化设计提供重要理论基础, 有望开启微藻工业化技术研发的新热点。

参 考 文 献

- [1] Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 35: 265–278.
- [2] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 510–516.
- [3] Fernández Sevilla JM, Cerón García MC, Sánchez Mirón A, Belarbi el H, García Camacho F, Molina Grima E. Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricorutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(3): 728–736.
- [4] Lin TS, Wu JY. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 100–107.
- [5] Li TT, Zheng YB, Yu L, Chen SL. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 66: 204–213.
- [6] Kong WB, Wang Y, Yang H, Xi YQ, Han R, Niu SQ. Effects of different trophic modes on growth characteristics, metabolism and cellular components of *Chlorella vulgaris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 299–310. (in Chinese)
孔维宝, 汪洋, 杨红, 蕙玉琴, 韩锐, 牛世全. 不同营养方式对普通小球藻生长代谢及生化组分的影响. *微生物学报*, 2015, 55(3): 299–310.
- [7] Bišová K, Zachleder V. Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(10): 2585–2602.
- [8] Waghmare AG, Salve MK, LeBlanc JG, Arya SS. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, 3: 16.
- [9] Park WK, Yoo G, Moon M, Kim CW, Choi YE, Yang JW. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171(5): 1128–1142.
- [10] Oldenhof H, Zachleder V, van den Ende H. Blue- and red-light regulation of the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 2006, 41(3): 313–320.
- [11] Spudich JL, Sager R. Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *The Journal of Cell Biology*, 1980, 85(1): 136–145.
- [12] Matsumura K, Yagi T, Hattori A, Soloviev M, Yasuda K. Using single cell cultivation system for on-chip monitoring of the interdivision timer in *Chlamydomonas reinhardtii* cell cycle. *Journal of Nanobiotechnology*, 2010, 8: 23.
- [13] Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events

- in G₁ leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(16): 5365–5369.
- [14] Safi C, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 2014, 3: 61–65.
- [15] 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. 2012-11-12.
- [16] Tang QQ, Fang ZG, Ji WW, Xia HL. Effects of light quality on the growth characteristics and biochemical component of *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Science*, 2014, 35(11): 4212–4217. (in Chinese)
唐青青, 方治国, 嵇雯雯, 夏会龙. 光质对蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 生长特征及生化组成的影响研究. *环境科学*, 2014, 35(11): 4212–4217.
- [17] Huang GH, Ren QG, He H, Kuang YL, Leng YW. The effects of aeration on the growth and organic carbon component contents under photoautotrophy condition. *Renewable Energy Resources*, 2011, 29(5): 94–98. (in Chinese)
黄冠华, 任庆功, 何环, 匡亚莉, 冷云伟. 通气对光合自养培养下蛋白核小球藻生长和有机碳成分含量的影响. *可再生能源*, 2011, 29(5): 94–98.
- [18] Zhang WG, Zhang PL, Sun H, Chen MZ, Lu S, Li PF. Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresource Technology*, 2014, 173: 52–58.
- [19] Sharma AK, Sahoo PK, Singhal S, Patel A. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech*, 2016, 6: 116.
- [20] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriology Reviews*, 1971, 35(2): 171–205.
- [21] Zhao P, Yu XY, Li JJ, Tang XH, Huang ZX. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(1): 72–77.
- [22] Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144(3): 307–313.
- [23] Ren J, Lang XY, Liu ZY. Rapidly determining relative lipid level of *Chlorella vulgaris* sp. by three dyeing methods. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(7): 967–972. (in Chinese)
任洁, 郎筱宇, 刘志媛. 三种脂染色法快速检测小球藻油脂相对含量. *农业生物技术学报*, 2015, 23(7): 967–972.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [25] Xu P, Meng YY, Yang HB, You HY. Detection of starch content in marine microalga. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(18): 130–132. (in Chinese)
徐滨, 孟迎迎, 杨海波, 尤慧艳. 海洋微藻淀粉含量的测定. *广东农业科学*, 2012, 39(18): 130–132.
- [26] Voigt J, Münzner P. The *Chlamydomonas* cell cycle is regulated by a light/dark-responsive cell-cycle switch. *Planta*, 1987, 172(4): 463–472.
- [27] Wei D, Zhang HZ, Chen JM. Optimization of trophic modes for enhancing the production of biomass, protein, and chlorophyll from *Chlorella pyrenoidosa*. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(4): 160–167. (in Chinese)
魏东, 张会贞, 陈娇敏. 优化营养方式强化蛋白核小球藻生物量及蛋白质和叶绿素生产. *现代食品科技*, 2017, 33(4): 160–167.
- [28] Huang JF, Tang H, Chen HL, Zheng J. Growth and oil accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* under carbon-rich condition. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(29): 243–244, 298. (in Chinese)
黄建锋, 唐花, 陈欢林, 郑江. 富碳条件下蛋白核小球藻的生长及其对油脂的积累. *安徽农业科学*, 2015, 43(29): 243–244, 298.
- [29] Woodworth BD, Mead RL, Nichols CN, Kolling DRJ. Photosynthetic light reactions increase total lipid accumulation in carbon-supplemented batch cultures of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 159–164.
- [30] Lang XY, Liu ZY, Xu M, Xie LY, Li RZ. Effects of glucose on photosynthesis and growth of *Chloralla* sp. HN08 cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 550–559. (in Chinese)
郎筱宇, 刘志媛, 徐梦, 谢灵玉, 李容珍. 葡萄糖对小球藻 (*Chloralla* sp. HN08) 光合作用和生长的影响. *微生物学报*, 2017, 57(4): 550–559.
- [31] Steinmüller K, Zetsche K. Photo- and metabolite regulation of the synthesis of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiology*, 1984, 76(4): 935–939.
- [32] Wang SS, Liu YD, Zou YD, Li DH. Modulation and adaptation of carbonic anhydrase activity in *Microcystis* spp. under different environmental factors. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2443–2448. (in Chinese)
王山杉, 刘永定, 邹永东, 李敦海. 微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应. *生态学报*, 2006, 26(8): 2443–2448.
- [33] Oldenhof H, Zachleder V, van den Ende H. The cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of the commitment point. *Folia Microbiologica*, 2007, 52(1): 53–60.
- [34] Tulin F, Cross FR. Cyclin-dependent kinase regulation of diurnal transcription in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 2015, 27(10): 2727–2742.
- [35] Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. P-element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 1984, 39(2): 369–376.
- [36] Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 1990, 343(6258): 536–540.

Circadian rhythm response of *Chlorella pyrenoidosa* under autotrophic and mixotrophic cultivation

Cheng Wang, Yan Zhao*

College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To study the effect of autotrophic and mixotrophic cultivation on the growth, division and biochemical components accumulation of *Chlorella pyrenoidosa*, then to explore the response mechanism on circadian rhythm under artificial cultivation and optimize the corresponding technology. [Methods] BG11 medium was used for autotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* and BG11 medium supplemented with glucose of different concentrations (1, 5, 10, 20 g/L) for mixotrophic cultivation. The algae cell number was determined by a hemocytometer, biomass was measured by dry weight, and the size and division of algae cells were observed by a microscope. We used staining method for quantification the total lipids of *Chlorella pyrenoidosa*. Chlorophyll, protein and starch contents were determined by ultraviolet spectrophotometry. [Results] Glucose had a significant growth promoting effect on *Chlorella pyrenoidosa*, and the optimum concentration was 10 g/L. Under a circadian rhythm, about 76.00% of new daughter cells in the autotrophic cultivation group were proliferated under dark period on the second and fifth day, whereas 67.50% of the new daughter cells were generated under light period in the mixotrophic group. The silent period of the algae in the autotrophic group was 8 hours, but that in the mixotrophic condition was only 4 hours on the second day. On the eighth day, the contents of total lipids and chlorophyll of algae cells kept relatively stable under a light-dark period, the protein and starch content of that reached their respective peak after 8 and 12 hours in light. [Conclusion] Mixotrophic cultivation with glucose can increase the biomass of *Chlorella pyrenoidosa* notably. The growth, proliferation and the biochemical components accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* were regulated by circadian rhythm, the algae in autotrophic culture mainly grow during day in light and undergo cell proliferation in dark. The mechanism of mixotrophic cultivation increasing the biomass was shortening the growth silence period of algae cells, and increasing the proportion of larger cells for passing through commitment point of cell-cycle, it was especially obvious during light period. The protein and starch contents of *Chlorella pyrenoidosa* showed obvious circadian rhythm, their best harvest time were 8 and 12 hours after in light, respectively.

Keywords: *Chlorella pyrenoidosa*, autotrophic cultivation, mixotrophic cultivation, circadian rhythm, commitment point

(本文责编: 李磊)

Supported by the First-Class Discipline Construction Project in Zhejiang Province 2017 (Food Science and Engineering) (1110JYN6517001G) and by the National Natural Science Foundation of China (31772100)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008970; E-mail: yanzhao9918@163.com

Received: 10 October 2017; Revised: 30 December 2017; Published online: 24 January 2018