

产神经酸微藻 *Mychonastes afer* 的兼养固碳培养

师晓艺¹, 丁晓婷², 万子璇², 英 瑜³, 李福利², 高 昕¹, 范 勇²

1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266071

2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

3. 青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 266071

摘要: 微藻是水体中重要的生产者和环境调节因素, 作为饵料和调水剂在水产养殖中起着重要作用。微藻的培养方式多样, 探究了微藻 *Mychonastes afer* 和小球藻 *Chlorella sorokiniana* 在不同营养方式及通气情况的生长与光合能力。在自养、兼养和异养, 以及不同浓度二氧化碳 (CO₂) 通气的条件下, 分别测定了两株藻的生长曲线、光合电子传递效率、有机碳源利用率、光合放氧和呼吸耗氧速率, 并着重对 *M. afer* 的油脂组分进行分析。结果表明小球藻 *C. sorokiniana* 可以摆脱对光能的依赖, 完全依靠有机碳源营养生长, 而在此条件下 *M. afer* 几乎不能生长。有机碳源的加入, 对两株藻的光合系统活性均产生了一定程度的抑制作用, 使光合电子传递效率以及光合放氧水平下降; 同时发现在兼养条件下, 高浓度 CO₂ 最有利于 *M. afer* 生长, 促进了细胞对葡萄糖的利用效率, 且油脂和神经酸产量提高。研究表明两株藻在协同利用外源有机碳源和自身光合系统方面存在显著差异, 并探究出一种用于生产天然神经酸的 *M. afer* 最佳兼养条件。

关键词: 微藻 *Mychonastes afer*; 兼养培养; 二氧化碳; 呼吸作用; 光合作用

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Mixotrophic and carbon fixation culture of nervonic acid-producing microalgae *Mychonastes afer*

SHI Xiaoyi¹, DING Xiaoting², WAN Zixuan², YING Yu³, LI Fuli², GAO Xin¹, FAN Yong²

1. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266071, China

2. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266101, China

3. Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao 266071, China

Abstract: Microalgae are a group of single cell microorganism, which play an important role in aquatic production such as aquatic feeding and water regulating. This research focuses on the growth and photosynthetic capacity of *Mychonastes afer* and *Chlorella sorokiniana* under different nutrition and aeration conditions. The microalgae were cultivated under autotrophic, mixotrophic or heterotrophic conditions, respectively. And the influence of CO₂ concentration was also investigated. The growth curve, photosynthetic electron transfer rate, organic carbon source utilization, photosynthetic oxygen evolution and respiratory oxygen consumption rate were measured to inflect the differences between *M. afer* and *C. sorokiniana*, and the emphasis was given to lipid components of *M. afer*. The results show that *C. sorokiniana* could grow under heterotrophic condition without light, while *M. afer* could not. The photosynthetic system of the two species were both inhibited by organic carbon sources, displaying lower efficiency of photosynthetic electron transfer rates and slower photosynthetic oxygen evolution rates. Besides, it is

收稿日期: 2021-10-22; 修回日期: 2021-12-14

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD0901904); 国际科技创新合作重点专项 (2018YFE 0107200)

作者简介: 师晓艺 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻生理生化。E-mail: 18525479602@163.com

通信作者: 李福利 (1975—), 男, 研究员, 博士, 从事工业微生物技术研究。E-mail: lifl@qibebt.ac.cn

高 昕 (1968—), 男, 教授, 博士, 从事水产品加工与贮藏技术研究。E-mail: xingao@ouc.edu.cn

found that under mixotrophy condition, high concentration of CO₂ was beneficial to the growth of *M. afer*, which promoted cell utilization of glucose, and increased the production of lipid and nervonic acid. The study explores a mixotrophic condition for *M. afer* to produce natural nervonic acid, shows significant differences between the two algae species in photosynthetic system, and explores the cooperative utilization of external organic carbon sources.

Keywords: *Mychonastes afer*; Mixotrophy; CO₂; Respiration; Photosynthesis

微藻是一种单细胞光合微生物, 因富含蛋白质和生物活性物质, 可以作为水产动物的开口饵料和饲料营养强化剂^[1-3]。微藻在改善养殖水质、净化养殖废水方面也有广泛应用, 如卢崇德等^[4]将小球藻 (*Chlorella* sp.) 固定后应用于水产养殖水体, 通过生物增氧的方式改善水体缺氧问题; Ding 等^[5]将微藻与膜生物反应器耦合, 对海水对虾养殖废水中的氮、磷实现了较高的清除效率。其中应用最广泛的微藻之一是小球藻。小球藻隶属绿藻门、绿藻纲、小球藻科、小球藻属, 为一种单细胞绿藻, 广泛分布在淡水水域中, 蛋白质含量高, 生长速度快。小球藻营养方式多样, 可以自养培养, 也可以利用有机碳源进行培养^[6-8], 特别在异养条件下可以实现生物量的快速积累^[9-11]。中国科学院水生生物研究所探究出一种异养超高密度发酵培养方式, 在实验室和中试发酵罐放大条件下, 小球藻最高细胞生物量分别达到 271 和 247 g·L⁻¹^[12], 这是目前报道的小球藻最高生物量密度。

开发多种微藻种质资源是更好发挥微藻在水产养殖中积极作用的一种重要方式。2011 年中国科学院青岛生物能源与过程研究所筛选到一株 *Mychonastes afer* HSO-3-1 微藻^[13-15], 其隶属于绿藻门、绿藻纲、麦可属, 细胞粒径约为 2~3 μm, 属于超微型浮游藻类。超微型浮游藻类在生态系统的能量流动和物质循环中起主要作用, 是浮游植物总生物量和生产力的主要组成部分, 约占总叶绿素 *a* 的 35%~44% 和总初级生产力的 42%~55%^[16]。超微藻类是微食物环的重要组成部分, 研究表明超微藻具有更高的二氧化碳 (CO₂) 固定效率, 对富营养化水体中初级生产力的贡献可达 55%, 且对浮游微生物的种群具有调控作用^[17]。另外, 该藻种神经酸含量可达到中性脂肪酸含量的 6.5%, 是世界上首次发现富含高比例神经酸的微藻品种^[18]。神经酸是大脑神经细胞和神经组织的核心成分, 是公认可以促进受损神经细胞、组织修复和再生的活性物质^[19-20], *M. afer* 作为天然神经酸的可靠来源^[13,21], 可以为水产动物提供更优质的脂质资源, 且该藻种

蛋白质氨基酸模式更合理, 易于被水产动物吸收利用。

探究 *M. afer* 藻株的高效培养方式, 通过加入有机碳源, 加速细胞生长速度, 缩短细胞生长时间, 有利于实现高生物量和生物活性物质的积累。光合系统在加入有机碳源后所起作用、兼养过程中的通气以及通入高浓度 CO₂ 等问题仍备受争议。一些学者认为 CO₂ 的通入以及光合系统作用会降低有机碳利用速率, 如 Sforza 等^[22]发现在 *C. protothecoides* 和 *Nannochloropsis salina* 兼养过程中通入过量 (5%) CO₂ 降低了有机碳源的同化效率, 使得兼养条件的比生长速率基本等同于自养条件; Curien 等^[23]认为在嗜极微藻 *Galdieria sulphuraria* 培养基中加入有机碳源可以缓解 CO₂ 缺乏对细胞生长的抑制, 但人为外加 0.5% CO₂ 却将自养与异养之间的协同效应打破, 从而抑制了细胞的快速生长; Oliveira 等^[24]在研究 *Choricystis minor* var. *minor* 藻株时发现, 兼养和异养条件下的细胞均比自养表现出更高的生长速率, 但在兼养的同时通入 CO₂ 却导致生物量的下降, 表明 CO₂ 削弱了有机碳源对细胞生长的促进作用。同时也有另一种观点, Martinez 和 Orus^[25]在研究普通小球藻藻株 UAM 101 时发现, 在以葡萄糖作为有机碳源的同时, 通入 2% CO₂ 可使细胞实现最大的比生长速率。因此, 微藻利用有机碳源生长与其自身光合作用之间的关系存在着种间差异, 发现并优化可同时利用有机碳源和自身光合作用的藻种, 是提高微藻经济效益的重要途径之一。本研究主要比较了小球藻 *C. sorokiniana* 和 *M. afer* 在兼养过程中利用有机碳源和协同光合作用的能力, 并探索 *M. afer* 的最佳兼养培养条件。

1 材料与方法

1.1 实验藻种与培养

小球藻采样于山东青岛大沽河流域, 本实验室保存, 经 18S 测序为小球藻 *C. sorokiniana*, 保藏编号为 xzl; *M. afer* HSO-3-1 保藏于中国典型微生物

保藏中心,藻种保藏号为CGMCC No. 4654。

两种微藻均以BG-11作为基础自养培养基。培养基通过121℃灭菌20 min后使用。进行兼养和异养培养时,向BG-11培养基内添加过滤除菌的葡萄糖作为有机碳源。前期研究通过比较葡萄糖、甘油、乙酸盐等不同浓度有机碳源对*M. afer*生长的影响,发现2 g·L⁻¹葡萄糖最有利于*M. afer*生长^[26]。因此本实验*M. afer*兼养培养使用2 g·L⁻¹葡萄糖,小球藻以10 g·L⁻¹葡萄糖作为有机碳源。

细胞培养于直径3 cm、高30 cm的玻璃柱式生物反应器中进行,培养体系为100 mL,使用白色荧光灯进行照明,光照强度为5 000 lx,光暗比16:8,培养过程中全程通气,通气方式分为空气和高CO₂(CO₂体积分数为4%,使用流量计进行调节),因此本实验中,对两种微藻分别设置4个实验组:自养-4% CO₂、兼养-4% CO₂、兼养-空气、异养-空气。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞生长测定和光合参数曲线

使用酶标仪(SynergyTM HT, BioTek, Winooski, VT, USA)测定藻液在λ₇₅₀下吸光度,取藻液并适当稀释后,取200 μL加入96孔板进行测定,以OD₇₅₀表征细胞密度,并绘制藻细胞生长曲线。

使用IMAGING-PAM调制叶绿素荧光仪(Walz, Effeltrich, Germany)测定细胞光合电子传递效率ETR。加藻液200 μL于黑色96孔板中避光处理30 min后进行测定。

1.2.2 细胞呼吸耗氧和光合放氧水平测定

使用荧光光纤氧气测量仪(FireStingO₂, PyroScience GmbH, Germany)和呼吸瓶传感器测定藻液光合放氧和呼吸耗氧水平。该测量仪利用RED-FLASH光极O₂传感器技术,REDFLASH指示剂荧光强度随接触的O₂分子浓度升高而发生荧光淬灭,这种荧光变化通过光纤传输到测量仪,测量仪检测其相位漂移并据此换算成O₂浓度。

参照仪器说明书,将荧光光纤氧气测量仪校正后,吸取2 mL藻液于呼吸瓶内,将呼吸瓶置于培养光强下,使用Pyro oxygen logger软件记录30 min内氧气增加情况,测算其速率,记为表观放氧速率;30 min后将呼吸瓶暗处理,连续测定30 min内氧气减少情况,计算其速率,记为呼吸速率;将表观放氧速率与呼吸速率相加,记为实际放氧速率[mg·(L·h·OD)⁻¹]。

1.2.3 体系内葡萄糖剩余量测定

在培养的第3、第6和第8天取藻液,离心取上清,使用葡萄糖含量检测试剂盒(BC2505, Solarbio)测定培养基中葡萄糖剩余量,待葡萄糖耗尽后向体系中补充经过过滤除菌的葡萄糖溶液;*M. afer*培养体系中补充0.2 g,小球藻中补充1.0 g。

1.2.4 细胞生物量测定

收集30 mL藻液,6 500 r·min⁻¹离心10 min,弃去上清,超纯水清洗离心收集后冻干,使用分析天平测定藻细胞生物量。

1.2.5 *M. afer*细胞内脂肪酸和神经酸含量测定

1) 取30 mg的干藻泥,加入具塞玻璃管中,加入1.5 mL氯仿-甲醇溶液[V(氯仿):V(甲醇)=2:1]和3.5 mL硫酸甲醇溶液(2%硫酸),拧紧塞子充分混匀后置于85℃烘箱中反应2 h,取出后置于冰上冷却至室温;

2) 向上述各管中加入2 mL C26烷内标溶液,充分震荡混匀,然后加入700 μL 0.9%的氯化钾溶液,充分混匀,静置待分层;

3) 取萃取完全后的上清液200 μL于带内插管的气相小瓶中,使用气相色谱(7890A, Agilent technologies, Inc., CA)进行油脂成分分析;气相色谱升温程序为:100℃,5 min;以10℃·min⁻¹升温14 min,达到240℃,维持6 min,分流比为10:1。

1.3 统计与分析

实验数据采用Graphpad Prism软件进行整理及绘制,数据显著性分析采用单因素分析法(One-way ANOVA, N=3)进行, P<0.05代表数据差异具有显著性。

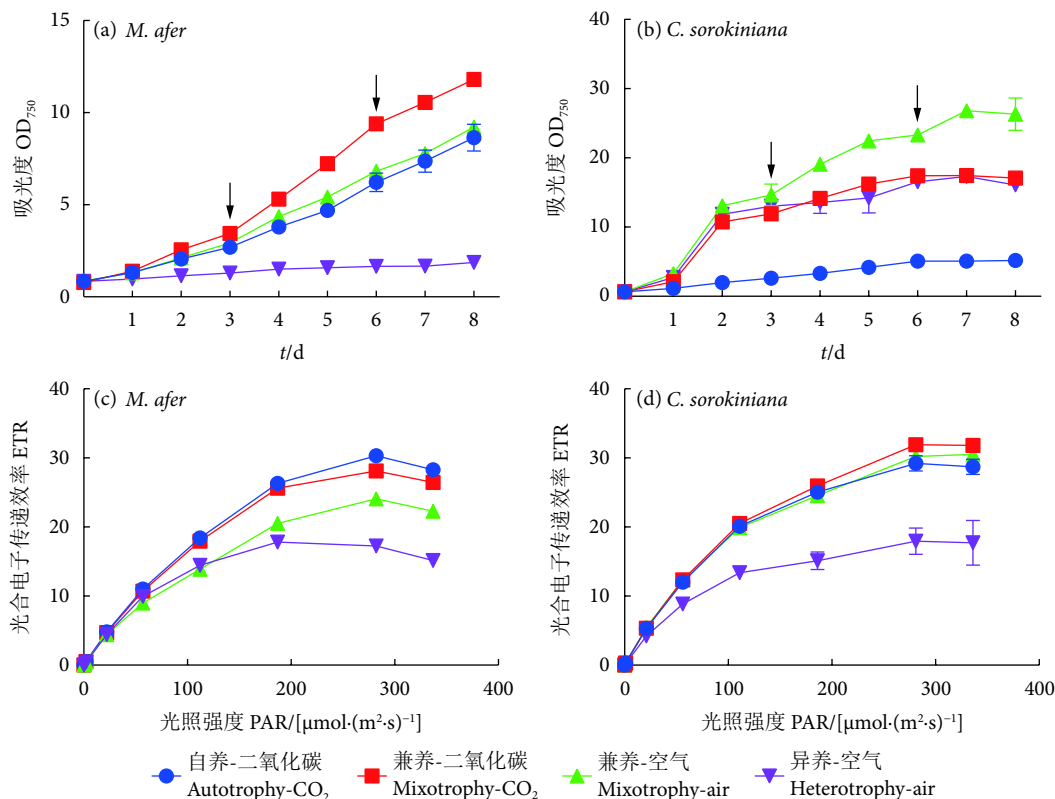
2 结果

2.1 不同培养条件对细胞生长和光合参数的影响

从生长曲线(图1-a, 1-b)来看,初始各组OD₇₅₀为0.8,培养8 d,培养过程中,两种微藻对于有机碳源的利用显著不同,在避光条件下的异养培养过程中(异养-空气组),小球藻生长好于自养培养,而*M. afer*在异养条件下生长十分缓慢,最终OD₇₅₀为1.8,表明*M. afer*不能单纯依靠有机碳源营异养生长。而小球藻在葡萄糖的异养条件下,能够较好地生长,最终OD₇₅₀为16。进一步在异养培养的基础上,添加光照处理,即兼养-空气的培养条件下,两种微藻均可较快生长,*M. afer*在该条件下同该藻自养培养的生长速率接近,

最终 OD₇₅₀ 约为 9.5; 小球藻在该条件下达到最优的生长速率 (OD₇₅₀ 达到 25)。再进一步将空气替换成高 CO₂ 的混合气体进行通气, *M. afer* 的生长速率进一步提升, 该组 OD₇₅₀ 达到 11.8, 因此兼养-CO₂ 条件对 *M. afer* 生长有最显著的促进作用。这个过程中仅改变了 CO₂ 的浓度, 笔者认为高浓度无机碳源促进了细胞的生长; 而小球藻在该条件

下, 同兼养-空气相比, 生长速率下降, 最终 OD 约为 16.5, 高浓度的 CO₂ 抑制了细胞对有机碳源的利用。生长曲线的数据说明两种微藻在兼养条件下的性质不同, 有机碳源和无机碳源的协同作用也不同。*M. afer* 可以协同有机碳源和无机碳源的利用, 而小球藻可以只利用有机碳源, 但在高浓度 CO₂ 条件下其生长受到一定的抑制。



黑色箭头表示在第3和第6天补充葡萄糖至初始水平。

The black arrows indicate that glucose was supplemented to the initial level on Day 3 and Day 6.

图1 不同培养条件下*M. afer* (a, c)和小球藻*C. sorokiniana* (b, d)的生长曲线和光合电子传递效率变化情况

Fig. 1 Growth curves and ETR of *M. afer* (a, c) and *C. sorokiniana* (b, d) under different culture conditions

对光合系统的参数进行测定也在一定程度上说明了两种微藻的不同, 光合系统的最大电子传递效率可以表征光合作用的效率。本研究中选择生长过程发生显著分化的第4天, 对不同培养条件下两种微藻的电子传递效率进行分析, 在 *M. afer* 中 (图1-c), 异养培养的光合系统最大电子传递速率显著低于其他组, 在光照条件下的不同处理过程中, *M. afer* 的光合系统作用效率呈现梯度变化, 高含量 CO₂ 通入的处理组, *M. afer* 的光合效率较高, 表明 CO₂ 的通入对光合效率提高有显著作用, 高浓度 CO₂ 处理能提高 *M. afer* 的碳固定作用。在小球藻中 (图1-d), 异养培养条件下小球藻的最大电子传递速率显著低于其他组, 其他光照条件下的

该参数无显著差异。

2.2 不同培养条件对细胞有机碳源利用效率的影响

兼养过程中, 两种微藻在不同浓度 CO₂ 条件下, 细胞的生长速率不同, 有机碳源的利用速率也存在差异。在培养第3、第6和第8天取样测定培养基内葡萄糖剩余量, 结果见表1。在兼养条件下, 小球藻在通空气的情况下葡萄糖消耗速率最快, 而 *M. afer* 在通高浓度 CO₂ 的情况下消耗最快, 糖消耗速率的快慢与两株藻的生长情况一致。

2.3 不同培养条件对细胞光合放氧和呼吸耗氧水平的影响

在微生物发酵过程中, 氧的传递非常重要。细

表1 培养基中葡萄糖剩余量 ($\bar{X}\pm\text{SD}$)
Table 1 Residual glucose in culture medium

时间 t/d	<i>C. sorokiniana</i>		<i>M. afer</i>	
	兼养-空气 Mixotrophy-air	兼养-二氧化碳 Mixotrophy-CO ₂	兼养-空气 Mixotrophy-air	兼养-二氧化碳 Mixotrophy-CO ₂
3	1.50±0.001	2.86±0.010	0.45±0.030	ND
6	0.03±0.001	3.60±0.001	1.50±0.320	ND
8	6.00±0.530	10.99±0.270	4.02±0.620	1.19±0.050

注：ND 为未检测出葡萄糖，即培养过程中每次添加的 2 g·L⁻¹ 葡萄糖在检测时已全部利用。
Note: ND indicates that no glucose was detected, which means that 2 g·L⁻¹ glucose had been fully utilized.

胞进行呼吸作用需要大量氧气，同时光合微藻进行碳固定过程中也释放氧气，因此光合作用的效率可以通过氧气释放量来表达。本研究结合细胞生长和葡萄糖利用等结果，对培养系统中溶解氧变化过程进行监测和分析。图 2-a 显示了培养系统中检测溶解氧的过程，如方法中所述，首先从培养体系中取出藻液，在同样光照条件下测定不同培养体系的藻液在光照下 30 min 的耗氧变化，此过程分析光合作用放氧速率与细胞呼吸作用耗氧速率之间的差值；随后将检测体系避光处理，继续检测在黑暗条件下 30 min 的氧消耗变化，此过程分析不同条件下细胞的呼吸速率，溶解氧变化速率单位均为

mg·(L·h·OD)⁻¹。结果如图 2-b 所示，在小球藻中放氧水平依次为自养>兼养-空气>兼养-CO₂，而在 *M. afer* 中放氧速率为自养>兼养-CO₂≈兼养-空气，有机碳源的加入均对两株藻的放氧水平产生了抑制作用，但小球藻放氧水平还在很大程度上受通气条件的影响。图 2-c 反映了两株藻在不同培养条件下的呼吸水平，与生长曲线(图 1-a, 1-c)结合分析发现，细胞呼吸水平与细胞生长成正比例关系。结合以上结果，小球藻在异养条件下耗氧速率最快且有较高的生长速率，该条件下细胞生长的全部能量依赖于有机碳源分解代谢产生的 ATP，但在兼养条件下，添加有机碳源时，细胞的光合作用

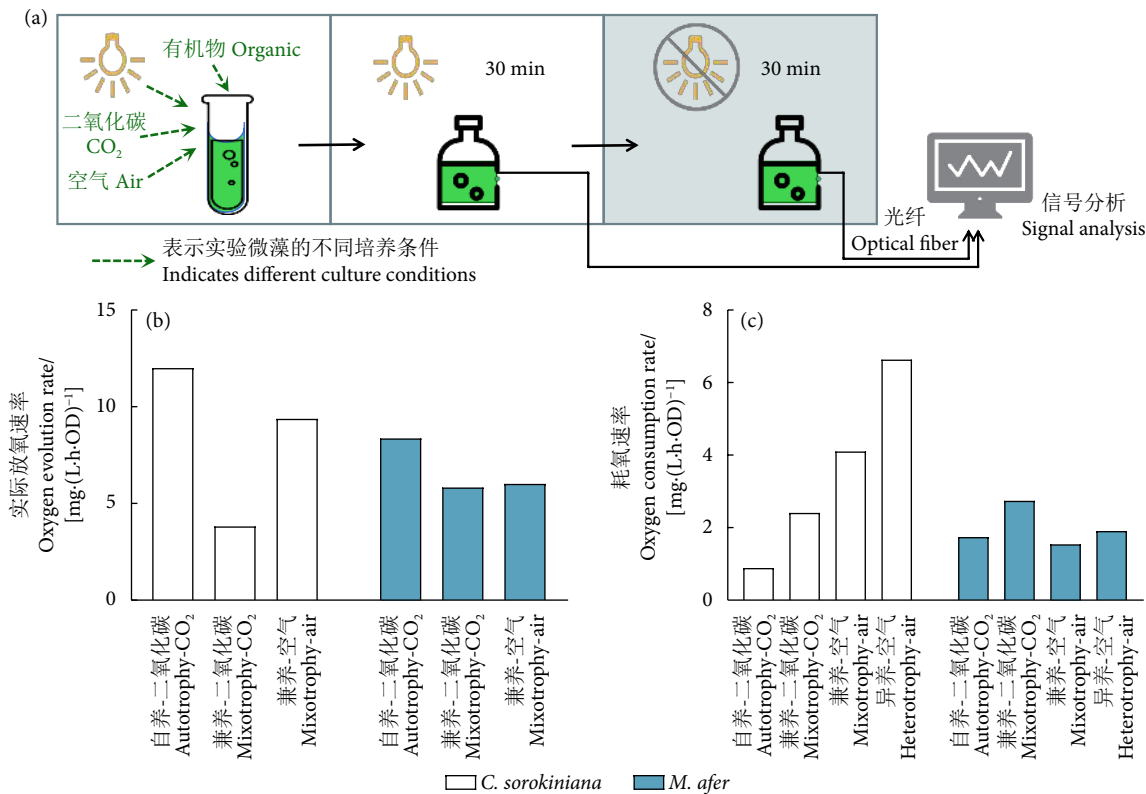


图2 溶解氧测定示意图及*M. afer*与小球藻 *C. sorokiniana* 耗放氧情况

Fig. 2 Schematic diagram of dissolved oxygen determination and oxygen release, consumption rate of *M. afer* and *C. sorokiniana*

相比自养条件受到抑制; 在有光的条件下, 小球藻启动光合作用, 细胞的呼吸水平降低, 表明这个过程对细胞利用有机碳源生长产生抑制。在 *M. afer* 的检测过程中发现, 在兼养通高浓度 CO₂ 条件下生长速率最快, 同时该条件下细胞呼吸水平最高; 相对于兼养-空气组, 在有高浓度 CO₂ 的情况下, 细胞呼吸水平提高, 一定程度上说明 CO₂ 的吸收促进了细胞对有机碳源的利用; 并且由于实际放氧速率在兼养条件下无显著差异, 可以认为有机碳源的添加未对 *M. afer* 的光合系统造成影响。

2.4 不同培养条件对 *M. afer* 生物量、细胞内脂肪酸和神经酸产量的影响

由于 *M. afer* 生长过程中积累神经酸^[13-14,26-27],

因此对该藻在不同培养条件下的细胞油脂含量进行分析。将藻液离心后收集藻泥进行烘干, 测定细胞生物量和细胞内脂肪酸、神经酸含量, 结果见表 2。与自养条件相比, 葡萄糖加入后, 细胞生物量、脂肪酸和神经酸含量均有显著提高, 兼养-CO₂ 组细胞生物量最大, 为 3.26 g·L⁻¹。在兼养-CO₂ 条件下, 每克生物量含 253.02 mg 脂肪酸、5.93 mg 神经酸, 神经酸含量占总脂肪酸的 2.34%; 兼养-空气组每克生物量含 154.01 mg 脂肪酸、2.59 mg 神经酸, 脂肪酸占比为 1.68%; 自养条件下每克生物量仅含 132.20 mg 脂肪酸、0.93 mg 神经酸。在最优的兼养-CO₂ 组, 神经酸含量分别为自养、兼养通空气条件的 6.4、2.3 倍。

表2 不同条件下*M. afer*细胞生物量、脂肪酸和神经酸质量分数 ($\bar{X}\pm\text{SD}$)
Table 2 Biomass, mass fraction of fatty acids and nervonic acids of *M. afer* cells under different conditions

	生物量 Biomass/(g·L ⁻¹)	脂肪酸质量分数 Mass fraction of fatty acid/(mg·g ⁻¹)	神经酸质量分数 Mass fraction of nervonic acid/(mg·g ⁻¹)
自养-二氧化碳 Autotrophy-CO ₂	2.458 3±0.000 4	132.20±9.68	0.93±0.02
兼养-空气 Mixotrophy-air	2.620 0±0.000 3	154.01±16.63	2.59±0.01
兼养-二氧化碳 Mixotrophy-CO ₂	3.261 7±0.000 1	253.02±6.33	5.93±0.15

3 讨论

本研究主要比较了小球藻和 *M. afer* 在兼养过程中利用有机碳源和协同光合作用的能力, 并探索 *M. afer* 最佳的兼养培养条件。*M. afer* 和小球藻均可以利用有机碳源和光源进行兼养生长, 但是两株藻在利用有机碳源和协同光合作用的能力方面存在显著差异。与 *M. afer* 相比, 小球藻可以利用更高浓度的葡萄糖, 实现更快速生长; 小球藻属于一种高产蛋白质的微藻, 而 *M. afer* 是一种典型产油微藻, 与具有高淀粉或高蛋白含量的微藻相比, 产油微藻通常表现出较慢的生长速率和较低的生物量, 这一点在多种微藻中得到印证^[28-30]。小球藻可以单独依靠有机碳源营养生长, 且在通空气的条件下生长速率更快, 在有机碳源和光能同时存在时, 小球藻更倾向于利用有机碳源, 推测原因可能为有机碳源的加入抑制了小球藻细胞的光合作用, 降低了光合色素含量^[31]。但在培养初期, 光合系统的代谢占总代谢的 70% 以上^[32], 仍然有助于细胞的生长, 使兼养培养的生长速率较高。空气的持续通入供氧, 更有利于葡萄糖的分解代谢, 因此相对于兼养-CO₂ 组, 在兼养-空气条件下的生长速率

更高。

有机碳源的引入对两株藻光合系统活性显示出不同程度的抑制作用。Vidotti 等^[33] 发现, 小球藻从自养条件转入兼养后, 光合系统 II 和光合系统 I 活性及效率均下降, 光合色素含量减少, 细胞内光合相关基因如 *psbA*、*psbC*、*psaB* 等显著下调, 同时检测到在光照条件下, 培养基中葡萄糖的存在导致光合结构的降解以及类囊体膜蛋白丰度的降低。刘晓娟^[34] 研究不同营养方式对三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 的影响, 发现有机碳源加入后, 细胞内光合色素含量下降, PS II 系统活性/光合放氧速率等均下降, 即有机碳降低了三角褐指藻的光合能力。外源葡萄糖通过分解代谢, 为藻细胞生长提供所需能量及小分子碳骨架, 从而降低了细胞对光能的依赖, 因此兼养条件下细胞光合电子传递效率 (ETR)、光合放氧水平等均低于自养水平。

不同于小球藻, 当切断光源后, *M. afer* 几乎不能生长, 表明 *M. afer* 不能完全摆脱对光源的依赖, 完全营异养生长。*M. afer* 在有机碳源和高浓度 CO₂ 共同存在时, 具有最高的生长速率、最快的葡萄糖消耗速率、更高的呼吸水平, 且积累了更

多的生物活性物质。通常在自养条件下,高浓度 CO_2 的引入,缓解了 CO_2 缺乏对细胞生长的抑制,提高碳固定途径关键酶 Rubisco (核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶) 的活性^[35],增加碳固定效率,积累更多生物量。本研究发现,在 *M. afer* 中,通过光合参数和放氧速率检测,通入高浓度的 CO_2 并未使得光合系统的速率得到提升,但是细胞呼吸速率和葡萄糖的利用速率显著提高。该过程的分子机制仍有待通过转录组等数据阐明。推测在 CO_2 通入细胞后,细胞的 CO_2 通过类碳-4 途径进行了初步的固定,首先丙酮酸在磷酸丙酮酸双激酶的作用下生成了磷酸烯醇式丙酮酸,然后在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的作用下与 CO_2 结合,进入中心碳代谢途径,进而与有机碳利用的糖酵解过程相偶联,促进了有机碳的利用。今后的工作中将进一步证明这个过程。

综上所述,两种微藻在兼养过程中协同有机碳源和光合作用的机制存在差异,*M. afer* 在有机碳源存在的条件下仍可固定 CO_2 ,在这种培养模式下,期待能够一方面添加有机碳源提高微藻的生长速率,一方面固碳减排,使微藻快速积累生物量,为碳中和碳达峰的目标提供重要解决途径。

参考文献:

- [1] 魏东. 微藻在水产养殖业中的应用及发展趋势 [J]. 当代水产, 2014, 39(2): 57-58.
- [2] 张国维, 李勤慎, 邵东宏, 等. 微藻在水产养殖中的研究应用进展 [J]. 中国水产, 2020(2): 72-74.
- [3] 王盛林, 刘平怀, 曹猛. 微藻营养价值及微藻饲料的开发利用 [J]. 食品工业, 2019, 40(7): 275-279.
- [4] 芦崇德, 刘婧婧, 冯一平, 等. 固定化小球藻产氧及光合速率的研究 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(3): 92-98.
- [5] DING Y, GUO Z, MEI J, et al. Investigation into the novel microalgae membrane bioreactor with internal circulating fluidized bed for marine aquaculture wastewater treatment[J]. Membranes (Basel), 2020, 10(11): 353.
- [6] 刘鹏. 兼养培养对三种典型微藻生长与胞内组分及脂质合成相关基因表达的影响研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010: 10-15.
- [7] 牛海亚, 马玉龙, 石勋祥, 等. 不同营养方式对小球藻 FACHB 484 生长的影响及其非自养生长机理研究 [J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 474-479.
- [8] LI T, ZHENG Y, YU L, et al. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production[J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 66: 204-213.
- [9] 周华伟, 林炜铁, 陈涛. 小球藻的异养培养及应用前景 [J]. 氨基酸和生物资源, 2005(4): 69-73.
- [10] LIU T, LIU F, WANG C, et al. The boosted lipid accumulation in microalgae *Chlorella vulgaris* by a heterotrophy and nutrition-limitation transition cultivation regime[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(12): 202.
- [11] ROSENBERG J N, KOBAYASHI N, BARNES A, et al. Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalgae *C. sorokiniana*[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e92460.
- [12] JIN H, ZHANG H, ZHOU Z, et al. Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green microalgae *Scenedesmus acuminatus* and application of the cells to photoautotrophic culture enhance biomass and lipid production[J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(1): 96-108.
- [13] YUAN C, LIU J H, FAN Y, et al. *Mychonastes afer* HSO-3-1 as a potential new source of biodiesel[J]. Biotechnol Biofuels, 2011, 4(1): 47.
- [14] YUAN C, XU K, SUN J, et al. Ammonium, nitrate, and urea play different roles for lipid accumulation in the nervonic acid-producing microalgae *Mychonastes afer* HSO-3-1[J]. J Appl Phycol, 2018, 30(2): 793-801.
- [15] FENG X, YONG F, FUHONG M, et al. Naphthylacetic acid and tea polyphenol application promote biomass and lipid production of nervonic acid-producing microalgae[J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 506.
- [16] LI S, SHI X, LEPÈRE C, et al. Unexpected predominance of photosynthetic picoeukaryotes in shallow eutrophic lakes[J]. J Plankton Res, 2016, 38(4): 830-842.
- [17] LIU C, SHI X, WU F, et al. Genome analyses provide insights into the evolution and adaptation of the eukaryotic picophytoplankton *Mychonastes homosphaera*[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 477.
- [18] 范勇, 袁程, 刘君寒, 等. 利用微藻 *Mychonastes afer* HSO-3 生产神经酸的研究初探 [C]//中国藻类学会第八次会员大会暨第十六次学术讨论会论文摘要集. 上海: 中国海洋湖沼学会, 2011: 229.
- [19] 王性炎, 王姝清. 神经酸研究现状及应用前景 [J]. 中国油脂, 2010, 35(3): 1-5.
- [20] HU D D, CUI Y J, ZHANG J. Nervonic acid ameliorates motor disorder in mice with Parkinson's disease[J]. Neurochem J, 2021, 15(3): 317-324.
- [21] FAN Y, MENG H M, HU G R, et al. Biosynthesis of nervonic acid and perspectives for its production by microalgae and other microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(7): 3027-3035.
- [22] SFORZA E, CIPRIANI R, MOROSINOTTO T, et al. Excess CO_2 supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*[J]. Bioresource Technol, 2012, 104: 523-529.
- [23] CURIEN G, LYSKA D, GUGLIELMINO E, et al. Mixotrophic growth of the extremophile *Galdieria sulphuraria* reveals the flexibility of its carbon assimilation metabolism[J]. New Phytol, 2021,

- 231(1): 326-338.
- [24] OLIVEIRA C Y B, D'ALESSANDRO E B, ANTONIOSI N R, et al. Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga *Choricystis minor* var. *minor*[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 759: 143476.
- [25] MARTINEZ F, ORUS M I. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101[J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(4): 1150-1155.
- [26] 徐峰. 产神经酸微藻 *Mychonastes afer* 的藻种改良和培养模式优化 [D]. 青岛: 青岛农业大学, 2018: 50-57.
- [27] 袁程. 微藻生产生物柴油评价及其高产条件的优化 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011: 34-42.
- [28] LIU J, HUANG J, FAN K W, et al. Production potential of *Chlorella zofingienensis* as a feedstock for biodiesel[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(22): 8658-8663.
- [29] SUN N, WANG Y, LI Y T, et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)[J]. *Process Biochem*, 2008, 43(11): 1288-1292.
- [30] DOUCHA J, LÍVANSKÝ K. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters[J]. *J Appl Phycol*, 2012, 24(1): 35-43.
- [31] 杨树玲. 基于代谢组学技术研究不同营养方式对普通小球藻生理代谢的影响 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2020: 2-7.
- [32] JEONGEUN P, SHAN Z, HIEP H T, et al. The contribution ratio of autotrophic and heterotrophic metabolism during a mixotrophic culture of *Chlorella sorokiniana*[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(3): 1353.
- [33] VIDOTTI A D S, RIAÑO-PACHÓN D M, MATTIELLO L, et al. Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches[J]. *Algal Res*, 2020, 51: 102060.
- [34] 刘晓娟. 三角褐指藻的自养、兼养和异养特性研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2008: 58-88.
- [35] CAMPBELW J L, ALLEN L H, BOWES G. Effects of CO₂ concentration on Rubisco activity, amount, and photosynthesis in soybean leaves[J]. *Plant physiol*, 1988, 88(4): 1310-1316.