

复合诱变-高通量培养选育高产蛋白的蛋白核小球藻

叶慧诗, 魏东*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为了采用复合诱变技术提高蛋白核小球藻发酵蛋白产量并改善氨基酸品质, 以本团队前期选育获得的高蛋白叶绿素合成缺陷型突变株 CX41 为出发藻株, 采用甲基磺酸乙酯 (Ethyl Mesylate, EMS) 和常压室温等离子体 (Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP) 诱变技术进行复合诱变处理, 与微生物微液滴培养系统 (Microbial Microdroplet Culture System, MMC) 和 48 孔板培养高通量筛选相结合, 经 250 mL 摇瓶培养复筛后, 最终得到突变藻株 Y11, 在含 30 g·L⁻¹ 葡萄糖、3.75 g·L⁻¹ 硝酸钠的 Basal 培养基中, 于 30 ℃、160 r·min⁻¹ 条件下避光发酵 96 h, 其生物量、蛋白含量及产率分别达到 9.05 g·L⁻¹、55.54 g/100 g 干重和 1.26 g·(L·d)⁻¹, 较出发藻株 CX41 分别显著提高了 21.15%、25.60%、51.81%; 氨基酸评分达 94.41, 支链氨基酸总含量达 6.96 g/100 g 干重, 较出发藻株 CX41 分别提高了 3.49 分和 27.35%; 叶黄素含量、产量及产率分别达到 1.12 mg·g⁻¹、10.10 mg·L⁻¹ 和 2.52 mg·(L·d)⁻¹, 相较于出发藻株 CX41 分别提高了 4.67%、26.88%、26.63%。该研究为利用复合诱变手段-高通量筛选技术选育优质微藻菌株提供了理论基础和技术支撑。

关键词: 蛋白核小球藻; 常压室温等离子体; 甲基磺酸乙酯; 复合诱变; 蛋白质

文章编号: 1673-9078(2026)04-114-121 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0166

Breeding a Mutant Strain of *Auxenochlorella pyrenoidosa* through Combined Mutagenesis and High-throughput Screening for High-yield Protein Production by Fermentation

YE Huishi, WEI Dong*

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

Abstract: To enhance the fermentation protein yield of *Auxenochlorella pyrenoidosa* and its amino acid quality through combined mutagenesis, the high-protein, chlorophyll-deficient mutant strain CX41, previously obtained by the research team, was used as the original strain. Combined mutagenesis was conducted using ethyl mesylate and atmospheric and room temperature plasma, followed by high-throughput screening through a microbial microdroplet culture system and 48-well plate cultivation. Subsequently, after secondary screening via 250 mL shake flask cultivation, the mutant strain Y11 was ultimately obtained. Under dark fermentation conditions at 30 ℃ and 160 r·min⁻¹ for 96 h in basal medium containing 30 g·L⁻¹ glucose and 3.75 g·L⁻¹ sodium nitrate, the biomass, protein content, and yield of Y11 reached 9.05 g·L⁻¹, 55.54 g/100 g dry weight, and 1.26 g·(L·d)⁻¹, respectively, which were significantly higher than those of the original strain CX41, with increases of 21.15%, 25.60%, and 51.81%, respectively. The amino acid score (94.41) and total branched-chain amino acid content (6.96 g/100 g dry weight) also improved by 3.49 points

引文格式:

叶慧诗,魏东.复合诱变-高通量培养选育高产蛋白的蛋白核小球藻[J].现代食品科技,2026,42(4):114-121.

YE Huishi, WEI Dong. Breeding a mutant strain of *Auxenochlorella pyrenoidosa* through combined mutagenesis and high-throughput screening for high-yield protein production by fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 114-121.

收稿日期: 2025-02-12 ; 修回日期: 2025-04-22 ; 接受日期: 2025-05-01
基金项目: 谷孚科研基金资助项目 (GFICRG202102)
作者简介: 叶慧诗 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微藻生物技术, E-mail : yehuishi1999@163.com
通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术, E-mail : fewd304@scut.edu.cn

and 27.35%, respectively. Moreover, compared with CX41, the lutein content ($1.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), yield ($10.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and productivity ($2.52 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$) significantly increased by 4.67%, 26.88%, and 26.63%, respectively. This study provides a theoretical basis and technical support for the breeding of high-quality microalgal strains by using combined mutagenesis and high-throughput screening techniques.

Key words: *Auxenochlorella pyrenoidosa*; atmospheric and room temperature plasma; ethyl mesylate; combined mutagenesis; protein

联合国粮食及农业组织预计全球人口将在 2050 年达到 90 亿, 食物蛋白需求增量高达 2.65 亿 t^[1], 这对现行的蛋白质供给体系提出了巨大挑战。动物源蛋白作为传统蛋白的主要来源, 因其对环境气候的污染、抗生素的滥用和引发健康问题等而受到批评, 因此更高效、可持续供应的蛋白质来源成为目前的研究热潮^[2]。为响应全球对蛋白质的需求, 替代蛋白(包括来自藻类、昆虫和部分植物等^[3]资源的蛋白)的概念应运而生。蛋白核小球藻(*Auxenochlorella pyrenoidosa*)作为一种替代蛋白, 蛋白质含量高达 50%~60%^[4], 且富含必需氨基酸、多糖和叶酸等营养成分, 于 2012 年被中国批准为新食品原料^[5]。它具有植物(光合自养)和微生物(高细胞密度异养发酵或光发酵)的两性营养模式, 为高效生产提供了工业化途径^[6]。自养模式可以降低培养成本, 对环境友好, 但存在光照依赖性, 且光合自养的生长速率和生物量与异养和兼养相比通常较低^[7]。高密度异养发酵虽然不依赖光照, 生长迅速且参数可控, 但因藻种特性和发酵培养基较高的 C/N 比, 导致蛋白质含量较低(约 38 g/100 g 干重), 限制了其发酵蛋白的商业化生产^[8]。兼养模式结合了自养和异养的特点, 可以在光照条件下进行光合作用, 同时利用有机碳源, 使蛋白核小球藻的生物量和产物产量积累更多, 且减少对外部 CO₂ 的依赖^[9]。另一方面, 野生型蛋白核小球藻粉呈现出浓重的墨绿色, 还散发着明显的藻腥味, 作为食品配料时消费者接受度较低^[9,10]。

微藻诱变育种是依据特定的目标 and 需求, 利用各种物理和化学诱变手段, 引起藻种遗传性状产生变异, 再经过精准定向筛选, 获得改良突变藻株的育种技术^[11]。陈霄^[12]以野生型蛋白核小球藻为出发藻株, 利用常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)技术成功筛选出叶绿素合成缺陷型突变株 CX41, 简化了藻细胞加工利用的脱色、脱腥过程, 其蛋白质含量比野生型显著提高了 45.05%。Trovao 等^[13]利用甲基磺酸乙酯(Ethyl Mesylate, EMS)对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)进行诱变, 获得黄色突变株 31Y15 和白色突变株 31W62。Huang 等^[14]利用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理佐芬小球藻(*Chlorella zofingiensis*)细胞, 诱

变出高产叶黄素、玉米黄质和 β -胡萝卜素的突变株 CZ-bkt1。

复合诱变是指采用两种或以上的诱变技术对微藻进行育种, 旨在提升基因突变的多样性, 从而获得更多性状优良的突变藻株^[15,16]。目前, 复合诱变技术在微藻诱变育种领域应用案例仍相对较少, 多用于细菌育种领域。例如, Zhu 等^[17]利用 ARTP 和亚硝基胍复合诱变提高了刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora Spinosa*)的多杀菌素产量及杀虫毒力。赵盛等^[18]利用 UV-ARTP 复合诱变提高了拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica* QLM⁻¹)的 MTBE 降解性能。微生物微液滴培养(Microbial Microdroplet Culture System, MMC)系统依托微流控芯片, 能精准控制流体体积和传质^[19], 可快速产生大量微液滴并能独立监控每一个液滴的吸光和荧光性质^[20], 具有通量高、平行性好、自动程度高等优点, 可极大节约人力和时间成本。这两种技术联用, 不仅能发挥复合诱变对构建大容量突变株库的优势, 还能通过 MMC 高通量筛选弥补诱变的随机性, 更高效获得具有生长和特殊性状优势的突变株。

该研究使用本团队保藏的上述黄色蛋白核小球藻高蛋白突变株 CX41^[12,21]进行新一轮复合诱变处理, 借助 MMC 高通量培养等筛选体系, 探究复合诱变对藻株生物量、蛋白含量及产率的影响, 筛选出蛋白含量及产量更高、氨基酸组成更优的突变藻株, 最终为发酵生产微藻蛋白提供最优藻种。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻株

蛋白核小球藻 CX41 系本团队前期选育和保藏的高蛋白叶绿素合成缺陷型专利突变株^[12,21]。

1.1.2 试剂与培养基

浓硫酸, 购自广州荣满生物科技有限公司; 硼酸、技术型琼脂, 购自天津市大茂化学试剂厂; 甲基磺酸乙酯、叶黄素标准品, 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

Basal 培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[12]: 葡萄糖 10~30、 NaNO_3 1.25~3.75、 KH_2PO_4 1.25、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0、EDTA 0.5、 H_3BO_3 0.114 2、 $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.111、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.049 8、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.088 2、 MoO_3 0.007 1、 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.014 2、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.015 7、 $\text{CoNO}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.006 1, 购自天津市大茂化学试剂厂, pH 值调节至 6.1, 121 °C 灭菌 15 min。若配制 Basal 固体(斜面、平板)培养基, 需再加入 2% (质量分数) 琼脂。

1.1.3 仪器与设备

ARTP 诱变育种仪和 MMC-B2 全自动高通量液滴培养仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; DHZ-DA 恒温摇床, 苏州培英实验设备有限公司; AL104 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; CytoFLEX 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司; K9840 半自动凯氏定氮仪, 山东海能未来技术集团股份有限公司; L-890 氨基酸全自动分析仪, 日本 HITACHI 公司; AMA240 高压蒸汽灭菌锅, 英国 ASTELL 公司; Modulyod-230 冷冻干燥机, 美国 Thermo Fisher 公司。HPLC 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent Technologies Inc 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 出发藻株活化及种子液制备

从 4 °C 保存的 Basal 斜面培养基上挑取 CX41 藻苔, 在 Basal 固体平板上连续划线、且置于 30 °C 下避光培养 3~4 轮, 挑取单藻落接种至含 20 mL 无菌 Basal 液体培养基 ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钠) 的 50 mL 摇瓶中, 随后将此摇瓶置于恒温摇床中, 30 °C、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下避光培养 4 d 以制备种子液。

1.2.2 复合诱变

1.2.2.1 出发藻株 CX41 藻悬液的制备

取 1 mL CX41 种子液置于 2 mL 无菌离心管中, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 收集藻泥沉淀, 在藻泥沉淀中加入 1 mL 无菌水混匀, 按此方法离心洗涤 3 次, 用无菌水稀释至 $10^6\sim 10^7\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 制成藻悬液。

1.2.2.2 EMS 诱变

取 6 组 1 mL 藻悬液置于 2 mL 无菌离心管中, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除上清液。使用无菌 PBS 缓冲液 (pH 值 7.0) 配制不同摩尔浓度 EMS 溶液, 经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微滤孔膜过滤除菌后分别取 1 mL 加入含有藻泥沉淀的 2 mL 离心管中, 使 EMS 终浓度分别为 0、100、200、300、400、500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每组 3 个平行样, 紧盖, 置于振荡器上 30 °C、 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 避光条件振荡 30 min。随后立即向各管加入 1 mL 5 wt.% 硫代硫酸钠

溶液终止反应, 离心去除诱变液后, 加入 1 mL 无菌 PBS 缓冲液冲洗藻泥沉淀, 混匀, 按此方法离心洗涤 1 次。洗涤后藻泥沉淀加入 1 mL 无菌水进行混匀, 将藻悬液进行梯度稀释, 取 100 μL 涂布于 Basal 固体平板, 置于 30 °C 培养箱中避光培养至出现单藻落。以未添加 EMS 的藻液为对照, 统计各诱变组的藻落数, 致死率计算公式如下, 绘制致死曲线。

$$D = (1 - \frac{D_n}{D_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——致死率, %;

D_n ——处理组藻落数, 个;

D_0 ——对照组藻落数, 个。

1.2.2.3 ARTP 诱变

取 8 组按 1.2.2.1 方法制备的 1 mL 藻悬液, 分别与等体积的 10% (体积分数) 无菌甘油溶液混合, 使甘油终浓度为 5% (体积分数) 作为诱变保护剂。随后从各混合液中吸取 10 μL 滴加至无菌金属载片中央, 置于 ARTP 诱变仪中进行诱变处理。诱变条件设置为: 高纯氦气作为工作气源、电源功率为 120 W、气体流量为 10 SLM、照射距离为 2 mm。在此条件下, 对 8 个载片上的藻细胞进行诱变处理, 处理时间依次为 0、10、15、20、22、25、30、35 s, 每个时间点设置 3 个重复实验。诱变结束后, 将含藻悬液的无菌金属载片进行梯度稀释, 并取 100 μL 涂布于 Basal 固体平板, 置于 30 °C 培养箱中避光培养至出现单藻落, 以未诱变处理的藻液为对照, 统计各诱变组的藻落数, 按公式 (1) 计算致死率, 绘制致死曲线。

1.2.2.4 EMS-ARTP 复合诱变

经 EMS 最佳诱变剂量处理后的藻悬液直接与 10% (体积分数) 无菌甘油溶液等体积混合, 再经 ARTP 最佳诱变时间处理, 该藻悬液接种至 20 mL 的 Basal 液体培养基 ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钠) 中, 于 30 °C、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中避光培养 4 d。

1.2.3 全自动高通量微液滴高通量培养

对数期的复合诱变培养液用无菌水稀释至 OD_{450} 0.6~0.8 左右, 取 10 mL 稀释液转入微生物液滴培养仪 (MMC-B2) 中。初始化操作前, 需对液滴微流控设备的培养室内外区域进行 30 min 紫外线照射。随后对微流控芯片进行初始化操作, 相关参数为: 温度 30 °C, OD 检测波长为 450 nm, 检测周期为 0 h (即连续检测), 生成起始液滴数量为 100 个, 微液滴生成体积为 2~3 μL 。以 OD_{450} 作为细胞生长指标, 筛选标准为每接近仪器检测上限, 手动剔除 OD_{450} 排名在后 50% 的液滴, 对前 50% 的液滴进行扩培操作。经过 3

轮扩培和1轮传代验证,对OD₄₅₀最高的液滴进行采收。

1.2.4 平板固体培养和48孔板液体培养初筛

将MMC-B2采收到的微液滴进行稀释并涂布平板,置于30℃恒温培养箱中避光培养10d,挑选生长迅速、形态圆润饱满且直径大的单藻落,进行进一步的平板划线验证。再从转接平板中挑选生长快、藻落大的突变株单克隆,接种至含800μL无菌Basal培养基(10g·L⁻¹葡萄糖、1.25g·L⁻¹硝酸钠)的48孔板中,接种密度为5×10⁶ cells·mL⁻¹,每组4个平行孔。将加盖微孔板置于微孔板振荡器上,于30℃恒温培养箱中500r·min⁻¹下避光培养4d。取第0天和第4天的50μL藻液测定细胞密度,700μL用于测定生物量。以细胞比生长速率和生物量为指标进行评价,筛选获得具有生长优势的突变株。

1.2.5 摇瓶复筛

将筛选获得的具有生长优势的突变株按照1.2.1制备种子液,再接种于100mL的无菌Basal液体培养基(30g·L⁻¹葡萄糖、3.75g·L⁻¹硝酸钠)的250mL摇瓶中,使终细胞密度为每毫升5×10⁶ cells,置于30℃、160r·min⁻¹的恒温摇床中避光培养4d。每24h取2mL分别测定细胞密度和生物量。培养结束后收集藻液,离心、洗涤,经冷冻干燥后收集藻粉,避光储存于-20℃下用于分析蛋白含量、产量、产率以及氨基酸组成^[21]。

1.3 分析与测试

1.3.1 细胞密度和生物量的测定

采用流式细胞仪测定小球藻细胞密度;称重法测定生物量^[22]。细胞平均比生长速率计算公式如下:

$$C = \frac{\ln C_{t4} - \ln C_{t0}}{4} \quad (2)$$

式中:

C ——平均比生长速率, d⁻¹;

C_{t0} ——第0天时藻液中每毫升的细胞数;

C_{t4} ——第4天时藻液中每毫升的细胞数。

1.3.2 蛋白质和氨基酸含量的测定

采用凯氏定氮法测定小球藻蛋白质含量^[23],计算公式如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.014 \times 6.25}{m} \times 100 \quad (3)$$

式中:

X ——试样中蛋白含量, g/100g干重;

$V_1 - V_2$ ——盐酸标准液消耗体积, mL;

C ——盐酸标准液摩尔浓度, mol·L⁻¹;

m ——藻粉质量, g。

采用氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组成和含量^[23],计算公式如下:

$$\omega = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_i}{A_{st} \times m_0 \times V_{st} \times 10^6} \times 100 \quad (4)$$

式中:

ω ——试样中蛋白含量, g/100g干重;

n ——试样水解溶液的稀释倍数;

V ——试样中水解溶液体积, mL;

c ——标准工作液中对氨基酸的浓度, nmol·mL⁻¹;

m_0 ——试样质量, mg;

M ——氨基酸摩尔质量, g·mol⁻¹;

V_i 、 V_{st} ——分别为试样进样体积、氨基酸标准溶液进样体积, μL;

A_i 、 A_{st} ——分别为试样中对应氨基酸的峰面积、氨基酸标准溶液的峰面积;

每种突变株藻粉的氨基酸评分(Amino Acid Score, AAS)计算公式如下,蛋白整体评分取最低的一项(即第一限制性氨基酸)评分。

$$AAS = \frac{A_n}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

式中:

AAS ——氨基酸评分;

A_n ——藻粉中每克蛋白质的氨基酸总量, g/100g干重;

A_0 ——每克理想模式或参考蛋白的氨基酸总量, g/100g干重。

1.3.3 叶黄素含量的测定

采用高效液相色谱测定藻粉中叶黄素含量^[12]。

1.4 数据分析

实验设置3个平行样,结果以平均值±标准差表示。采用Excel 2021和Microsoft Origin 2021对实验数据进行处理与分析,采用SPSS Statistics 27对数据进行单因素方差分析和显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 复合诱变最优条件的确定

2.1.1 EMS诱变的致死率曲线制作

出发藻株CX41的EMS致死曲线见图1。细胞致死率随着EMS处理浓度的增加而提高,在500mmol·L⁻¹EMS处理条件下细胞达到100%致死。有研究表明,高于90%的致死率会增加获得正向突变的机会^[24]。当EMS摩尔浓度为400mmol·L⁻¹时,致死率达到94.71%,因此选择此浓度作为EMS诱变的最佳剂量。

2.1.2 ARTP诱变的致死率曲线制作

出发藻株CX41的ARTP致死曲线见图2。细胞

致死率随着 ARTP 处理时间的延长而提高, 且等离子体对细胞的致死趋势呈指数增长而非线性, 这一规律在已有研究中同样被观察到^[12,25]。出发藻株细胞在 35 s 处理下达到 100% 致死; 20 s 时致死率为 92.94%, 25 s 时达到 97.62%。考虑到节约载气及致死率范围, 因此选择 20 s 作为 ARTP 诱变处理时间。

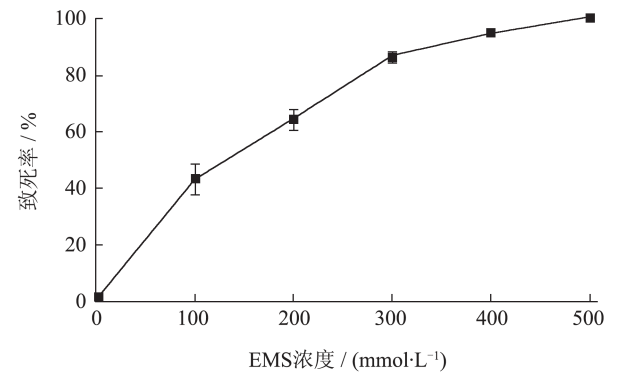


图 1 出发藻株 CX41 的 EMS 诱变致死曲线
Fig.1 Lethal curve of EMS on the original strain CX41

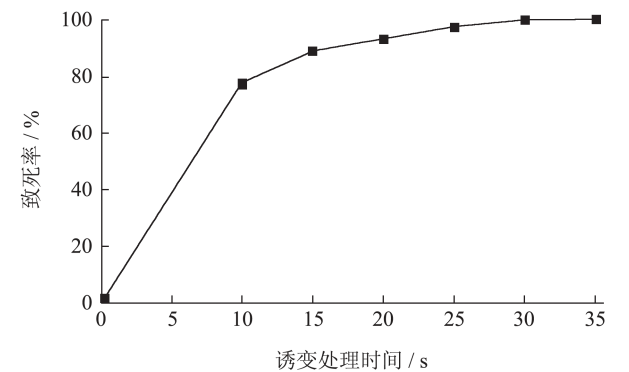


图 2 出发藻株 CX41 的 ARTP 诱变致死曲线
Fig.2 Lethal curve of ARTP on the original strain CX41

2.2 复合诱变偶联高通量培养筛选突变株

2.2.1 复合诱变偶联微液滴高通量培养初筛突变株

处于对数期的出发藻株 CX41 种子液, 按照 1.2.2.4 方法经 EMS-ARTP 复合诱变后避光培养 4 d, 用无菌 Basal 液体培养基稀释并转入微生物微液滴培养仪 (MMC-B2) 中进行培养, 过程中实时检测微液滴 OD₄₅₀ 值以鉴别高生长速率的微液滴。结果表明, 100 个微液滴的 OD₄₅₀ 值随着培养时间的延长不断上升, 短时间内可达到仪器 OD 检测上限 15。此时手动剔除 OD₄₅₀ 排名后 50% 的微液滴, 将排名前 50% 的微液滴扩培 1 次。全过程液滴共扩培 3 次, 随后进行 1 次手动传代。最终挑选出传代前后 OD₄₅₀ 均为最高的微液滴 (编号 23)。培养过程生长曲线如图 3 所示。收集该微液滴进行稀释后涂布在 Basal 固体培养基 (10 g·L⁻¹ 葡萄糖、1.25 g·L⁻¹ 硝酸钠) 中, 30 ℃ 避光

培养至单藻落出现。以藻落出现时间和藻落直径大小 为指标进行初筛, 共挑选了 30 个单藻落 (即突变株), 同时平板划线培养保种。

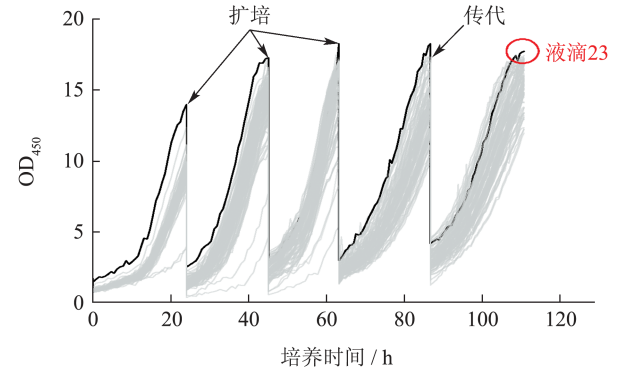


图 3 MMC 中 100 个微液滴扩培和传代过程的生长曲线
Fig.3 Growth curve of 100 microdroplets in MMC system with amplification and passage

2.2.2 30 个突变株的微孔板高通量培养复筛

表 1 微孔板培养下 22 个突变株与出发藻株 CX41 的比较
Table 1 Comparison of 22 mutant strains with the original strain

CX41 grown in a 48 well plate			
	平均比生长速率 /(d ⁻¹)	细胞密度 /(×10 ⁸ cells·mL ⁻¹)	生物量 /(g·L ⁻¹)
CX41	0.97 ± 0.00	2.44 ± 0.02	4.17 ± 0.05
Y1	0.99 ± 0.00	2.62 ± 0.00	4.31 ± 0.02
Y2	0.96 ± 0.01	2.35 ± 0.06	4.11 ± 0.11
Y3	0.96 ± 0.01	2.29 ± 0.10	4.04 ± 0.18
Y4	0.97 ± 0.00	2.45 ± 0.02	3.57 ± 0.23
Y5	1.00 ± 0.00	2.68 ± 0.00	4.29 ± 0.00
Y6	0.99 ± 0.01	2.62 ± 0.13	4.25 ± 0.05
Y7	1.00 ± 0.00	2.75 ± 0.02	4.54 ± 0.18
Y8	0.93 ± 0.01	2.06 ± 0.04	3.68 ± 0.03
Y9	1.01 ± 0.00	2.86 ± 0.02	4.35 ± 0.08
Y10	0.96 ± 0.01	2.36 ± 0.08	4.1 ± 0.10
Y11	1.01 ± 0.00	2.84 ± 0.00	4.38 ± 0.11
Y12	0.95 ± 0.00	2.27 ± 0.02	3.93 ± 0.07
Y13	0.96 ± 0.00	2.28 ± 0.02	4.13 ± 0.02
Y14	0.90 ± 0.00	1.82 ± 0.00	3.93 ± 0.00
Y15	0.96 ± 0.00	2.31 ± 0.04	3.92 ± 0.01
Y16	0.97 ± 0.00	2.4 ± 0.02	3.61 ± 0.04
Y17	0.88 ± 0.00	1.68 ± 0.02	3.64 ± 0.07
Y18	0.82 ± 0.00	1.36 ± 0.02	3.13 ± 0.00
Y19	0.83 ± 0.00	1.4 ± 0.00	3.81 ± 0.15
Y20	0.96 ± 0.00	2.33 ± 0.02	3.93 ± 0.20
Y21	0.94 ± 0.00	2.15 ± 0.04	3.22 ± 0.08
Y22	1.00 ± 0.01	2.77 ± 0.14	4.2 ± 0.01

从 30 株划线平板上再次挑选了 22 株生长快的突变株，于 48 孔板中进行培养复筛，其比生长速率、细胞密度及生物量如表 1 所示。由表 1 可见，22 个突变株的生长情况存在一定差异，这是由于 ARTP 诱变具有随机性^[24]。Y1、Y5、Y6、Y7、Y9、Y11 和 Y22 的平均比生长速率和细胞密度均显著高于出发藻株 CX41 ($P<0.05$)，其中突变株 Y9 的最终细胞密度最高，达到 2.86×10^8 cells·mL⁻¹；Y7 的最终生物量最高 (4.54 g·L⁻¹)，分别比 CX41 提高了 17.21% 和 8.87%，而其他突变株的生物量与 CX41 无显著差异。综合三项指标（即平均比生长速率、细胞密度和生物量均高于出发藻株 CX41），在 22 株突变株中挑选出排名前 7 的优势突变株为 Y1、Y5、Y6、Y7、Y9、Y11、Y22，进行下一步的摇瓶培养验证。

2.2.3 7个优势突变株的摇瓶培养复筛

2.2.3.1 7个突变株的细胞生长和生物量生产性能

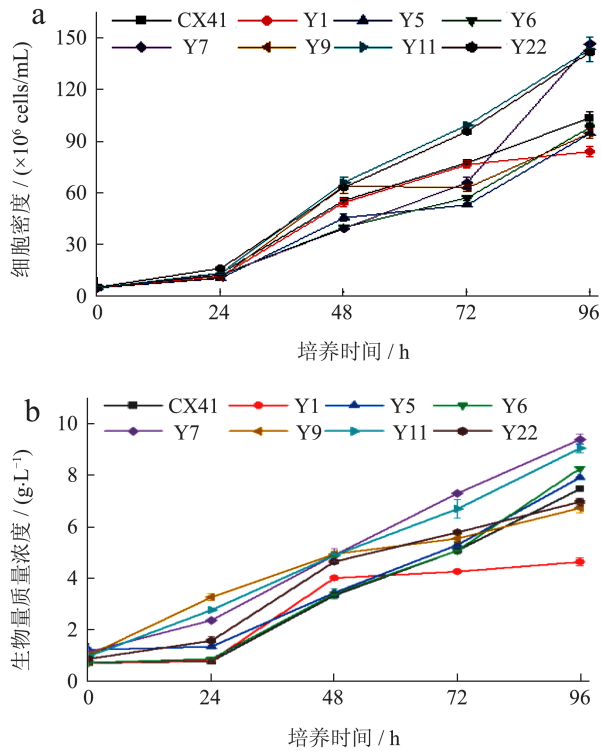


图 4 摇瓶培养中 7 个突变株与出发藻株 CX41 的细胞密度和生物量质量浓度比较

Fig.4 Comparison of cell density and biomass among 7 mutant strains and the original strain CX41 cultured in shake flask

上述 7 个突变株按 1.2.5 条件避光培养 96 h，其细胞密度和生物量如图 4 所示。Y7 和 Y11 的细胞密度 (1.46 和 1.44×10^8 cells·mL⁻¹) 和生物量 (9.4 和 9.05 g·L⁻¹) 均极显著高于出发藻株 CX41 ($P<0.01$)，说明复合诱变能显著提高突变株的生长性能。Wei

等^[26]使用 ARTP 对 *Scenedesmus* sp. 进行诱变，同样提高了生物量，推测可能是由于突变导致某些关键酶的表达水平或代谢物的积累途径发生了变化。然而 Y5、Y9、Y6、Y22 的生物量和细胞密度之间不成正相关，可能是突变株内容物含量差异及细胞大小差异所致^[12]。有研究表明，微孔板中细胞生长可能存在边缘效应，不同类型微孔间发酵液的产量存在显著性差异^[27]。也有研究表明，相比 48 孔板，24 孔板与摇瓶发酵产量的相关性提高但二者间仍存在差异^[28]。由此推测，摇瓶复筛与 48 孔板初筛结果相比，部分突变株的细胞密度和生物量的优势有所下降，可能是微孔板中微孔间溶氧量、孔间水分蒸发量等不均导致的，而摇瓶不存在这个问题。

2.2.3.2 7个突变株的蛋白生产性能比较

7 个突变株在摇瓶中黑暗培养下蛋白质含量、产量及产率如图 5 所示。经复合诱变后，部分突变株的蛋白含量和产量有所增加，其中 Y9 和 Y11 的蛋白含量极显著高于出发藻株 CX41 ($P<0.01$)；蛋白产量最高的三个突变株依次为 Y11、Y7 和 Y5。可见，突变株 Y11 的蛋白产能最佳，蛋白含量、产量及产率分别达到 55.54 g/100 g 干重、 5.02 g·L⁻¹ 和 1.26 g·(L·d)⁻¹，均极显著高于其他突变株和出发藻株 ($P<0.01$)，相较于出发藻株 CX41 分别提高了 25.60%、52.12% 和 51.81%。Liu 等^[23]使用 ARTP-MMC 的诱变筛选方法获得黄色蛋白核小球藻突变株 MMC-8，其蛋白质含量高达 63.26 g/100 g 干重，为目前已知黄色蛋白核小球藻突变株库中最高的蛋白质含量，但其生物量受到抑制，蛋白产量为 4.42 g·L⁻¹。该实验中突变株 Y11 的蛋白产量高于 MMC-8，说明复合诱变能提升突变株 Y11 的蛋白产量，具有良好的发酵产微藻蛋白的应用潜力。

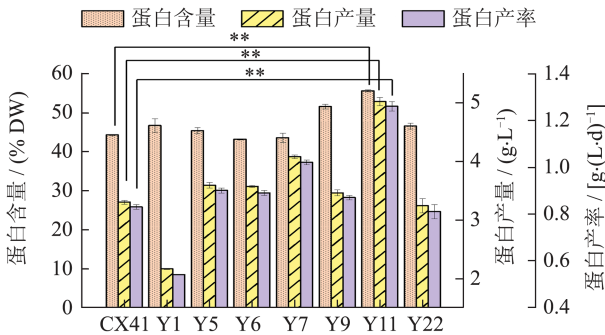


图 5 摇瓶培养中 7 株突变株与出发藻株 CX41 的蛋白生产性能比较

Fig.5 Comparison of protein production capability among 7 mutant strains and the original strain CX41 cultured in shake flask

注：** 表示 $P<0.01$ 。

2.2.3.3 最优突变株Y11的氨基酸组成分析

对蛋白生产性能最优的突变株 Y11 做进一步的氨基酸分析，与相同培养条件下出发藻株 CX41 的氨基酸组成比较结果见表 2。最优突变株 Y11 的氨基酸总量达到 39.52 g/100 g 干重，较出发藻株 CX41 提高了 30.21%；18 种氨基酸含量均提高，其中精氨酸含量增幅最大，较出发藻株 CX41 提高了 51.75%。进一步分析显示，必需氨基酸（Essential Amino Acid, EAA）总量为 16 g/100 g 干重，占氨基酸总量的 40%；支链氨基酸（Branched-chain Amino Acids, BCAA）作为一类对肌肉合成至关重要的氨基酸，其总量达到 6.96% 干重，比 CX41 提高了 27.35%。此外，非必需氨基酸（Non-Essential Amino Acids, NEAA）总量为 23.52 g/100 g 干重。通过计算得到 EAA/NEAA 为 0.68，符合 FAO/WHO 推荐的理想蛋白标准参考值（EAA/TAA 在 40% 左右，EAA/NEAA 在 60% 以上）^[29]。

表 2 突变株Y11和出发藻株CX41的氨基酸组成比较
Table 2 Comparison of amino acid composition between mutant strain Y11 and the original strain CX41

Amino acids (AA, g/100 g 干重)	CX41	Y11
Total AA	30.35 ± 0.54	39.52 ± 0.90
Lys	2.22 ± 0.03	2.89 ± 0.06
Trp	0.51 ± 0.00	0.68 ± 0.00
Phe	1.49 ± 0.01	1.94 ± 0.04
Met	1.66 ± 0.06	1.74 ± 0.02
Thr	1.41 ± 0.01	1.79 ± 0.02
Val (BCAA)	1.67 ± 0.02	2.12 ± 0.05
Ile (BCAA)	1.21 ± 0.03	1.57 ± 0.05
Leu (BCAA)	2.59 ± 0.05	3.27 ± 0.10
Total BCAA	5.47 ± 0.10	6.96 ± 0.20
Total EAA	12.76 ± 0.21	16.00 ± 0.34
His	0.72 ± 0.00	0.91 ± 0.02
Asp	2.84 ± 0.10	3.61 ± 0.09
Ser	1.33 ± 0.04	1.66 ± 0.04
Glu	3.98 ± 0.05	5.51 ± 0.08
Gly	1.68 ± 0.04	2.22 ± 0.06
Ala	2.55 ± 0.05	3.08 ± 0.07
Cys	0.18 ± 0.00	0.25 ± 0.00
Tyr	0.95 ± 0.02	1.45 ± 0.05
Arg	2.28 ± 0.02	3.46 ± 0.11
Pro	1.08 ± 0.01	1.37 ± 0.04
Total NEAA	17.59 ± 0.33	23.52 ± 0.56
EAA/NEAA	0.72 ± 0.00	0.68 ± 0.00
EAA/TAA	0.42 ± 0.00	0.40 ± 0.00

依据必需氨基酸组成计算得到氨基酸评分表，如表 3 所示。可见，Y11 的氨基酸评分达到 94.41，限制性氨基酸为缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸，其中，异亮氨酸为第一限制性氨基酸，其余氨基酸均高于 FAO/WHO 所推荐的营养模式标准^[29]。与出发藻株 CX41 相比，尽管 Y11 在蛋氨酸和半胱氨酸的评分上略有下降，具体数值为 35.65，但其整体氨基酸评分实现提升，氨基酸组成更优。鉴于 Y11 的综合优势，该突变株在微藻发酵生产替代蛋白领域具有良好的应用潜力，可作为未来食品工业中一种高效、可持续的优质蛋白来源。

表 3 突变株Y11和出发藻株CX41的氨基酸评分比较
Table 3 Comparison of amino acid scores between mutant strain Y11 and the original strain CX41

Strains	FAO/WHO model	CX41	Y11
Thr	23.00	31.78 ± 0.28	32.3 ± 0.42
Val	39	37.77 ± 0.55	38.1 ± 0.97
Met+Cys	22	41.48 ± 1.37	35.65 ± 0.4
Ile	30	27.27 ± 0.64	28.32 ± 0.83
Leu	59	58.45 ± 1.16	58.82 ± 1.75
Phe+Tyr	38	55 ± 0.79	60.93 ± 1.73
Lys	45	50.28 ± 0.69	52.1 ± 1.08
Trp	6	11.48 ± 0.06	12.22 ± 0.06
Amino acid score (AAS)	100	90.92 ± 2.14	94.41 ± 2.78

2.2.3.4 Y11突变株的叶黄素含量

突变株 Y11 藻粉中叶黄素含量、产量及产率分别达到 1.12 mg·g⁻¹、10.10 mg·L⁻¹ 和 2.52 mg·(L·d)⁻¹，相较于出发藻株 CX41 [1.07 mg·g⁻¹、7.96 mg·L⁻¹、1.99 mg·(L·d)⁻¹] 分别提高了 4.67%、26.88%、26.63%，尽管 Y11 的叶黄素含量尚未达到 Gong 等^[30] 利用 ARTP 获得的普通小球藻（*Chlorella pyrenoidosa*）突变株 A19 的 5 mg·g⁻¹ 高水平，但显著高于 Mafalda 等^[13] 利用 EMS 诱变的小球藻（*Chlorella vulgaris*）突变株 37Y01（叶黄素含量为 0.31 mg·g⁻¹），一定程度上增强了其作为富含叶黄素的藻蛋白原料的应用前景。

3 结论

本研究以蛋白核小球藻黄色突变株 CX41 为出发藻株，首先建立了化学-物理法复合诱变的最佳条件：EMS 处理浓度 400 mmol·L⁻¹，ARTP 诱变时间 20 s。进而构建了 EMS-ARTP 复合诱变耦合微液滴高通量培养、微孔板高通量培养筛选高蛋白突变株的方法体系，选育到高产蛋白的最优突变株 Y11，其在含 30 g·L⁻¹

葡萄糖和 $3.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钠的 Basal 培养基中摇瓶避光发酵 4 d, 其比生长速率 (0.83 d^{-1})、生物量 ($9.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和蛋白产能 ($5.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 均显著高于出发藻株 CX41 ($P < 0.05$), 叶黄素产量 ($10.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为出发藻株 CX41 的 1.27 倍, 氨基酸评分高达 94.41, 是一株发酵法生产微藻蛋白的优良藻株, 丰富了低叶绿素且高蛋白的小球藻突变株库, 为目前具最高蛋白产量的黄色蛋白核小球藻, 在微藻源替代蛋白生产领域及新型食品补充剂领域具有良好的应用潜力。

参考文献

- [1] 刘延峰, 邓梦婷, 陈坚. 微生物替代蛋白生物制造: 进展与展望[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 1-5.
- [2] NSERABADI M N, DOOST A S, MEZZENGA R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106789.
- [3] FATIMA N, EMAMBUX M N, OLAIMATL A N, et al. Recent advances in microalgae, insects, and cultured meat as sustainable alternative protein sources [J]. Food and Humanity, 2023, 1: 731-741.
- [4] WANG Z J, ZHOU Z, WANG Z Y, et al. Cultivation of *Chlorella* for biomass production and nutrient removal from unsterilized human urine containing washing powder wastewater [J]. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 2023, 45(4): 12899-12908.
- [5] KYUNG J C, MIN U K, GEUM J J, et al. Optimization of protease treatment conditions for *Chlorella pyrenoidosa* protein extraction and investigation of its potential as an alternative protein source [J]. Foods, 2024, 13(3): 366.
- [6] JIN H, CHUAI W H, LI K P, et al. Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* for biomass production [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(10): 4138-4151.
- [7] CECCHIN M, BENFATTO S, GRIGGIO F, et al. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 6465.
- [8] 肖雪花. 提高异养小球藻蛋白质含量的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2021.
- [9] SAHNI P, AGGARWAL P, SHARMA S, et al. Nuances of microalgal technology in food and nutraceuticals: a review [J]. Nutrition and Food Science, 2019, 49(5): 866-885.
- [10] GEADA P, MOREIRA C, SILVA M, et al. Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties [J]. Bioresource Technology, 2021, 332: 125125.
- [11] 梁英, 陈书秀. 微藻育种的研究现状及前景[J]. 海洋通报, 2008, 3: 88-94.
- [12] 陈霄. 叶绿素合成缺陷型蛋白核小球藻突变株的选育及其系统评价[D]. 广州: 华南理工大学, 2023.
- [13] TROVÃO M, CARDOSO L, SCHÜLER L, et al. Oxyfluorfen: a novel metabolic inhibitor to select microalgal chlorophyll-deficient mutant strains for nutritional applications [J]. Algal Research, 2024, 81: 103572.
- [14] HUANG W P, LIN Y, HE M X, et al. Induced high-Yield production of zeaxanthin, lutein, and β -carotene by a mutant of *Chlorella zofingiensis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(4): 891-897.
- [15] 魏婷婷. 高产油蛋白核小球藻~(60)Co- γ 射线诱变育种的初步研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
- [16] 杨端鹏, 李仲先, 王胜男, 等. 微藻基因诱变研究及应用进展[J]. 海洋科学, 2021, 45(11): 165-178.
- [17] ZHU Z, CHEN W, CAO L, et al. ARTP/NTG compound mutagenesis improved the spinosad production and the insecticidal virulence of *Saccharopolyspora spinosa* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(22): 12308.
- [18] 赵盛, 李玲玲, 高翔, 等. 基于紫外-ARTP复合诱变选育高效MTBE降解突变菌株[J]. 环境科学与技术, 2025, 48(2): 88-95.
- [19] JAYDENE M, STEVEN M, JHANINE B S, et al. Microbial screening reveals oralsite-specific locations of the periodontal pathogen *Selenomonas noxia* [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2021, 43(1): 353-364.
- [20] WANG Y T, ZHANG X X, SHANG L R, et al. Thriving microfluidic technology [J]. Science Bulletin, 2020, 66(1): 9-12.
- [21] 魏东, 陈霄. 一种蛋白核小球藻叶绿素合成缺陷型突变株及其应用: 中国, CN116574613A[P]. 2023-12-01.
- [22] 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.
- [23] LIU Y, CHEN X, WEI D. Rapid screening of high-protein *Auxenochlorella pyrenoidosa* mutant by an integrated system of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput microbial microdroplet culture [J]. Algal Research, 2024, 80: 103509.
- [24] 唐晨旻, 张劲松, 刘艳芳, 等. 常压室温等离子体诱变育种与微生物液滴培养筛选技术应用进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1177-1194.
- [25] 王方方. 异养小球藻ARTP诱变育种试验研究[J]. 食品安全导刊, 2024, 21: 123-126.
- [26] WEI W Q, HUANG F. Analysis of oil accumulation mechanisms in plasma induced mutant *Scenedesmus* strains compared to original *Scenedesmus* strains [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 21250.
- [27] ZHAO X D, ROLAND K, THOMAS B. Evaluation of microtiter plate as a high-throughput screening platform for beer fermentation [J]. European Food Research and Technology, 2022, 248(7): 1831-1846.
- [28] 周健, 李翔飞, 李闯, 等. 游动放线菌产阿卡波糖高通量筛选模型的建立及优化[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20): 73-80.
- [29] NOACK R. NAHRUNG. Energy and protein requirements: report of a joint FAO/WHO Ad Hoc expert committee, rome, 22 March-2 April 1971 [M]. Food and Agriculture Organization, 1973.
- [30] GONG Q, WANG J, ZHAO W, et al. Development of fast-growing chlorophyll-deficient *Chlorella pyrenoidosa* mutant using atmospheric and room temperature plasma mutagenesis [J]. Bioresource Technology, 2025, 422: 132245.