

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.04.024

岳海艳, 刘小杰, 孙敏, 等. 蛋白核小球藻的培养及应用研究[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(4): 178-184.

YUE H Y, LIU X J, SUN M, et al. Cultivation and application of *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(4): 178-184.

蛋白核小球藻的培养及应用研究

岳海艳¹, 刘小杰¹✉, 孙敏¹, 李娜¹, 刘占峰²

(1. 上海城建职业学院, 上海 201415;

2. 上海化工研究院有限公司, 上海 200062)

摘要: 选用密闭气升式反应器进行自培养蛋白核小球藻, 通过单因素优化获得碳源二氧化碳的通氧量 2%, 氮源硝酸钠为 10 g/L; 通过对蛋白核小球藻培养基的均匀设计, 获得了适宜的培养基组成: 磷酸氢二钾 0.6 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L, 硝酸钠 11 g/L, 硫酸钾 0.8 g/L, 柠檬酸铁胺 0.006 g/L, 氯化钙 0.05 g/L, 维生素 B₁ 0.11 g/L, EDTANa₂ 0.01 g/L, 钨酸钠 0.08×10⁻³ g/L, 氯化镍 0.02×10⁻³ g/L; 实验采用中间白光四周彩光的合适光源, 用除氧剂使氧气维持在 20%左右, 获得了 8.648 g/L 的干菌体。经分析, 蛋白核小球藻蛋白质含量高达 58 g/100 g, 同时含有丰富的氨基酸和矿物质元素。用蛋白核小球藻替代艾草粉, 制作出了蛋白核小球藻青团。

关键词: 气升式反应器; 蛋白核小球藻; 培养; 青团

中图分类号: Q815, TS213.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)04-0178-07

网络首发时间: 2022-06-30 18:51:39

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.ts.20220629.1739.026.html>

Cultivation and Application of *Chlorella pyrenoidosa*

YUE Hai-yan¹, LIU Xiao-jie¹✉, SUN Min¹, LI Na¹, LIU Zhan-feng²

(1. Shanghai Urban Construction Vocational College, Shanghai 201415;

2. Shanghai Research Institute of Chemical Industry Co. Ltd, Shanghai 200062)

Abstract: A closed gas-up reactor was selected for self-cultured *Chlorella pyrenoidosa*, the ventilation of carbon dioxide from carbon source obtained by univariate optimization was 2%, and the sodium nitrate of nitrogen source was 10 g/L. More suitable medium components were obtained through the uniform design of *Chlorella pyrenoidosa* culture medium: K₂HPO₄ of 0.6 g/L, MgSO₄ of 0.2 g/L, NaNO₃ of 11 g/L, K₂SO₄ of 0.8 g/L, ammonium ferric citrate of 0.006 g/L, CaCl₂ of 0.05 g/L, vitamin_{B1} of 0.11 g/L, EDTANa₂ of 0.01 g/L, Na₂WO₄ of 0.08×10⁻³ g/L, NiCl₂ of 0.02×10⁻³ g/L; In the experiment, a suitable light source with intermediate white light and surrounding colored light was used, and the oxygen was maintained at about 20% with an oxygen scavenger, under which 8.648 g/L dry cell was obtained finally. The protein content of *Chlorella pyrenoidosa* is as high as 58 g/100 g, and the amino acid and mineral elements of *Chlorella pyrenoidosa* is also rich by analysis. We studied the replacement of wormwood powder with *Chlorella*

收稿日期: 2022-04-04

基金项目: 上海城建职业学院教育科学研究项目 (cjky202106)

Supported by: Educational Science Research Project of Shanghai Urban Construction Vocational College (No. cjky202106)

作者简介: 岳海艳, 女, 1966 年出生, 硕士, 副教授, 研究方向为功能食品加工与检测。E-mail: 372100627@qq.com.

通讯作者: 刘小杰, 男, 1973 年出生, 博士, 高级工程师, 研究方向为功能食品与发酵工程。E-mail: liuxiaojie2000@163.com.

pyrenoidosa, and produced *Chlorella pyrenoidosa* qingtuan.

Key words: airlift reactor; *Chlorella pyrenoidosa*; cultivation; qingtuan

蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 为绿藻门小球藻属普生性单细胞绿藻, 是一种球形单细胞淡水藻类, 通常以光合自养生长繁殖, 分布极广。蛋白核小球藻含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质、食物纤维、核酸、不饱和脂肪酸及叶绿素等, 具有降脂、降压、降血糖、预防和改善动脉粥样硬化等功能^[1-2], 尤其小球藻特有的生长因子, 使其具有排除体内毒素、促进新陈代谢、补充人体营养、提高细胞再生能力以及增强人体免疫力等功效^[3-5]; 美国和日本将小球藻作为优良食品和动物饲料添加剂已有 30 多年的历史, 近年来, 东亚和欧洲每年生产数千吨的小球藻作为饲料添加剂、保健食品和营养补充食品^[6]。2012 年底《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》将蛋白核小球藻列为新资源食品^[7], 丰富了国内藻类健康食品种类, 已经应用于大米、酿酒、豆腐、发酵乳制品、面条、饼干和面包等^[8-12], 将来在功能性食品中必然有着更广阔的应用前景^[13]。

目前蛋白核小球藻培养方法很多, 其培养方式包括密闭无菌培养法、开放半无菌培养法、开放藻菌混养法等^[14-20]。生长方式有自养和异养生长两种, 随着碳氮比 (C/N) 和光照条件变化在自养和异养之间自由转变^[21]。由于开放和半开放培养方式容易使杂菌, 尤其是有害细菌进入, 并繁殖, 使菌体遭到污染, 不宜食用; 自养向异养转化过程伴有叶绿素和叶绿体的消失, 类胡萝卜素和叶黄素降低, 蛋白质含量减少以及脂肪急剧增加等问题^[22]。因此本文探索一种利用气升反应器高密度培养食品用蛋白核小球藻的方法, 即采用密闭无菌的自养方式, 并首次将获得的蛋白核小球藻用于青团制作。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

FAZHB-5 小球藻: 中科院水生生物研究所; 硝酸钠 (AR)、硫酸钾 (AR)、柠檬酸铁铵 (CP)、钨酸钠 (AR)、浓硫酸 (AR)、硝酸 (AR) 等;

国药集团化学试剂有限公司; 磷酸氢二钾 (AR)、氯化钙 (AR)、乙二胺四乙酸二钠 (AR): 上海展云化工有限公司; 钼酸钠 ($\geq 99\%$): 上海化学试剂有限公司; 硫酸镁 (AR): 上海强盛功能化学股份有限公司; 铁质除氧剂: 上海化工研究院有限公司; 糯米粉、水晶饺子粉以及豆沙馅等: 市售; AccQ.Tag 分析蛋白水解氨基酸方法试剂包: 济南赛畅科学仪器有限公司。

1.2 仪器与设备

IRH-IS160 二氧化碳培养/振荡培养一体箱: 北京陆希科技有限公司; 大容量离心机: UNION 5KR Hanil Science Industrial Co., Ltd; CX41 显微镜: Olympus Optical Co., LTD; TGL-16aR 台式冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂; BCD626WD11HP 容声冰箱: 海信容声 (广东) 冰箱有限公司; MP1002 电子天平: 上海民桥电子仪器厂; HX12L-0179 立式压力蒸汽灭菌锅: 上海华线医用核子仪器有限公司; GY-FYQ-1812-ZZ 微藻培养光生物反应器: 上海光语生物科技有限公司; 海能 K1100 全自动凯氏定氮仪: 上海力晶科学仪器有限公司; L8900 全自动氨基酸分析仪: 广州仪德精密仪器股份有限公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES): PerkinElmer Avio200, MA, USA。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白核小球藻培养工艺

将 FAZHB-5 小球藻接种于无菌发酵培养基中, 装置密闭, 气体装置内循环, 根据设置自动通入无菌二氧化碳, 保持装置内二氧化碳 2% 浓度, 氧气 21%, 温度 25 °C, 12 h 光照/d, 培养 8 d。

1.3.2 碳源和氮源优化

采用单因素实验, 以 FAZHB-5 小球藻为出发菌株, BG11 为培养基, 100 mL/250mL 锥形瓶装液量, 转速 100 r/min, 在二氧化碳培养/振荡培养一体箱中 12 h 光照/24 h 培养 4 d, 考察二氧化碳不同浓度对小球藻生长的影响。

采用单因素实验, 以 FAZHB-5 小球藻为出发

菌株, 2%二氧化碳作为碳源, 固定 BG11 培养基中除硝酸钠以外其他成分, 100 mL/250 mL 锥形瓶装液量, 转速 100 r/min, 在二氧化碳培养/振荡培养一体箱中 12 h 光照/24 h 培养 4 d, 观察不同硝酸钠加入量对菌体生长影响。

1.3.3 培养基以及均匀设计

BG11 培养基 (g/L): NaNO_3 1.5, K_2HPO_4 0.04, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁铵 0.006, EDTANa_2 0.001, Na_2CO_3 0.02, A_5 1 mL。

A_5 (痕迹金属, g/L): H_3BO_3 2.86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.86, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH 7.1。

在二氧化碳含量、温度、光照以及培养时间不变, 借鉴 BG11 培养基并参考相关文献^[14-20], 采用 10 因素 12 水平均匀设计, 见表 1。依次改变硝酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁等培养基成分含量, 测定不同培养基组成条件下的干菌体质量。

表 1 均匀设计要素

Table 1 The essential factor for the uniform design

代码	因素	因素水平
X ₁	磷酸氢二钾/(g/L)	0.01~3.2
X ₂	柠檬酸铁铵/(g/L)	0.01~0.4
X ₃	硫酸镁/(g/L)	0.01~0.22
X ₄	硝酸钠/(g/L)	1~12
X ₅	氯化钙/(g/L)	0.01~0.22
X ₆	硫酸钾/(g/L)	0.1~2.2
X ₇	维生素 B ₁ /(g/L)	0.1~0.12
X ₈	EDTA 二钠盐/(g/L)	0.000 5~0.04
X ₉	氯化镍/(g/L)×10 ⁻³	0.01~0.12
X ₁₀	钨酸钠/(g/L)×10 ⁻³	0.01~0.12

1.3.4 光源选择

设备配备了内置和外置 LED 光源, 白色: 10 000 lux; 红: 蓝为 4: 1 的彩光: 5 000 lux。

1.3.5 超量氧气去除方法

采用铁质除氧剂吸收过量氧气。

1.3.6 干菌体重量

将一定体积的培养液经 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 收集湿菌体, 经 80 °C 烘干至恒重, 利用精密电子天平称重。

1.3.7 蛋白核小球藻营养成分测定

1.3.7.1 采用全自动凯氏定氮仪检测蛋白核小球

藻蛋白质含量 依据 GB5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》第一法, 将 10 mL 浓硫酸和 1 片催化剂(0.5 g 硫酸铜和 6 g 硫酸钾)加入到装有 0.5 g 蛋白核小球藻粉的消化管中, 200 °C 消化 1 h, 然后 420 °C 继续消化 1 h; 消化液冷却后上机。

1.3.7.2 利用全自动氨基酸分析仪测定氨基酸组成和含量 将 50 mg 小球藻粉加入到 1 mL 6 mol/L 盐酸中, 110 °C 酸解 24 h。取 200 μL 液体加入 535 μL 2 mol/L 氢氧化钠中和, 用 AccQ•Tag Ultra Borate 缓冲液稀释 2 倍。取上述溶液 10 uL 加入 70 μL AccQ•Tag Ultra Borate 缓冲液和 20 μL AccQ•Tag 试剂中, 55 °C 加热 10 min, 冷却后上机。

1.3.7.3 采用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定矿物质元素含量 称取 25 mg 小球藻, 加入到装有 1 mL 硝酸溶液的确煮管中, 沸水蒸煮 1 h, 加去离子水定容至 10 mL, 用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定矿物质元素。

光谱条件: 低波范围 5; 高波范围 5; 最大积分时间 30 s; 样品冲洗时间 30 s; 重复次数 3; 泵延时间 5 s。

1.3.8 蛋白核小球藻青团配方

基础配方 (g): 糯米粉 150, 水晶饺子粉 (澄面) 50, 猪油 10, 海藻糖 30, 水 180, 豆沙馅 250。

2 结果与分析

2.1 碳源对菌体生长影响

自养培养的小球藻, 二氧化碳既作为碳源, 又是光合作用的底物, 其浓度影响着菌体的生长以及淀粉的累积, 在一定范围内, 光合作用速率随二氧化碳浓度升高而加快, 但达到一定浓度后, 光合作用速率不再加快, 这主要是因为高浓度的二氧化碳易使培养基酸化, 抑制了菌体生长。

二氧化碳不同浓度对小球藻生长的影响, 实验结果见表 2。从表 2 的结果可以看出, 二氧化碳浓度在 0.4%到 2%区间内, 随着二氧化碳浓度提高, 小球藻菌体量 (以 OD 值表示) 不断提高, 但当二氧化碳浓度超过 2%后, 反而不利用于菌体生长, 因此下面的研究中, 选择 2%浓度二氧化碳作为碳源的最适浓度。

表2 二氧化碳通气量对小球藻生长影响
 Table 2 Effect of carbon dioxide aeration rate on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

序号	二氧化碳浓度/%	OD/ (600 nm)
1	0	0.000
2	1	0.263
3	2	0.503
4	3	0.242
5	4	-0.100

注：吸光度以发酵液 0 h 作为对照。

Note: The absorbance of the fermentation broth at 0 h was used as the control.

2.2 氮源对菌体生长影响

小球藻能够利用硝酸盐作为氮源, 进行生长, 并合成蛋白质、淀粉等^[23], 不同硝酸钠加入量对菌体生长的影响, 实验结果如表 3 所示。从表 3 的结果可以看出, 10 g/L 的硝酸钠更适合小球藻生长。继续提高硝酸钠的添加量, 菌体生长反而受到抑制, 其作用机理有待进一步研究。

表3 硝酸钠加入量对小球藻生长影响
 Table 3 Effect of sodium nitrate addition on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

序号	硝酸钠/(g/L)	OD/ (600 nm)
1	5	0.127
2	10	0.763
3	15	0.496
4	20	0.335
5	25	0.189

注：吸光度以发酵液 0 h 作为对照。

Note: The absorbance of the fermentation broth at 0 h was used as the control.

2.3 培养基优化

小球藻培养基主要以碳源、氮源和无机盐为主, 在以 FAZHB-5 小球藻为出发菌株, 2%二氧化碳作为碳源, 100 mL/250 mL 锥形瓶装液量, 转速 100 r/min, 在二氧化碳培养/振荡培养一体箱中 12 h 光照/24 h 培养 4 d, 通过对磷酸氢二钾、硫酸镁、硝酸钠、硫酸钾、柠檬酸铁胺、氯化钙、维生素 B₁、EDTANa₂、钨酸钠、氯化镍进行如表 1 的 10 因素 12 水平均匀实验, 获得了优化后的培养基成分, 实验设计和结果见表 4。

对表 4 的数据进行二次多项式逐步回归分析, 得出拟合线性回归方程如下:

$$Y=1.3X_1+0.006X_2+0.2X_3+7.0X_4+0.01X_5+2.0X_6+0.01X_7+0.001X_8+4\times 10^{-5}X_9+6\times 10^{-5}X_{10},$$

$$\text{其中: } R^2=0.999\ 998, F=159\ 230\ 7, P=0.000\ 6。$$

从而可以获得优化后的培养基组成: 磷酸氢二钾 0.6 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L, 硝酸钠 11 g/L, 硫酸钾 0.8 g/L, 柠檬酸铁胺 0.006 g/L, 氯化钙 0.05 g/L, 维生素 B₁ 0.11 g/L, EDTANa₂ 0.01 g/L, 钨酸钠 0.08×10⁻³ g/L, 氯化镍 0.02×10⁻³ g/L, 理论上可以获得 8.500 g/L 干菌体。

以 2%二氧化碳为碳源, 按照优化培养基组成, 利用密闭的气升式生物反应器为培养装置, 在控制无菌二氧化碳进入情况下, 气体内部循环, 进行 3 次重复培养, 测得菌体干重分别为 8.539、8.648 和 8.407 g/L, 基本达到甚至超过优化水平, 与模型预测值较接近, 说明该回归方程较可靠。

表4 均匀实验设计及结果

Table 4 The design and results of uniform experiment

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	干菌体/(g/100 mL)
1	0.01	0.02	0.04	4	0.08	1.0	0.08	0.0240	10	12	0.480
2	0.05	0.06	0.10	8	0.20	2.2	0.03	0.0080	7	11	0.513
3	0.10	0.10	0.16	12	0.02	0.8	0.11	0.0005	4	10	0.510
4	0.20	0.20	0.22	3	0.12	2.0	0.06	0.0280	1	9	0.334
5	0.40	0.30	0.02	7	0.22	0.6	0.01	0.0120	11	8	0.777
6	0.80	0.40	0.08	11	0.06	1.8	0.09	0.0010	8	7	0.535
7	1.20	0.01	0.14	2	0.16	0.4	0.04	0.0320	5	6	0.815
8	1.60	0.04	0.20	6	0.01	1.6	0.12	0.0160	2	5	0.090
9	2.00	0.08	0.01	10	0.10	0.2	0.07	0.0020	12	4	0.657
10	2.40	0.15	0.06	1	0.20	1.4	0.02	0.0400	9	3	0.575
11	2.80	0.25	0.12	5	0.04	0.1	0.10	0.0200	6	2	0.707
12	3.20	0.35	0.18	9	0.14	1.2	0.05	0.0040	3	1	0.835

2.4 光源种类和位置对小球藻菌体干重的影响

叶绿素是与光合作用有关的最重要的色素，它可从光中吸收能量，用来将二氧化碳转变为碳水化合物淀粉。叶绿素 a、叶绿素 b 的吸收光谱有两个，分别为波长 630~680 nm 的红光区和波长为 400~460 nm 的蓝紫光区^[24]。常用的 LED 白光，本身发出的是 450 nm 的光，相较于叶绿素所需，红光部分利用率偏低。

实验采用上述优化培养基配方，利用密闭的气升式生物反应器为培养装置，在控制无菌二氧化碳进入情况下，气体内部循环，光源为 LED 白光（10 000 lux）和红蓝彩光（4：1，5 000 lux），放置在装置内中心位置和四周位置。通过调整光源种类和位置，考察光源种类和位置对小球藻菌体干重的影响，实验结果如表 5 所示。

表 5 不同光源和位置的光照实验

光照	只有中心白色 LED 光照	增加了四周白色 LED 光照	在四周光照基础上将中心白色 LED 换成彩色 LED	四周以及中心全部为彩色 LED
发酵液体积/L	16	16	16	16
培养时间/d	8	8	8	8
菌体干重/(g/L)	2.815	4.727	8.635	3.434

从表 5 的实验结果可以看出，增加四周光照后，菌体干重比仅有中心光源增加了 70%，而中心彩色 LED 灯的更换，使菌体干重提高了 1.8 倍，比最初提高了 3 倍以上，效果非常明显；实验也发现，四周及中心全部采用彩光，菌体干重提高效果并不理想。将来全光谱的 LED 灯会更好地应用到藻类培养中。

2.5 氧气量对小球藻菌体干重的影响

氧气浓度过高，抑制小球藻生长^[25]。如果不加控制，发酵 8 d，氧气量最高可到 40%左右，因此采用除氧剂吸收过量的氧气。不同氧气浓度对菌体干重的影响如表 6 所示，从表 6 的实验结果可以看出，氧气量 20%更适合菌体生长，几乎是空气中氧气浓度。氧气量过高或过低都产生抑制，这与文献报道基本一致。

表 6 不同氧气量对菌体生长影响

氧气浓度/%	发酵液体积/L	培养时间/d	菌体干重/(g/L)
15	16	8	3.225
20	16	8	8.634
25	16	8	8.132
30	16	8	7.208
35	16	8	6.524
40	16	8	4.722

2.6 蛋白核小球藻营养成分检测

2.6.1 蛋白核小球藻蛋白质含量测定

根据 GB5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》第一法，采用全自动凯氏定氮仪，测得蛋白核小球藻蛋白质含量高达 58 g/100g，验证了密闭自养培养方式，可以获得蛋白质含量更高的蛋白核小球藻，这与前人的研究报道一致^[26]。

2.6.2 氨基酸含量测定

利用氨基酸测定仪检测了蛋白核小球藻氨基酸含量，结果表明蛋白核小球藻含有丰富的氨基酸，测定结果见表 7。

表 7 蛋白核小球藻氨基酸含量

氨基酸	小球藻/(mg/g)
L-丙氨酸	41.258
L-胱氨酸	1.652
L-赖氨酸	45.952
L-色氨酸	0.001
L-苯丙氨酸	25.147
L-亮氨酸	42.233
L-异亮氨酸	18.888
L-苏氨酸	20.204

从蛋白质和氨基酸检测结果可以看出，蛋白核小球藻均高于世界卫生组织（WHO）和联合国粮农组织（FAO）颁布的用于人类营养的蛋白质标准，是一种优质蛋白质资源^[27]。

2.6.3 蛋白核小球藻矿物质元素含量测定

根据 GB5009.268—2016《食品安全国家标准食品中多元素的测定》，采用电感耦合等离子体发射光谱仪（ICP-OES）检测该蛋白核小球藻中矿物质的含量。测定结果显示：矿物质元素 K、Ca、Mg 等含量丰富；重金属 Pb、Cr 和 Cd 含量均未

超标,符合新资源食品要求,具体结果见表8。

表8 蛋白核小球藻中主要矿物质元素含量

Table 8 Main mineral element content in *Chlorella pyrenoidosa*

矿物质元素	小球藻/(mg/kg)
Na	14.186
Mg	3.802
K	9.816
Ca	5.183
Se	0.004
Fe	0.019
Mn	0.078
Cr	0.000
Pb	0.000
Cd	0.000

2.7 蛋白核小球藻青团制作

根据基础配方,在其它配料用量不变,通过改变蛋白核小球藻的添加量,已经获得了颜色翠绿、不油腻、弹性好、口感好、无碱味等优点的蛋白核小球藻青团。

3 结论

1) 单因素优化获得碳源为2%二氧化碳,氮源为10 g/L的硝酸钠;均匀设计获得优化的培养基:磷酸氢二钾0.6 g/L,硫酸镁0.2 g/L,硝酸钠11 g/L,硫酸钾0.8 g/L,柠檬酸铁胺0.006 g/L,氯化钙0.05 g/L,维生素B₁0.11 g/L,EDTANa₂0.01 g/L,钨酸钠0.08×10⁻³ g/L,氯化镍0.02×10⁻³ g/L。

2) 实验证明氧气体积为20%时,是菌体最适宜的生长环境,LED红蓝4:1彩光替代白光,有效地弥补了白光中红蓝色的不足,更有利于光合作用进行。

3) 蛋白核小球藻粉蛋白质含量高达58 g/100g,同时含有丰富的赖氨酸、胱氨酸、丙氨酸、矿物质元素K、Ca、Mg等。

4) 利用获得的蛋白核小球藻,制作了蛋白核小球藻青团,拓展了蛋白核小球藻在食品工业中的应用领域。

参考文献:

- [1] TOKUSOGLU ÖUMK. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*[J]. J Food Sci, 2010, 68(4): 1144-1148.
- [2] BERG G, RIEDEL K, GRUBE M. Flechten-Mikrobiom: eine alte symbiose neu entdeckt[J]. Biospektrum, 2016, 22(1): 12-15.
- [3] 董黎明,汪莘,李金穗,等. 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.
- [4] DONG L M, WANG P, LI J S, et al. Analysis of nutritional components and amino acid composition of heterotrophic *Chlorella sp*[J]. Food Science, 2012, 33(3): 232-237.
- [4] 郝宗娣,刘洋洋,续晓光,等. 小球藻(*Chlorella*)活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 369-372.
- [5] HAO Z D, LIU Y Y, XU X G, et al. Research progress in active components of *Chlorella*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(12): 369-372.
- [5] 梅帅,赵凤敏,曹有福,等. 三种小球藻的蛋白质营养价值评价[J]. 营养学报, 2014, 36(5): 505-507.
- [6] MEI S, ZHAO F M, CAO Y F, et al. Evaluation of protein value in three kinds of *Chlorella*[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2014, 36(5): 505-507.
- [6] TANG D Y Y, KHOO K S, CHEW K W, et al. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products[J]. Bioresource Technology, 2020, 304: 122-997.
- [7] 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.
- [7] Ministry of Health of the People's Republic of China. Announcement on approval of four new resource foods such as *Chlorella pyrenoidosa*[J]. China Food Additives, 2013, (1): 227-228.
- [8] 孔维宝,李龙因,张继,等. 小球藻的营养保健功能及其在食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 323-328.
- [8] KONG W B, LI G N, ZHANG W, et al. Healthcare functions and applications in food industry of *Chlorella*[J]. Food Science, 2010, 31(9): 323-328.
- [9] 张帅,赵神彳,贾惜文,等. 不同胶凝剂对块状脂肪模拟物物理化学特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(16): 12-18.
- [9] ZHANG S, ZHAO S C, JIA X W, et al. Effect of different gelling agents on the physical and chemical properties of cube fat analogue[J]. Food Research and Development, 2018, 39(16): 12-18.
- [10] 王宝贝,蔡舒琳,李丽婷,等. 小球藻在食品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 341-346+352.
- [10] WANG B B, CAI S L, LI L T, et al. Applications of *Chlorella* in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 341-346+352.
- [11] 李家泳,刘锐,刘晖,等. 蛋白核小球藻韧性饼干加工工艺研究[J]. 食品工业, 2017, 38(3):35-39.
- [11] LI J Y, LIU R, LIU H, et al. The process technology of semi hard biscuit with *Chlorella pyrenoidosa*[J]. The Food Industry, 2017, 38(3): 35-39.
- [12] 罗柳茵,刘晖,刘锐,等. 蛋白核小球藻面包的加工工艺研究[J]. 食品科技, 2017, 42(3): 148-154.
- [12] LUO L Y, LIU H, LIU R, et al. Processing technology of the *Chlorella Pyrenoidosa* bread[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(3): 148-154.

- [13] 胡浩杰, 田双起, 赵仁勇, 等. 新资源可食用微藻的活性物质提取及其在食品中应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 390-396.
HU H J, TIAN S Q, ZHAO Z Y, et al. Research progress on the extraction of active substances from new resource edible microalgae and its application in food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 390-396.
- [14] 于贞, 王长海. 小球藻培养条件的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2005, 18(3): 206-211.
YU Z, WANG C H. Optimization of culture conditions of *Chlorella spp*[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2005, 18(3): 206-211.
- [15] SHI X M, JIANG Y, CHEN F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture[J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(4): 723-727.
- [16] WU Z Y, SHI X M. Rheological properties of *Chlorella pyrenoidosa* culture grown heterotrophically in a fermentor[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 279-282.
- [17] WANG X J, LI Z S. Optimization of *Chlorella pyrenoidosa*-15 photoheterotrophic culture and its use in wastewater treatment[J]. Environment science, 2012, 33 (8): 2735-2740.
- [18] WEN X B, GENG Y H. Enhanced lipid production in *Chlorella pyrenoidosa* by continuous culture[J]. Bioresour Technol, 2014, 161: 297-303.
- [19] 张正洁, 汪苹. 自养小球藻培养条件的优化[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2011, 29(1): 54-58.
ZHANG Z J, WANG P. Optimization of culture conditions of *Chlorella. Sp*[J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2011, 29(1): 54-58.
- [20] 桂林, 史贤明, 李琳, 等. 蛋白核小球藻不同培养方式的比较[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(5): 52-55.
GUI L, SHI X M, LI L, et al. Comparison of the different cultivation systems for *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2005, 26(5): 52-55.
- [21] 张大兵, 吴庆余. 小球藻细胞的异养转化[J]. 植物生理通讯, 1996, 32(2): 140-144.
ZHANG D B, WU Q Y. The heterotrophic transition of *Chlorella cell*[J]. Plant Physiology Communications, 1996, 32(2): 140-144.
- [22] ZHU S N, HUANG W, XU J, et al. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*[J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 292-298.
- [23] 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 X Y, CHEN J H, WEI D. High efficient assimilation of NO_3^- -N with coproduction of microalgal proteins by *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(6): 1150-1161.
- [24] 徐圆圆, 覃仪, 吕蔓芳, 等. LED光源在植物工厂中的应用[J]. 现代农业科技, 2016, (6): 161-162+170.
XU Y Y, QIN Y, LV M F, et al. Current status and developmental trends of LED light source utilization in plant factory[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016, (6): 161-162+170.
- [25] 张翔, 戴涌骋, 周百成. 气升式藻类光生物反应器的应用研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 14-17.
ZHANG X, ZHE Y C, ZHOU B C. Studies on the application of airlift allgal photobioreactor[J]. Marine Sciences, 2000, 24(5): 14-17.
- [26] CARL S, BACHAR Z, OTHMANE M, et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Review, 2014, 35: 265-278.
- [27] 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[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 160-167.
WEI D, ZHANG H Z, CHEN J M. Optimization of trophic modes for enhancing the production of biomass, protein, and chlorophyll from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4):160-167. 完