



渔业科学进展
Progress in Fishery Sciences
ISSN 2095-9869, CN 37-1466/S

《渔业科学进展》网络首发论文

题目: 蛋白核小球藻浓缩制品低温保藏技术研究
作者: 骆小英, 杨润青, 魏东
DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200930001
收稿日期: 2020-09-30
网络首发日期: 2021-04-15
引用格式: 骆小英, 杨润青, 魏东. 蛋白核小球藻浓缩制品低温保藏技术研究. 渔业科学进展. <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200930001>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

骆小英, 杨润青, 魏东. 蛋白核小球藻浓缩制品低温保藏技术研究. 渔业科学进展, 2021, 42

Luo XY, Yang RQ, Wei D. Study of cryopreservation technology for concentrated products of *Chlorella pyrenoidosa*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42

蛋白核小球藻浓缩制品低温保藏技术研究*

骆小英 杨润青 魏东^①

(华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510640)

摘要 本研究以离心和重悬工艺获得的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)浓缩藻膏(8×10^{10} cells/ml)和浓缩藻液(1×10^8 cells/ml)为研究对象,系统评价了巴氏杀菌以及保藏温度[室温(25℃)和4℃]对短期避光保藏下细胞相对活性和营养保持率的影响。结果显示,巴氏杀菌处理会引起2种蛋白核小球藻浓缩制品的褐变,室温保藏会加速它们的腐败。浓缩制品可在4℃低温下直接保藏15 d,浓缩藻膏中总叶绿素、总类胡萝卜素和蛋白质含量分别为保藏前的97.20%、100%和98.20%;浓缩藻液中总叶绿素、总类胡萝卜素和蛋白质含量无变化,均为保藏前的100%。本研究还建立了荧光探针法检测蛋白核小球藻细胞活性的最优条件:细胞浓度为 2.6×10^5 cells/ml、二醋酸荧光素工作浓度为60 μmol/L、染色时间为30 min。结果显示,4℃条件下直接保藏15 d后,浓缩藻膏和浓缩藻液的细胞相对活性分别为保藏前的48.26%和61.36%。本研究建立的蛋白核小球藻浓缩制品的低温保藏技术,为微藻新鲜浓缩制品的下游水产应用提供了重要技术支撑。

关键词 蛋白核小球藻;浓缩制品;保藏;细胞活力;营养品质

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A

微藻在水产养殖中应用广泛,可作为鲜活饵料、调水剂、功能性饲料添加剂等(张国维等,2020)。我国是世界水产养殖第一大国,对饵料微藻的需求量巨大。小球藻(*Chlorella*)是一类单细胞绿藻,对环境适应能力强、生长速度快,细胞内含有丰富的蛋白质、脂质、叶绿素、维生素等营养成分(严佳琦等,2011)。与世界卫生组织 WHO 和联合国粮农组织 FAO 于1973年发布的其他食物蛋白的标准蛋白质氨基酸模式(氨基酸的含量、比例和可用性)相比,小球藻蛋白质中的氨基酸模式更有利于实现畜禽等对氨基酸的平衡摄入。此外,鱼类以小球藻为饵料进行培养时,具有较高的生物利用率和消化率(Becker, 2007; Lai et

al, 2019)。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)是最常见的小球藻品种,2012年已被卫生部批准为新资源食品(Yu et al, 2018),其细胞内的蛋白质含量可高达细胞干重的59.8%(Li et al, 2019),在水产养殖业具有广阔的应用前景。何海生等(2019)研究发现,在水产养殖水体中接种蛋白核小球藻可去除水体中的氮、磷,改善水质;同时,可提高养殖动物的特定生长率、成活率及免疫酶活性。

目前,蛋白核小球藻在我国水产养殖业的应用仍存在许多技术瓶颈。例如,微藻鲜活制品在实际应用中常常会出现供应不及时、保质期过短、营养品质和卫生指标大幅下降等问题,不仅会增加育苗成本,也

* 中国石化技术开发项目(218017-1; 36100002-19-FW2099-0035)和广东省基础与应用基础研究基金项目(2019B1515120002)共同资助 [This work was supported by Sinopec Technology Development Project (218017-1, 36100002-19-FW2099-0035), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019B1515120002)]. 骆小英, E-mail: 1075903861@qq.com

^① 通讯作者: 魏东, 教授, E-mail: fewd304@scut.edu.cn

收稿日期: 2020-09-30, 收修稿日期: 2020-11-14

可能带来病害导致育苗的失败(俞建中等, 2013)。为控制微藻制品中的细菌数量, 在保藏前对其进行杀菌处理可有效延长微藻保质期。目前, 用于微藻液体杀菌的方法通常是巴氏杀菌及过滤除菌法(李元广等, 2014)。此外, 微藻常用的保藏方法是藻种低温保藏法, 但需要添加不同种类的保护剂如二甲基亚砷、甲醇等(Chellappan *et al*, 2020; Saadaoui *et al*, 2016), 一方面会增加保藏成本, 另一方面也可能在水产养殖食物链中存在潜在毒性。因此, 微藻浓缩制品的直接保藏成为近些年的研究热点。研究发现, 4℃直接保藏 2 个月的螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻液浓缩制品仍保持较高的细胞活力(刘恒恒等, 2020); 微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)和杜氏藻(*Dunaliella tertiolecta*)浓缩藻液在 4℃条件下保藏 2 个月, 其脂肪酸成分及蛋白质含量无显著变化(Welladsen *et al*, 2014)。如何有效保持微藻鲜活制品的相对细胞活性、营养品质并延长货架期, 对于微藻在水产养殖业的商业化应用至关重要。

本研究以实验室光发酵后得到的蛋白核小球藻浓缩藻膏和浓缩藻液为研究对象, 考察巴氏杀菌处理以及不同保藏温度条件下, 细胞内的天然色素、蛋白质和细胞活性在连续避光保藏 15 d 过程中的变化规律, 为开发具有实际应用价值的保藏技术提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻(15-2070)由北京大学陈峰教授惠赠, 采用 Basal 培养基(Ogbonna *et al*, 1997)进行斜面转接保藏, 保藏温度为 4℃。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白核小球藻光发酵藻液的制备 用接种环从实验室保存的蛋白核小球藻藻种斜面上挑取一小环, 转接到无菌 Basal 液体培养基中(121℃高压灭菌 15 min, 含 10 g/L 葡萄糖和 1.25 g/L 硝酸钠), 置于温度为 30℃、光照为 10 μmol/(m² s)的摇床中培养 3~5 d。随后, 将藻液转接至带有 LED 外光照系统的 5 L 光发酵罐中, 为降低细胞密度增长带来的遮蔽效应对生长的影响, 在培养过程中采用逐步调光策略, 光照强度范围为 120~560 μmol/(m² s), pH 为 6.5±0.05, 温度为(30±2)℃, 搅拌转速为 150~200 r/min, 通气量为 2.5~10 L/min, 消泡剂浓度为 0.3% (W/V), 培养 3~5 d

(骆小英等, 2020)。

1.2.2 蛋白核小球藻浓缩制品的制备 浓缩藻膏制备: 取光发酵后藻液于 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后加蒸馏水进行漩涡混合洗涤, 离心后弃上清液, 再加 BG11 培养基进行洗涤, 离心弃去上清液, 得到的离心沉淀即浓缩藻膏(细胞密度为 8×10¹⁰ cells/ml), 直接装入 15 ml 无菌离心管, 装满并排除管内空气用于后续实验。

浓缩藻液制备: 采用 BG11 培养基悬浮稀释浓缩藻膏, 得到细胞密度为 1×10⁸ cells/ml 的浓缩藻液。装入 15 ml 无菌离心管, 装满后用于后续实验。

1.2.3 蛋白核小球藻浓缩制品的巴氏杀菌 巴氏杀菌处理参考李元广等(2014): 将制备好的浓缩藻膏和浓缩藻液离心管放入恒温水浴锅中, 于 85℃连续加热 15 min, 加热过程中多次手动混匀。冷却至室温后进行后续实验。

1.2.4 蛋白核小球藻浓缩制品的保藏 浓缩制品的保藏: 将未经巴氏杀菌处理、经巴氏杀菌处理的浓缩制品(藻膏及藻液)分别置于室温(18℃~25℃)或者低温(4℃)条件下避光保藏 15 d。每组 3 个平行。保藏起始时, 取 0.5 ml 样品用于细胞活性测定; 保藏过程中, 每 3 天取样 1 次, 每次取样 2 ml, 经-40℃真空冷冻干燥后测定藻粉中色素及蛋白质含量。

1.3 分析测试

1.3.1 蛋白质含量 取 100 mg 冻干藻粉至消化管中, 加入 6.40 g 混合还原性催化剂及 12 ml 浓硫酸, 静置过夜后, 于消化炉中 150℃保持 40 min, 随后 420℃保持 120~150 min, 至消化管中的液体呈现透明的绿色, 停止消化。冷却至室温后, 置于半自动凯氏定氮仪(2300, FOSS, 美国)上实现自动加液、蒸馏(使用前加入 400 g/L NaOH 溶液以及 20 g/L 硼酸溶液), 以甲基红-溴甲酚绿作混合指示剂, 用 HCl 标准溶液(0.10 mol/L)滴定, 粗蛋白含量(%)采用下述公式计算(Wang *et al*, 2020)。

$$\text{蛋白质含量}\% = \frac{(V_2 - V_1) \times 0.10 \times \frac{14}{1000} \times 6.25}{m \times \frac{V'}{V}} \times 100$$

式中, V_2 是滴定样品所消耗盐酸标准滴定溶液的体积(ml); V_1 是滴定空白所消耗盐酸标准滴定溶液的体积(ml); m 是样品质量(g); V' 是样品消煮液总体积(ml); V 是蒸馏用消煮液总体积(ml)。

1.3.2 色素含量测定 称取冻干藻粉 10 mg 于 2 ml

冻存管中, 加入适量的陶瓷珠及 1 ml 90%丙酮溶液, 经研磨仪(Tissuelyser-24, 净信, 上海)振荡后在液氮中迅速冷冻, 离心收集上清液。反复多次提取至藻粉呈现白色后, 合并所有上清液并定容到 10 ml。经 6000 r/min 离心 10 min 后, 再次吸取上清液定容至 10 ml。利用紫外分光光度计(UV2300, 天美, 上海)测定 470 nm、646 nm 和 663 nm 下的吸光度, 利用下述公式计算叶绿素 *a* (Chl.*a*)、叶绿素 *b* (Chl.*b*)和类胡萝卜素(Car)的浓度(mg/L)(Chen *et al.*, 2013)。

$$C_a = 12.21 \times A_{663 \text{ nm}} - 2.81 \times A_{646 \text{ nm}}$$

$$C_b = 20.12 \times A_{646 \text{ nm}} - 5.03 \times A_{663 \text{ nm}}$$

$$C_t = (1000 \times A_{470 \text{ nm}} - 3.27 \times C_a - 10^4 \times C_b) / 198$$

$$\text{色素含量 mg/g} = (\text{色素浓度(mg/L)} \times$$

$$\text{提取液体积(L)} \times \text{稀释倍数}) / \text{样品干重(g)}$$

式中, C_a 、 C_b 、 C_t 分别为 Chl.*a*、Chl.*b* 和 Car 的浓度, A 为吸光度。

1.3.3 细胞活性的测定

(1)利用无碳 Basal 培养基将收获的蛋白核小球藻细胞数梯度稀释到 $1 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^6$ cells/ml, 用于后续实验。

(2)配制荧光探针染料: 称取 4.16 mg 二醋酸荧光素(FDA), 用丙酮定容至 10 ml, 配成 1.0 mmol/L 的母液并放置在 -20°C 冰箱中进行保存。

(3)细胞活性检测方法: 每 5 ml 梯度稀释藻液分别加入 0、5、20、40、60、80、100、120 和 140 μmol 的 FDA, 充分振荡后于室温下避光放置 30 min。按每孔 100 μl 加样于 96 孔板上, 利用多功能酶标仪(Synergy Neo2, BioTek, 美国)在 525 nm 下检测其荧光值(FDA 激发波长为 488 nm, 最大发射波长为 525 nm), 每组 3 个平行, 结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。保藏前、后细胞相对活性用以下公式计算(吴瑞珊, 2008)。

$$\text{细胞相对活性(\%)} =$$

$$\left(1 - \frac{\text{保藏前荧光值} - \text{保藏后荧光值}}{\text{保藏前荧光值}}\right) \times 100\%$$

1.4 数据统计分析

采用 Microsoft Origin 2018 Software 进行绘图, 使用 IBM SPSS Statistics 24 软件通过单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计学分析, 显著性水平为 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

2 结果与讨论

2.1 保藏前后浓缩藻膏和藻液的感官变化

在实验过程中, 不同保藏条件下蛋白核小球藻浓缩藻膏和浓缩藻液的颜色和气味等感官特征变化很大。新鲜制备的蛋白核小球藻藻膏和浓缩藻液均呈现出正常的浓墨绿色; 而经巴氏杀菌处理后则呈现不同程度的褐色。这与前人的研究结果一致, 小球藻的颜色在 115°C 加热 15 min 后出现褐变(Castello *et al.*, 2018)。这是因为在高温条件下, 小球藻细胞内的色素体受到破坏, 从而导致叶绿素大量降解(Morist *et al.*, 2001)。保藏到第 3 天时, 藻膏和浓缩藻液在室温条件下均产生刺鼻的腥味, 膏体变稀, 出现了腐败的迹象; 而在 4°C 直接保藏的藻膏和浓缩藻液均未出现明显变化。随着保藏时间的延长, 未经巴氏杀菌处理的藻膏和浓缩藻液的颜色在室温条件下逐渐由鲜绿色变成褐色; 而在 4°C 连续保藏 15 d 后, 藻膏和浓缩藻液的颜色均保持为浓墨绿色。此外, 保藏在所有条件下的蛋白核小球藻藻膏和浓缩藻液均随着保藏时间的延长逐渐产生刺鼻的腥味。这种腥味产生的原因是因为高密度藻细胞在常温下代谢旺盛, 而保藏条件下营养有限, 使得部分藻细胞死亡并发生酸败, 产生了一些具有刺鼻性气味的胺类、醛、酮、脂肪聚合物、过氧化氢和烃类等(陈炜等, 2012)。

2.2 不同保藏条件下藻膏的营养品质评价

图 1 为蛋白核小球藻藻膏在不同保藏条件下细胞内色素含量随保藏时间的变化。结果发现, 巴氏杀菌后未开始保藏前, 藻膏中叶绿素的含量与巴氏杀菌前相比未有明显变化。室温条件下, 无论是否经过巴氏杀菌处理, 藻膏在保藏第 3 天时总叶绿素含量均显著性下降($P < 0.01$)(图 1a 和图 1b), 直接室温保藏和巴氏杀菌后室温保藏的叶绿素损失量分别达到 41.11% 和 34.76%; 而在 4°C 条件下, 未经巴氏杀菌处理的藻膏中总叶绿素含量未明显下降, 而经巴氏杀菌处理的藻膏总叶绿素含量下降了 42.92% ($P < 0.01$)。这一结果与藻膏在保藏过程中出现的颜色变化呈正相关, 说明 4°C 条件下未经巴氏杀菌处理的蛋白核小球藻的藻膏中细胞内色素含量随保藏时间的延长未出现明显变化, 且在保藏结束时细胞内色素含量基本与保藏前相同。

蛋白核小球藻藻膏在不同保藏条件下, 细胞内蛋白质含量随保藏时间的变化见图 2。由图 2 可知, 经巴氏杀菌处理的藻膏中蛋白质含量与未经巴氏杀菌

处理的相比略有下降。随着保藏时间的延长,藻膏中蛋白质含量出现波动。经巴氏杀菌处理后,在室温条件和 4℃ 条件下保藏结束时藻膏蛋白质含量与第 0 天相比均显著提高($P<0.05$),这可能是巴氏杀菌并不

彻底,导致浓缩藻膏腐败变稀,在凯氏定氮时造成测量误差;二是由于微生物滋生,菌体蛋白可能被测定计入,导致数据偏高;而直接保藏条件下的则无显著性差异。与此相似的是,细胞密度为 8×10^{10} cells/ml

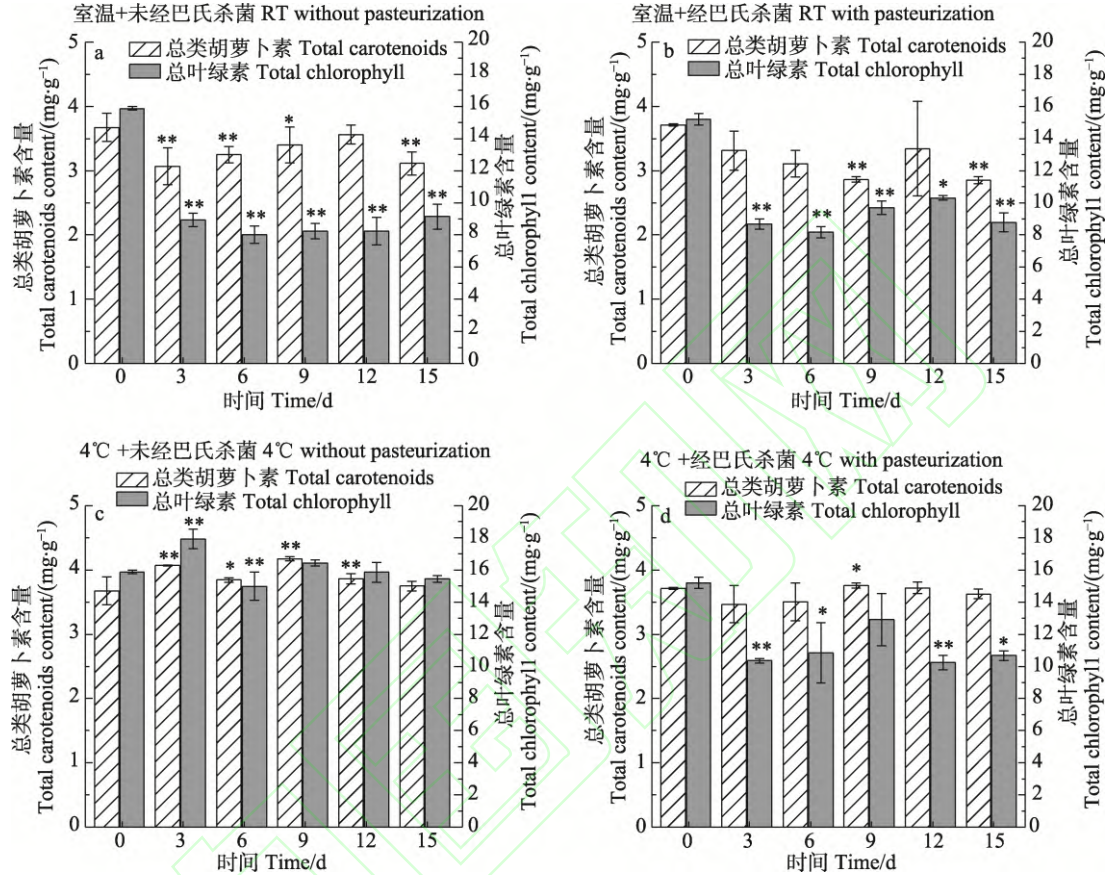


图 1 在不同保藏条件下藻膏中色素含量的变化

Fig.1 Changes of pigments content in algal paste under different preservation conditions

保藏第 0 天时为对照组, *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。下同

The 0th day was set as control group. * represents significant difference ($P<0.05$), ** represents significant difference ($P<0.01$). The same as below

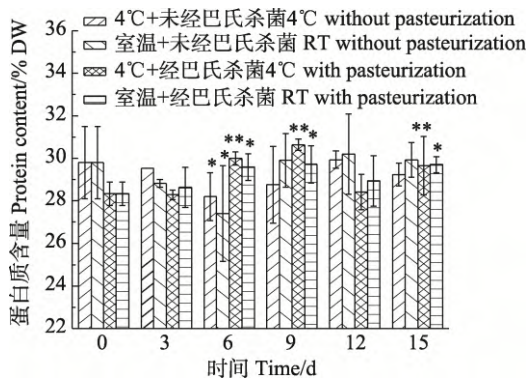


图 2 在不同保藏条件下藻膏中蛋白质含量的变化

Fig.2 Changes of protein contents in algal paste under different preservation conditions

的微拟球藻浓缩制品在 4℃ 条件下弱光保存 2 个月后,其蛋白质含量未出现显著性变化(Welladsen *et al.*, 2014)。

综上,未经巴氏杀菌处理的蛋白核小球藻藻膏在 4℃ 下连续避光保藏 15 d,细胞内色素及蛋白质含量无明显下降($P>0.05$),其总叶绿素含量、总类胡萝卜素含量及蛋白含量分别为保藏前的 97.20%、100%和 98.20%。

2.3 不同保藏条件下浓缩藻液的营养品质评价

蛋白核小球藻浓缩藻液在不同保藏条件下细胞内色素含量随保藏时间的变化情况见图 3。由图 3 可知,经过巴氏杀菌处理后,浓缩藻液的总类胡萝卜素

含量和总叶绿素含量分别为 2.93 和 11.77 mg/g, 比未经巴氏杀菌处理的藻液分别下降了 15.32% 和 24.06%。研究表明, 加热温度越高越容易使细胞内的色素发生降解, 且产生的褐变程度越高; 同时, 巴氏杀菌时间越长, 细胞内的总叶绿素含量下降的越多(Morist *et al.*,

2001)。与藻膏相比, 浓缩藻液经巴氏杀菌处理后总叶绿素损失率更高, 这可能是因为浓缩藻液的密度更低, 传热效率高, 受热更均匀, 导致其叶绿素降解更严重。在室温条件下, 当保藏时间延长到第 3 天时,

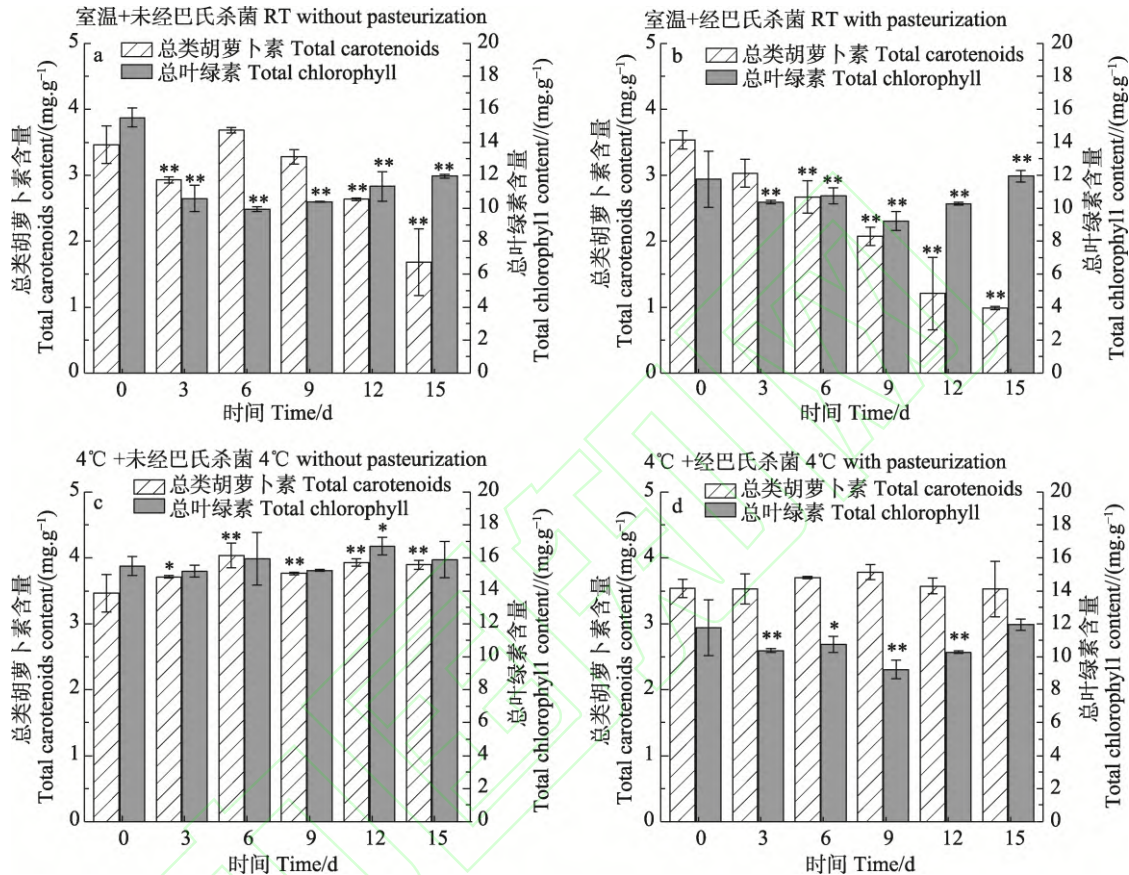


图 3 在不同保藏条件下浓缩藻液色素含量的变化

Fig.3 Changes of pigments content in concentrated fluid under different preservation conditions

直接保藏和巴氏杀菌保藏的浓缩藻液中总叶绿素含量分别下降到 10.59 和 9.26 mg/g, 损失率分别为 31.68% 和 21.33%。培养结束时, 叶绿素含量在室温条件下均极显著低于初始水平($P < 0.01$)。与藻膏(图 1a 和图 1b)不同的是, 在室温条件下浓缩藻液胞内的总类胡萝卜素含量随保藏时间的延长而下降。保藏结束时, 未经巴氏杀菌处理和经巴氏杀菌处理的浓缩藻液中总类胡萝卜素含量分别是保藏前的 51.16% 和 72.03%。由图 3c 和图 3d 可知, 在 4°C 条件下保藏的浓缩藻液尽管在保藏过程中色素含量出现波动, 但保藏结束时其总叶绿素和总类胡萝卜素含量未出现显著性降低。

不同保藏条件下, 蛋白核小球藻浓缩藻液蛋白质含量随保藏时间的变化(图 4)。由图 4 可知, 在室温

条件下, 未经巴氏杀菌处理的浓缩藻液蛋白质含量随保藏时间的延长而显著上升($P < 0.01$), 这可能是因为未经巴氏杀菌处理的藻液中细菌活动旺盛, 可以利用 BG11 培养基中的氮素及腐败藻体维持代谢, 而在利用凯氏定氮法测定蛋白质含量时无法分离藻体和菌体, 菌体蛋白可能被测定计入, 从而导致测定的蛋白质含量数据偏高。而经巴氏杀菌处理后再保藏的浓缩藻液的蛋白质含量随保藏时间的延长而显著下降($P < 0.01$), 这可能是由于小球藻体在巴氏杀菌后裂解死亡, 从而导致蛋白质含量的下降。在 4°C 条件下直接保藏的浓缩藻液蛋白质含量在保藏结束时未有明显变化。这与 Welladsen 等(2014)的研究结果类似, 杜氏藻(4.38×10^8 cells/ml)在 4°C 条件下保藏 2 个月后蛋白质含量无显著性变化。

综上表明,未经巴氏杀菌处理的蛋白核小球藻浓缩藻液在 4℃ 连续避光保藏 15 d, 细胞内的色素和蛋白质含量无显著性变化, 均为保藏前的 100%。

尽管在连续保藏 15 d 后的蛋白核小球藻藻膏和浓缩藻液中蛋白质含量无显著变化, 但本研究中采用凯氏定氮法无法区分样品中的蛋白态氮、多肽氮和氨基酸态氮。研究表明, 微拟球藻在 4℃ 保藏过程中蛋白质总量及必需氨基酸含量未出现显著性下降, 而亮氨酸及缬氨酸含量呈现出显著上升的趋势 ($P < 0.05$)。因此, 要获得保藏过程中细胞内蛋白质含量的准确变化, 需要采取更精确的分析方法, 如氨基酸分析仪测定氨基酸等。

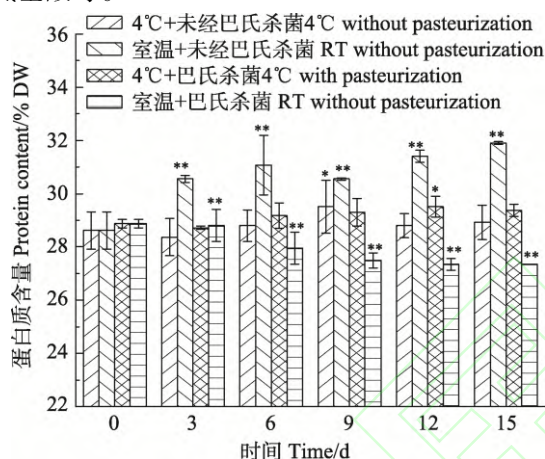


图 4 在不同保藏条件下浓缩藻液蛋白质含量的变化

Fig.4 Changes of protein content in concentrated fluid under different preservation conditions

2.4 细胞相对活性的分析

2.4.1 荧光探针法分析细胞相对活性 不同细胞密度下 FDA 浓度对蛋白核小球藻染色效果的影响(图 5)。根据吴瑞珊(2008)设定蛋白核小球藻的浓度梯度为 1.5×10^3 、 1.4×10^4 、 2.6×10^5 和 2.4×10^6 cells/ml。如图 5 所示, 利用荧光探针法分析可知, 最适细胞密度为 2.6×10^5 cells/ml。在过高或过低的细胞密度下, 其荧光值几乎持平。这是因为在过高的细胞密度下, FDA 不易渗入细胞而影响染色效果; 而细胞密度过低会导致荧光值较低, 超出检测下限而无法检测。在细胞密度为 2.6×10^5 cells/ml 时, 检测所得的荧光强度随 FDA 浓度的上升而上升, 并在 $60 \mu\text{mol/L}$ 时达到最大值, 而后随着 FDA 浓度的进一步增加, 荧光值下

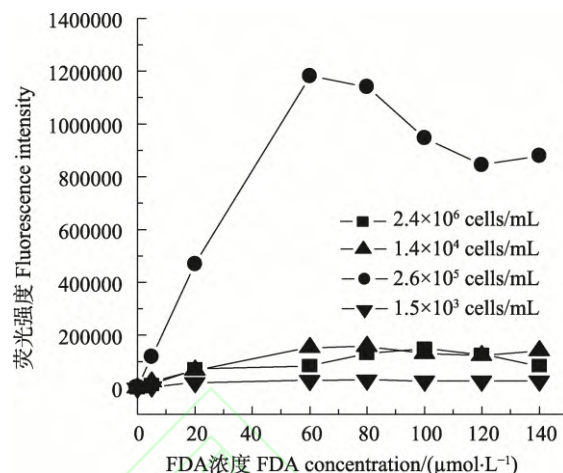


图 5 不同细胞密度下 FDA 浓度对蛋白核小球藻染色效果的影响

Fig.5 Effect of FDA concentrations on the cell staining of *C. pyrenoidosa* under different cell densities

降并趋于平缓。因此, 根据本研究的结果, 建立了检测细胞相对活性的最佳检测条件: 细胞浓度为 2.6×10^5 cells/ml, FDA 终浓度为 $60 \mu\text{mol/L}$ 、染色时间为 30 min。这与吴瑞珊(2008)利用 FDA 检测眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*)的细胞活性所采用的浓度相一致。

2.4.2 保藏前后藻膏及浓缩藻液的细胞活性分析

由 2.1 可知, 在 4℃ 条件下, 未经巴氏杀菌处理的蛋白核小球藻藻膏和浓缩藻液在连续保藏 15 d 后, 颜色始终保持为鲜亮的绿色。针对这 2 个组别, 利用 2.4.1 中建立的检测细胞相对活性的最优条件, 检测其保藏前后的细胞相对活性。结果显示, 蛋白核小球藻藻膏保藏前后样品的荧光值分别为 7.74×10^{10} 和 3.73×10^{10} , 细胞相对活性为保藏前的 48.26%; 浓缩藻液保藏前后样品的荧光值分别为 6.91×10^6 和 4.24×10^6 , 细胞相对活性为保藏前的 61.36%。研究发现, 四肩突四鞭藻(*Tetraselmis suecica*)的细胞活力在保藏过程中会随着其浓度的升高而下降(Montaini *et al*, 1995), 这与本研究结果一致。但微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*)在不同初始保藏浓度下(5 和 150 g/L)经 6 个月的 4℃ 避光保藏, 其细胞活性均保持在 90% 以上(Camacho-Rodriguez *et al*, 2016), 这与本研究结果不同, 可能是微藻的不同特性所致。

3 结论

本研究主要针对蛋白核小球藻离心浓缩和重悬工艺得到的藻膏(8×10^{10} cells/ml)和浓缩藻液(1×10^8 cells/ml)的保藏条件(是否巴氏杀菌处理及不同保藏温度)进行

了系统的评价,证实了新鲜浓缩制品在 4℃ 条件下保藏 15 d 品质最好。藻膏中的相对细胞活性,总叶绿素、总类胡萝卜素和蛋白含量分别为保藏前的 48.26%、97.20%、100% 和 98.20%;浓缩藻液中的相对细胞活性,总叶绿素、总类胡萝卜素和蛋白含量分别为保藏前的 61.36%、100%、100% 和 100%。本研究中蛋白核小球藻浓缩制品直接保藏半个月的时间还相对较短,在今后的研究中,应对更长保藏时间下的保藏效果及卫生指标变化进行更深入的研究,以提高实际应用的可操作性。

参 考 文 献

- Becker EW. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 2007, 25(2): 207–210
- Camacho-Rodriguez J, Ceron-Garcia MC, Macias-Sanchez MD, *et al.* Long-term preservation of concentrated *Nannochloropsis gaditana* cultures for use in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 299–312
- Castello ML, Pariente G, Andres A, *et al.* Evaluation of strategies for preservation of microalgae *Chlorella*. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018, 42(2): 8
- Chellappan A, Thangamani P, Markose S, *et al.* Long-term preservation of micro-algal stock for fish hatcheries. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 6
- Chen W, Wang XF, Bai YA, *et al.* Effects of concentrate and storage condition on fatty acid in alga *Chlorella pyrenoidosa* paste. *Journal of Dalian Ocean University*. 2012, 27(1): 1–5 [陈伟, 王秀芬, 白永安等. 浓缩方法及保存条件对小球藻藻膏脂肪酸的影响. *大连海洋大学学报*. 2012, 27(1): 1–5]
- Chen YM, Vaidyanathan S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica Chimica Acta*. 2013, 776: 31–40
- He HS, Yuan JL, Liu M, *et al.* Preliminary study on effects of *Chlorella vulgaris* and *iomoea auatica* regulation on the water quality and growth of *Penaeus vannamei*. *Freshwater Fisheries*, 2019, 3: 102–107 [何海生, 原居林, 刘梅, 倪蒙, 顾志敏. 蛋白核小球藻与水蕹菜调控对南美白对虾养殖水体及其生长影响的初步研究. *淡水渔业*, 2019, 3: 102–107]
- Lai YC, Chang CH, Chen CY, *et al.* Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 11
- Li HK, Zhong YM, Lu Q, *et al.* Co-cultivation of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella pyrenoidosa* to improve nutrient removal and protein content by their synergistic relationship. *Rsc Advances*, 2019, 9(25): 14331–14342
- Li YG, Zhang L, Sun BY, *et al.* Method for controlling microbes in algae powder by combination of pasteurization and spray drying. China, CN103990155A, 2014 [李元广, 张林, 孙炳耀等. 一种联用巴氏杀菌与喷雾干燥控制藻粉中微生物的方法. 中国, CN103990155A, 2014]
- Liu HH, Wu ZJ, Dong SR, *et al.* Evaluation of the viability of trehalose-preserved microalgae based on the SLogistic model. *Food Research and Development*, 2020, 41(18): 195–201 [刘恒恒, 吴子健, 董世瑞, 等. 基于微藻 SLogistic 模型的海藻糖保藏藻种活力评价. *食品研究与开发*, 2020, 41(18): 195–201]
- Luo XY, Chen JH, Wei D. High efficient assimilation of NO_3^- -N with coproduction of microalgal proteins by *Chlorella pyrenoidosa*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1150–1161 [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. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1150–1161]
- Montaini E Chini-Zittelli G, Tredici MR, Molina-Grima E, *et al.* Long-term preservation of *Tetraselmis suecica*: Influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture* 1995, 134: 81–90
- Morist A, Montesinos JL, Cusido JA, *et al.* Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 2001, 37(5): 535–547
- Ogbonna JC, Masui H, Tanaka H. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation-An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(4): 359–366
- Saadoui I, Al Emadi M, Bounnit T, *et al.* Cryopreservation of microalgae from desert environments of Qatar. *Journal of Applied Phycology*. 2016, 28(4): 2233–2240
- Wang QK, Yu ZY, Wei D. High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* through the bioconversion of high ammonium in wastewater. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 9
- Welladsen H, Kent M, Mangott A, *et al.* Shelf-life assessment of microalgae concentrates: Effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. *Aquaculture*, 2014, 430: 241–247
- Wu RS. Study on low temperature storage technology of Marine microalgae concentrate. Master's Thesis of South China University of Technology, 2008 [吴瑞珊. 海洋微藻浓缩液低温保藏技术研究. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Yan JQ, Huang XX, Huang ZZ, *et al.* Effect of different trophic modes on the growth performance and nutrition of *Chlorella* sp. *Process in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 77–85 [严佳琦, 黄旭雄, 黄征征, 等. 营养方式对小球藻生长性能及营养价值的影响. *渔业科学进展*. 2011, 32(4): 77–85]
- Yu JZ, Liang XX, Chen F, *et al.* Evaluation of the preservation methods for two microalgal concentrates. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29: 948–952 [俞建中, 梁欣欣, 陈峰等. 两种微藻浓缩液保藏效果的比较. *现代食品科技*, 2013, 29: 948–952]
- Yu ZY, Liu L, Chen JH, *et al.* Effect of crude glycerol on

heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(6): 2989–2996

Zhang GW, Li QS, Shao DH, *et al.* Advances in the research and

application of microalgae in aquaculture. *China Fisheries*, 2020(2): 72–74 [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. *中国水产*, 2020(2): 72–74].

(编辑 马瑾艳)



Evaluation of Cryopreservation Technology for Concentrated Products of *Chlorella pyrenoidosa*

LUO Xiaoying, YANG Runqing, WEI Dong^①

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

Abstract *Chlorella pyrenoidosa* is widely used in aquaculture as a living food, water adjusting agent, and functional feed additive. It is thus important to study the methods of effectively maintaining cell activity and nutritional quality, and extending shelf life in the concentrated products of *C. pyrenoidosa*. At present, the commonly used preservation method for microalgae is cryopreservation. In this study, we used concentrated algal paste (8×10^{10} cells/ml) and concentrated algal fluid (1×10^8 cells/ml) of *C. pyrenoidosa* prepared by centrifugation and resuspension as the research objects, and systematically evaluated the effects of pasteurization and temperature (25°C and 4°C) on the relative cell activity and nutrient retention rates under short-term storage without light exposure. Our results showed that pasteurization treatment caused the browning of both *C. pyrenoidosa* concentrates, and storage at room temperature accelerated the decay of concentrated products. Thus, the concentrated products could be stored directly at a low temperature of 4°C for 15 days without pasteurization treatment. The total chlorophyll, carotenoids, and protein content in the concentrated *C. pyrenoidosa* paste reached 97.20%, 100%, and 98.20% of the levels before preservation, respectively; in the concentrated *C. pyrenoidosa* fluid all levels were 100% of those before preservation. This study also established the optimal conditions of the fluorescent probe method for cell viability detection; these were found to be a cell density of 2.6×10^5 cells/ml, a working concentration of 60 $\mu\text{mol/L}$ of fluorescein diacetate, and a staining time of 30 min. The results indicated that the relative cell viability of the concentrated *C. pyrenoidosa* paste and fluid directly stored at 4°C were 48.26% and 61.36%, respectively, before preservation. The cryopreservation technology established in this study for the concentrated products of *C. pyrenoidosa* provides a critical technology support for the downstream aquaculture applications of fresh concentrated products of microalgae.

Key words *Chlorella pyrenoidosa*; Concentrated products; Cryopreservation; Cell viability; Nutritional quality

① Corresponding author: WEI Dong, Email: fewd304@scut.edu.cn