DOI:10.12441/spyswjs.20240326003 [文章编号] 1673-1689(2024)11-0071-09

微藻光合转化甲酸生产蛋白质的研究

郑伟杰[1,2] 邢蒙蒙[1,2] 江 静[1,3] 王旺银[1] 曹旭鹏[1] 李 灿[1,2*]

(1. 中国科学院大连化学物理研究所催化基础国家重点实验室,辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院大学化学科学学院,北京 100049; 3. 中国科学技术大学化学与材料科学学院,安徽 合肥 230026)

摘要:蛋白质是重要的食品原料,其高质量稳定供应对提升人民生活水平和保证国家粮食战略安全至关重要。目前中国对蛋白质的进口依存度较高,急需高效的非粮来源高品质蛋白质的生产技术。近年来莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*)作为一种显著增长的可食用蛋白质资源受到广泛关注,但其主要以乙酸为碳源进行异养发酵,无法利用其光合作用在绿色生物制造方面的优势。作者利用CO_2清洁能源还原产物甲酸作为强化碳源,探索甲酸提高*C. reinhardtii*光合生产效率的可行性。基于$HCOO^-$对光合活性的抑制作用,以叶绿素荧光动力学参数为依据,通过逐步提升培养基中$HCOO^-$浓度,获得$HCOO^-$耐受浓度达到 150 mmol/L 的驯化藻株。在 50~150 mmol/L 的$HCOO^-$下,驯化藻株的光系统Ⅱ的最大量子产率(F_v/F_m)以及光合作用相关的多不饱和脂肪酸的质量分数维持稳定。在相同培养条件下,接近于乙酸添加的培养效率,蛋白质的质量分数为 30%~35%,达到或超过常规衣藻乙酸发酵产品的蛋白质质量分数。该研究在人工光合杂化高效转化CO_2的背景下,提供了一种以甲酸为原料快速生产*C. reinhardtii*蛋白质的技术路线,也为绿色生物制造提供了一种新的技术选择。该研究所获得的高浓度$HCOO^-$耐受藻株,为探索光合活性调控机制提供了理想的研究对象。

关键词:人工光合成;莱茵衣藻;甲酸;蛋白质;绿色生物制造

Photosynthetic Conversion of Formate to Produce Protein by Microalgae

ZHENG Weijie[1,2] *XING Mengmeng*[1,2] *JIANG Jing*[1,3] *WANG Wangyin*[1]
CAO Xupeng[1] *LI Can*[1,2*]

(1. State Key Laboratory of Catalysis, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. School of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Protein is a crucial nutrient for human beings, and its stable and high-quality supply is the key to improving people's living standards and ensuring national food security. Currently, due to the high dependence on imported protein, there is a pressing need for new technologies to produce high-quality protein through non-food approaches. A promising candidate is the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), which has shown potential for producing dietary protein through fermentation on acetate. However, this method ignores the advantage of photosynthesis in green bio-manufactory. Here, the author demonstrated the feasibility of utilizing formate, one of the products of CO_2 reduction driven by clean energy, to enhance the photosynthetic production of *C. reinhardtii.* To eliminate the serious inhibition of $HCOO^-$ on photosynthetic activity, the author employed

基金项目:国家"十四五"重点研发计划项目(2022YFC3401802);国家自然科学基金项目(21878285);国家自然科学基金委"人工光合成"基础科学中心项目(22088102)。

通信作者:李灿(1960—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事催化基础理论和太阳能清洁利用研究。E-mail:canli@dicp.ac.cn

收稿日期:2024-03-26 **修回日期:**2024-04-24

adaptive lab evolution with the guide by chlorophyll fluorescence dynamic parameters and obtained a domesticated stain capable of growing under as high as 150 mmol/L $HCOO^-$. With the addition of 50~150 mmol/L $HCOO^-$, the strain maintained stable the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m), preserved a consistent fatty acid profile, and achieved a growth rate similar to acetate addition in batch cultures. Moreover, the protein content of biomass obtained with $HCOO^-$ was 30%~35%, comparable to or even higher than that of commercial fermentation on acetate. This work provides a novel green approach for non-food sourced protein production through artificial-natural hybrid photosynthesis. Furthermore, the high $HCOO^-$-tolerant strain serves as an excellent model to investigate the regulation of photosynthesis.

Keywords: artificial photosynthesis; *Chlamydomonas reinhardtii*; formic acid; protein; green bio-manufactory

蛋白质是人体不可或缺的营养成分。随着人口增长以及人均蛋白质消耗的增加，全球蛋白质供给压力日益增加。从全球视角来看，蛋白质供给主要包括植物来源和动物来源，二者的比例大约是2∶1。由于动物蛋白在营养构成方面更符合人体需求，因此，对动物蛋白的需求呈现出更明显的上升趋势。然而，动物蛋白的获得主要依赖于植物性原料，如畜牧业和禽类养殖，这一过程不仅消耗了大量的生物质原料，同时也是全球温室气体的主要来源之一[1-2]。这一问题在中国更加严峻，因为中国的可利用耕地面积有限，每年需要进口大量粮食以满足人们和畜牧业的需求，尤其是大豆，2023年其进口依存度已经超过80%[3]。因此，在低碳绿色和粮食安全的背景下，对新型非粮来源的可食用蛋白质生产技术的需求日益迫切。

微藻是一类重要的水生光合生物，能够利用太阳光为能量来源固定CO_2，用于生产碳水化合物、蛋白质、脂肪酸等，因此受到了广泛关注。然而，由于水生环境中较低的CO_2传递效率和光能传递效率，目前在微藻的工业化生产中，实际光合能量利用率仅为2%~3%，低于光合作用理论效率的三分之一，极大地限制了微藻工业化生产的发展[4]。微藻蛋白质已被证实更接近于动物蛋白，且与传统来自微生物的单细胞蛋白质不同。目前已有多种微藻被获批可直接作为食用蛋白质原料，其中*C. reinhardtii*受到了广泛关注[5]。商品化的*C. reinhardtii*是以乙酸为碳源进行发酵培养，这种方式不仅没有充分利用其光合作用潜力，还要排放大量的CO_2。因此，如何实现更加绿色和高效的生产是*C. reinhardtii*蛋白质生产技术面临的重大挑战。自然界中玉米等高产C_4植物为人们提供了启示，这类植物能够通过四碳有机酸作为中间产物来实现碳元素的高效传递。相比CO_2，以盐类作为载体，C_4植物的液相碳通量能够提升多个数量级。

早在2018年，中国率先提出了利用太阳能将CO_2和H_2O结合起来生产“液态太阳燃料”的“液态阳光”概念。在2020年，王集杰等[6]率先完成全球首个千吨级“液态阳光”甲醇的工业生产示范线，为人工光合成技术打下了坚实的基础，其太阳能转换效率超过13%。除了甲醇，甲酸也是具有高太阳能转化效率的“太阳燃料”，是生产能量需求最小的“太阳燃料”。与其他“太阳燃料”相比，甲酸因成盐性等优势，具备在规模开放系统中应用的潜力[7-8]。如果能将“液态阳光”的人工光合成技术与微藻的生物光合作用相结合，就能从原理上提升效率，甚至突破自然光合能量利用极限。

甲酸作为生物转化底物具有鲜明的特点。一方面，甲酸的还原电位较低，容易作为电子供体生成CO_2，同时为细胞提供还原力和能量，驱动甲基营养微生物的同化路径和生长。另一方面，甲酸中碳的价态相对较高，后续形成C—C键，需要提供还原力和能量。这两个特点也恰好对应了利用天然生物甲酸的两种途径，即根据其最初介入细胞代谢的方式，分为同化途径与异化途径[9]。其中同化途径中额外的能量大多来自其他化能自养过程，而异化途径则导致一部分甲酸中的碳无法被利用。相较而言，将甲酸作为碳载体应用于微藻培养，并以光能作为甲酸同化的驱动力，有望真正实现太阳光能驱动CO_2固定生产蛋白质。

然而，将甲酸应用到微藻光合培养面临着巨大的挑战。早在20世纪80年代，人们就发现，$HCOO^-$与HCO_3^-结构类似，因此会与HCO_3^-竞争光合系统中的结合位点，导致对光合作用的抑制，尤其是对光合系统II活性的抑制。研究表明在低浓度（<25 mmol/L）$HCOO^-$的抑制作用可以通过加入HCO_3^-来

缓解，且HCO_3^-浓度为$HCOO^-$的2倍以上，但是高浓度$HCOO^-$的抑制作用则无法通过这种方法解除[10]。此外，25 mmol/L或以下浓度的$HCOO^-$能够提供的碳通量较小，对微藻培养碳通量的提升也比较有限。考虑到生物进化早期低碳化合物含量较高，且存在天然甲酸的同化途径，以及在基因组信息中鉴定到了不完整的甲酸同化途径，推测*C. reinhardtii*具有提高甲酸的耐受和转化的潜力。因此，Yao等[11]和Jiang等[12]先后借助实验室自适应进化技术，将甲酸用于光合微藻培养的研究。先后实现了在乙酸与20 mmol/L的甲酸下混合培养*C. reinhardtii*以及在乙酸与50 mmol/L的甲酸下光照培养*C. reinhardtii*，提升了整体生物量和能量转化效率，证实了甲酸在一定浓度下能够作为辅助碳源促进*C. reinhardtii*的光合生长。

然而，上述研究仅在50 mmol/L或以下浓度的$HCOO^-$下进行，对微藻培养提供的碳通量比较有限，无法满足更高时空规模生产的需求，需要进一步提升$HCOO^-$的浓度以及$HCOO^-$的转化效率。因此，该研究以*C. reinhardtii*为研究对象，通过光合活性指导下的自适应进化，筛选获得具有150 mmol/L $HCOO^-$耐受能力的藻株，并分析其在高浓度$HCOO^-$下的培养情况，尤其是在生产蛋白质方面。最终证实了在人工光合杂化高效转化CO_2的背景下，用*C. reinhardtii*绿色高效转化甲酸生产蛋白质的可行性。与传统光合培养以及乙酸发酵相比，该技术更具有大规模和高效应用的前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C. reinhardtii CC-137 3#-P3株系：由CC-137野生株构建的过表达叶绿体型甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase）的工程藻株，以及后续进化筛选获得的系列藻株[13]。

Tris：美国Sigma公司；蒽酮、甲酸钠、乙酸、氯化铵、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠：国药集团化学试剂有限公司；氢氧化钠、盐酸、硫酸、甲醇、氯仿、正己烷、Nessler试剂、无水硫酸钠、DMSO、酒石酸钾钠：天津市科密欧化学试剂有限公司；考马斯亮蓝G250：美国Bio-Rad公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计：Jasco V-650型，日本Jasco公司；鼓风干燥箱：DGC-9240A型，上海森信实验仪器有限公司；pH电极：PHSJ-3F型，上海仪电科学仪器股份有限公司；核磁共振波谱仪：Avence III 400M型，瑞士Bruker公司；叶绿素荧光分析仪：Water-PAM型，德国Walz公司；气相色谱仪：7890B型，美国Agilent公司。

1.3 培养基

*C. reinhardtii*生长所需的基本培养基为TAP（tris-acetate-phosphate）培养基，按照标准方法配制该培养基。在TAP培养基的基础上，将CH_3COO^-替换成不同浓度的$HCOO^-$，并以质量分数10%的盐酸或1 mol/L的NaOH溶液将培养基的pH调至7.5，称为TFP（tris-formate-phosphate）培养基。根据$HCOO^-$终浓度（35、50、75、100、150 mmol/L），记为TFP35组、TFP50组、TFP75组、TFP100组和TFP150组。TAP培养基进行基础培养的藻株记为TAP组，即对照组。配好的培养基封装好后于121 ℃高压蒸汽灭菌20 min，灭菌后冷却至室温。TAP/TFP培养基在使用前接种培养基体积0.1%的潮霉素B（10 mg/mL）避免微生物污染。

1.4 培养条件

在30 μmol/（m^2·s）光照强度的培养箱（27 ℃）中，*C. reinhardtii*藻种在TFP50培养基中传代培养。当OD_{750}值达到1.0~1.2时，将藻细胞悬液离心，弃去上清液收获藻种并接种到新鲜的培养基中进行试验。

用于试验的藻株置于锥形瓶或光生物反应器中培养，从锥形瓶到光生物反应器的培养系统示意图见图1。从左至右分别为锥形瓶种子液培养、光生物反应器种子液培养、Algal Station系统和光生物反应器高密度培养。

分别将一定量*C. reinhardtii*的种子液接种于锥形瓶中（装有500 mL的TAP培养基或TFP培养基），起始OD_{750}值为0.1。将其置于光照培养箱中培养，放置在水平摇床上振荡（100 r/min），温度27 ℃，连续光照24 h，光照强度为30 μmol/（m^2·s）。间隔1 d取样，测定OD_{750}值和叶绿素荧光动力学参数。

选择$HCOO^-$浓度为50、75、150 mmol/L进行光生物反应器的培养，分别将一定量*C. reinhardtii*的种子液接种于鼓泡柱状光生物反应器中（装有500 mL的TAP培养基或TFP培养基），接种的起始OD_{750}值为0.1，置于光照培养架

上，使用由中国科学院大连化学物理研究所自行开发的 Algal Station 系统控制通气和光照，可在线监测包括叶绿素荧光动力学参数在内的培养指标[14]。培养温度 27~29 ℃，连续光照 24 h，光生物反应器表面的光照强度为 110~120 μmol/(m²·s)，通气（体积分数 2% 的 CO_2 和空气的混合气）24 h，通气流量为 80 mL/min，通气比为 0.16 mL/(mL·min)。

1.5 生物量的测定

间隔 12 h 取样，使用紫外可见分光光度计测量 OD_{750} 值和藻细胞的干质量。OD_{750} 值主要与细胞数量相关，反映细胞的增殖变化。如果样品浓度过高，则需要在测试前对样品进行稀释，使 OD_{750} 值保持在线性范围内。

使用预先干燥并称质量的 Whatman GF/C 滤膜（孔径 1.2 μm）过滤一定体积的微藻悬液，并在 60 ℃鼓风干燥箱中干燥 24 h，干燥前后的质量差即为藻细胞的干质量。将剩余的微藻悬液离心，收集藻细胞，冷冻干燥后保存。

藻细胞的质量浓度与相应的 OD_{750} 值的比值即为单位 OD 值藻细胞的质量浓度，单位为 mg/mL，反映平均每个藻细胞的质量变化。藻细胞的质量浓度按照式（1）进行计算，取 3 次测定的平均值。

$$\omega = (m_2 - m_1)/V \tag{1}$$

式中：

ω——藻细胞的质量浓度，mg/mL；

m_1——预先干燥的 Whatman GF/C 滤膜的质量，mg；

m_2——过滤藻类培养物的滤膜和藻细胞的质量，mg；

V——过滤微藻悬液的体积，mL；

微藻的生长速率由相对增长率表示，*C. reinhardtii* 的相对增长率按照式（2）进行计算。

$$\mu = (\ln O_{D2} - \ln O_{D1})/(t_2 - t_1) \tag{2}$$

式中：

μ——*C. reinhardtii* 的相对增长率，h^{-1}；

t_1——较早的采样时间，h；

t_2——较晚的采样时间，h；

O_{D1}——采样时间为 t_1 时 *C. reinhardtii* 的 OD_{750} 值；

O_{D2}——采样时间为 t_2 时 *C. reinhardtii* 的 OD_{750} 值。

1.6 pH、$HCOO^-$ 浓度和 NH_4^+ 浓度的测定

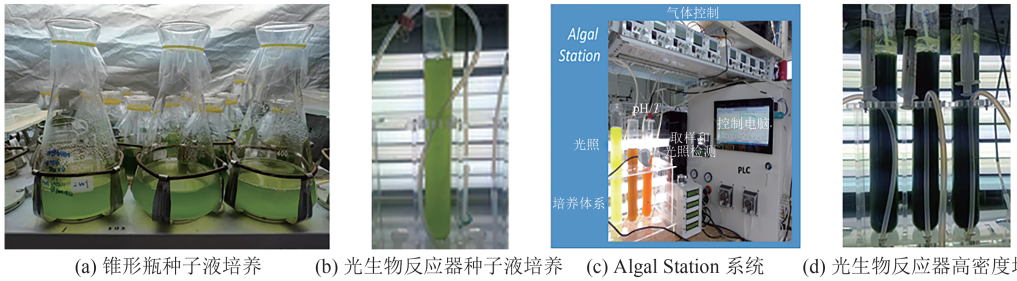
间隔 12 h 取样，使用 pH 电极测量微藻悬液样品离心后上清液的 pH。

间隔 12 h 取样，使用核磁共振波谱仪根据相应的标准曲线对上清液中的 CH_3COO^- 和 $HCOO^-$ 浓度进行测定。取 600 μL 待测样品加入核磁管，再加入 100 μL 体积分数 0.01% 的 DMSO 和 100 μL D_2O，混合均匀，进行核磁上样，选择压制水峰“zgpr”模式，扫描 32 圈，根据测试结果的峰面积定量计算 CH_3COO^- 和 $HCOO^-$ 的浓度。

间隔 12 h 取样，采用 Nessler 试剂分光光度法测定上清液的 NH_4^+ 浓度。取 100 μL 的样品，加入 190 μL 的水进行稀释，再加入 1 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液，静置 5 min 后，加入 200 μL 1.5 mol/L 的酒石酸钾钠溶液和 1 mL Nessler 试剂，混合后于暗处放置 10 min 后测定 425 nm 处的吸光度，根据标准曲线和稀释倍数计算上清液的 NH_4^+ 浓度。

1.7 叶绿素荧光动力学参数的测定

间隔 12 h 取样，通过叶绿素荧光分析仪测量叶绿素荧光动力学参数，包括 F_v/F_m、实际量子产率（F_v'/F_m'）和非光化学猝灭系数（NPQ）。F_v/F_m 反映光合系统的潜能和整体状况，F_v'/F_m' 反映实际光合反应中光能利用的效率，NPQ 反映光保护能力和光合系统受到损伤的程度。叶绿素荧光动力学参数



(a) 锥形瓶种子液培养 (b) 光生物反应器种子液培养 (c) Algal Station 系统 (d) 光生物反应器高密度培养

图 1 从锥形瓶到光生物反应器的培养系统的示意图

Fig. 1 Culture systems from conical flasks to photobioreactors

用于测定光合作用过程中光系统对光能的吸收、传递、耗散、分配等，其变化与环境胁迫、养分供应等因素有关，因此可以通过叶绿素荧光动力学参数来监测光合系统的生理状况和应对外界压力的能力[15]。

1.8 蛋白质质量分数和脂肪酸质量分数的测定

培养结束后，用考马斯亮蓝G250法测定每天收获的冻干藻细胞中的蛋白质质量分数。取4~5 mg冻干藻粉，加入1 mL 0.5 mol/L的NaOH溶液，超声仪冰浴破碎细胞后，于80 ℃水浴10 min，再于12 000 r/min离心3 min，收集上清液；用1 mL 0.5 mol/L的NaOH溶液在80 ℃水浴中重复提取10 min，离心后合并上清液并定容至5 mL。取20 μL藻粉提取液，用0.15 mol/L的NaCl溶液稀释5倍，再加入1 mL考马斯亮蓝G250试剂，摇匀后静置5 min，于595 nm波长下测定吸光度。根据梯度牛血清蛋白的质量浓度-吸光度标准曲线和稀释倍数计算藻细胞中蛋白质质量分数。

培养结束后，通过转酯化和气相色谱法测定冻干藻细胞中的脂肪酸质量分数。称取5 mg的冻干藻粉，加入体积分数2%的硫酸-甲醇溶液，混合物在70 ℃的油浴中冷凝回流反应1 h进行脂肪酸的甲酯化，加入C17∶0三酰甘油作为内标进行定量，然后加入经去离子水和己烷提取的脂肪酸甲酯（FAME）。使用气相色谱仪、DB-23型毛细管柱（30 mm×0.32 mm×0.25 μm）和火焰离子化检测器（FID）分离和鉴定FAME。进样器分流进样温度为270 ℃，分流比为10∶1。气相升温程序为130 ℃下保持1 min，以10 ℃/min的速率升至170 ℃，再以2.8 ℃/min的速率升至215 ℃，并保持1 min。得到FAME气相色谱图后，计算脂肪酸质量分数。

1.9 数据分析

数据处理分析和图表绘制主要通过Origin 2017和Excel 2016进行，试验数据以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 高浓度$HCOO^-$耐受藻株的筛选

自适应进化是一种通过梯度培养条件筛选出具有特定生物特性的菌株或者藻株的方法。通常自适应进化是以生长状态为指标进行判定，但是在培养过程中，需要获得在一定$HCOO^-$存在条件下仍然能保持较高光合活性的藻株。因此以表征光合活性的叶绿素荧光动力学参数（F_v/F_m和F_v'/F_m'）为指标进行判定，最终获得了能够在150 mmol/L条件下维持较高光合活性并且生长的驯化藻株。

在进行反应器生长评价前，首先对摇瓶中的种子液状态进行评价。驯化藻株的种子液在不同$HCOO^-$浓度下生长和光合活性的变化见图2。可以看出，TFP30组和TFP50组具有较长的迟滞期，但是进入到指数生长期，其生长曲线斜率与TAP组相比差异不大，最终生物量也相近。TFP100组和TFP150组的生长速率明显下降。但是从光合活性来看，所有组别的F_v/F_m都维持稳定，没有明显下降甚至高于TAP组，说明驯化藻株能够解除$HCOO^-$（浓度≤150 mmol/L）对光合活性的抑制作用。但TFP150组的F_v'/F_m'略低于TAP组，这与生长曲线的变化规律一致。

2.2 高浓度$HCOO^-$耐受藻株在光生物反应器中的生长评价

从生长曲线结果可以看出，TFP50组的生物量水平与TAP组相同，因此使用TFP50培养基进行藻种培养和传代，并对后续高浓度$HCOO^-$条件进行考察。根据已有培养经验，在光生物反应器的批次培养中，NH_4^+耗尽后细胞的生长和生理生化指标会有明显变化，因此在培养过程中监测NH_4^+浓度，选择培养基中NH_4^+耗尽后的第2天终止培养。

2.2.1 生长的变化

光生物反应器中藻株的培养结果见图3。藻株的生长曲线见图3（a），与锥形瓶中的培养结果类似，TFP150组驯化藻株的生长速率明显慢于TFP50组和TFP75组，而TFP50组和TFP75组差别不明显。藻细胞质量浓度变化见图3（b），TFP150组的增长也明显慢于TFP50组和TFP75组。如图3（c）所示，TFP150组的单位OD值藻细胞的质量浓度显著高于TFP50组和TFP75组，从0.67 mg/mL增加至0.92 mg/mL，提高了37%。

单细胞质量的增加通常受到2种因素的影响：一种是细胞代谢增强，胞内产物积累增多导致细胞生物量增加；另一种可能是细胞周期被干扰，细胞正常分裂受抑制，例如常见的多倍体。从OD_{750}值的变化推测，细胞数目的增加减缓，150 mmol/L的$HCOO^-$有可能对细胞周期产生了明显的扰动。作

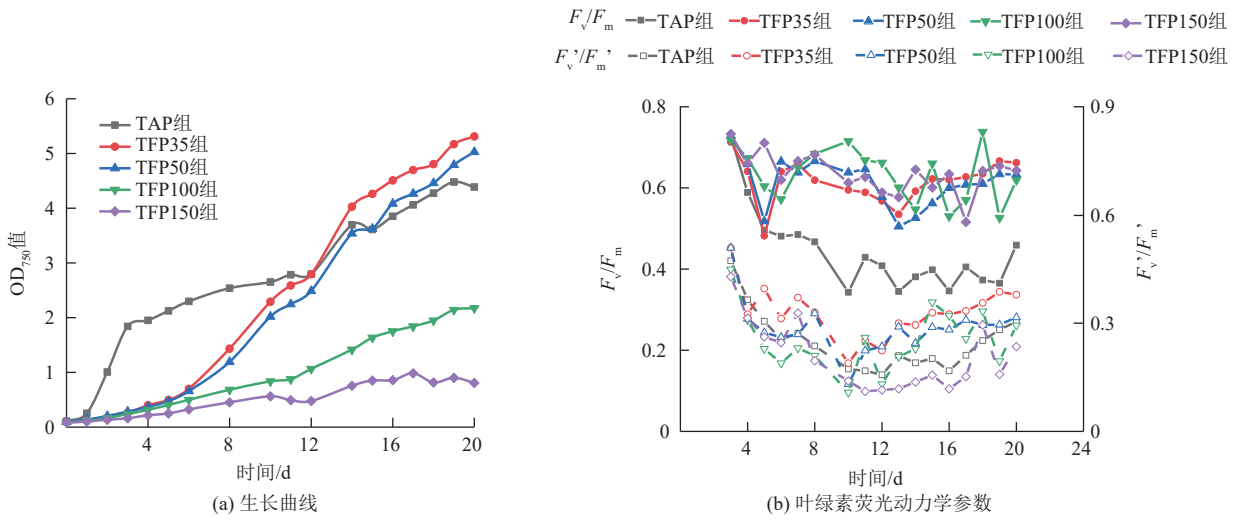


图 2　不同浓度 $HCOO^-$ 的驯化藻株的生长曲线和叶绿素荧光动力学参数

Fig. 2　Growth curves and chlorophyll fluorescence kenetics of a domesticated algal strain under different concentrations of $HCOO^-$

为核苷酸合成的主要一碳底物来源，$HCOO^-$ 能够显著影响细胞内嘌呤和嘧啶的合成，导致下游细胞代谢的重构[16]。Jiang 等[12]通过流式细胞术发现，当 50 mmol/L $HCOO^-$ 作为辅助碳源培养时，胞内核酸含量升高，也证实了细胞周期受到干扰的结论。

2.2.2　光合活性的变化

对光合活性变化的监测结果见图 3(d)。当 50 mmol/L $HCOO^-$ 的种子液接种至 TFP150 后，细胞的 F_v/F_m 和 F_v'/F_m' 在接种后都有轻微下降，2 d 后逐步恢复至正常水平。而 TFP50 组和 TFP75 组并没有受接种的影响，因此推测尽管锥形瓶培养已经证明该藻株能够耐受 150 mmol/L 的 $HCOO^-$，但高浓度 $HCOO^-$ 耐受是一个动态适应过程。

早期研究认为，$HCOO^-$ 是通过与光反应中心及光合电子传递链中 HCO_3^- 结合位点竞争来抑制光合活性，随着 $HCOO^-$ 浓度的增加，这种竞争性抑制愈加明显[17-18]。然而，从自适应进化筛选和 TFP50 种子液在 TFP150 培养基中培养过程的变化可知，可能在高浓度 $HCOO^-$ 条件下存在着未知的光合活性调控机制，这也为加深理解光合作用提供了新的探索方向。

2.2.3　主要营养代谢的变化

$HCOO^-$ 和 NH_4^+ 为主要的辅助碳源和氮源，因此在培养过程中监测了两者的浓度变化，同时也考察了体系中 pH 的变化，见图 4(a)~(b)。

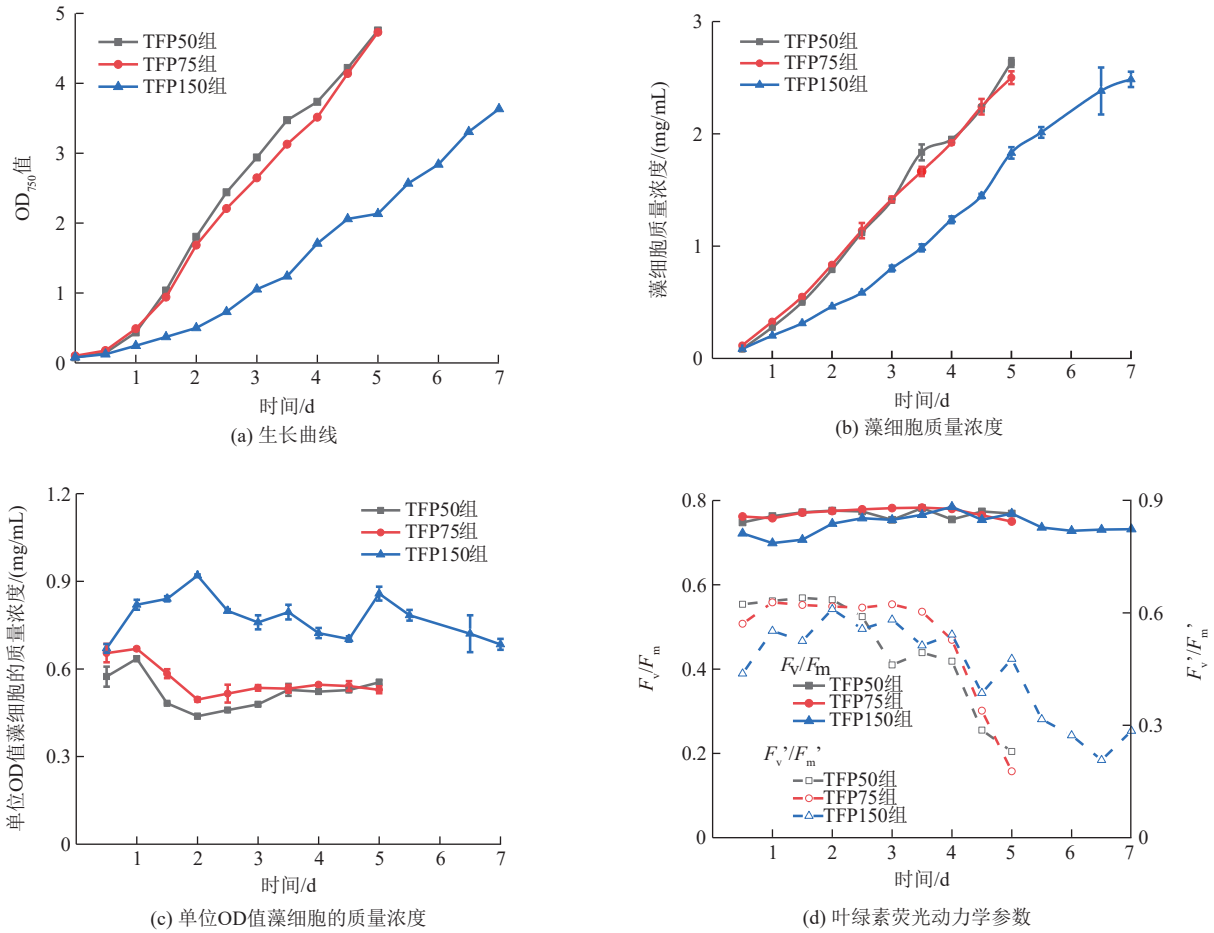
TFP50 组和 TFP75 组中 $HCOO^-$ 以及 NH_4^+ 的消耗速率没有明显差异。在 TFP150 组中，即使排除接种初期的停滞期的影响，NH_4^+ 的利用速率也明显变慢，而 $HCOO^-$ 的转化速率略有提升，这也许得益于更高浓度 $HCOO^-$ 刺激细胞产生了更多的一碳底物进行转化利用。

从系统电中性平衡角度分析，甲酸作为一种弱电解质，在 $HCOO^-$ 转化过程中，培养基中会相应地积累 OH^-，从而导致 pH 变化。随着 $HCOO^-$ 浓度从 50 mmol/L 增加到 150 mmol/L，培养后期溶液 pH 也越来越大，尤其是 TFP150 组具有更高的 $HCOO^-$ 利用速率。虽然 $HCOO^-$ 的浓度变化并不一定是导致 pH 变化的唯一因素，但是作为一种易于实现在线连续监测的指标，寻找 pH 变化与甲酸代谢的关系，有望实现更便利的生产监控。

2.3　高浓度 $HCOO^-$ 条件下驯化株的蛋白质质量分数和脂肪酸组成分析

为了开发替代性的非粮来源蛋白质生产技术，测定了培养收获的冻干藻粉的蛋白质质量分数。TFP50 组、TFP75 组和 TFP150 组的蛋白质质量分数分别为 32.5%、33.4% 和 34.0%，处于同一水平，略高于商品化乙酸发酵产品的蛋白质质量分数(≥30%)。但是蛋白质质量分数与氮元素供给等有关，需要进一步优化得到更优质的产品。

在生长趋势的研究中发现，TFP150 组中的细胞质量更大，同时氮消耗速率慢于 TFP50 组和 TFP75 组，因此对 TFP150 组的蛋白质质量分数在

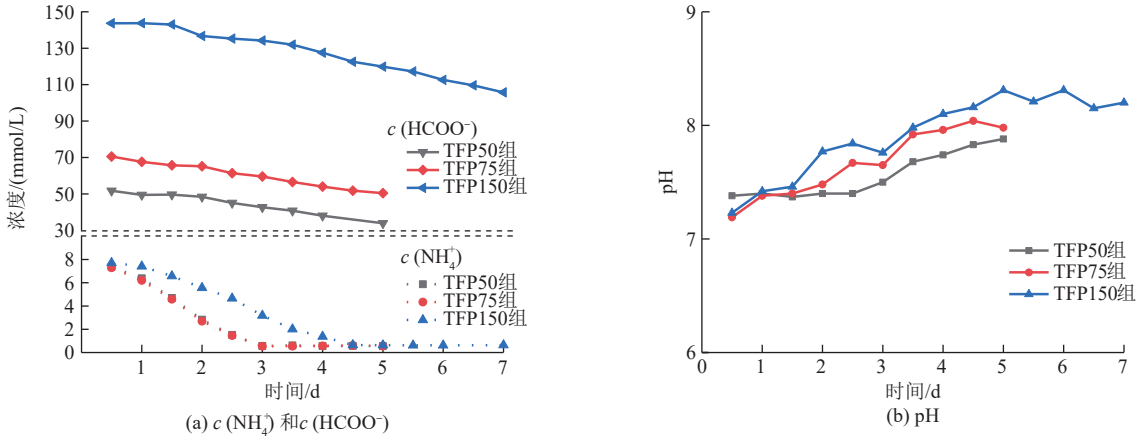


(a) 生长曲线　(b) 藻细胞质量浓度

(c) 单位OD值藻细胞的质量浓度　(d) 叶绿素荧光动力学参数

图 3　高浓度 $HCOO^-$ 下的生长

Fig. 3　Growth under high concentrations of $HCOO^-$



(a) c (NH_4^+) 和 c ($HCOO^-$)　(b) pH

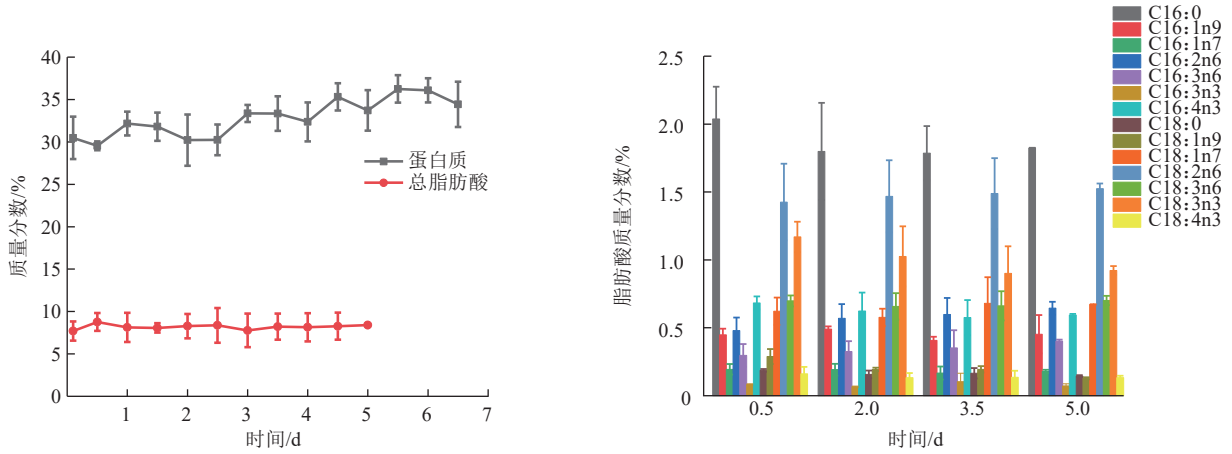
图 4　高浓度 $HCOO^-$ 下的底物消耗

Fig. 4　Substrate consumption under high concentrations of $HCOO^-$

生长周期中的稳定性进行监测，见图 5。结果表明，培养过程中藻体内蛋白质质量分数相对稳定。

脂肪酸尤其是多不饱和脂肪酸是微藻生产的重要成分，也是微藻光合活性整体变化的重要指标。对 TFP150 组前 5 d 的总脂肪酸质量分数和构成进行分析，结果见图 5（a）~（b）。此时培养基中仍有一定量的 NH_4^+，脂肪酸无论从质量分数还是构成上都保持稳定。Yang 等[19]发现 *C. reinhardtii* 的多不饱和脂肪酸能够非常灵敏地感知环境氮源等条件的变化，尤其是用

于构建光合系统类囊体膜的糖脂类化合物，主要的多不饱和脂肪酸比例与生长条件具有一定的量效关系。因此，相对稳定的总脂肪酸质量分数和成分构成证实了 *C. reinhardtii* 具有在 $HCOO^-$ 浓度为 150 mmol/L 的条件下维持光合活性的能力。



(a) 蛋白质和总脂肪酸的质量分数　　(b) 脂肪酸的质量分数

图 5　TFP150 培养蛋白质和脂肪酸的变化

Fig. 5　Content of protein and fatty acids in the culture with TFP150

3　结论

氨基酸是重要的营养及风味物质，其来源和生产调控一直受到人们的关注[20-21]。*C. reinhardtii* 目前已经得到了包括美国 FDA、中华人民共和国国家卫生健康委员会等机构的许可，是富含蛋白质的新食品原料。乙酸发酵的蛋白质生产过程在碳排放和无菌发酵技术的可扩展性方面均存在局限性，因此难以满足中国对于千万吨级蛋白质原料的需求。利用非耕地资源和太阳光能构建人工光合成体系，有望实现该目标。

在众多微藻中，*C. reinhardtii* 自身具备多种营养生长模式，既能够完全依赖 CO_2、水和阳光进行光合自养生长，也能在无光条件下以乙酸为碳源进行发酵生长，或者二者共存的兼养生长，因此成为研究光合作用的独特平台。这也意味着 *C. reinhardtii* 自身具有复杂的碳代谢和能量代谢调控能力，这可能就是 *C. reinhardtii* 能够通过实验室自适应进化不断提升其 $HCOO^-$ 耐受上限的原因。通过引入光合活性监测导向的实验室自适应进化技术，将 *C. reinhardtii* 对 $HCOO^-$ 的耐受能力提升到高浓度水平（150 mmol/L），实现了批次培养条件下的稳定生长和接近于乙酸添加的培养效果。在 50~150 mmol/L 的 $HCOO^-$ 条件下，驯化藻株的 F_v/F_m 维持稳定，脂肪酸尤其是与光合作用相关的多不饱和脂肪酸的质量分数稳定，这为进一步拓展光合微藻的生产规模提供了契机。在高浓度 $HCOO^-$ 条件下，单位细胞的质量更大，同时蛋白质质量分数达到 30%~35%，满足对 *C. reinhardtii* 中蛋白质质量分数的要求，也有助于利用 *C. reinhardtii* 进行规模化生产蛋白质原料。在人工光合杂化高效转化 CO_2 的背景下，该研究进一步推动了以甲酸为碳源快速生产蛋白质技术的发展，为绿色生物制造提供了新的研究方向。

参考文献

[1] 刘儒曦，刘扬，吴博. 饮食与环境温室气体排放和人类健康[J]. 中国公共卫生，2018，34(2)：293-297.
LIU R X, LIU Y, WU B. Association of dietary pattern and greenhouse gas emission with human health [J]. Chinese Journal of Public Health, 2018, 34(2): 293-297. (in Chinese)

[2] LESER S. The 2013 FAO report on dietary protein quality evaluation in human nutrition: recommendations and implications[J]. Nutrition Bulletin, 2013, 38(4): 421-428.

[3] 魏艳骄，何岭，张慧艳，等. 我国大豆进口依赖性风险生成机理分析：基于相互依存视角[J]. 大豆科学，2023，42(6)：757-768.
WEI Y J, HE L, ZHANG H Y, et al. Analysis on the generation mechanism of dependence risk of China's soybean import: from the perspective of interdependence[J]. Soybean

Science，2023，42（6）：757-768.（in Chinese）

[4] ZHU X G，LONG S P，ORT D R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? [J]. Current Opinion in Biotechnology，2008，19（2）：153-159.

[5] DARWISH R，GEDI M A，AKEPACH P，et al. *Chlamydomonas reinhardtii* is a potential food supplement with the capacity to outperform *Chlorella* and *Spirulina* [J]. Applied Sciences-basel，2020，10（19）：6736.

[6] 王集杰，韩哲，陈思宇，等. 太阳燃料甲醇合成[J]. 化工进展，2022，41（3）：1309-1317.
WANG J J，HAN Z，CHEN S Y，et al. Liquid sunshine methanol [J]. Chemical Industry and Engineering Progress，2022，41（3）：1309-1317.（in Chinese）

[7] JIN S，HAO Z M，ZHANG K，et al. Advances and challenges for the electrochemical reduction of CO_2 to CO：from fundamentals to industrialization [J]. Angewandte Chemie International Edition，2021，60（38）：20627-20648.

[8] JIANG W，VILLAMOR D H，PENG H D，et al. Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C_1 feedstocks [J]. Nature Chemical Biology，2021，17（8）：845-855.

[9] MAO W，YUAN Q Q，QI H G，et al. Recent progress in metabolic engineering of microbial formate assimilation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104：6905-6917.

[10] CAO J，GOVINDJEE. Bicarbonate effect on electron flow in a cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 [J]. Photosynthesis Research，1988，19：277-285.

[11] YAO S Y，CAO X P，WANG Y C，et al. Enhancing overall carbon fixation and energy conversion with formate in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research，2023，72：103108.

[12] JIANG J，LI X W，YANG K G，et al. Formate for enhancing the growth of microalgae and accumulating high-value products [J]. Algal Research，2023，75：103261.

[13] 朱振，曹旭鹏，苑广泽，等. 莱茵衣藻叶绿体型磷酸甘油醛脱氢酶过表达对其储能物质生产的影响[J]. 中国海洋大学学报，2019，49（9）：50-58.
ZHU Z，CAO X P，YUAN G Z，et al. Studies on the effect of overexpressed chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on carbohydrate and fatty acid contents of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Periodical of Ocean University of China，2019，49（9）：50-58.（in Chinese）

[14] CAO X P，XI Y M，LIU J，et al. New insights into the CO_2-steady and pH-steady cultivations of two microalgae based on continuous online parameter monitoring[J]. Algal Research，2019，38：101370.

[15] LI S X，WANG P P，ZHANG C，et al. Influence of polystyrene microplastics on the growth，photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Science of the Total Environment，2020，714：136767.

[16] OIZEL K，TAIT-MULDER J，FERNANDEZ-DE-COSSIO-DIAZ J，et al. Formate induces a metabolic switch in nucleotide and energy metabolism [J]. Cell Death & Disease，2020，11（5）：310.

[17] SAITO K，RUTHERFORD A W，ISHIKITA H. Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2013，110（3）：954-959.

[18] WINCENCJUSZ H，ALLAKHVERDIEV S I，KLIMOV V V，et al. Bicarbonate-reversible formate inhibition at the donor side of Photosystem II[J]. Biochimica et Biophysica Acta（BBA）- Bioenergetics，1996，1273（1）：1-3.

[19] YANG M，MENG Y Y，CHU Y D，et al. Triacylglycerol accumulates exclusively outside the chloroplast in short-term nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biochimica et Biophysica Acta（BBA）- Molecular and Cell Biology of Lipids，2018，1863（12）：1478-1487.

[20] 李冬梅，任响，林峻鑫，等. 碱性氨基酸影响肉品品质及机理的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41（8）：35-42.
LI D M，REN X，LIN J X，et al. Research progress on basic amino acids affecting meat quality and its mechanism [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41（8）：35-42.（in Chinese）

[21] 吴若彤，王兴伟，夏书芹，等. 外源氨基酸对牡蛎肽美拉德反应产物风味特性的调控作用[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（3）：30-37.
WU R T，WANG X W，XIA S Q，et al. Flavor characteristics of oyster peptide Maillard reaction products regulated by exogenous amino acids [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（3）：30-37.（in Chinese）

（责任编辑：闫林红）