



刘晨,陈瑞升,王祯,等.高糖胁迫对小球藻生长和类胡萝卜素合成的影响[J].轻工学报,2026,41(3):54-61.

LIU C, CHEN R S, WANG Z, et al. Effects of high glucose stress on growth and carotenoids synthesis of *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Light Industry, 2026, 41(3):54-61. DOI:10.12187/2026.03.006

# 高糖胁迫对小球藻生长和类胡萝卜素合成的影响

刘晨<sup>1</sup>, 陈瑞升<sup>2</sup>, 王祯<sup>1</sup>, 杨红静<sup>1</sup>, 宋凯<sup>1</sup>, 魏进彬<sup>1</sup>, 韩露<sup>1</sup>

1. 甘肃烟草工业有限责任公司, 甘肃 兰州 730050;
2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001

**摘要:**【目的】减轻小球藻发酵过程中初始葡萄糖质量浓度对其生长及类胡萝卜素合成的抑制效应。【方法】以生物量和类胡萝卜素产量为指标,采用紫外诱变联合葡萄糖质量浓度梯度胁迫定向驯化技术筛选耐高糖小球藻,从转录组水平分析高糖胁迫对小球藻生长的影响机制,并利用逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)对分析结果进行验证。【结果】定向驯化获得一株能耐受30 g/L葡萄糖质量浓度的小球藻菌株,其糖耐受性较普通小球藻提高了约50%,类胡萝卜素产量为5.38 mg/L;耐高糖小球藻的基因表达量FPKM值在区间分布上与对照组有明显差异,且二者表达模式的相似度较低;耐高糖小球藻中有4个与半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路相关的上调差异表达基因(DEGs)使其细胞内的丙酸及其衍生物累积,进而抑制其生长,其中gene2.1.1.14、gene2.5.1.6和gene3.5.99.7的表达相较于对照组分别上调184.74倍、175.68倍和179.28倍。【结论】紫外诱变联合梯度葡萄糖质量浓度胁迫的定向驯化策略可有效提升小球藻的糖耐受性,而半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路的异常调控是高糖环境抑制小球藻生长的重要分子机制之一。

**关键词:**高糖胁迫;定向驯化;小球藻;类胡萝卜素;转录组分析

**中图分类号:**TS202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)03-0054-08

## 0 引言

类胡萝卜素具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生理活性,被广泛应用于保健品、食品添加剂、饲料添加剂等领域。目前,类胡萝卜素的获取主要依赖于传统的天然产物提取和化学合成,但这些传统方法受生产成本低、产物活性低、纯度有限等因素制约,不利于工业化大规模生产<sup>[1]</sup>。相比之下,微生物合

成法具有发酵条件温和、底物来源广泛、不受季节限制、产物活性高、副产物含量低等优势,已成为开发天然活性产物的重要研究方向之一<sup>[2]</sup>。然而,微生物合成法仍面临产量较低、发酵成本较高等挑战,如何有效提高类胡萝卜素产量,成为当前该领域亟待解决的关键问题<sup>[3]</sup>。现有研究主要围绕廉价发酵原料的选择<sup>[4]</sup>、微生物合成途径改造<sup>[5]</sup>、关键基因挖掘及其关键酶工程开发<sup>[6]</sup>、细胞工厂的人

收稿日期:2025-04-16;修回日期:2025-12-16;出版日期:2026-06-15

基金项目:甘肃省重点研发计划项目(22YF11GA292);中国烟草实业发展中心青年人才项目(ZYSYQ-2022-7)

作者简介:刘晨(1987—),男,山东省齐河县人,甘肃烟草工业有限责任公司工程师,主要研究方向为烟草分子生物学与微生物学。E-mail:liuc11258@163.com

通信作者:韩露(1979—),女,辽宁省昌图县人,甘肃烟草工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为烟草化学与微生物学。E-mail:hanlu@gszcf.com

工构建<sup>[7]</sup>、精准发酵控制策略优化<sup>[8]</sup>等方面,其中基于菌藻协同代谢稳定混合培养技术的研究已成为提高目标产物产量、降低发酵成本的研究热点之一<sup>[9-11]</sup>。

小球藻(*Chlorella vulgaris*)和粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)作为2种营养类型不同的微生物,均可利用低值含糖废弃原料合成类胡萝卜素和油脂<sup>[10]</sup>。相较于单一微生物,基于上述2种微生物构建的混合培养体系能更高效地促进目标产物的生物合成<sup>[12-13]</sup>。然而,这2种微生物的培养条件存在一定差异,尤其是最佳生长与产物合成所需的碳源质量浓度差异性较大。对于小球藻来说,低质量浓度葡萄糖有利于其生长,高质量浓度葡萄糖会显著抑制其生长<sup>[13]</sup>;而粘红酵母属于异养型微生物,其生长和产物合成均需要相对较高的碳源质量浓度<sup>[14]</sup>。因此,在混合培养过程中,为了实现二者的稳定同步生长及便于优化产物合成调控策略,迫切需要提升小球藻对高质量浓度葡萄糖的耐受性。

鉴于此,本文拟通过不同质量浓度葡萄糖胁迫诱使小球藻进行定向驯化,以获得较高糖耐受性的小球藻,并结合转录组学及逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR),初步分析其在高糖胁迫下的关键基因表达情况,以期为菌藻混合发酵协同合成类胡萝卜素的深入研究提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试菌种

小球藻,由郑州轻工业大学烟草生物重点实验室提供,采用BG-11斜面固体培养基培养后,4℃冰箱保存,备用。

### 1.2 主要试剂

葡萄糖、琼脂、NaNO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、ZnSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O,郑州利研生物科技有限公司;酵母粉,赛博生物科技有限公司;柠檬酸钠、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸铁铵,河南欣之源化工产品有限公司;Trizol试剂盒,上海尚宝生物科技有限公司;类胡萝卜素标准品,上海甄淮生物科技有限公司;HCl、石油醚、

丙酮,国药集团化学试剂有限公司;PrimeScript TM 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司。以上试剂均为分析纯。

### 1.3 主要仪器与设备

DT-1300袖珍型光度计,青岛聚创环保集团有限公司;TCP1型pH计,上海雷磁科学仪器厂;321XJ型分析电子天平,上海精科实业有限公司;YJ-800型超净工作台,苏州苏信环境科技有限公司;HQ-48X1C-Z型恒温振荡摇床,上海赫田科学仪器有限公司;YM100L型立式压力蒸汽灭菌锅,上海三申医疗器械有限公司;J-HH-A型水浴锅,上海冠森生物科技有限公司;T5型LED灯管,普翊电子(东莞)有限公司;紫外灯,广州市朗普光电科技有限公司;Microfuge 20/20R型台式高速离心机,贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司;UV1800型紫外-可见分光光度计,上海让奇仪器有限责任公司;2100生物分析仪,安捷伦科技有限公司;SBA-40D型生物传感分析仪,山东佰森泰克仪器有限公司;TIB8600型实时荧光定量PCR仪,泰普生物科学中国有限公司。

### 1.4 培养基与培养条件

小球藻种子培养基:参考文献[10],采用BG-11斜面固体培养基培养活化菌种,具体配方为NaNO<sub>3</sub> 1.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.075 g/L, CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.36 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 g/L, 柠檬酸钠 0.006 g/L, 琼脂 20 g/L, 微量元素A5溶液(1000×) 1 ml/L。

微量元素A5溶液: H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 2.86 g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.81 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0.222 g/L, Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 0.39 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.079 g/L, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.494 g/L。

定向驯化用培养基:采用菌藻混合培养基,按BG-11液体培养基(BG-11斜面固体培养基中不添加琼脂)的配制方法配制一定量的培养基,再依次加入KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,使其终质量浓度分别为7 g/L、2 g/L和1.5 g/L,分装于不同摇瓶中后,添加葡萄糖于各摇瓶中,形成葡萄糖质量浓度梯度为10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L和50 g/L的培养组。

所有培养基无需调整pH值,采用116℃高压

蒸汽灭菌 25 min, 备用。培养温度为 30 ℃ (水浴锅保温)、通气量为 2 L/min, 500 mL 摇瓶装液量为 300 mL, 接种量为 10% (体积分数, 下同)。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 小球藻高耐糖定向驯化与培养** 小球藻种子活化后, 按接种量 10% 先接种于初始葡萄糖质量浓度为 10 g/L 的 1 号摇瓶中培养, 用 LED 灯模拟日光强度 (5000 Lux) 并培养至对数期。在距离摇瓶侧面 20 cm 处设置 20 W 紫外灯照射 30 s, 再按接种量 10% 转接于初始葡萄糖质量浓度为 20 g/L 的 2 号摇瓶中, 相同条件继续培养至对数期。以此类推, 直到接种于初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L 的 5 号摇瓶并完成定向驯化培养。小球藻高耐糖定向驯化装置示意图如图 1 所示。

**1.5.2 生物量和发酵液残糖测定** 1) 生物量测定: 取 1 mL 发酵液, 于 5000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液, 用生理盐水重悬浮沉淀, 按上述条件离心洗涤 2 遍后, 将菌体重悬浮, 并用去离子水稀释到合适倍数, 采用紫外-可见分光光度计在 680 nm 波长处测定吸光度, 按下式 ( $R^2 = 0.999$ ) 计算发酵液生物量 (g/L)。

$$\text{生物量} = n \times (2.8737 \times A_{680} - 0.0787)$$

式中,  $n$  为稀释倍数,  $A_{680}$  为样品在 680 nm 波长处的吸光度。

2) 发酵液残糖测定: 取 1 mL 发酵液, 于 5000 r/min 条件下离心 5 min 后, 移取上清液并稀释 100 倍, 使发酵液中葡萄糖质量浓度处于生物传感分析

仪的检测范围内, 进行残糖质量浓度测定。

**1.5.3 类胡萝卜素含量和产量测定** 参考朱丽花等<sup>[15]</sup>的方法, 取 1 mL 发酵液, 于 5000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液, 收集菌体沉淀, 用蒸馏水重悬浮菌体后再次离心, 收集菌体沉淀并向其中加入 6 mL 3 mol/L 的 HCl 溶液, 振荡悬浮菌体直至均匀混合后, 于沸水浴中静置 5 min, 迅速冷却菌液, 于 8000 r/min 条件下离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 6 mL 等体积混合的石油醚-丙酮溶液, 充分振荡, 分层萃取类胡萝卜素, 萃取液离心后, 用去离子水稀释到合适倍数, 于 475 nm 波长处测定其吸光度, 按下式计算类胡萝卜素含量 (mg/g) 及产量 (mg/L)。

$$\text{类胡萝卜素含量} = \frac{A_{475} \times D \times V}{0.16 \times W}$$

式中,  $A_{475}$  为样品在 475 nm 波长处的吸光度,  $D$  为稀释倍数,  $V$  为消耗石油醚-丙酮溶液的总体积/L,  $W$  为生物量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.16 为类胡萝卜素消光系数。

类胡萝卜素产量 = 类胡萝卜素含量 × 生物量

**1.5.4 转录组测序** 为初步揭示高糖胁迫定向驯化小球藻的分子机制, 对小球藻最高葡萄糖质量浓度实验组 (50 g/L, 定为实验组 XQZ51 和 XQZ52) 和适宜葡萄糖质量浓度组 (30 g/L, 对照组 XQZ1) 取样, 每组均取 6 个平行样品, 完成无参转录组测序分析。后续转录组测序委托南京派森诺基因科技有限公司完成。使用 Trizol 试剂盒法分离提取样品总 RNA, 利用 Oligo (dT) 磁珠特异性富集总 RNA 中带有 polyA 结构的 mRNA; 采用离子打断方式, 构建 300 bp 左右的 RNA 片段库, 以片段化 mRNA 为模板, 进行逆转录反应合成第一链 cDNA, 再通过 RNA 酶 H 和 DNA 聚合酶 I 完成双链 cDNA 合成。采用高保真 DNA 聚合酶进行有限循环次数的 PCR 扩增, 选取 450 bp 左右的文库片段, 并采用 2100 生物分析仪对文库进行质量控制, 完成单链文库的构建。采用第二代测序技术, 基于 Illumina 测序平台进行测序。数据质量检测与处理均由南京派森诺基因科技有限公司完成。

转录本表达水平、基因表达水平和外显子表达水平共同组成转录组表达分析, 使用不同基因剪切



图 1 小球藻高耐糖定向驯化装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the directional domestication device for glucose tolerance of *C. vulgaris*

方式表达相同基因,其生物学效应结果会表现出较大差异,因此有必要以转录本序列为参考,使用转录组表达定量软件(RSEM)进行差异化表达分析,对每个样本的基因表达水平进行估计,将变化1倍及以上的基因视为差异表达基因(DEGs)<sup>[16]</sup>,进一步统计每个样品比对到每个基因上的序列数,并基于该序列数计算每个基因的FPKM(Fragments Per Kilobase of Transcript per Million Mapped Fragments)值,即每百万条比对到基因组的片段中,每千个碱基转录本所对应的片段数。

**1.5.5 RT-qPCR 验证** 使用 PrimeScript™ 1st stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA,扩增体系和反应程序如下:反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,其中 2 $\times$ SYBR real-time PCR premixture 10  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}$ 的正反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{L}$ 。将配制的 PCR 反应溶液置于实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s、60  $^{\circ}\text{C}$  30 s;40 个循环。每个样品均重复 3 次。其中 Gene2. 1. 1. 14 的引物为 F(GCCACTGAAGGTTACTGGAAC),R(AGACAGGTCTAGTATGAATACCT); Gene2. 5. 1. 6 的引物为 F(AACGATGAGATTGCAGCTGACT),R(TAGGTGTCAACGAAGACGGACA); Gene4. 4. 1. 14 的引物为 F(TACAACGACAATCAACTCGTGT),R(CTTATCCTCCTCACCAAAGACT); Gene3. 5. 99. 7 的引物为 F(TTGCGGTAACAAGATCAGAA),R(TATGGATGTTTCAGAGCATCCT)。

## 2 结果与分析

### 2.1 小球藻生长和类胡萝卜素合成结果分析

小球藻定向驯化后的生物量和类胡萝卜素产量如图 2 所示。由图 2 可知,当初始葡萄糖质量浓度小于 20 g/L 时,小球藻的生物量与初始葡萄糖质量浓度成正比,最大生物量约 2.56 g/L;当初始葡萄糖质量浓度大于 30 g/L 时,小球藻的生物量出现下降趋势,尤其是当初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L 时,小球藻的生长能力受到强烈抑制。然而,在较高葡萄糖质量浓度条件下能够获得较高的类胡萝卜素产量,当初始葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时,类胡萝卜素产量达最大值 5.38 mg/L,这可能是由于

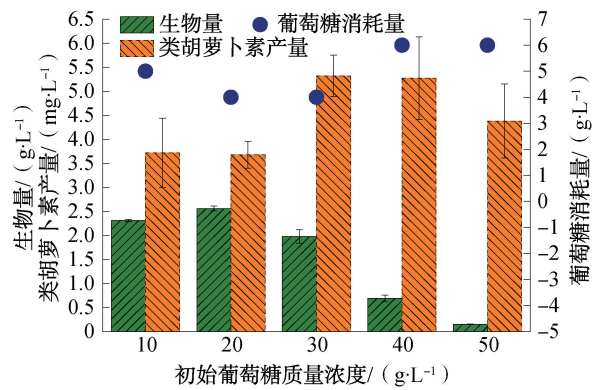


图 2 小球藻定向驯化后的生物量和类胡萝卜素产量  
Fig. 2 Biomass and carotenoid yields of *C. vulgaris* after directional domestication

较高质量浓度葡萄糖有利于菌体获取碳源,进而促进四萜类次级代谢产物合成<sup>[17]</sup>;当初始葡萄糖质量浓度超过 40 g/L 时,类胡萝卜素产量逐渐下降,这与已有文献报道<sup>[12-13,18]</sup>的结果较一致。因此,选择初始葡萄糖质量浓度为 30 g/L 较为适宜。在该质量浓度下,定向驯化获得的一株小球藻对高糖的耐受性较驯化前提高了约 50%。

小球藻能够在自养、异养和混合营养模式下生长,且在有机碳源存在且光照充足的条件下,异养或混合营养模式可获得较高的生物量,这有利于简化后续收集过程,促进其合成产品的可持续性推广应用<sup>[12,18]</sup>。尤其是基于不同微生物营养特性而发展的菌藻混合培养技术,能够使 2 种微生物在培养体系中原位实现 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 交换、培养体系 pH 值自动调节、次级代谢产物互利等生物学过程<sup>[10]</sup>。葡萄糖是小球藻进行异养生长的最佳碳源<sup>[19]</sup>,耐高糖小球藻的定向驯化有利于保证混合培养体系中 2 种微生物生长的一致性,进而提高二者协同代谢能力。

### 2.2 转录组测序结果分析

**2.2.1 表达量与相关性分析** 样品基因表达量特征的 FPKM 密度分布图如图 3 所示,其中横坐标为 FPKM 值取以 10 为底的对数,纵坐标为对应表达量的基因分布密度,而 FPKM 密度分布图可从总转录基因中考查各基因的表达量及相应模式。由图 3 可知,XQZ1 中 mRNA 的表达量 FPKM 值主要集中在 1~10 和 10~100 这 2 个区间,总共有 19 467 个基因,占全部基因的 84.24%;XQZ51 和 XQZ52 中

mRNA 的表达量 FPKM 值也主要分布于 1~10 和 10~100 这 2 个区间。值得注意的是,在 XQZ51 和 XQZ52 中,mRNA 的表达量 FPKM 值在区间 0~0.01 内出现显著上升,较普通小球藻平均多表达 3854 个基因,占总表达基因的 16.58%。此外,耐高糖小球藻在区间 0.1~1.0 的 mRNA 表达量 FPKM 值同样发生增加,表明实验组与对照组在基因表达量 FPKM 值区间分布上存在明显差异。

样品之间基因表达水平的相关性可判断样品选择是否合理,是检验实验可靠性的重要标准之一,其中皮尔逊相关系数(Pearson Correlation Coefficient)能表示样品之间基因表达水平相关性的紧密程度。样品相关性分析图如图 4 所示。由图 4 可知,XQZ51 与 XQZ52 之间的相关系数为 0.99~1.00,表明实验组之间存在极强的相关性,但二者与 XQZ1

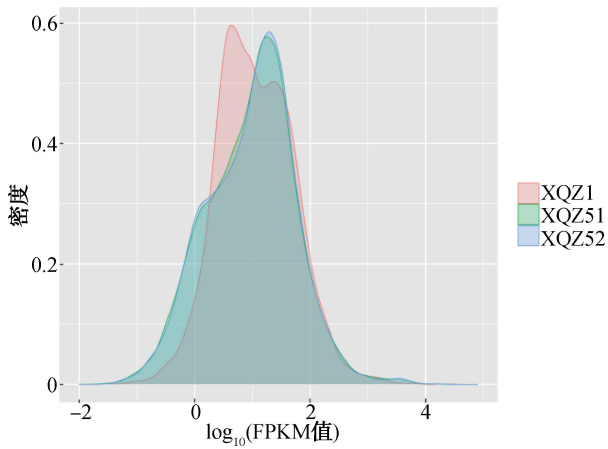


图 3 样品基因表达量特征的 FPKM 密度分布图  
Fig. 3 FPKM density distribution of sample gene expression characteristics

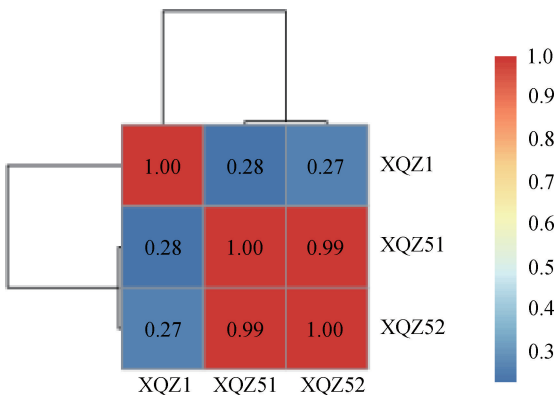


图 4 样品相关性分析图

Fig. 4 Correlation analysis of samples

之间的相关性较低,表明耐高糖小球藻与普通小球藻之间表达模式的相似度较低。

**2.2.2 DEGs 分析** DEGs 的筛选需要设置一定的条件:表达差异倍数  $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ ,显著性  $P < 0.05$ ,并使用 DESeq 软件对 DEGs 进行分析<sup>[20]</sup>。实验组与对照组的 DEGs 火山图如图 5 所示。由图 5a)可知,与 XQZ1 相比,XQZ51 总共有 16 个 DEGs,其中有 9 个上调基因和 7 个下调基因;由图 5b)可知,与 XQZ1 相比,XQZ52 总共有 24 个 DEGs,其中有 13 个上调基因和 11 个下调基因。

**2.2.3 GO 功能注释及 KEGG 富集、代谢通路分析** 采用 GO 注释对上述 DEGs 进行功能鉴定,并结合 KEGG 富集相关功能基因。结果发现,DEGs 功

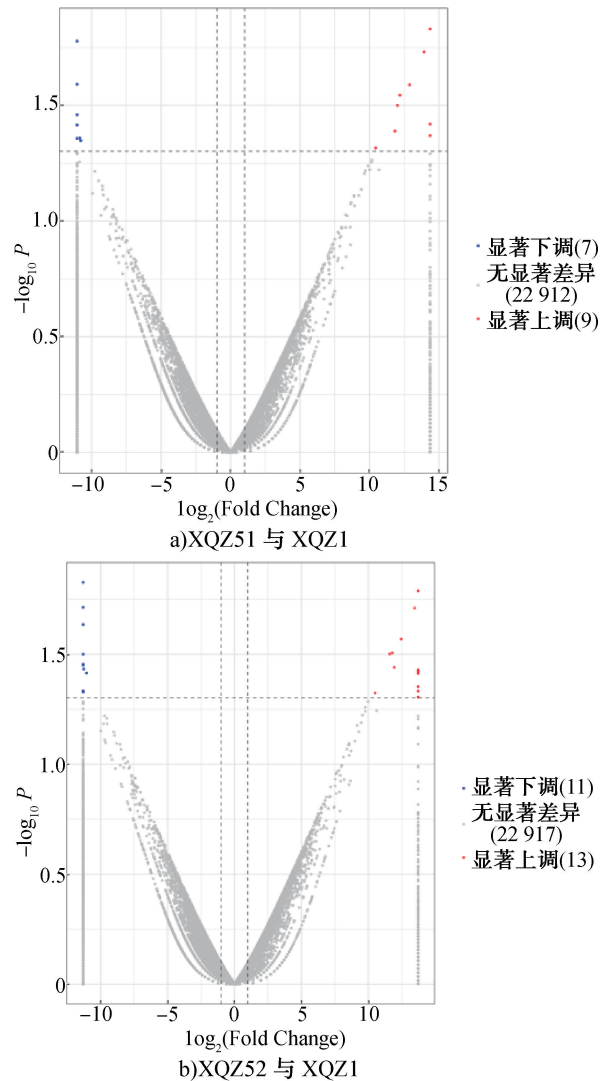


图 5 实验组与对照组的 DEGs 火山图

Fig. 5 Volcano plots of DEGs between experimental and control groups

能可归类为生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC),实验组与对照组存在78个差异显著富集的GO term,且包含12个极其显著的功能基因簇。在GO功能富集差异最显著的前10个基因簇中,含有24个上调基因和12个下调基因。一部分DEGs主要被富集在与“转移酶和合成酶”相关的酶促反应过程中,如S-甲基转移酶活性、胺跨膜转运蛋白活性、蛋氨酸合成酶活性等;一部分DEGs被富集在与物质转运相关的生物过程中,如碳酸氢盐、草酸盐、甲基铵、硫酸盐转运等;也有部分DEGs被富集在生物合成和物质共生相关的生物过程中。KEGG富集分析显示,半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路中涉及4个上调的DEGs,表达产物包括5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸-同型半胱氨酸S-甲基转移酶、S-腺苷甲硫氨酸t合成酶、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)合成酶和ACC脱氢酶。KEGG代谢通路如图6所示。由图6可知,在高糖胁迫下,小球藻细胞中5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸-同型半胱氨酸S-甲基转移酶基因表达的上调,强化了氨基酸向ACC代谢的能力,而ACC进一步分解为乙烯或2-酮丁酸,尤其是ACC脱氢酶表达的上调,推动代谢途径发生偏向性改变,促使丙酸盐成为产物中的主流代谢方向,这会造成丙酸及其衍生物的累积,进一步影响小球藻的生长。造成该现象的原因如下:1)丙酸的累积可影响小球藻细胞膜和光合系统的工作效率<sup>[1]</sup>;2)小球藻的最佳生长pH值为中性偏酸,而丙酸作为一种有机酸,其累积会使小球藻细胞环境pH值出现断崖式下降,进而抑制小球藻生长<sup>[18]</sup>;3)丙酸过度累积对小球藻是一种胁迫刺激,可能改变小球藻原有的碳源主流代谢类型,而小球藻需要一定时间完成对该胁迫刺激自我调控与适应<sup>[11]</sup>。

高葡萄糖质量浓度主要通过多方面协同抑制小球藻生长<sup>[21]</sup>:1)抑制光合作用,降低叶绿素合成、碳酸酐酶活性及光合碳固定效率;2)扰乱碳代谢,过度激活糖酵解,抑制TCA循环与氧化磷酸化,导致能量供应不足;3)阻碍氮等元素吸收及蛋白质、氨基酸合成,且与高光强叠加而加剧抑制,最终通过光合受损、代谢紊乱、物质合成受阻抑制小球藻生长与生物量累积。本研究结果表明,高葡萄糖质量浓

度推动小球藻代谢偏向丙酸盐合成并累积,通过影响细胞膜与光合系统、降低胞内pH值、改变碳源代谢类型,抑制小球藻生长,这丰富了相关机制内容。

### 2.3 RT-qPCR 分析

为进一步验证上文中半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路中涉及的4个上调基因的准确性,进行了RT-qPCR分析,DEGs在半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路中的相对表达量如图7所示,其中\*表示差异显著( $P < 0.05$ ),\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ ),\*\*\*表示



图6 KEGG代谢通路

Fig. 6 KEGG metabolic pathway

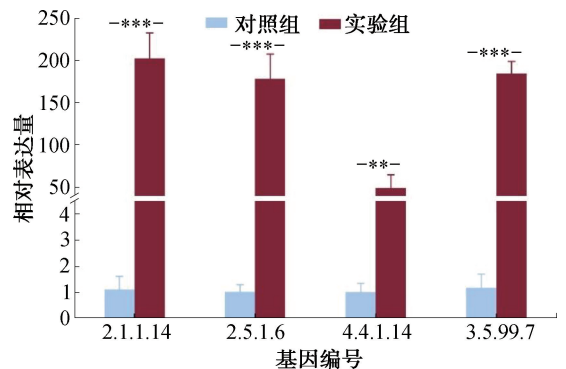


图7 DEGs在半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of DEGs in the cysteine/methionine metabolic pathway

示差异极其显著( $P < 0.001$ )。由图7可知,相较于对照组,实验组4个DEGs均明显上调, gene2.1.1.14、gene2.5.1.6和gene3.5.99.7表达上调倍数较大,分别为184.74倍、175.68倍和179.28倍,这表明转录组测序数据基本可靠。

### 3 结论

本研究以紫外诱变为预处理,结合梯度葡萄糖质量浓度定向驯化小球藻,以最大生物量和类胡萝卜素产量为筛选指标,成功获得一株耐30 g/L葡萄糖的优良菌株,其糖耐受性较普通小球藻提升约50%。以50 g/L葡萄糖质量浓度组为实验组、30 g/L葡萄糖质量浓度组为对照组,开展无参转录组测序分析,在GO功能富集差异最显著的前10个基因簇中,含有24个上调基因和12个下调基因。结合GO功能注释与KEGG富集分析发现,半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路是核心响应通路,细胞内丙酸及其衍生物累积是高糖抑制小球藻生长的主要原因之一。选取半胱氨酸/蛋氨酸代谢通路中的4个上调基因(gene2.1.1.14、gene2.5.1.6、gene4.4.1.14、gene3.5.99.7)进行RT-qPCR验证,发现这4个基因在高糖胁迫下均呈明显上调趋势,其中gene2.1.1.14、gene2.5.1.6、gene3.5.99.7的上调倍数尤为显著,分别为184.74倍、175.68倍和179.28倍,证实转录组测序结果基本可靠。本研究获得的耐高糖小球藻可为菌藻混合培养合成类胡萝卜素提供优质资源,而机制研究可为相关发酵工艺的调控提供理论参考。

### 参考文献:

- [1] 郑方铭,王鹏超.微生物合成四萜类化合物研究进展[J].中国生物工程杂志,2023,43(10):96-108.  
ZHENG L M, WANG P C. Progress in the synthesis of tetraterpenes by microorganisms[J]. China Biotechnology, 2023,43(10):96-108.
- [2] 张志平,段乃心,魏湘楠,等.基于光胁迫粘红酵母合成高值化类胡萝卜素发酵条件优化[J].轻工学报,2022,37(4):10-17.  
ZHANG Z P, DUAN N X, WEI X N, et al. Optimization of fermentation conditions for high value carotenoid synthesis by *Rhodotorula glutinis* under light stress[J]. Journal of Light Industry, 2022,37(4):10-17.
- [3] 周琳,梁轩铭,赵磊.天然类胡萝卜素的生物合成研究进展[J].生物技术通报,2022,38(7):119-127.  
ZHOU L, LIANG X M, ZHAO L. Biosynthesis of natural carotenoids: Progress and perspective[J]. Biotechnology Bulletin, 2022,38(7):119-127.
- [4] MARTÍNEZ-CÁMARA S, IBAÑEZ A, RUBIO S, et al. Main carotenoids produced by microorganisms[J]. Encyclopedia, 2021,1(4):1223-1245.
- [5] LIU Z Y, YU W L, NOMURA C T, et al. Increased flux through the TCA cycle enhances bacitracin production by *Bacillus licheniformis* DW2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018,102(16):6935-6946.
- [6] HAN J Y, SONG J M, SEO S H, et al. Ty1-fused protein-body formation for spatial organization of metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018,115(3):694-704.
- [7] BIAN Q, JIAO X, CHEN Y, et al. Hierarchical dynamic regulation of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced lutein biosynthesis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2023,120(2):536-552.
- [8] 刘晓桐,孙欣宇,刘玥,等.诱变筛选高产虾青素法夫酵母及发酵条件优化[J].大连工业大学学报,2021,40(6):396-400.  
LIU X T, SUN X Y, LIU Y, et al. Screening of high astaxanthin producing *Phaffia rhodozyma* by mutagenesis and optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2021,40(6):396-400.
- [9] VILLEGAS-MÉNDEZ M Á, MONTAÑEZ J, CONTRERAS-ESQUIVEL J C, et al. Scale-up and fed-batch cultivation strategy for the enhanced co-production of microbial lipids and carotenoids using renewable waste feedstock[J]. Journal of Environmental Management, 2023,339:117866.
- [10] JIN D, ZHANG X N, ZHOU L, et al. Emerging applications and mechanisms of algal-bacterial symbiosis on sustainable wastewater treatment: A comprehensive review[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024,65:105912.
- [11] GONG G P, WU B, LIU L P, et al. Enhanced biomass and lipid production by light exposure with mixed culture of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella vulgaris* using acetate as sole carbon source[J]. Bioresource Technology, 2022,364:128139.
- [12] 刘方舟,任洪艳,陈红芬,等.不同碳源对普通小球藻和粘红酵母共培养产油脂的影响[J].基因组学与应用生物学,2020,39(8):3612-3619.  
LIU F Z, REN H Y, CHEN H F, et al. Effects of different carbon sources on lipid production in co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Rhodotorula glutinis*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020,39(8):3612-3619.
- [13] 杜梦帆,王露.不同碳源对小球藻生长的影响[J].生物化工,2022,8(4):93-95.  
DU M F, WANG L. Effects of different carbon sources on the growth of *Chlorella*[J]. Biological Chemical Engineering, 2022,8(4):93-95.
- [14] FERRO L, GOJKOVIC Z, MUÑOZ R, et al. Growth performance and nutrient removal of a *Chlorella vulgaris*-*Rhizobium* sp. co-culture during mixotrophic feed-batch cultivation in synthetic wastewater[J]. Algal Research,

- 2019,44;101690.
- [15] 朱丽花,马延琴,纪彦宇,等.产类胡萝卜素酵母菌的筛选及色素稳定性分析[J].中国酿造,2021,40(9):139-144.
- ZHU L H, MA Y Q, JI Y Y, et al. Screening of carotenoid-producing yeast and pigment stability analysis[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 139-144.
- [16] 汤冬,张国森,赵晓芳.基于二代测序技术的转录组测序生物信息分析[J].河南大学学报(医学版),2019,38(1):67-76.
- TANG D, ZHANG G S, ZHAO X F. Bioinformatics analysis of transcriptome sequencing based on next generation sequencing[J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2019, 38(1): 67-76.
- [17] ZHANG Z P, PANG Z J, XU S Y, et al. Improved carotenoid productivity and COD removal efficiency by co-culture of *Rhodotorula glutinis* and *Chlorella vulgaris* using starch wastewaters as raw material[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(1): 193-205.
- [18] 梁长利,郑训艺,郑祖凤,等.有机碳源对异养小球藻生长、蛋白质和叶绿素含量的影响[J].广东化工,2021,48(13):71-73.
- LIANG C L, ZHENG X Y, ZHENG Z F, et al. Influence of organic carbon sources on the growth, protein and chlorophyll content of heterotrophic *Chlorella vulgaris*[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(13): 71-73.
- [19] JOUN J, SIROHI R, SIM S J. The effects of acetate and glucose on carbon fixation and carbon utilization in mixotrophy of *Haematococcus Pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2023, 367: 128218.
- [20] CAI Y H, LIU Y H, LIU T Y, et al. Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using broken rice hydrolysate as carbon source for biomass and pigment production[J]. Bioresource Technology, 2021, 323: 124607.
- [21] 郎筱宇,刘志媛,徐梦,等.葡萄糖对小球藻(*Chlorella* sp. HN08)光合作用和生长的影响[J].微生物学报,2017,57(4):550-559.
- LANG X Y, LIU Z Y, XU M, et al. Effects of glucose on photosynthesis and growth of *Chlorella* sp. HN08 cells [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(4): 550-559.

## Effects of high glucose stress on growth and carotenoids synthesis of *Chlorella vulgaris*

LIU Chen<sup>1</sup>, CHEN Ruisheng<sup>2</sup>, WANG Zhen<sup>1</sup>, YANG Hongjing<sup>1</sup>, SONG Kai<sup>1</sup>, WEI Jingbin<sup>1</sup>, HAN Lu<sup>1</sup>

1. Gansu Tobacco Industry Co., Ltd., Lanzhou 730050, China;

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** [Objective] This study aimed to alleviate the inhibitory effect of high initial glucose concentration on the growth and carotenoid synthesis of *Chlorella vulgaris* during fermentation. [Methods] High glucose-tolerant *C. vulgaris* strains were screened with biomass and carotenoid yield as indicators, using UV mutagenesis combined with directional domestication under glucose concentration gradient stress. The mechanism underlying the effect of high glucose stress on the growth of *C. vulgaris* was analyzed at the transcriptome level, and the result were verified by RT-qPCR. [Results] A *C. vulgaris* strain capable of tolerating a glucose concentration of 30 g/L was obtained through directional domestication. Compared with the original strain, its glucose tolerance increased by approximately 50%, and the carotenoid yield reached 5.38 mg/L. The FPKM density distribution of gene expression in the high glucose-tolerant strain differed significantly from that of the control group, and the two expression patterns showed low similarity. Four upregulated differentially expressed genes (DEGs) related to the cysteine and methionine metabolism pathway in the high glucose-tolerant strain led to the accumulation of propionate and its derivatives in cells, thereby inhibiting growth. The expression levels of gene 2.1.1.14, gene 2.5.1.6, and gene 3.5.99.7 were upregulated 184.74-fold, 175.68-fold, and 179.28-fold, respectively, compared with the control group. [Conclusion] The strategy of UV mutagenesis combined with directional domestication under glucose concentration gradient stress can effectively improve the glucose tolerance of *C. vulgaris*, and the abnormal regulation of the cysteine/methionine metabolism pathway is one of the important molecular mechanisms by which high glucose stress inhibits its growth.

**Key words:** high glucose stress; directional domestication; *Chlorella vulgaris*; carotenoids; transcriptome analysis

[责任编辑:杨晓娟 申慧珊]