

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :299 - 310; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140393

不同营养方式对普通小球藻生长代谢及生化组分的影响

孔维宝, 汪洋, 杨红, 蕙玉琴, 韩锐, 牛世全

西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070

摘要:【目的】系统研究自养、混养和异养 3 种营养方式对真核模式微藻——普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长特性、细胞生化组分和碳代谢途径关键酶活性的影响。【方法】以 *C. vulgaris* 为研究对象, 通过设置光合自养、混养和异养 3 种营养方式, 采用光谱学、色谱学方法, 研究不同营养方式对 *C. vulgaris* 从生长特性、细胞组分合成和碳代谢等方面的影响。【结果】*C. vulgaris* 依次经自养至混养和异养的培养方式转变中, 藻细胞的可溶性糖和油脂含量显著提高, 油脂中 C16、C18 不饱和脂肪酸的相对含量降低, 而饱和脂肪酸的含量升高; 蛋白质含量、光合色素含量显著下降, 18 种氨基酸的相对含量也呈下降趋势; 葡萄糖的添加可抑制藻细胞吸收和积累除碳元素以外的其他测试元素。在添加葡萄糖的前提下, 光照可促进藻细胞的生长量、不饱和脂肪酸和氨基酸, 以及除碳元素以外的其他测试参数增加。对微藻胞外碳酸酐酶和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的活性分析结果表明, 异养和混养直接影响 *C. vulgaris* 的碳代谢途径。【结论】光源和葡萄糖的供给与否直接影响 *C. vulgaris* 的生长代谢和生化组分合成, 葡萄糖的添加在显著促进藻细胞生物量积累的同时, 刺激碳素(糖类和油脂)生化成分的合成, 而抑制氮素成分(蛋白质和光合色素)的合成; 在光照条件下培养基中葡萄糖的浓度和消耗水平直接决定藻细胞主营自养或异养生长。添加有机碳源葡萄糖的混养(光照)和异养(暗处理)培养可促进藻细胞的生长, 异养和自养的生物量之和接近于混养, 表明混养是最佳的藻细胞营养生长方式。

关键词: 营养方式, 普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 生长特性, 代谢, 细胞组成, 差异性

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0299-12

微藻是一类系统发生各异、个体较小、通常为单细胞或群体的、能进行光合作用(部分为异养或混养)的水生(或陆生、气生、共生)低等植物。微藻种类繁多, 表现为系统发生的多样性、遗传和表型的多样性、生长方式的多样性、生态多样性、代谢多样性、化学多样性和生物功能多样性^[1]。随着生物质新能源和多样化新型生物基产品开发的迫切需求, 微

藻生物技术产业重新得到了世界各国政府和科研人员的普遍关注^[2]。鉴于其具有生物量大、光合效率高、生长周期短、油脂含量高、培养要求低和环境友好等突出优点^[3], 加之微藻细胞的培养可以实现污染水体的深度净化、高效生物固定 CO₂ 与高价值生物质生产的多项耦合, 这一生物有机体被认为是新产品开发和应用的新秀^[4-5]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360192, 31260134); 西北师范大学青年教师科研能力提升项目(NWNU-LKQN-10-30)

作者简介: 孔维宝(1981-), 男, 甘肃永靖人, 副教授, 博士, 研究方向为微藻生物技术。E-mail: kwbao@163.com

收稿日期: 2014-08-08; **修回日期:** 2014-11-06

微藻营养代谢方面的研究一直以来是该领域的重点和热点内容。微藻细胞具有营养方式的多样性,即能在以 CO₂ 或碳酸盐为唯一碳源的环境下可进行自养生长的同时,部分微藻可进行混合营养(混养)或异养生长^[6]。在混养或异养培养条件下,蓝藻、绿藻和红藻等的生长速率明显提高,生物量也显著增加。由于混养或异养培养能促进许多微藻的生长及其细胞组分的合成,可缩短培养周期、实现细胞高密度培养,使其成为微藻培养的新技术,在工业生产上具有重要的应用潜力和价值^[7-8]。

近年来,众多研究者针对微藻能源的开发需求,报道了大量有关采用不同营养方式和培养技术以提高藻细胞浓度和油脂含量的研究成果^[9-11],但是系统深入研究真核微藻混养或异养生长代谢机理的文献相对较少^[12-13]。本文以普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 为模式真核微藻,比较研究了其在自养、混养和异养培养条件下生长代谢特性以及细胞组分生物合成的差异,较全面地考察了不同营养方式对藻细胞生长动力学、光合色素含量、蛋白质及氨基酸组成、油脂及脂肪酸组成等的影响,并首次报道了不同营养方式下小球藻细胞吸收积累营养元素和碳代谢途径关键酶(胞外碳酸酐酶和核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶)活性变化的差异性,旨在进一步认识真核单细胞微藻的混养和异养生长特性及生理生化机理,为经济型微藻的高密度、规模化培养提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料和试剂: 实验用普通小球藻 (*C. vulgaris*-31#) 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。藻种基础培养基为土壤浸出液培养基 (SoilEM)。培养基营养盐、NaOH、HCl、H₂SO₄、葱酮、考马斯亮蓝 G-250、正己烷、甲醇等所用试剂均为分析纯试剂。

1.1.2 仪器设备: TDL-5000B 低温冷冻离心机 (上海安亭)、LDZX-40BI 型高压蒸汽灭菌器 (上海申安)、分析天平 (日本岛津)、DHZ-C 型大容量恒温振荡器 (江苏太仓)、超净工作台 (江苏安泰)、Orion 686 酸度计 (美国奥利龙)、JPSJ-605 溶氧仪 (上海雷磁)、照度计 (深圳华谊)、日立 UV-1800 可见紫外分光光度计、GY92-2D 超声波细胞破碎仪 (浙江宁

波)、电热烘箱 (上海一恒)、冷冻干燥机 (湖南湘仪)、Agilent 2890A/5975C GC/MS、835-50 型高速氨基酸分析仪 (日本日立)、F-4600 型荧光分光光度计 (日本日立)、DCR-3D Nd: YAg 激光诱导击穿光谱 (Spectra-Physics)。

1.2 *C. vulgaris* 的培养方法

C. vulgaris-31# 的种子平板分离培养基和液体培养液均采用 SoilEM, 其组成为 (/L): 0.25 g NaNO₃, 0.175 g KH₂PO₄, 0.075 g K₂HPO₄, 0.075 g MgSO₄·7H₂O, 0.025 g NaCl, 0.025 g CaCl₂·2H₂O, 5 mg FeCl₃·6H₂O, A₅ 溶液 1mL (0.287 mg ZnSO₄·7H₂O; 0.169 mg MnSO₄·H₂O; 0.061 mg H₃BO₃; 2.5 μg CuSO₄·5H₂O) 和 1.24 μg (Na)₆Mo₇O₂₄·7H₂O), 土壤浸出液 40 mL。固体培养基中添加 2% 琼脂。各种培养基接种前在 121℃、0.1 MPa 条件下灭菌 20 min。

将购置的新藻种在 SoilEM 固体培养基上划线分离纯化培养,挑取生长良好的藻种,接种于 SoilEM 液体培养基中,将培养至对数生长期的 *C. vulgaris* 作为藻种使用,接种量为 10% (V/V)。培养条件为 25 ± 1℃, 2500 lux, 光暗比为 12 h L:12 h D, 摇瓶转速为 120 r/min。

以 SoilEM 培养基为基础培养基,设置 3 组实验:光合自养组将 *C. vulgaris* 直接培养在 SoilEM 中;混合营养和异养实验组以 SoilEM 为基础培养基,并添加 10 g/L 的葡萄糖作为有机碳源,自养和混合营养组进行光照培养 (2500 lux),异养组实验进行暗培养,其他培养条件同上,每隔 24 h 定时取样测定。3 组实验进行 3 次重复培养,结果以平均值 ± 标准偏差表示。

1.3 分析方法

1.3.1 藻细胞浓度的测定: 藻细胞生长曲线采用比浊法测定,测定波长为 660 nm。藻细胞浓度采用称重法测定,具体测定方法为:取一定体积定时培养的藻液,以 2500 × g 离心 10 min,弃去上清液,所得藻泥用等体积去离子水重新洗涤、悬浮后再在相同条件下离心获得藻泥。用比浊法测定时将藻泥再次用等体积的去离子水悬浮,摇匀,用去离子水稀释适当倍数后在 660 nm 下测定吸光值 (OD)。称重法测定藻细胞浓度时,将洗涤离心所得藻泥置于已干燥称重的离心管中,在 70℃ 恒温烘箱中干燥至恒重,并称重计算藻细胞浓度 (g/L)。通过测定对数生长期

的藻细胞浓度 (g/L) 和培养时间, 计算比生长速率 (μ , day^{-1}) 和产率 (P , g/L/day)。 $\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / (t_x - t_0)$, $P = (X_t - X_0) / (t_x - t_0)$, 式中, X_t 和 X_0 分别为培养 t_x 和 t_0 时的细胞干重浓度 (g/L) [14]。

1.3.2 pH 值和溶解氧 (DO) 的测定: 培养基 pH 值和溶解氧含量分别采用酸度计和溶氧仪测定。

1.3.3 光合色素含量的测定: 采用 3 波长比色法测定光合色素含量。取培养一定时间的藻液, 以 2500 × g 离心 10 min, 弃去上清液, 藻泥再次用去离子水洗涤、离心后, 在沉淀藻细胞中加入 80% 的乙醇, 摇匀后置于 4℃ 冰箱中避光反复提取色素两次, 取上清液合并, 适当稀释后测定, 计算藻细胞中的叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量。具体操作和计算方法参考文献 [15]。

1.3.4 粗脂肪含量的测定: 粗脂肪含量测定采用正己烷提取一称重法。以 2500 × g 离心 10 min 收集培养结束的藻液, 去离子水洗涤 2 次, 离心收集的藻泥经冷冻干燥后, 将干藻粉用小型研磨器充分研磨至细粉, 达到细胞破壁的目的, 在室温下用正己烷反复抽提 3 次, 每次振荡提取 1 h, 合并提取液, 45℃ 旋转蒸发回收溶剂后在 70℃ 烘干至恒重, 称重计算粗脂肪含量。

1.3.5 GC-MS 分析脂肪酸组成: 采用 $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 法对 1.3.4 所得脂肪样品进行甲酯化, 具体方法参考文献 [16], 甲酯化样品采用 GC-MS 进行分析。色谱条件: 色谱柱: HP-5 ms 弹性石英毛细管柱; 进样口温度 290℃; 程序升温: 初始温度 80℃, 保持 2 min, 以 6℃/min 的升温速率升温至 290℃, 保持 5 min; 载气为高纯氦气, 流速为 1 mL/min, 分流比 50:1。质谱条件: MSD 离子源为 EI 源, 离子源温度 230℃, 电子能量 70 eV, m/z 范围 29 - 700 amu; 利用美国 NIST05 谱库进行定性分析。

1.3.6 总蛋白质含量和氨基酸组成的测定: 藻细胞总蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法, 具体测定和计算方法参考文献 [15]。

1.3.7 可溶性蛋白质含量的测定: 培养所得藻液以 2500 × g 离心 10 min, 用去离子水洗涤藻泥 2 次, 取藻泥用一定量的 50 mmol/L pH 8.0 磷酸缓冲溶液稀释, 并进行细胞破碎 (400 W, 20 min, 超声 5 s, 间歇 1 s), 细胞破碎液在 50℃ 热水浴中提取 2 次, 每次 1 h, 提取液以 2500 × g 离心 10 min, 合并两次提

取液, 定容后取适量样品, 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定 [15]。

1.3.8 可溶性糖含量的测定: 取一定体积的培养藻液, 2500 × g 离心 10 min 收集藻细胞, 用去离子水洗涤藻细胞 2 次, 取藻泥用 50 mmol/L pH 8.0 磷酸缓冲溶液稀释, 并进行细胞破碎 (400 W, 20 min, 超声 5 s, 间歇 1 s), 细胞破碎液在沸水浴中提取 2 次, 每次 1 h, 提取液以 2500 × g 离心 10 min, 合并两次提取液, 定容后采用蒽酮-硫酸比色法测定可溶性糖含量 [15]。

1.3.9 藻细胞中主要元素的分析方法: 培养液经离心收集藻细胞后用去离子水洗涤 2 次, 再次离心后所得藻细胞冷冻干燥, 干燥样品经压片后采用激光诱导击穿光谱技术测试元素组成。元素测试和分析工作由西北师范大学物理与电子工程学院原子分子物理研究所协助完成。

1.3.10 藻细胞中相关酶活性的测定: 胞外碳酸酐酶: 采用完整细胞 pH 漂移法测定藻细胞胞外碳酸酐酶活性 [17-18]。收集的藻细胞经缓冲液 (pH 8.3, 20 mmol/L 巴比妥缓冲液) 洗涤后, 取适量测定胞外碳酸酐酶活性。取 5 mL 经洗涤定容的藻液, 在 4℃ 下迅速加入 5 mL 0℃ CO_2 饱和水, 用 pH 计监测反应体系 pH 从 8.3 降至 7.3 所需的时间, 记为 T。按 $\text{EU} = 10 \times (T_0/T - 1)$ 公式计算酶活性。酶活性单位为 $\text{EU}/\mu\text{g}$ 叶绿素 a。T₀ 为反应体系中未加藻细胞时 pH 值下降所需的时间。叶绿素测定方法同 1.3.3。

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶: 取不同处理组的藻液经离心收集藻细胞, 洗涤、再离心后取藻细胞, 加入预冷 (0 - 4℃) 的酶抽提缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5, 含 2 mmol/L 二巯代苏糖醇, 5 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L NaHCO_3 , 1 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L-巯基乙醇), 4℃ 超声波破碎细胞 30 min 使其破壁, 4℃ 离心后收集上清液即为粗酶提取液, 测定可溶性蛋白质含量和酶活性。酶活性的测定方法参照文献 [19], 活性以 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mg 蛋白} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

2 结果

2.1 不同营养方式对 *C. vulgaris* 生长动力学参数的影响

采用自养、异养和混合营养 3 种方式对 *C. vulgaris* 进行培养, 在相同条件下对其生长过程中的

动态变化进行检测。结果显示(图 1),培养基中添加有机碳源可以使藻细胞生长提前进入对数生长期和稳定期。混合营养和异养培养的 *C. vulgaris* 在第 3 天进入稳定期,在培养的第 1 天和第 2 天藻细胞快速增殖,很快度过对数期进入稳定期;而自养培养的 *C. vulgaris* 在整个培养过程中缓慢增长。在 3 种营养方式中,异养和混合营养条件下 *C. vulgaris* 的生长速率明显优于光合自养。而在异养和混养组中,后者又表现出一定的优势,尤其是在生长的稳定期,异养方式因为能源物质消耗殆尽,进入衰退期,而混养却生长强劲,增长速度平稳。

由表 1 可以看出 3 种培养条件下,混合营养和异养培养的 *C. vulgaris* 生物量浓度分别是光合自养对照组的 7.31 倍和 6.24 倍,比生长速率分别是光合自养对照组的 3.38 倍和 3.34 倍,生物量产率分别是光合自养对照组的 7 倍和 6 倍。此外,混合营

养结合光合自养和异养营养模式的特征,比单独进行自养或异养生长更具有优势。

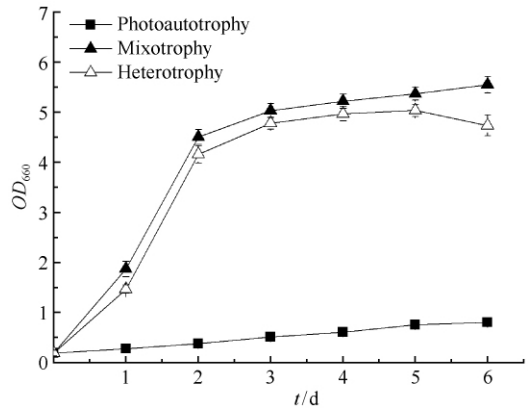


图 1. 营养方式对 *C. vulgaris* 生长特性的影响 ($n=3$)

Figure 1. Effects of trophic modes on the growth behavior of *C. vulgaris* ($n=3$).

表 1. 营养方式对 *C. vulgaris* 生物量生产的影响 ($n=3$)

Table 1. Effects of trophic modes on the biomass production of *C. vulgaris* ($n=3$)

| Trophic modes | Biomass content / (g/L) | Specific growth rate / (μ /day) | Biomass productivity / [g / (L·day)] |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Photoautotrophy | 0.29 ± 0.03 | 0.32 ± 0.02 | 0.05 ± 0.004 |
| Mixotrophy | 2.12 ± 0.10 | 1.08 ± 0.07 | 0.35 ± 0.0017 |
| Heterotrophy | 1.81 ± 0.08 | 1.07 ± 0.06 | 0.30 ± 0.014 |

2.2 不同营养方式对 *C. vulgaris* 培养基 pH 值和溶解氧 (DO) 的影响

pH 值是影响藻类生长代谢的重要因子之一,培养基的 pH 值会影响光合作用中 CO_2 的可用性,在呼吸作用中会影响微藻对有机碳源的利用效率,同时由于 pH 值直接影响细胞膜的渗透性,会影响微藻细胞对培养液中离子的吸收和利用,以及代谢产物的再利用性和毒性。不同培养方式下培养基 pH 值的变化如图 2-A 所示。自养条件下培养液的 pH 值偏碱性而且不断增长,培养结束时 pH 值接近 10。

不同营养方式下培养基中溶解氧含量的变化如图 2-B 所示。光合自养条件下培养基中的溶解氧含量较混养和异养要高,而且随着培养时间的延续,溶解氧含量有增高的趋势,这主要和藻细胞的自养光合放氧有关;异养培养条件下培养基中的溶解氧含量相对最低,在藻细胞生长进入稳定期(第 4 天)时氧含量最高;混合营养培养基中的溶解氧含量介于光合自养和异养培养基中的溶氧含量之间。值得注意的是在藻细胞生长进入第 6 天(稳定期后期)时,

混合营养培养基中的溶氧含量呈现上升趋势,而异养的则呈下降趋势。这说明,在培养后期当培养基中的有机碳源消耗殆尽时,混合营养实验组中提供的光能可能促使藻细胞进行光合放氧,导致培养基中溶解氧含量的上升。

2.3 不同营养方式对 *C. vulgaris* 细胞生化组分的影响

2.3.1 光合色素含量: 图 3 为不同营养方式对 *C. vulgaris* 叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量的影响。由图 3 可知,不同营养方式对单位质量藻细胞中光合色素合成量具有显著影响。自养方式下藻细胞积累的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量显著高于异养和混合营养方式;而异养和混合营养相比较,后者光合色素的含量较高。实验中还发现异养条件下的藻液呈淡黄绿色,这与 *C. vulgaris* 在异养转化过程中出现叶绿体逐渐消失、细胞呈黄化的现象有关^[20]。从光合色素含量的变化可以反映出营养方式直接影响藻细胞的光合作用,有机碳源(葡萄糖)的添加抑制了藻细胞的光合作

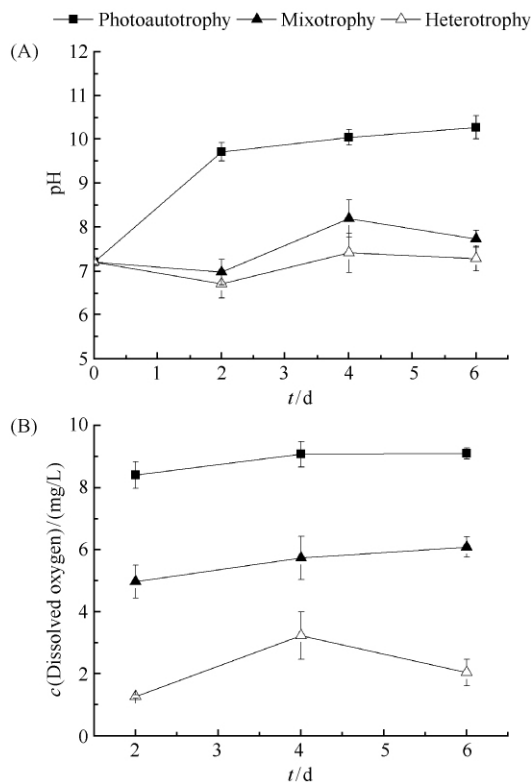


图 2. 营养方式对培养基 pH 值 (A) 和溶解氧 (B) 的影响 ($n=3$)

Figure 2. Effects of trophic modes on the pH values (A) and DO (B) in culture medium ($n=3$).

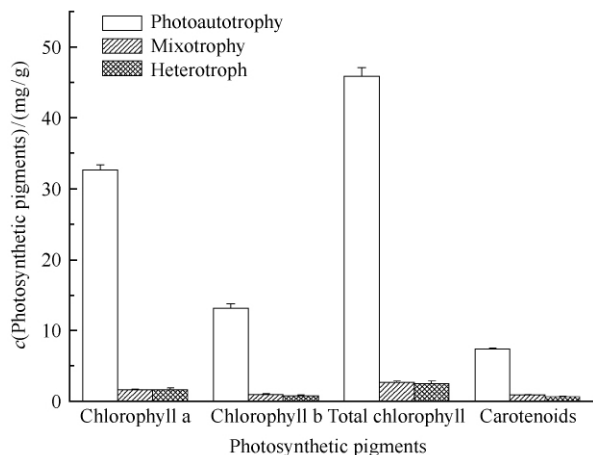


图 3. 营养方式对 *C. vulgaris* 光合色素含量的影响 ($n=3$)

Figure 3. Effects of trophic modes on the photosynthetic pigments contents of *C. vulgaris* ($n=3$).

用, 导致光合色素含量的降低。分析总叶绿素的产率得出, 混合营养条件下总叶绿素的产率为 $2.23 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$, 而自养和异养条件下的总叶绿素的产

率分别为 $1.38 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$ 和 $1.00 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$ 。从上述分析认为, 虽然混合营养培养方式下单位质量藻细胞的叶绿素含量较自养要低, 但是由于混合营养的藻细胞浓度较高, 所以其叶绿素产率相对较高。因此, 从微藻生物合成叶绿素的角度考虑, 混合营养培养模式具有藻细胞浓度高和叶绿素产率高的特点, 比光合自养和异养模式更具优势。

2.3.2 油脂、蛋白质和可溶性糖含量: 图 4 显示了不同营养方式对 *C. vulgaris* 蛋白质、油脂和可溶性糖含量的影响。由图 4 可知, 光合自养条件下蛋白质含量比混养和异养条件下的要高, 经过添加葡萄糖使藻细胞营养方式向混养和异养发生转化后, 其油脂含量和可溶性糖含量显著提高。而混养和异养条件下, *C. vulgaris* 的油脂、蛋白质和可溶性糖含量的差异不显著。这与已有的研究结果相符。Orús 等的研究认为 *C. vulgaris* 从自养方式转变为混合营养时, 藻细胞蛋白质含量的减少通过提高油脂和糖类含量来补偿^[21]。这一结果另外也能反映出营养方式的转变和有机碳源的供给直接影响到 *C. vulgaris* 的碳代谢和氮代谢途径。

分析 3 种细胞生化组分的单位体积产率可知, 自养、混养和异养培养条件下, 油脂产率分别为 3.00 、 73.13 、 $65.00 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$, 蛋白质产率分别为 13.88 、 51.89 、 $47.17 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$, 可溶性糖产率分别为 1.83 、 64.63 、 $64.82 \text{ mg/L}\cdot\text{day}^{-1}$ 。由此可见, 混养和异养转化培养后, 从产率考虑, 藻细胞生物合成油脂、蛋白质和可溶性糖的能力明显高于光合自养

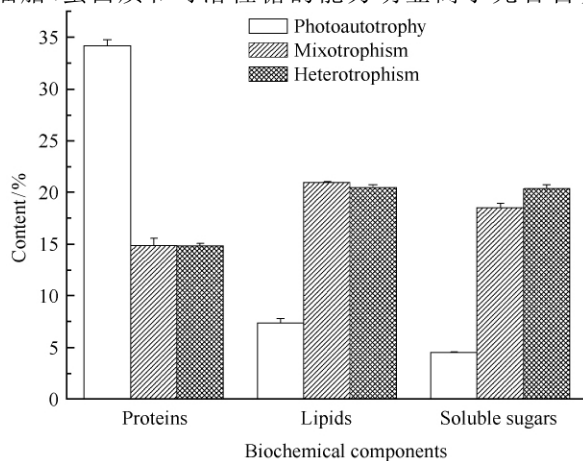


图 4. 营养方式对 *C. vulgaris* 蛋白质、油脂和可溶性糖含量的影响 ($n=3$)

Figure 4. Effects of trophic modes on the proteins, lipids and soluble sugars contents of *C. vulgaris* ($n=3$).

对照组。

2.3.3 脂肪酸组成:藻细胞经从光合自养向混养和异养转化培养后不但油脂含量显著提高,而且直接影响 *C. vulgaris* 油脂的脂肪酸组成。分析表 2 可知,3 种营养方式下微藻油脂的主要脂肪酸为油酸、棕榈酸和亚油酸。但是随着营养方式从自养到混养、再到异养的转变,三烯酸、二烯酸等不饱和脂肪酸含量有下降的趋势,而饱和脂肪酸含量趋于增高,

这说明葡萄糖对藻细胞的脂肪酸合成途径也产生了影响。本文的研究结果与吴庆余教授的报道相似^[13]。

从生产生物能源的角度考虑,上述这些藻细胞在营养方式转变过程中细胞组成方面的变化,包括蛋白质含量的降低、油脂和可溶性糖含量的提高,以及饱和脂肪酸含量的增加都有利于微藻生物柴油和燃料乙醇的生产。

表 2. 营养方式对 *C. vulgaris* 脂肪酸组成的影响

Table 2. Effects of trophic modes on the fatty acids composition of *C. vulgaris*

| Fatty acid composition | c (Relative) /% | | |
|--|-----------------|------------|--------------|
| | Photoautotrophy | Mixotrophy | Heterotrophy |
| Hexadecatrienoic acid (C16:3Δ7c,10c,13c) | 3.66 | 1.80 | 0.91 |
| Hexadecadienoic acid (C16:2Δ7c,10c) | 2.11 | 0.55 | 0.41 |
| Hexadecenoic acid (C16:1Δ7c) | 2.48 | 0.55 | 0.60 |
| Hexadecanoic acid (C16:0) | 31.66 | 36.96 | 36.43 |
| Octadecadienoic acid (C18:2Δ9c,12c) | 19.03 | 18.25 | 17.90 |
| Octadecenoic acid (C18:1Δ9c) | 37.69 | 36.11 | 37.99 |
| Octadecanoic acid (C18:0) | 3.36 | 5.78 | 5.76 |

2.3.4 氨基酸组成:藻细胞营养方式的转变不仅影响蛋白质含量,而且直接影响 *C. vulgaris* 蛋白质中的氨基酸组成(如表 3 所示)。结合图 4 和表 3 中的数据变化可以看出,相同氮源水平下(0.25g/L NaNO₃),自养培养所得藻细胞的蛋白质含量较高,其蛋白质中各种氨基酸的相对含量最高。而经过混养和异养转换培养后 *C. vulgaris* 的蛋白质含量显著降低,蛋白质中各种氨基酸的比例也相应地下降,各

组氨基酸含量高低顺序依次为自养 > 混养 > 异养,自养、混养和异养组氨基酸总量分别为 35.61%、21.03% 和 18.25%。蛋白质和氨基酸分析结果表明,*C. vulgaris* 经过营养方式转变后藻细胞蛋白质的 18 种氨基酸的相对含量发生了明显变化,添加葡萄糖和光/暗培养处理直接影响到 *C. vulgaris* 的氮代谢途径,使氨基酸和蛋白质的合成代谢途径改变。

表 3. 营养方式对 *C. vulgaris* 细胞氨基酸组成的影响

Table 3. Effects of trophic modes on the amino acids composition of *C. vulgaris*

| Amino acid composition | c (Photoautotrophy) /% * | c (Mixotrophy) /% * | c (Heterotrophy) /% * |
|------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| Asparaginic acid | 3.30 | 1.78 | 1.58 |
| Threonine | 1.69 | 1.04 | 0.92 |
| Serine | 1.27 | 0.74 | 0.65 |
| Glutamic acid | 4.22 | 2.30 | 2.00 |
| Glycine | 2.22 | 1.27 | 1.10 |
| Alanine | 2.93 | 1.74 | 1.52 |
| Valine | 2.29 | 1.56 | 1.39 |
| Methionine | 1.85 | 1.39 | 1.22 |
| Isoleucine | 1.51 | 1.00 | 0.90 |
| Leucine | 3.24 | 1.95 | 1.64 |
| Tyrosine | 1.36 | 0.76 | 0.65 |
| Phenylalanine | 2.03 | 1.07 | 0.93 |
| Lysine | 2.04 | 1.17 | 1.02 |
| Histidine | 0.67 | 0.34 | 0.34 |
| Arginine | 2.22 | 1.18 | 1.04 |
| Proline | 1.81 | 1.09 | 0.81 |
| Cystine | 0.75 | 0.53 | 0.46 |
| Tryptophan | 0.21 | 0.12 | 0.08 |
| Total | 35.61 | 21.03 | 18.25 |

* The tested samples were dried solid powder, the values are relative percentage (%).

2.3.5 细胞元素组成:在上述研究的基础之上,采用激光诱导击穿光谱技术测定了 *C. vulgaris* 的元素组成,结果如表 4 所示。由数据可以反映,藻细胞在自养、混养和异养条件下对培养液中元素的转化吸收存在差异。在 3 组培养实验中,碳元素的相对含量在异养组中最高,为 36.25%,混养次之为 30.77%,自养的为 23.59%。这一结果说明在培养基中添加有机碳源可促使微藻细胞转化合成较多的碳素,而且从添加有机碳源的混养和自养组实验结

果显示,混合营养方式下光照对碳素的转化利用有抑制作用,无光照的异养培养可获得较高的碳素转化率。除碳元素之外,其它元素随着自养向混养、异养的转换而逐渐下降。自养与混养和异养方式下藻细胞元素的相对含量相比,差异性非常显著。而混养和异养间的元素差异相对较小。这说明有机碳源的供应,以及有机碳源供应前提下的光暗处理均会对藻细胞吸收转换培养液中的营养物和元素产生影响。

表 4. 营养方式对 *C. vulgaris* 细胞元素的影响

Table 4. Effects of trophic modes on the cellular elements of *C. vulgaris*

| Elements [*] | C/H | P/H | K/H | Ca/H | Na/H | Mg/H | Fe/H | Cu/H | Mn/H |
|-----------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Photoautotrophy (%) | 23.59 | 2.22 | 1.57 | 2.92 | 0.31 | 1.91 | 4.88 | 0.06 | 1.00 |
| Mixotrophy (%) | 30.77 | 0.68 | 1.06 | 0.39 | 0.06 | 0.26 | 1.21 | 0.01 | 0.13 |
| Heterotrophy (%) | 36.25 | 0.66 | 0.80 | 0.26 | 0.04 | 0.22 | 0.91 | 0.01 | 0.09 |

* The results are the element relative to the H element content in each sample.

2.4 不同营养方式对 *C. vulgaris* 细胞碳代谢途径关键酶活性的影响

不同营养方式对 *C. vulgaris* 胞外碳酸酐酶 (CA) 和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 (Rubisco) 活性的影响如图 5 所示。从 CA 和 Rubisco 活性的变化可知,营养方式的转变直接影响 *C. vulgaris* 的碳代谢。由图 5-A 可知,与光合自养对照组的 CA 活性持续缓慢上升的态势相比,混养和异养实验组在培养进入第 1 天时 CA 活性显著下降,培养第 2 天时混养组 CA 活性非常微弱,而异养组已检测不到活性。在之后的培养过程中以吸收空气中的 CO₂ 为唯一碳源的光合自养组始终能检测到 CA 活性,而且随着藻细胞的生长 CA 活性有缓慢增加的趋势;而异养组的藻细胞中始终未检测到 CA 活性,混养组的在培养后期能检测到微弱的 CA 活性回升。

由图 5-B 可知,营养方式及培养时间对 *C. vulgaris* Rubisco 的活性也同样有显著的影响。待接种的 *C. vulgaris* 藻细胞中 Rubisco 的活性较高,培养进入第 1 天时,光合自养组的 Rubisco 活性有所下降,这可能与藻细胞的营养与培养条件的适应过渡有关,而在培养进入第 2 天时 Rubisco 活性逐渐上升。而混养和异养组的 Rubisco 活性在培养的前 2 天内显著下降,结合藻细胞的生长曲线认为这种明显下降与其主要以异养生长有关,葡萄糖的添加显著抑制了 *C. vulgaris* 的光合作用。从培养第 2 天开始,光合自养和混养组 *C. vulgaris* 细胞的 Rubisco

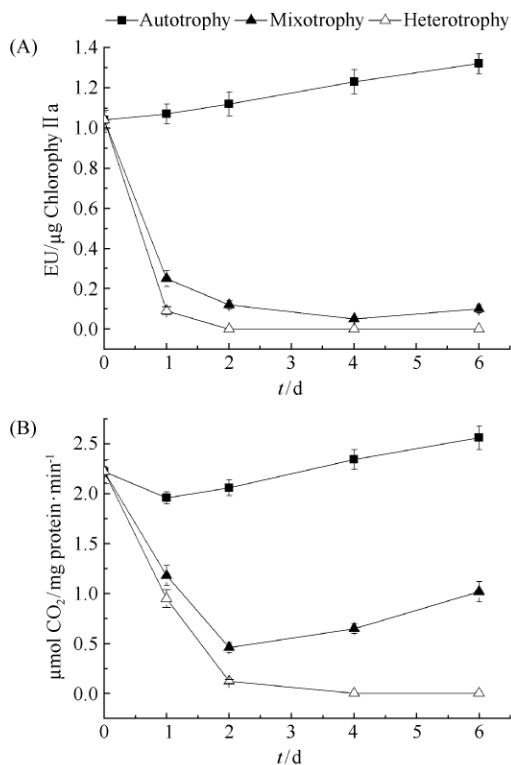


图 5. 营养方式对 *C. vulgaris* 胞外碳酸酐酶和 Rubisco 活性的影响 ($n = 3$)

Figure 5. Effects of trophic modes on carbonic anhydrase and Rubisco activities of *C. vulgaris* ($n = 3$). A: Carbonic anhydrase; B: Rubisco.

活性逐渐上升,自养组的 Rubisco 活性高于混养组,而在之后的培养过程中异养组的 Rubisco 活性逐渐

消失。从光合自养和混养组 Rubisco 活性上升的变化反映出自养藻细胞的光合作用较强。而混养组在培养中后期 Rubisco 活性也出现逐渐回升的态势,这表明当培养基中的葡萄糖在逐渐被消耗利用后,在光照条件下藻细胞的光合作用逐渐加强, Rubisco 不断合成。而异养组在培养中后期未检测到 Rubisco 活性,说明在葡萄糖和暗处理的双重作用下 Rubisco 的合成被抑制。

3 讨论

3.1 *C. vulgaris* 营养方式多样性的生理生态学意义

微藻营养方式的多样性对于生物学来说具有极其深远的意义。某些藻类为了适应恶劣的生活环境,如低光照、低营养条件,在长期的自然选择下形成了混养甚至异养的生存能力,这在后来的生物进化和遗传上起到了重要的作用^[22]。随着浮游生物生态学和赤潮研究工作的不断推进,对混养和异养型浮游生物(含微藻)与环境及营养因子的相互关系的研究也逐步深入,其中包括光照、营养物浓度、盐度和酸碱度对混养型浮游生物的摄食、光合作用、生长繁殖等的影响^[23-25],以及混合营养型浮游生物对微食物网营养动力学产生的影响^[26]。

本文的研究结果显示,在添加有机碳源葡萄糖的条件下,混养和异养培养可显著促进藻细胞的生长,最终分别可获得 7 倍、6 倍于自养的生物量产率,异养(1.81 g/L)和自养(0.29 g/L)方式下的藻细胞生物量之和接近于混养(2.12 g/L)的生物量,这一研究结果与庄惠如等^[27]的相近。碳源是影响 *C. vulgaris* 生长的一个重要因素。从藻细胞的生长态势分析,在供给有机碳源和光能的混养方式较自养和异养表示出较强的生长优势,特别是在培养至后期时,随着培养基中有机碳源的消耗殆尽和代谢产物的积累,自养组细胞生长量缓慢增高,暗培养下的异养组细胞生长量呈缓慢下降态势,而混养组在培养后期的生长态势趋同于自养组,这说明混养过程兼备自养和异养的特点,在有机碳源充足的条件下主营异养,在有机碳源匮乏的条件下转换为自养,使得藻细胞继续生长^[28]。这一现象也可从图 5 的不同营养方式对 *C. vulgaris* 细胞碳代谢途径关键酶——胞外碳酸酐酶和 Rubisco 活性的影响方面得

到解释。葡萄糖的添加抑制了 *C. vulgaris* 的光合作用,使藻细胞主营异养生长,而且随着培养基中有机碳源浓度的逐渐降低,在培养的不同阶段藻细胞可实现从异养、混养和自养之间的转换。从图 1 中可以看出,异养和混合营养在生长后期的差别也从另一个方面说明葡萄糖作为碳源对 *C. vulgaris* 生长有促进作用,葡萄糖的存在可能弥补了气体碳源 CO₂ 供应的不充足,并可能使细胞在碳源利用中节省所消耗的 ATP 和 NADPH^[29-30]。光照作为另一个影响 *C. vulgaris* 生长的因素,其重要性在本实验中也得到了证实。在一个光暗培养周期中,光照条件下的生长也略快于暗条件。这说明光能够促进碳源的代谢和能量的输送,利于混合营养的进行^[31]。

从图 2 中不同营养方式对培养基 pH 值(A)和溶解氧(B)的影响结果显示,培养液中 pH 值的变化是由于自养条件下 *C. vulgaris* 进行光合作用,随着其生长而不断消耗培养基中的 CO₂ 所致,而且碱性环境更容易使气相中的 CO₂ 溶解于培养液中供藻细胞进行光合作用。异养条件下 pH 值增长的趋势不明显且会有下降,是由于 *C. vulgaris* 进行异养繁殖积累 CO₂ 的原因;而混养条件下 pH 值介于两者之间,这说明细胞的光合作用和呼吸代谢强度可能存在相互竞争和补助,呼吸作用产生的 CO₂ 会被光合途径中的“CO₂ 泵”重新吸收利用,补偿到光合途径中。另外混合营养和异养培养过程中 pH 值的变化与葡萄糖代谢产生的有机酸有关^[32-33]。

不同营养方式对 *C. vulgaris* 胞外碳酸酐酶(CA)活性的影响(图 5-A)反映出,一方面由于有机碳源葡萄糖的添加显著抑制了光合作用,另一方面使 *C. vulgaris* 的有氧呼吸作用加强,细胞在进行异养生长过程中释放出的 CO₂ 显著抑制了 CA 的活性。单细胞微藻有多种形式的 CA,其表达受环境中 CO₂ 水平的影响。小球藻(*C. saccharophila*)在低 CO₂ 浓度条件下,CA 受诱导,胞外活性明显升高,而在较高 CO₂ 条件下活性受抑制^[34]。张大兵^[35]等的研究表明,自养 *C. protothecoides* 的 Rubisco 蛋白含量占细胞可溶性蛋白质的 24%。而异养转变后的藻细胞内不含 Rubisco。异养藻向自养生长转变过程中,20 h 后细胞内叶绿素含量逐渐增加,24 h 时细胞内出现 Rubisco,并大量增加,至 41 h 时含量达最高峰,这表明藻细胞光合作用能力的恢复和加强。本研究显示,混养和异养同样抑制 Rubisco 活性,但

是这种抑制随着光源供给和培养液中有机碳源浓度的变化而变化,进而造成在不同营养和环境条件下其营养方式的转换。

上述研究结果表明, *C. vulgaris* 为了适应不同类型的环境和营养因子,特别是为了应对光照强度和水体中碳源种类及浓度,进化出了多功能的生理代谢途径和营养方式以达到生存和生长的目的,体现出其生长特性和营养方式的多功能及多途径。

3.2 *C. vulgaris* 营养方式多样性的应用价值

微藻营养方式多样性的研究不仅在进化生物学和生态学领域具有重要的理论意义,而且在环境治理、高密度培养功能微藻生物合成活性物质和微藻能源领域具有重要的应用价值。Kim 等的研究显示混养培养的小球藻 (*C. vulgaris*) 可有效除去废水中的总碳和高浓度的氮,而且随着污水中碳氮的不断去除,藻细胞的生长量不断增加,研究认为藻细胞可有效利用废水中的营养物质合成生物质,可达到废水处理和生物质合成的双重目的^[36];异养小球藻 (*C. zofingiensis*) 能快速生长并能高效积累虾青素,具有大规模生产虾青素的潜力^[37];异养小球藻 (*C. protothecoides*) 可快速生长而且能积累细胞干重 55% 的油脂,提取所得油脂经酸催化酯交换反应后可获得高品质的生物柴油^[38]。

Wang 等^[39]报道了小球藻在自养、异养和混养条件下的生长状况及细胞生化成分的差异,有关异养和混养可显著提高藻细胞生物量和比生长速率的结果相近。但是该报道的研究显示异养可显著提高脂肪含量,而且有利于亚麻酸的积累。本研究显示,异养同样可提高藻细胞的脂肪含量,但是随着营养方式从自养至混养和异养转变的过程中,不饱和脂肪酸的比例逐渐下降。这一研究结果与文献有所不同。分析原因可能是由于藻种的差异和培养条件(主要是文献中的培养时间较长为 9 天,本实验为 6 天)的差异所致。因此,动态考察不同营养方式下藻细胞主要生化组分含量和比例的变化对进一步认识其生长和代谢机理具有重要意义。

本研究结果表明,混养和异养培养方式可显著提高 *C. vulgaris* 的生物量浓度、比生长速率和产率;*C. vulgaris* 依次从自养、混养至异养的转换培养后,其蛋白质和光合色素含量显著下降,藻细胞蛋白质中 18 种氨基酸的相对含量逐渐降低,可溶性糖和油脂含量显著提高;微藻油脂的不饱和脂肪酸的比例

下降,饱和脂肪酸的比例上升;异养和混养可促进 *C. vulgaris* 对碳元素的积累,而抑制对其他元素,如 K、P、Ca、Mg、Fe 等的吸收和积累。这些细胞生化组成方面的变化反映出,利用含碳有机废水进行混养和异养培养微藻合成的生物质都有利于微藻生物燃料的生产,主要优势在于其含有较高含量的糖类和油脂,而具有较低的蛋白质含量。因此,鉴于混合营养的藻种类型较多,并结合本文的研究结果认为,混合营养模式是高密度、高产率、短周期培养 *C. vulgaris* 等具有经济价值的微藻的较适宜的培养方式,可应用于重要微藻活性物质的生物合成。

综上所述,不同营养方式(自养、混养和异养)显著影响 *C. vulgaris* 的生长和代谢特征,葡萄糖的添加和光源的供给直接导致藻细胞生理代谢途径和细胞生化组成的改变,尤其对碳代谢途径、光合作用过程、油脂及脂肪酸组成、蛋白质及氨基酸组成和细胞元素积累影响显著。葡萄糖的添加明显促进 *C. vulgaris* 细胞的生长和生物量的积累,刺激碳素生化组分(如糖类、油脂)的合成,而抑制氮素生化组分(如蛋白质、光合色素)的生物合成。从 CA 和 Rubisco 的活性分析结果反映出,在光照条件下培养基中葡萄糖的消耗水平直接决定 *C. vulgaris* 细胞主营自养或异养生长。光照条件下葡萄糖浓度对 *C. vulgaris* 细胞主营自养或异养生长方式的动态基因调控机制正在进一步研究中。

参考文献

- [1] Richmond A. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Wiley-Blackwell, 2003.
- [2] Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14 (3): 1037-1047.
- [3] Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasada S, Banerjee UC. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009, 13 (9): 2361-72.
- [4] Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem I BM. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012, 19 (3): 257-275.
- [5] Pienkos PT, Darzins A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels Bioproducts and*

- Biorefining, 2009, 3 (4): 431-440.
- [6] Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, 2008, 8 (1): 77-93.
- [7] Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 2011, 45 (1): 11-36.
- [8] Wang J, Yang H, Wang F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172 (7): 3307-3329.
- [9] Kumar V, Muthuraj M, Palabhanvi B, Ghoshal AK, Das D. High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 115-124.
- [10] Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 66: 204-213.
- [11] Feng X, Walker TH, Bridges WC, Thornton C, Gopalakrishnan K. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 17-23.
- [12] Yu H, Jia S, Xu G. Interactions between autotrophic and heterotrophic metabolism in mixotrophic cultures of *Nostoc flagelliforme* cells. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2011, 25 (6): 1016-1020.
于海峰, 贾士儒, 徐国华. 发状念珠藻单体细胞混合营养模式下光合自养和异养代谢的关系. 高校化学工程学报, 2011, 25 (6): 1016-1020.
- [13] Wu Q. Fine cell structure and biochemical compositions of *Chlorella protothecoides* after transferring from autotrophic to heterotrophic metabolism. *Journal of Nanjing University (Science Edition)*, 1993, 29 (4): 622-630. (in Chinese)
吴庆余. 自养小球藻转化为异养代谢生长后细胞的超微结构与相关生化组成. 南京大学学报(自然科学版), 1993, 29 (4): 622-630.
- [14] Andrade MR, Costa JAV. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 2007, 264 (1-4): 130-134.
- [15] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [16] GB/T 17376-2008. 动植物油脂脂肪酸甲酯制备. 北京: 中国标准出版社, 2009-4-20.
- [17] Willbur KM, Anderson NG. Electronic and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176: 147-154.
- [18] Yu J, Xia J, Zou Y. Response of carbonic anhydrase activity and photosynthesis to high salinity stress in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35 (4): 515-523. (in Chinese)
余锦兰, 夏建荣, 邹永东. 小新月菱形藻碳酸酐酶活性和光合作用对高盐胁迫的响应. 水产学报, 2011, 35 (4): 515-523.
- [19] Lan Y, Mott KA. Determination of apparent Km values for ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase using the spectrophotometric assay of Rubisco activity. *Plant Physiology*, 1991, 95 (2): 604-609.
- [20] Zhang D, Wu Q. The heterotrophic transition of *Chlorella* cell. *Plant Physiology Communications*, 1996, 32 (2): 140-144. (in Chinese)
张大兵, 吴庆余. 小球藻细胞的异养转化. 植物生理通讯, 1996, 32 (2): 140-144.
- [21] Orús MI, Marco E, Martínez F. Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. *Bioresource Technology*, 1991, 38, 179-184.
- [22] Dai C, He J, Wang G, Li S. A review of ecological research on mixotrophic plankton. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (9): 2399-2405. (in Chinese)
戴聪杰, 何剑锋, 王桂忠, 李少菁. 混合营养型浮游生物生态学研究进展. 生态学报, 2005, 25 (9): 2399-2405.
- [23] Legrand C, Johansson N, Johnsen G, Borsheim KY, Granéli E. Phagotrophy and toxicity variation in the mixotrophic *Prymnesium patelliferum* (Haptophyceae). *Limnology and Oceanography*, 2001, 46 (5): 1208-1214.
- [24] Hansen PJ, Hjorth M. Growth and grazing responses of *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae): the role of irradiance, prey concentration and pH. *Marine Biology*, 2002, 141 (5): 975-983.
- [25] Hansen PJ, Skovgaard A, Glud RN, Stoecker DK. Physiology of the mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. II. Effects of time scale and prey concentration on photosynthetic performance. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 201: 137-146.
- [26] Samuelsson K, Berglund J, Haecky P, Andersson A.

- Structural changes in an aquatic microbial food web caused by inorganic nutrient addition [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 29 (1): 29-38.
- [27] Zhuang H, Chen B, Wang M, Lu H, Shi Q. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis*. *Microbiology China*, 2000, 27 (3): 198-201. (in Chinese)
庄惠如, 陈必链, 王明兹, 卢海声, 施巧琴. 雨生红球藻混合营养与异养培养研究. 微生物学通报, 2000, 27(3): 198-201.
- [28] Yang C, Hua Q, Shimizu K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 6 (2): 87-102.
- [29] Lalucat J, Imperial J, Pares R. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ79. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26 (7): 677-681.
- [30] Martínez F, Orús MI. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. *Plant Physiology*, 1991, 95 (4): 1150-1155.
- [31] Yu G, Cong W, Cai Z, Shi D, Ouyang F. Effects of organic compounds on the growth of *Anabaena* sp. 7120. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27 (3): 238-242. (in Chinese)
喻国策, 丛威, 蔡昭铃, 施定基, 欧阳藩. 有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响. 水生生物学报, 2003, 27 (3): 238-242.
- [32] Ma W, Qian Z, Sun L, Wang Q. Mixotrophic cultivation of *Microcystis viridis* (A. Br.) Lemm. *Bulletin of Botanical Research*, 2002, 22 (2): 241-246. (in Chinese)
马为民, 钱志萍, 孙莉, 王全喜. 绿色微囊藻的混合营养生长. 植物研究, 2002, 22 (2): 241-246.
- [33] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 510-516.
- [34] Badger M. The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynthesis Research*, 2003, 77 (2-3): 83-94.
- [35] Zhang D, Li L, Miao Y, Wu Q. Purification of RubisCO from *Chlorella protothecoides* and its content change during transition from heterotrophy to autotrophy. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1994, 20 (4): 346-352. (in Chinese)
张大兵, 李立人, 缪有刚, 吴庆余. 小球藻 RubisCO 的纯化及其在异养向自养转变过程中的含量变化. 植物生理学报, 1994, 20 (4): 346-352.
- [36] Kim J, Lingaraju BP, Rheume R, Lee JY, Siddiqui KF. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science & Technology*, 2010, 15 (4): 391-396.
- [37] Chen T, Xiang W, He H, Chen F. Effects of carbon sources on the production of astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Microbiology China*, 2007, 34 (5): 856-858. (in Chinese)
陈涛, 向文洲, 何慧, 陈峰. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响. 微生物学通报, 2007, 34 (5): 856-858.
- [38] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 2006, 97 (6): 841-846.
- [39] Wang H, Guo S, Zheng B, Li C. Growth and biochemical components of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivations. *Journal of South China University of Technology (Natural Science)*, 2004, 32 (5): 47-50. (in Chinese)
王海英, 郭祀远, 郑必胜, 李存芝. 自养、异养和混养下小球藻的生长及生化成分. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004, 32 (5): 47-50.

Effects of different trophic modes on growth characteristics, metabolism and cellular components of *Chlorella vulgaris*

Weibao Kong^{*}, Yang Wang, Hong Yang, Yuqin Xi, Rui Han, Shiquan Niu

College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the effects of trophic modes related to glucose and light (photoautotrophy, mixotrophy and heterotrophy) on growth, cellular components and carbon metabolic pathway of *Chlorella vulgaris*. [Methods] The parameters about growth of algal cells were investigated by using spectroscopy and chromatography techniques. [Results] When trophic mode changed from photoautotrophy to mixotrophy and to heterotrophy successively, the concentrations of soluble sugar, lipid and saturated C16/C18 fatty acids in *C. vulgaris* increased, whereas the concentrations of unsaturated C16, C18 fatty acids, proteins, photosynthetic pigments and 18 relative amino acids decreased. Light and glucose affect the growth, metabolism and the biochemical components biosynthesis of *C. vulgaris*. Addition of glucose can promote algal biomass accumulation, stimulate the synthesis of carbonaceous components, but inhibit nitrogenous components. Under illumination cultivation, concentration and consumption level of glucose decided the main trophic modes of *C. vulgaris*. [Conclusion] Mixotrophic and heterotrophic cultivation could promote the growth of algal cells.

Keywords: trophic modes, *Chlorella vulgaris*, growth characteristics, metabolism, cellular components, difference

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31360192,31260134)

^{*} Corresponding author. E-mail: kwbao@163.com

Received: 8 August 2014/ Revised: 6 November 2014