



葡萄糖对小球藻(*Chloralla* sp. HN08)光合作用和生长的影响

郎筱宇, 刘志媛*, 徐梦, 谢灵玉, 李容珍

海南大学海洋学院, 海南 海口 570228

摘要:【目的】探讨葡萄糖作为外加碳源对热带海洋小球藻(*Chloralla* sp. HN08)生物质生产和脂、光合色素、碳水化合物及可溶性蛋白等细胞主要成份含量的影响。【方法】分析比较小球藻 HN08 在光合自养和兼养(添加 10 g/L 葡萄糖) 2 种营养方式下的生长速率、细胞密度、光合放氧速率、油脂相对含量, 以及可溶性总糖、淀粉和可溶性蛋白的含量。【结果】结果表明, 在光照条件下葡萄糖(10 g/L)能促进小球藻(*Chloralla* sp. HN08)生长, 提高细胞终密度, 而异养条件下藻细胞逐渐衰亡。兼养条件下, 细胞相对生长速率及细胞终密度分别是自养条件下的 6.8 倍和 1.3 倍。兼养藻细胞中可溶性糖、淀粉、油脂含量显著高于($P<0.05$)光合自养细胞, 然而可溶性蛋白质和光合色素含量显著低于($P<0.05$)光合自养细胞。添加葡萄糖的小球藻液的光饱和点和呼吸速率均高于光自养条件下的细胞, 但 2 种培养条件下藻液的净光合速率无显著差异($P>0.05$)。【结论】光照条件下, 添加葡萄糖可显著提高小球藻 HN08 相对生长速率和细胞终密度, 促进油脂与淀粉的积累。

关键词: 小球藻, 葡萄糖, 兼养, 自养, 光合作用

微藻是一类富含油脂、聚不饱和脂肪酸、优质蛋白、多糖及多种特殊次级代谢物质的光合自养低等植物, 其种类繁多, 蕴藏着巨大的开发潜力, 不但是水产养殖不可或缺的优质饵料, 更被认为是解决未来人类能源、食品及环境问题的重要物种。近几十年来, 随着微藻生物技术的迅速发展, 以微藻为原料的水产饵料、多不饱和脂肪酸、叶黄素、叶绿素、虾青素、岩藻黄素、多糖、蛋白及生物柴油等相关产品开发成为新兴技术产业。

获得高密度、高品质的生物质是微藻产业化的重要前提^[1]。成本相对较低的光合自养是目前小球藻、螺旋藻等商业化大规模培养所采取的主要模式。然而, 在微藻自养培养过程中, 随着细胞密度的升高, 光和 CO₂ 的供给往往不能满足细胞生长的需求, 导致单位水体中的生物产量过低, 并增加了采收等过程的成本。

近几年, 微藻高密度异养化培养受到关注。异养化微藻不利用光源, 而是通过吸收有机碳源

基金项目: 海南省自然科学基金(20154178)

*通信作者。Tel: +86-898-66279184; E-mail: liuzhiyuan111@163.com

收稿日期: 2016-08-16; 修回日期: 2016-10-31; 网络出版日期: 2016-12-08

来获取能量, 具有生长速度更快、单位产率高等优势^[2-6]。工业化生产也有广泛应用, 异养培养已应用于日本小球藻和雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* 712)的工业化培养^[7-8]。

异养模式虽然可实现微藻高密度培养, 但适应异养化培养的微藻种类较少。此外, 异养在黑暗条件下会抑制一些光诱导的代谢产物如光合色素等的合成, 影响微藻品质^[9]。

许多在黑暗条件下不能利用有机碳源进行异养培养的微藻可以在光照条件下利用有机碳源, 进行兼养并可获得比自养条件更高的生物量和比生长速率。如小球藻 *Chlorella protothecoides* 在添加葡萄糖的兼养条件下最大生长速率是自养条件下的 10 倍^[10]。*Nannochloropsis oculata* CCMP 525、*Dunaliella salina* FACHB 435 和 *Chlorella sorokiniana* CCTCC M209220 兼养条件下的生物量也分别达到自养条件下的 1.4 倍、2.2 倍和 4.2 倍^[11-12]。研究还表明, 在光照条件下, 添加葡萄糖不但提高微藻细胞的生长速率和生物质产量, 对细胞内含物如油脂^[13-14]、蛋白质或碳水化合物的积累也有促进作用^[15-16]。Lee 等在封闭式管道光生物反应器中, 利用异养-兼养交替培养方式培养小球藻 *Chlorella sorokiniana*, 白天兼养模式细胞产率为 10.2 g/(L·d), 显著高于夜间异养模式的 5.9 g/(L·d) ($P < 0.05$)^[7]。此外, 日本 FUJI 化学集团利用封闭光生物反应器两步法兼养培养雨生红球藻, 虾青素年产量可以达到 3000 kg^[17]。

小球藻(*Chlorella vulagris*)是一类广泛分布于淡水和海水中的单细胞绿藻, 由于其生长迅速、易培养, 细胞内活性成分较多, 因而是商业化大规模培养的主要微藻种类^[18-19]。我们在热带海域分离获得 1 株耐高温富油小球藻 *Chlorella* sp. HN08, 为提高其培养密度, 获得较高的生物质产量和油脂产

量, 我们研究了外加有机碳源葡萄糖对其生长、光合及主要光合产物含量的影响。本文报道这一结果。

1 材料和方法

1.1 材料与培养

1.1.1 藻种分离纯化: 海洋小球藻(*Chloralla* sp. HN08)分离自海南省海口近岸海域。抗生素平板分离法获得纯化藻种。

1.1.2 藻种分子鉴定: 藻株基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[20]。以 HN08 的基因组 DNA 为模板, 根据小球藻 18S rRNA 序列特征, 合成引物 For (5'-GGATCAGACTTCAATCTGGTTGATCCTGGA G-3')和 Rev (5'-CTCAGTGAGCTTGATCCTTCG GCAGGTTGACC-3'), 进行 PCR 扩增。其中 PCR 反应程序为: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 57 °C 40 s, 72 °C 150 s, 29 个循环; 72 °C 8 min; 4 °C 保存。18S rRNA 基因 PCR 产物纯化后进行测序分析, 测序由上海生物公司完成。将 HN08 的核酸序列与 GenBank 中相关核酸序列进行 BLAST 比对, 之后用 MEGA 5 软件构建系统发育树, 确定 HN08 分类地位。

1.1.3 藻种培养: 小球藻(*Chloralla* sp. HN08)培养基选用“宁波三号”培养液^[21]。海水取自海口市白沙门, 经过滤后高压灭菌。培养条件为(27±1) °C, 光照强度为 40 mol/(m²·s), 光暗周期为 14 h L:10 h D。

将培养至对数生长期的小球藻 HN08 以 25% (V/V)接种于 9 个 500 mL 三角瓶中, 每瓶 400 mL 培养液。小球藻生长至对数后期, 通过添加葡萄糖(10 g/L), 分别进行异养(加葡萄糖, 黑暗培养)、兼养(加葡萄糖, 照光培养)和自养(不加葡萄糖, 照光培养)培养。每个处理 3 个重复。葡萄糖处理 3 d 后, 测定光合放氧速率、光合色素、蛋白、碳水化合物和油脂等含量。

1.2 藻细胞密度及相对生长速率

将小球藻液按比例稀释成浓度梯度，用可见光分光光度计测定活体细胞在吸光度 500 nm 处的光密度值，血球计数板进行显微计数，将 OD_{500} 与对应的细胞个数进行相关分析^[22]。根据公式(1)计算相对生长速率 μ 。

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad \text{公式(1)}$$

其中， t_1 、 t_2 培养时间， N_1 和 N_2 分别为 t_1 、 t_2 时期的细胞密度。

1.3 藻生物量的测定

将混合纤维滤膜(孔径 0.45 μm)置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重干燥器中冷却后称重 W_1 ，取 10 mL 藻液抽滤，滤膜烘干称重记为 W_2 ，根据公式(2)计算生物量浓度(g/L)。

$$W = 1000 \times (W_2 - W_1) / 10 \quad \text{公式(2)}$$

1.4 光合色素的测定

90%丙酮萃取，按公式(3)、(4)、(5)计算提取液中色素含量(mg/L)^[23]。

$$\text{Chla (mg/L)} = 12.21 \times OD_{663} - 2.81 \times OD_{646} \quad \text{公式(3)}$$

$$\text{Chlb (mg/L)} = 20.13 \times OD_{646} - 5.03 \times OD_{663} \quad \text{公式(4)}$$

$$\text{Cartenoid (mg/L)} = (1000 \times OD_{470} - 3.27 \times \text{Chla} - 104 \times \text{Chlb}) / 229 \quad \text{公式(5)}$$

1.5 光合放氧速率的测定

将藻液分别稀释为细胞浓度 4.82×10^6 cells/mL (指数生长期浓度)和 9.46×10^6 cells/mL (指数生长后期浓度)的溶液，采用自制组装的溶解氧测定系统测定兼养与自养培养条件下藻细胞的光合放氧速率和光饱和点。系统由 STDO11 氧电极、1 L 广口瓶、磁力搅拌器和多组荧光冷光源组成。

反应体系为 1000 mL 藻液，光源为 LED 灯，温度为 $(27 \pm 1) ^{\circ}\text{C}$ 。磁力搅拌速率为 1200 r/min，按公式(6)、(7)、(8)计算光合放氧速率、呼吸速率和净光合速率。

光合放氧速率(mg/10⁷ cells·h)=

$$\frac{\Delta DO_1 (\text{mg/L})}{N(10^7 \text{ cells/L}) \cdot t (\text{h})} \quad \text{公式(6)}$$

$$\text{呼吸速率(mg/10}^7 \text{ cells·h)} = \frac{\Delta DO_2 (\text{mg/L})}{N(10^7 \text{ cells/L}) \cdot t (\text{h})} \quad \text{公式(7)}$$

$$\text{净光合速率(mg/10}^7 \text{ cells·h)} = \text{光合放氧速率} + \text{呼吸速率} \quad \text{公式(8)}$$

式中 ΔDO_1 为放氧过程中溶解氧浓度的变化(mg/L)， ΔDO_2 为呼吸过程中溶解氧浓度的变化(mg/L)， t 为光合作用反应时间(h)， N 为藻细胞浓度(10^7 cells/mL)。

1.6 可溶性蛋白含量的测定

考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[24]。

1.7 可溶性糖和淀粉含量的测定

蒽酮-硫酸比色法测定^[25]。

1.8 油脂相对含量的鉴定以及测定

尼罗红染色荧光分光光度法测定藻细胞的相对油脂含量^[26]。

1.9 数据处理和分析

采用 DPS 数据处理系统进行单因素方差分析^[27]。图中标有*表示处理之间为显著差异($P < 0.05$)。

2 结果和分析

2.1 微藻 HN08 的分子鉴定

藻株 HN08 经过 PCR 扩增获得 18S rRNA 基因，测序结果经 BLAST 比对，发现 HN08 的序列与小球藻属(*Chlorella* sp.)的相关序列(GenBank 登录号：X73992.1)相似性达 99% (图 1)，因此将 HN08 鉴定为小球藻属(*Chlorella* sp.) (GenBank 登录号：KX943590)。

2.2 小球藻 HN08 细胞密度与 OD_{500} 相关性

结果如图 2 所示， OD_{500} 与小球藻细胞数有显著正相关($P < 0.05$)，因此可以通过藻液在吸光度 500 的光密度值表示小球藻的细胞密度。

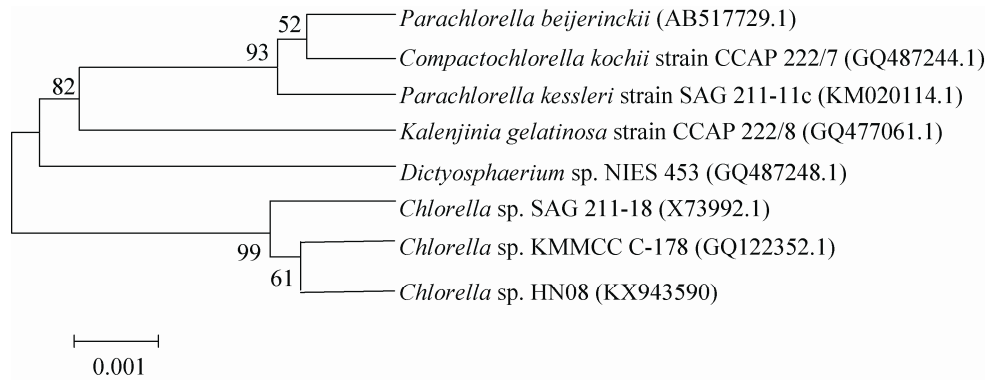


图 1. 基于藻株 HN08 18S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree of 18S rRNA sequences of HN08. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported bootstrap. Bar, 0.001 sequence divergence.

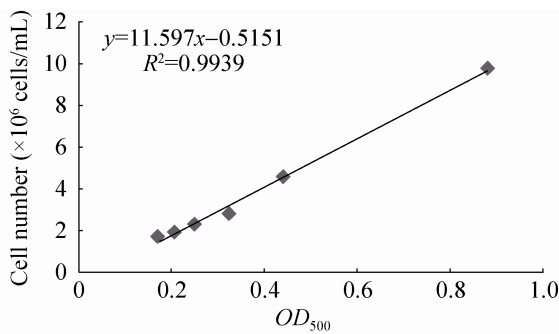


图 2. OD_{500} 与藻细胞数目线性关系

Figure 2. The linear relationship between the cell count and OD_{500} .

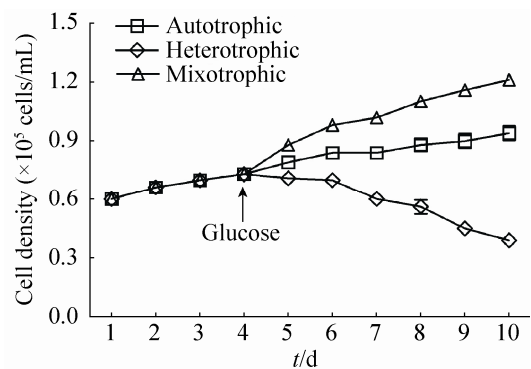


图 3. 自养、异养、兼养培养条件下细胞密度

Figure 3. Cell density in culture under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions.

2.3 葡萄糖对小球藻 HN08 生长的影响

小球藻 HN08 分别进行自养、异养、兼养模式培养。结果表明，兼养小球藻细胞比生长速率和生物量均显著高于($P < 0.05$)自养培养的细胞。添加葡萄糖 3 d 后，小球藻比生长速率为 0.373/d，显著高于后 3 天的 0.055/d ($P < 0.05$) (图 3)。添加葡萄糖 6 d 后，兼养藻生物量为 0.426 g/L，是自养的 1.24 倍。异养方式培养的小球藻在黑暗条件下大量细胞死亡，迅速进入衰亡期，表明小球藻 HN08 不能进行异养生长。

2.4 葡萄糖对小球藻 HN08 细胞组分的影响

2.4.1 淀粉、蛋白质、可溶性糖：光照条件下添加葡萄糖后，显著促进了小球藻细胞中碳水化合物的积累($P < 0.05$)。兼养培养 6 d 后，细胞内淀粉、可溶性糖含量分别为自养条件下的 3.47 倍和 1.26 倍(图 4)。而外源葡萄糖的添加显著降低了($P < 0.05$)蛋白质含量，兼养细胞的可溶性蛋白含量是自养条件下的 69%。

2.4.2 相对油脂含量：兼养培养 6 d 的小球藻藻液，经尼罗红染色后，在 480 nm 波长激发光下的

荧光图谱表明,在 585 nm 波长处有一明显的油脂发射峰,相对荧光强度达到 183.0 (图 5)。而自养条件下的小球藻细胞的油脂荧光发射峰在实验期间始终未出现。说明在光照条件下添加葡萄糖可促进小球藻 HN08 积累油脂。

2.4.3 光合色素:添加葡萄糖后小球藻细胞的叶绿素含量显著降低($P<0.05$) (图 6),叶绿素 a 和叶绿素 b 含量分别是自养条件下的 53%和 36%。但是,外源葡萄糖对小球藻类胡萝卜素含量无显著性影响($P>0.05$)。

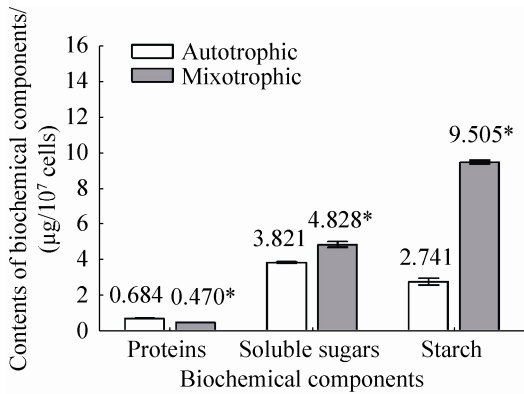


图 4. 自养、兼养培养条件下生化组分含量
Figure 4. Contents of biochemical components in culture under autotrophic and mixotrophic conditions. * $P<0.05$.

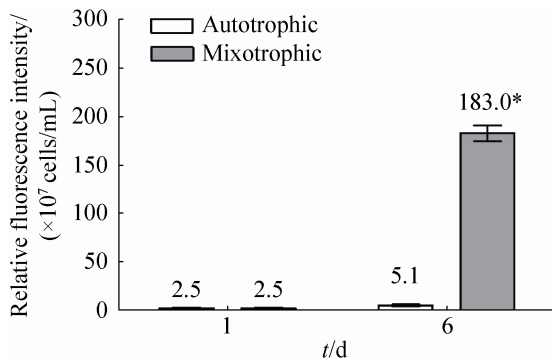


图 5. 自养、兼养培养条件下相对油脂含量
Figure 5. Relative fluorescence intensity in culture under autotrophic and mixotrophic conditions. * $P<0.05$.

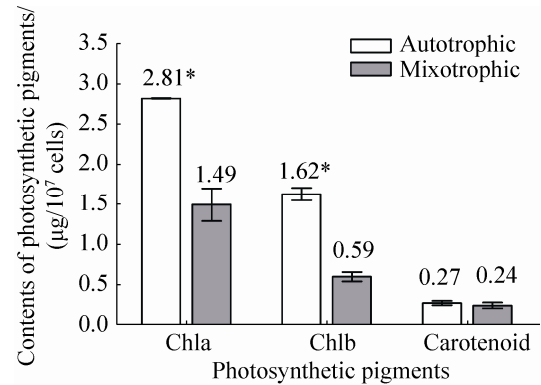


图 6. 自养、兼养培养条件下光合色素含量
Figure 6. Contents of photosynthetic pigments in culture under autotrophic and mixotrophic conditions. * $P<0.05$.

2.5 葡萄糖对小球藻光合放氧速率和呼吸速率的影响

小球藻 HN08 光合放氧速率的变化曲线变化见图 7,结果表明,在小球藻达到光饱和点前,兼养细胞的光合放氧速率均显著低于($P<0.05$)自养细胞,在较低细胞密度条件下二者差距更明显。当藻细胞密度为 4.81×10^6 cells/mL 时,在 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照条件下,兼养细胞光合放氧速率是自养条件下的 1.5 倍。

无论是自养还是兼养模式,较低细胞密度的小球藻的净光合放氧速率均显著高于较高密度的小球藻($P<0.05$)。此外,自养条件下,较低密度的藻液光饱和点为 $49 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,显著低于高密度光饱和点 $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ($P<0.05$),兼养小球藻的光饱和点在本实验中均未测到。

在光照强度 $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下,兼养小球藻 HN08 呼吸速率为 $0.0023 \text{ mg}/10^7(\text{cells} \cdot \text{h})$,显著高于自养 $0.00075 \text{ mg}/10^7(\text{cells} \cdot \text{h})$ ($P<0.05$),因而计算出,兼养细胞与自养细胞在 $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (小球藻培养光强)条件下的净光合速率无显著性差异($P>0.05$)。

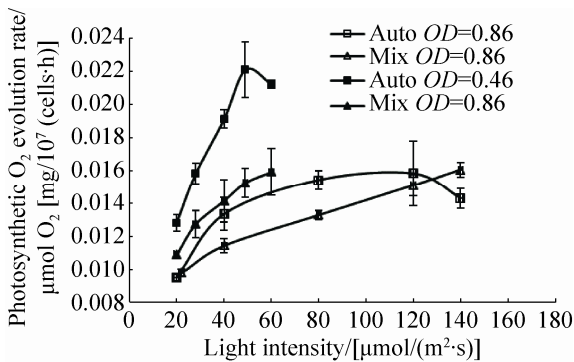


图 7. 自养、兼养培养条件下光合放氧速率
Figure 7. Photosynthetic O₂ evolution rate in culture under autotrophic and mixotrophic conditions.

3 讨论

结果表明,在光照条件下,外加葡萄糖可提高海洋小球藻 HN08 的比生长速率和细胞终密度,促进细胞淀粉和油脂等细胞贮藏物质的积累(图 3-5)。但在黑暗条件下,小球藻不能利用葡萄糖进行异养生长。许多研究表明,多数小球藻可以利用有机碳源,添加外源葡萄糖等有机碳源可显著提高细胞的比生长速率和细胞密度($P < 0.05$)^[10-12]。葡萄糖由培养基质进入细胞质后同化的第一步反应是氧化磷酸化,每 1 个分子葡萄糖需要消耗 1 个 ATP。在兼养条件下,光反应过程中产生的 ATP 可为葡萄糖在细胞中的氧化磷酸化提供能量,同时葡萄糖的氧化分解释放的 CO₂ 又可提高 [CO₂]/[O₂] 比值,促进 RuBisCo 羧化酶/加氧酶的羧化反应,促进光合碳固定反应。CO₂ 的还原与葡萄糖的氧化 2 个过程为细胞的生长提供了更多的物质基础。因此,光合作用与葡萄糖的氧化作用协同运转可能是兼养条件下细胞生长迅速的主要原因。

小球藻属中的不同藻种的营养特性不同。多数文献报导的小球藻株如 *C. vulgaris*、*Chlorella* sp.

484、*Chlorella* sp. 2003ZGHD23 等,在光照和黑暗条件下均可利用外源葡萄糖迅速生长。同时,葡萄糖对小球藻生长代谢的作用研究也多是以前异养的微藻为材料^[12,28-31]。研究认为,小球藻细胞中负责葡萄糖吸收和跨膜转运的“己糖/H⁺”同向转运系统蛋白基因表达受黑暗诱导和光的抑制^[32-34]。黑暗条件下,被吸收的葡萄糖主要通过磷酸戊糖途径(PPP)氧化分解,而光照条件下,细胞中的葡萄糖主要通过糖酵解(EMP)途径氧化分解。能量代谢通量分析(MFA)结果表明,葡萄糖通过 PPP 代谢途径转换效率高于糖酵解途径,所以异养条件下小球藻生长量显著高于自养($P < 0.05$)。但是,在光照条件下葡萄糖是如何转运吸收以及在细胞中的主要代谢途径尚不明确。

本实验所用小球藻 HN08 不具有异养特性,对葡萄糖的吸收和同化机制可能与前人已发表的具有异养特性的微藻不同。小球藻 HN08 在黑暗条件下不能利用葡萄糖,其原因可能是在黑暗条件下,细胞不能为葡萄糖同化的第 1 步反应氧化磷酸化提供充足的 ATP。

大量研究表明,外加葡萄糖会改变微藻细胞碳分配代谢途径,以及贮藏物质如淀粉、脂肪和蛋白的含量^[16]。小球藻 HN08 在添加 10 g/L 葡萄糖 3 d 后,可溶性糖、淀粉和油脂均显著高于自养条件的($P < 0.05$),尤其是淀粉积累明显。许多微藻在添加葡萄糖后,光合产物开始积累,并常以淀粉或脂的形式贮存,但几种积累物质的比例与藻细胞的种类和细胞生长状态、代谢有关。具有异养特性的小球藻 *C. protothecoides* 在添加葡萄糖的条件下,代谢倾向于脂的合成,而不是碳水化合物积累^[12]。也有研究表明,小球藻 *C. kessleri* 吸收葡萄糖后,仅有 1% 以游离葡萄糖形式存在,85% 的葡萄糖转变为寡糖(以蔗糖为主)和多糖(主

要为淀粉)^[35]。Magali 等研究衣藻, 实验表明添加葡萄糖后, 淀粉积累早于油脂, 淀粉分解后, 才进行脂质代谢^[36]。对于蛋白质、光合色素等氮素化合物, 外源有机碳不会影响异养条件下氮的吸收, 但是会抑制兼养条件下氮的吸收^[37]。

不同营养方式对藻细胞中光合色素也有显著影响。兼养方式下小球藻 HN08 藻细胞光合色素 (Chla、Chlb) 含量显著减少 ($P < 0.05$), 仅为自养条件的 50% (图 6)。兼养条件下的许多藻类, 与自养藻相比, 细胞色素含量普遍降低, 前人对小球藻 *Chlorella* sp. FC2 和 *C. vulgaris* 的研究也表明, 添加葡萄糖会降低叶绿素含量^[11,38]。

小球藻 HN08 在培养基中添加葡萄糖后, 加速了小球藻的氧化呼吸作用, 从而促进了培养基中氧气的消耗, 而由于自养与兼养条件下净光合放氧速率 [$40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 并未有显著变化 ($P > 0.05$), 因此导致表观光合放氧速率降低。说明虽然兼养条件下叶绿素含量下降, 但对光合反应可能并无显著影响 ($P > 0.05$)。这与 Xu 等的研究结果一致 *Nannochloropsis* sp. 在兼养条件下的呼吸速率增加, 净光合速率与自养细胞无显著差异 ($P > 0.05$)^[39]。但是也有研究表明, 由于兼养条件下较低的叶绿素含量, 导致净光合速率和光合放氧速率均下降^[40]。

兼养条件下的小球藻 HN08 的光饱和点则显著高于自养细胞 ($P < 0.05$) (图 7)。植物出现光饱和点实质是强光下碳反应速率跟不上光反应从而限制了光合速率随着光强的增加而提高^[41]。光合碳反应的限速酶 RuBisco 具有羧化和加氧双重特性, 羧化反应与加氧反应的相对速率取决于 CO_2 与 O_2 的相对浓度。 O_2 是羧化反应的竞争性抑制剂。兼养条件下, 葡萄糖在体内的同化作用可降低介质中的氧气分压, 使 RuBisco 羧化反应加强, 提高耐受光强, 延迟光抑制的产生。尤其是在较高细

胞密度培养条件下, 培养体系中的 O_2 分压过高是微藻高密度培养的主要限制因子, 添加葡萄糖可缓解这一问题, 从而提高细胞培养的终密度。然而, 也有研究认为外源葡萄糖会抑制 RuBisco 羧化活性。RuBisco 羧化酶含量与活性显著低于自养条件 ($P < 0.05$), 但自养下藻蓝蛋白含量却高于兼养以及异养^[42]。在分子方面, 小球藻 *C. sorokiniana* CCTCC M209220 在兼养条件下, 调控 *rbcL* 基因表达量显著低于自养条件 ($P < 0.05$)^[11]。因此, 添加葡萄糖对微藻 RuBisco 酶的含量、活性以及基因表达均有影响作用。

此外, Zhang 等认为, 兼养模式更加适应弱光环境, 而我们根据实验推测, 兼养模式的小球藻的光饱和点高于自养模式, 在高光下也具有优势。这可能是一方面因为葡萄糖的氧化分解可及时消耗光反应过程中产生的 ATP, 防止光氧化, 另一方面, 葡萄糖的氧化分解可释放 CO_2 , 为光合固碳过程提供原料, 促进光合作用进行^[43]。

因此, 添加葡萄糖对小球藻的生长和光合产物积累具有积极意义, 但由于藻种不同, 以及藻细胞所处的生理状态不同, 葡萄糖产生的生理效应也不同。利用本实验的初探结论, 可以在生产应用上, 针对藻种的特性优化培养和调控条件, 降低成本, 获得最佳生物量。

参 考 文 献

- [1] Miao AJ, Wang WX, Juneau P. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(10): 2603–2611.
- [2] Wu QY, Kuang M, Grant NG. Growth, AEC and pigments of *Chlorella protothecoides* in two strains under the autotrophic and heterotrophic conditions. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1992, 18(3): 293–299. (in Chinese)
吴庆余, 匡梅, Grant NG. 小球藻两个品系在自养与异养条

- 件下的生长、能荷与色素差异. 植物生理学报, 1992, 18(3): 293–299.
- [3] Yan JQ, Huang XX, Huang ZZ, Hu P, Lü WQ, Lin F. Effect of different trophic modes on the growth performance and nutrition of *Chlorella* sp.. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 77–85. (in Chinese)
严佳琦, 黄旭雄, 黄征征, 胡盼, 吕为群, 林锋. 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.
- [4] Li XW, Li YG, Shen GM, Yang D. Medium for culturing *Chlorella vulgaris* with sequential heterotrophic-autotrophic model. *Chinese Journal of Process Engineering*, 2006, 6(2): 277–280.
李兴武, 李元广, 沈国敏, 杨东. 普通小球藻异养-光自养串联培养的培养基. 过程工程学报, 2006, 6(2): 277–280.
- [5] Xiong W, Li XF, Xiang JY, Wu QY. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(1): 29–36.
- [6] Xiong W, Gao CF, Yan D, Wu C, Wu QY. Double CO₂ fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2287–2293.
- [7] Lee YK. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(5): 403–411.
- [8] Zhang ZB, Zhou AF, Xu LJ, Wang QX. The nutrient requirement and culture conditions of a green alga *Haematococcus pluvialis* sp. 712. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 2003, 32(4): 66–72. (in Chinese)
张在宝, 周爱芬, 徐琳佳, 王全喜. 雨生红球藻 712 株营养需求及其培养条件. 上海师范大学学报(自然科学版), 2003, 32(4): 66–72.
- [9] Chen F, Johns MR. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. *Process Biochemistry*, 1996, 31(6): 601–604.
- [10] Heredia-Arroyo T, Wei W, Hu B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(7): 1978–1995.
- [11] Wan MX, Liu P, Xia JL, Rosenberg JN, Oyler GA, Betenbaugh MJ, Nie ZY, Qiu GZ. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 835–844.
- [12] Ren XJ, Chen JK, Deschênes JS, Tremblay R, Jolicoeur M. Glucose feeding recalibrates carbon flux distribution and favours lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* through cell energetic management. *Algal Research*, 2016, 14: 83–91.
- [13] Baldissierotto C, Popovich C, Giovanardi M, Sabia A, Ferroni L, Constenla D, Leonardi P, Pancaldi S. Photosynthetic aspects and lipid profiles in the mixotrophic alga *Neochloris oleoabundans* as useful parameters for biodiesel production. *Algal Research*, 2016, 16: 255–265.
- [14] Sakurai T, Aoki M, Ju XH, Ueda T, Nakamura Y, Fujiwara S, Umemura T, Tsuzuki M, Minoda A. Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 861–866.
- [15] Rohit MV, Mohan SV. Tropho-metabolic transition during *Chlorella* sp. cultivation on synthesis of biodiesel. *Renewable Energy*, 2016, 98: 84–91.
- [16] Yan RM, Zhang ZB, Zeng QG, Zhu D, Chu J. Carbon metabolism and energetic utilization of *Synechococcus* sp. PCC7942 under mixotrophic condition. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(9): 1239–1248. (in Chinese)
颜日明, 张志斌, 曾庆桂, 朱笃, 储炬. 聚球藻 7942 混养培养中碳代谢与能量利用. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1239–1248.
- [17] 章真. 雨生红球藻异养细胞光诱导积累虾青素工艺的优化与放大. 华东理工大学博士学位论文, 2016.
- [18] Costache TA, Fernández FGA, Morales MM, Fernández-Sevilla JM, Stamatin I, Molina E. Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. *Applied microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7627–7637.
- [19] Ouyang ZR, Wen XB, Geng YH, Mei H, Hu HJ, Zhang GY, Li YG. The effects of light intensities, temperatures, pH and salinities on photosynthesis of *Chlorella*. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2010, 28(1): 49–55. (in Chinese)
欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 梅洪, 胡鸿钧, 张桂艳, 李夜光. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响. 武汉植物学研究, 2010, 28(1): 49–55.
- [20] 任洁. 氮限制条件下小球藻的油脂代谢研究. 海南大学硕士学位论文, 2015.
- [21] 成永旭. 生物饲料培养学. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [22] Liu ZY, Wang GC. Dynamics of lipid accumulation in marine microalga *Chlorella vulgaris* promoted by iron. *Marine Sciences*, 2008, 32(11): 56–59, 73. (in Chinese)
刘志媛, 王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态过程.

- 海洋科学, 2008, 32(11): 56–59, 73.
- [23] Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 1949, 24(1): 1–15.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [25] Fairbairn NJ. A modified anthrone reagent. *Chemistry & Industry*, 1953, (4): 86.
- [26] Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4717–4722.
- [27] Tang QY, Zhang CX. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 2013, 20(2): 254–260.
- [28] Woodworth BD, Mead RL, Nichols CN, Kolling DRJ. Photosynthetic light reactions increase total lipid accumulation in carbon-supplemented batch cultures of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 159–164.
- [29] Muthuraj M, Palabhanvi B, Misra S, Kumar V, Sivalingavasu K, Das D. Flux balance analysis of *Chlorella* sp. FC₂ IITG under photoautotrophic and heterotrophic growth conditions. *Photosynthesis Research*, 2013, 118(1/2): 167–179.
- [30] Yan RM, Zhu D, Zhang ZB, Zeng QG, Chu J. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC 7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(4): 657–668.
- [31] 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.
- [32] Komor E, Tanner W. The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Biochemistry*, 1976, 70(1): 197–204.
- [33] Komor E. Proton-coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. *FEBS Letters*, 1973, 38(1): 16–18.
- [34] Komor E, Tanner W. The hexose-proton cotransport system of *Chlorella*: pH-dependent change in K_m values and translocation constants of the uptake system. *The Journal of General Physiology*, 1974, 64(5): 568–581.
- [35] Tanner W. The *Chlorella* hexose/H⁺-symporters. *International Review of Cytology*, 2000, 200: 101–141.
- [36] Siaux M, Cuiné S, Cagnon C, Fessler B, Nguyen M, Carrier P, Beyly A, Beisson F, Triantaphyllidès C, Li-Beisson Y, Peltier G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 2011, 11(1): 7.
- [37] Combres C, Laliberté G, Reyssac JS, de la Noüe J. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Physiologia Plantarum*, 1994, 91(4): 729–734.
- [38] Giovanardi M, Ferroni L, Baldisserotto C, Tedeschi P, Maietti A, Pantaleoni L, Pancaldi S. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. *Protoplasma*, 2013, 250(1): 161–174.
- [39] Xu F, Hu HH, Cong W, Cai ZL, Ouyang F. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(1): 51–53.
- [40] Yu HF, Jia SR, Dong YS, Lin YX. Effects of organic carbon sources on growth and photosynthesis of *Nostoc flagelliforme* cells. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2008, 22(2): 277–281. (in Chinese)
- 于海峰, 贾士儒, 董永胜, 林永贤. 有机碳源对发状念珠藻单体细胞生长和光合作用的影响. *高校化学工程学报*, 2008, 22(2): 277–281.
- [41] 潘瑞炽. 植物生理学. 第 6 版. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [42] Steinmüller K, Zetsche K. Photo- and metabolite regulation of the synthesis of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiology*, 1984, 76(4): 935–939.
- [43] Zhang L, Li BP, Wu ZQ, Gu L, Yang Z. Changes in growth and photosynthesis of mixotrophic *Ochromonas* sp. in response to different concentrations of glucose. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 2671–2678.

Effects of glucose on photosynthesis and growth of *Chloralla* sp. HN08 cells

Xiaoyu Lang, Zhiyuan Liu*, Meng Xu, Lingyu Xie, Rongzhen Li

College of Oceanology, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China

Abstract: [Objective] To study the potential of using glucose as carbon source to produce microalgae biomass and biochemical components, such as photosynthetic pigments, lipids, carbohydrates and proteins by tropical marine microalgae *Chloralla* sp. HN08. [Methods] We compared the growth characteristics of *Chloralla* sp. HN08 cells under photoautotrophic and mixotrophic (10 g/L glucose was added into the medium) conditions. The photosynthesis, specific growth rates, cell densities, and the content of cell's major components including lipids, starch, soluble sugar, and soluble protein were determined and compared. [Results] Glucose (10 g/L in medium) could promote *Chloralla* growth and increase the final cell density under light condition. However, cells declined gradually under heterotrophic condition. Under mixotrophic condition, the specific growth rate and the final cell density were 6.8 and 1.3 times as that of cells under photoautotrophic condition, respectively. The content of soluble sugar, starch, and lipids in mixotrophic cells was also significantly higher ($P < 0.05$) than that in photoautotrophic cells. However, the content of soluble protein and photosynthetic pigments of mixotrophic cells was significantly lower ($P < 0.05$) than that of autotrophic cells. Algae culture with glucose addition showed a higher light saturation as well as respiration rate. No significant difference in net photosynthesis rate was found between autotrophic and mixotrophic cultures ($P > 0.05$). [Conclusion] Under light condition, glucose as a carbon source can promote lipids and starch accumulation, as well as biomass production.

Keywords: *Chloralla*, glucose, mixotrophy, autotrophy, photosynthesis

(本文责编: 李磊)

Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (20154178)

*Corresponding author. Tel: +86-898-66279184; E-mail: liuzhiyuan111@163.com

Received: 16 August 2016; Revised: 31 October 2016; Published online: 8 December 2016