

## 研究报告



## 乙酸钠调控小球藻生长及代谢产物

刘巧巧 胡小丽 杨钰娟 董京伟 高正 钱平康 邓祥元\*

江苏科技大学生物技术学院 江苏 镇江 212100

**摘要:**【背景】小球藻是一种单细胞绿藻,在不同培养条件下可积累高附加值的代谢产物,这些产物可用于生产生物燃料、食品、保健品、药品等。然而这些代谢产物在藻细胞中的生产率较低且很难通过经济可行的方法将其分离,这使其工业化规模生产受到限制。【目的】研究乙酸钠对小球藻生物量的影响,并分析其对小球藻代谢产物的调控作用。【方法】通过在小球藻培养液中添加不同浓度的乙酸钠(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L),研究其调控小球藻生长和代谢的作用机理。【结果】在添加 3.0 g/L 乙酸钠的培养液中,小球藻的生物量是对照组的 5.2 倍,尽管藻细胞中蛋白质含量无明显变化,但油脂和类胡萝卜素含量是对照组的 2.4 倍和 1.2 倍,多糖和叶绿素 a 含量却仅为对照组的 54.6%和 54.4%。【结论】乙酸钠不仅会影响藻细胞的生长,还会调控其代谢过程,这为深入探索乙酸钠在调控小球藻生长及代谢过程的作用机制提供了理论基础和技术资料。

**关键词:** 乙酸钠, 小球藻, 生长, 叶绿素, 蛋白, 多糖

Growth and metabolites of *Chlorella sorokiniana* regulated by sodium acetateLIU Qiaoqiao HU Xiaoli YANG Yujuan DONG Jingwei GAO Zheng  
QIAN Pingkang DENG Xiangyuan\*

College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212100, China

**Abstract:** [Background] As one of the unicellular green algae, *Chlorella* sp. can accumulate a variety of value-added metabolites under different culture conditions. These metabolites could be used as a good feedstock to produce cosmetics, foods, health products, medicines, etc. However, their large-scale industrial production is restricted because of low productivity of metabolites in the algal cells and the difficulty of separating them by economically viable methods. [Objectives] To study the effects of sodium acetate on biomass production of *Chlorella sorokiniana*, and to analyze its regulatory role in the production of algal metabolites. [Methods] Different concentrations of sodium acetate (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 g/L) were added to the cultures of *C. sorokiniana*. Growth and metabolites of this alga were determined during algae cultivation to study the regulatory role of sodium acetate. [Results] Biomass concentration of *C. sorokiniana* was 5.2 times higher than that in the controls, when this alga grew in the cultures with 3.0 g/L sodium acetate. Although no obvious changes in contents of proteins were observed,

**Foundation items:** Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (SWYY-025); Zhenjiang Key Research and Development Project of Jiangsu Province (SH2019004)

\*Corresponding author: E-mail: dengxiangyuan@just.edu.cn

Received: 14-12-2020; Accepted: 07-13-2021; Published online: 13-09-2021

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(SWYY-025); 江苏省镇江市重点研发计划项目(SH2019004)

\*通信作者: E-mail: dengxiangyuan@just.edu.cn

收稿日期: 2020-12-14; 接受日期: 2021-07-13; 网络首发日期: 2021-09-13

contents of lipids and carotenoids were 2.4 and 1.2 times greater than that in the controls, respectively, when the alga grew in the cultures with 3.0 g/L sodium acetate. In addition, contents of polysaccharides and chlorophyll a decreased, which were only 54.6 and 54.4% of that in the controls, respectively. **[Conclusion]** Sodium acetate not only affected the growth of *C. sorokiniana*, but also regulated its metabolic process. These results would provide theoretical basis and technical data for further exploring the regulatory role of sodium acetate in growth and metabolic process of *C. sorokiniana*.

**Keywords:** sodium acetate, *Chlorella sorokiniana*, growth, chlorophyll, protein, polysaccharide

作为微藻生长所必需的元素之一, 碳可为藻细胞的生长提供碳链骨架和能量, 含量约为藻体干重的 50.0%<sup>[1]</sup>。研究发现, 微藻不仅可以利用 CO<sub>2</sub> 及培养液中的其他无机碳源进行自养生长, 还可利用培养液中的有机碳源, 如葡萄糖、醋酸等进行异养生长<sup>[2-3]</sup>。在有机碳源和无机碳源同时存在的情况下, 微藻可进行混合生长, 形成同时具有自养和异养特性的组合代谢模式<sup>[4-5]</sup>。这种培养模式可显著提高培养体系中的藻细胞密度, 缩短培养时间, 降低微藻生长对光照的要求, 非常有利于微藻的大规模培养<sup>[6]</sup>。

小球藻(*Chlorella* sp.)是一种普生性单细胞真核微藻, 具有生长速度快且能在恶劣条件下生存等优点, 已成为不同行业(如化妆品、保健食品、化工和制药行业)生产色素、碳水化合物、脂质、蛋白质和维生素等高价产品的重要原料, 可生产许多实用的代谢产品, 如食品补充剂、脂质、酶、生物物质、聚合物、毒素、颜料和“绿色能源产品”<sup>[7]</sup>。

醋酸是一种典型的挥发性脂肪酸, 在工业上可通过化学合成和细菌发酵等方法进行生产。与其他碳源相比, 醋酸具有更有效的同化途径, 因为在醋酸消耗过程中只有乙酰辅酶 A 合成酶作为限速酶, 而其他碳源的消耗限速酶种类较多, 会影响细胞生长和产物积累的碳流量<sup>[8]</sup>。在前人的研究工作中, Ogawa 等<sup>[9]</sup>和 Martínez 等<sup>[10]</sup>研究发现小球藻(*Chlorella vulgaris*)可利用醋酸盐进行生长和繁殖。Bumbak 等<sup>[11]</sup>提出醋酸盐能够为大多数异养生长的微藻提供充足的能量和碳源。如在添加醋酸盐的混合营养培养中, 比生长速率是光

养和异养培养总和的 1.74 倍<sup>[12]</sup>。乙酸钠对微藻生长和油脂含量的影响与微藻的种类有关, 研究对象不同导致结果也不同。蔡佳佳等<sup>[13]</sup>在小球藻(*Chlorella* sp. KMMCC FC-21)培养液中添加乙酸钠后, 生物量和油脂含量分别提高 2 倍和 1.2 倍。符茹等<sup>[14]</sup>在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)培养液中添加乙酸钠后, 生物量和油脂含量分别提高了 1.7 倍和 1.9 倍。这些研究结果说明乙酸钠对微藻的生长、生物量积累以及有关代谢产物的合成具有一定的调控作用。

本文以具有广泛应用前景的小球藻(*Chlorella sorokiniana* FACHB-275)为研究对象, 在以 BG11 培养基<sup>[15]</sup>为基础的培养液中分别添加不同质量浓度的乙酸钠, 通过对其细胞密度、培养液 pH 值以及单位细胞的叶绿素 a 含量、类胡萝卜素含量、油脂、多糖、可溶性蛋白的测定, 分析乙酸钠调控小球藻生长和积累代谢产物的作用机制, 以期为进一步开发利用和降低生产成本提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小球藻(*Chlorella sorokiniana* FACHB-275)来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 其培养条件: BG11 培养基, 温度 24–26 °C, 光照强度约 3 000 lx, 光暗周期比 12 h/12 h, 摇床转速 150 r/min。

### 1.2 主要试剂和仪器

乙酸钠, 国药集团化学试剂有限公司; 尼罗红, Sigma-Aldrich 公司; 植物可溶性糖含量测试盒、总蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程

研究所。分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 摇床, 金坛市医疗仪器厂; pH 计, 上海三信仪表厂; 多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 小球藻的培养

首先取处于对数生长期(细胞密度约为  $3 \times 10^7 - 4 \times 10^7$  cells/mL)的小球藻藻液 50 mL,  $5\ 000 \times g$  离心 5 min 后弃上清获得藻泥, 取 5 mL BG11 培养基重悬后, 将其接种到装有 200 mL BG11 培养基的锥形瓶中, 置于  $24-26\ ^\circ\text{C}$  摇床(150 r/min)上进行 24 h 的恢复性培养后, 分别向处理组培养液中加入不同质量浓度的乙酸钠(1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L)后按照 1.1 的方法进行培养, 培养 7 d 至其平台期。每个浓度梯度设置 3 个平行。

#### 1.3.2 藻细胞密度的测定

使用分光光度计每日测定藻液的  $OD_{680}$  值, 并利用以下公式计算其细胞密度( $X$ , cells/mL):  $X(\text{cells/mL}) = (14.71 \times OD_{680} - 0.467) \times 10^6$ , ( $R^2 = 0.994$ )。

#### 1.3.3 藻细胞色素含量的测定

每日取 5 mL 藻液  $6\ 000 \times g$  离心 10 min 去上清, 使用蒸馏水重悬 2 次获得藻泥, 然后加入 5 mL 甲醇, 涡旋振荡 10 s 使藻粒分散均匀并于  $4\ ^\circ\text{C}$  条件下避光抽提 24 h, 再次涡旋振荡 10 s 后  $10\ 000 \times g$  离心 10 min, 以甲醇作为参比, 测定上清液的  $OD_{652}$ 、 $OD_{665}$  和  $OD_{470}$  值<sup>[16]</sup>。根据以下公式计算叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 和类胡萝卜素(Car)的浓度:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mL}) = 15.65 \times OD_{665} - 7.340 \times OD_{652};$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mL}) = 34.09 \times OD_{652} - 15.28 \times OD_{665};$$

$$\text{Car } (\mu\text{g/mL}) = \frac{1000 \times OD_{470} - 1.63 \times \text{Chl a} - 104.9 \times \text{Chl b}}{221}。$$

由以上公式所得的结果再根据藻细胞密度计算出单位细胞内叶绿素 a ( $C_{\text{chl a}}$ ) 和类胡萝卜素的含量( $C_{\text{car}}$ )。

#### 1.3.4 藻液 pH 值的测定

每日取 2 mL 藻液于 10 mL 离心管中, 使用

pH 计测定培养液的 pH 值<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.5 藻细胞内油脂含量的测定

每日取 800  $\mu\text{L}$  藻液加入 190  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 涡旋振荡 30 s 后加入 10  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{g/mL}$  的尼罗红, 涡旋 30 s, 暗处理 5 min 后, 用多功能酶标仪在激发波长 485 nm、发射波长 580 nm 下测定油脂荧光值, 然后根据藻细胞密度得出单位细胞油脂荧光值 (Fluorescence Unit, FU), 用于表示小球藻中的油脂含量<sup>[18]</sup>。

#### 1.3.6 藻细胞内多糖含量的测定

培养结束后收集 20 mL 藻液,  $5\ 000 \times g$  离心 10 min, 弃上清后加入 1 mL 的 0.02 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液, 沸水浴处理 20 min 破坏其细胞壁, 冷却至室温后  $8\ 000 \times g$  离心 10 min 取上清液, 用于测定藻细胞内的多糖含量<sup>[17]</sup>。测定方法按照植物可溶性糖含量测试盒说明书进行。

#### 1.3.7 藻细胞内可溶性蛋白含量的测定

培养结束后收集 20 mL 藻液,  $5\ 000 \times g$  离心 10 min, 弃上清后加入 1 mL 的 0.02 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液, 冰浴破碎细胞 10 min (破碎 5 s, 间隔 10 s), 经镜检无完整细胞后在  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000 \times g$  离心 10 min, 取上清液用于测定藻细胞内可溶性蛋白含量<sup>[17]</sup>。测定方法按照总蛋白定量测定试剂盒说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙酸钠对小球藻生长的影响

乙酸钠对小球藻生长的影响如图 1 所示。对照组培养结束后的藻细胞密度为  $3.60 \times 10^6$  cells/mL; 处理组藻细胞密度分别为对照组的 3.0、4.4、5.2、3.6 和 2.2 倍, 添加量在 0–3.0 g/L 之间时乙酸钠对小球藻的促进作用与添加量成正比, 在添加量为 3.0 g/L 时促进效果最佳, 添加浓度高于 3.0 g/L 时促进效果降低。在培养初期(1–2 d)处理组藻细胞聚集导致密度低于对照组; 培养至中后期, 第 3 天后处理组中的藻细胞密度开始增大,

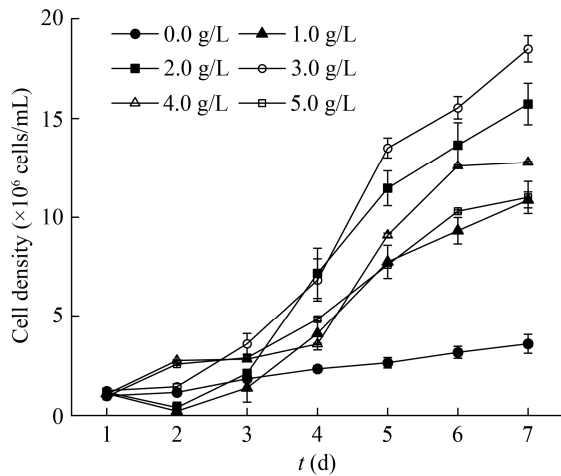


图 1 小球藻在不同浓度乙酸钠处理下的细胞密度  
Figure 1 Cell density of *Chlorella sorokiniana* under different concentrations of sodium acetate

在第 4 天后添加乙酸钠培养液中的藻细胞密度明显高于对照组,而在第 5 天后,藻细胞密度的增长速度有所减缓。因此,添加适量乙酸钠能够明显提高小球藻的细胞密度。

## 2.2 培养液中 pH 值的变化规律

添加乙酸钠后培养液中 pH 的变化规律如图 2 所示,培养液 pH 值随培养时间的延长逐渐升高,培养结束后对照组 pH 值为 9.52, 1.0 g/L 处理组 pH 值最高,为 10.27。当乙酸钠添加量 $\geq 2.0$  g/L 时,培养液的 pH 值低于 1.0 g/L 处理组,以适应

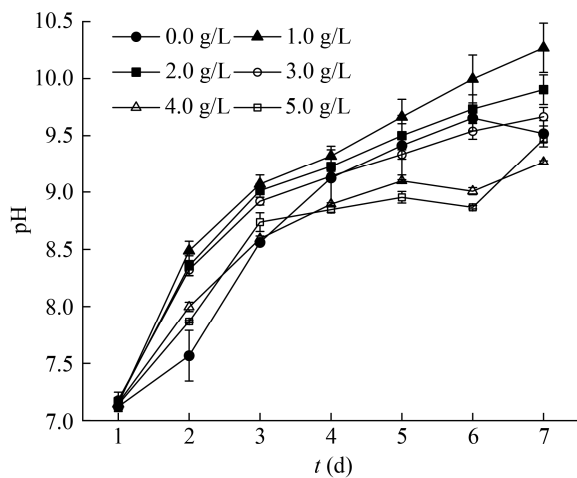


图 2 培养液中 pH 值的变化规律  
Figure 2 Changes in the pH value of algal culture

小球藻的生长。培养初期(1-3 d)的 pH 值上升幅度较大,后期上升幅度较小。

## 2.3 乙酸钠对小球藻色素含量的影响

乙酸钠对小球藻色素含量的影响如图 3 所示,对照组培养结束后的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量分别为  $0.99 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$  和  $0.13 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ 。如图 3A 所示,小球藻细胞内叶绿素 a 含量随着乙酸钠浓度的增加明显降低,当乙酸钠添加量为 5.0 g/L 时,藻细胞内叶绿素 a 的含量仅为对照组的 54.4%,表明乙酸钠可抑制藻细胞叶绿素 a 含量的增加。如图 3B 所示,与对照组相比,添加乙酸钠后小球藻细胞内类胡萝卜素含量升高,当乙酸钠浓度为 1.0 g/L 时,藻细胞内类胡萝卜素含量为对照组的 1.2 倍,表明乙酸钠可促进藻细胞内类胡萝卜素的积累。

## 2.4 乙酸钠对小球藻油脂含量的影响

乙酸钠对小球藻油脂含量的影响如图 4 所示。由图 4 可知,对照组藻细胞培养结束后的油脂含量为  $4197.63 \text{ FU}/10^6 \text{ cells}$ ,处理组油脂含量分别为对照组的 0.7、1.6、2.4、0.18 和 0.19 倍,表明乙酸钠在一定浓度范围内对小球藻细胞内油脂积累具有促进作用。当浓度大于 3 g/L 时,乙酸钠对小球藻油脂积累无促进作用。培养初期藻细胞内油脂含量增长速度较快,在第 2 天单位细胞油脂含量达到最高值,之后油脂含量开始降低,这与小球藻细胞密度的变化趋势(图 1)相反。

## 2.5 乙酸钠对小球藻多糖和可溶性蛋白含量的影响

乙酸钠对小球藻细胞内多糖和可溶性蛋白含量的影响如图 5 所示,对照组培养结束后的多糖和可溶性蛋白含量分别为  $1.57 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$  和  $1.17 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells}$ ,处理组藻细胞多糖和可溶性蛋白含量均低于对照组。当乙酸钠浓度为 3.0 g/L 时,多糖含量仅为对照组的 54.6%。乙酸钠的添加量为 1.0 g/L 时可溶性蛋白含量最低,为对照组的 75.4%;当乙酸钠添加量 $>3.0$  g/L 时,多糖含量有一定幅度的升高。

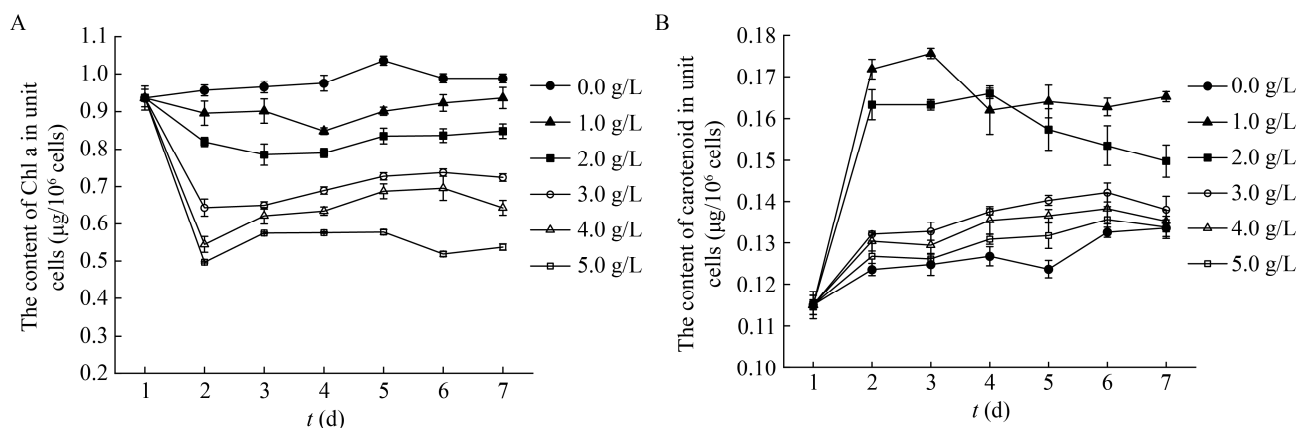


图3 小球藻在不同浓度乙酸钠处理下的色素含量

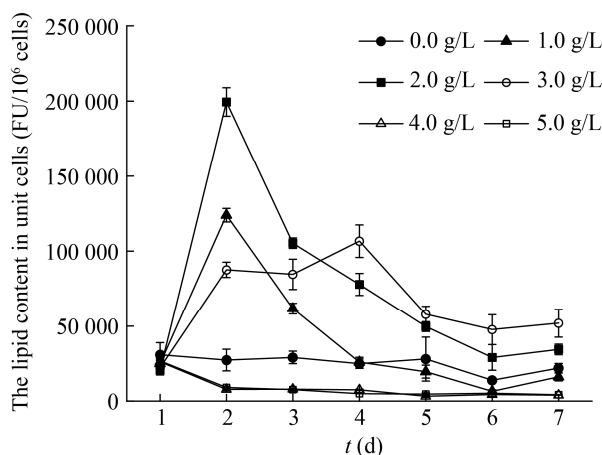
Figure 3 Contents of pigment in *Chlorella sorokiniana* under different concentrations of sodium acetate

图4 小球藻在不同浓度乙酸钠处理下的油脂含量

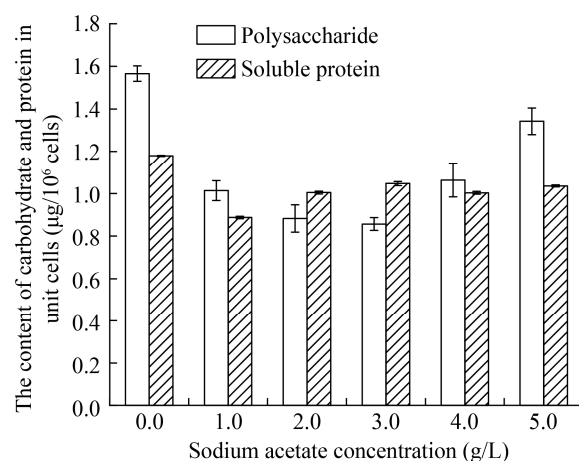
Figure 4 Contents of lipid in *Chlorella sorokiniana* under different concentrations of sodium acetate

图5 小球藻在不同浓度乙酸钠处理下的多糖和可溶性蛋白含量

Figure 5 Contents of polysaccharide and soluble protein in *Chlorella sorokiniana* under different concentrations of sodium acetate

### 3 讨论

研究表明,有机碳源调控小球藻生长及代谢产物与其浓度有关<sup>[19]</sup>。在本研究中,通过添加不同浓度的乙酸钠,可使小球藻的生物量较对照组增加5.2倍,这可能是由于在混合营养培养中,藻细胞可以吸收有机碳源产生能量,进而减少对自身能量的消耗,引起藻细胞内相关代谢产物的积累和生物量的增加<sup>[20]</sup>。这与 Shen 等<sup>[21]</sup>的研究结果基本一致,他们在培养液中添加乙酸钠后,异养微藻 (*Botryococcus* sp. NJD-1)的生物量增加 5.4 倍。

本研究中,乙酸钠添加浓度高于 3.0 g/L 时,促进效果降低,这是由于乙酸钠的水解,使得游离态和未游离态之间的溶解平衡可以形成丰富的未游离态乙酸钠<sup>[8]</sup>。这意味着,随着乙酸钠浓度的增加,未解离形式乙酸钠的含量也会增加。未解离的酸分子渗透到质膜中,从而导致细胞溶质酸化并进一步对细胞代谢造成压力,进而促进效果降低<sup>[8]</sup>。此外,在培养液中添加乙酸钠, pH 值随着时间的延长逐渐升高,这是由于当使用乙酸钠作

为碳源时, 剩余的  $\text{Na}^+$  与羟基或其他阴离子耦合形成碱, pH 值随着乙酸钠的消耗而上升<sup>[22]</sup>。当乙酸钠浓度  $\geq 2.0 \text{ g/L}$  时, 培养液的 pH 值低于  $1.0 \text{ g/L}$  处理组, 这与刘峰<sup>[23]</sup>提出的 pH 值随着乙酸钠的浓度升高而升高的现象不一致, 推测这种现象的发生与小球藻的生长状态有关。

本研究中添加乙酸钠后叶绿素含量明显降低的同时细胞密度增加, 这是由于微藻光合作用和有机碳物质的氧化磷酸化独立发挥作用, 有机碳代谢对光合作用产生相反的影响<sup>[24]</sup>。Giovanardi 等<sup>[25]</sup>和 Ip 等<sup>[26]</sup>也得到了类似的结果。黄沛玲等<sup>[27]</sup>研究发现当光合色素含量降低时, 水华微囊藻 (*Microcystis flos-aquae*) 通过稳定实际光能转化效率及光能利用率来增强光合活性。因此, 叶绿素含量的下降并不会影响小球藻的生长。

本研究中添加乙酸钠后小球藻类胡萝卜素含量明显提高, 这可能是由于类胡萝卜素是在微藻光合作用和光保护中发挥着不可替代的作用<sup>[28-29]</sup>。Ali 等<sup>[30]</sup>和 Piotrowska-Niczyporuk 等<sup>[31]</sup>研究发现微藻可以通过增加类胡萝卜素的含量进行生长和繁殖, 并以此增强微藻的环境适应性。因此, 类胡萝卜素含量的上升能够弥补叶绿素 a 含量下降所造成的损失。有研究表明<sup>[32-33]</sup>, 过量的醋酸盐会引起氮的相对短缺, 导致胡萝卜素的积累。当醋酸钠浓度为  $1.0 \text{ g/L}$  时细胞内胡萝卜素含量最高, 这可能是因为添加  $1.0 \text{ g/L}$  乙酸钠的培养中小球藻生物量较低, 培养基营养相对丰富, 藻细胞并未感受到氮饥饿条件的影响, 但随着乙酸钠浓度的升高, 生物量逐渐增加, 氮饥饿条件开始影响类胡萝卜素的生长。

本研究中小球藻细胞密度与油脂积累的变化趋势相反, 这可能是因为随着培养时间的延长小球藻细胞内养分从用于油脂合成转向细胞密度的增加, 这与 Popovich 等<sup>[34]</sup>观点一致, 他们提出在硅藻中细胞数的增加和油脂的积累发生在不同生长阶段。有研究表明<sup>[22,35]</sup>, 微藻发生应激反应时, 脂质和类胡萝卜素含量会增加, 在本研究中

油脂和类胡萝卜素含量同时增加, 说明在培养液中添加乙酸钠后小球藻也发生了类似的应激反应。当浓度大于  $3.0 \text{ g/L}$  时, 乙酸钠对小球藻油脂积累没有促进作用可能是由于藻细胞在营养过剩的条件下优先选择进行细胞生长和繁殖, 因而不利于油脂积累<sup>[36]</sup>。

本研究中添加乙酸钠后可溶性蛋白和多糖含量下降, 油脂含量上升。Zhang 等<sup>[37]</sup>提出在微藻培养过程中, 当培养条件改变时, 部分蛋白质可以与脂质相互转化。Wang 等<sup>[38]</sup>提出微藻能够进行光合碳分配的程序性变化, 细胞脂质、碳水化合物和蛋白质的相对量会根据环境和培养条件的变化做出反应。因此, 乙酸钠可调控小球藻细胞内碳代谢更多地流向油脂合成途径, 从而使油脂含量增加。

微藻被认为是生产生物燃料最有前途的非食品性原料<sup>[39]</sup>, 以小球藻为原料进行生物柴油的生产是不可再生化石燃料的良好替代品。天然类胡萝卜素对人类健康和医疗具有重要作用, 其产品的市场不断扩大对天然类胡萝卜素资源的商业化生产和利用提出了更高的要求<sup>[40]</sup>。本研究使用生化调控手段来提升小球藻单位细胞油脂和类胡萝卜素含量, 为小球藻同时生产脂质和高价值化合物用于生物能源和生物制药提供了有效的策略。

## 4 结论

本研究探讨了乙酸钠对小球藻生长及代谢产物的调控作用, 研究发现乙酸钠可显著促进小球藻的生长, 生物量增加了 5.2 倍; 此外, 乙酸钠可调控小球藻细胞内的生理生化成分, 如乙酸钠可明显促进油脂和类胡萝卜素的积累, 在含  $3.0 \text{ g/L}$  乙酸钠的培养液中, 其含量分别为对照组的 2.4 倍和 1.2 倍, 但乙酸钠的添加却显著抑制了藻细胞中多糖和叶绿素 a 的合成与积累。因此, 乙酸钠对小球藻的生长及代谢产物的合成具有一定的调控作用, 可在小球藻规模化培养过程中根据产品要求添加适量的乙酸钠。研究结果为工业化大规模生产小球藻代谢产物提供了有用的信息。

## REFERENCES

- [1] Yang SQ, Wei XH, Wang LJ, Yang SH, Luo GH. Growth, photosynthesis and total lipid of *Scenedesmus obliquus* under different nitrogen and carbon source combinations[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(12): 112-117 (in Chinese)  
杨宋琪, 魏喜红, 王丽娟, 杨生辉, 罗光宏. 不同氮/碳源组合条件下斜生栅藻的生长、光合及油脂产率[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 112-117
- [2] Nair A, Chakraborty S. Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* in bubble-column photobioreactors[J]. Algal Research, 2020, 46: 101799
- [3] Oliveira CYB, D'Alessandro EB, Antoniosi Filho NR, Lopes RG, Derner RB. Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga *Choricystis minor* var. *minor*[J]. Science of the Total Environment, 2021, 759: 143476
- [4] Mitra D, Van Leeuwen J, Lamsal B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products[J]. Algal Research, 2012, 1(1): 40-48
- [5] Kim S, Park JE, Cho YB, Hwang SJ. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions[J]. Bioresource Technology, 2013, 144: 8-13
- [6] Xu F, Hu HH, Cong W, Cai ZL, Ouyang F. Effect of organic carbon sources on growth and photosynthesis of *Nannochloropsis* sp.[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2003(6): 560-563 (in Chinese)  
徐芳, 胡晗华, 丛威, 蔡昭铃, 欧阳藩. 有机碳源对产EPA微藻(*Nannochloropsis* sp.)生长及光合作用的影响[J]. 过程工程学报, 2003(6): 560-563
- [7] Kose Engin I, Cekmecelioglu D, Yücel AM, Oktem HA. Enhancement of heterotrophic biomass production by *Micractinium* sp. ME05[J]. Waste and Biomass Valorization, 2018, 9(5): 811-820
- [8] Gong GP, Zhang X, Tan TW. Simultaneously enhanced intracellular lipogenesis and  $\beta$ -carotene biosynthesis of *Rhodotorula glutinis* by light exposure with sodium acetate as the substrate[J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122274
- [9] Ogawa T, Aiba SC. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1981, 23(5): 1121-1132
- [10] Martínez F, Orús MI. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101[J]. Plant Physiology, 1991, 95(4): 1150-1155
- [11] Bumbak F, Cook S, Zachleder V, Hauser S, Kovar K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 31-46
- [12] Pang N, Gu XY, Fu X, Chen SL. Effects of gluconate on biomass improvement and light stress tolerance of *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic culture[J]. Algal Research, 2019, 43: 101647
- [13] Cai JJ, Fei XW, Li YJ, Hu XW, Guo JC, Deng XD. Nutrient elements deficiency and carbon source addition affect on the growth and lipid accumulation in *Chlorella* sp. KMMCC FC-21[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(11): 2029-2036 (in Chinese)  
蔡佳佳, 费小雯, 李亚军, 胡新文, 郭建春, 邓晓东. 元素缺乏和外加碳源对小球藻(*Chlorella* sp. KMMCC FC-21)生长和油脂积累的影响[J]. 热带作物学报, 2011, 32(11): 2029-2036
- [14] Fu R, Huang CG, Wang HY. Effects of nutrients on growth and oil accumulation of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(11): 2292-2294, 2304 (in Chinese)  
符茹, 黄长干, 王海英. 营养条件对三角褐指藻生长和油脂积累的影响[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(11): 2292-2294, 2304
- [15] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*)[J]. Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171-205
- [16] Deng XY, Gao K, Sun JL. Physiological and biochemical responses of *Synechococcus* sp. PCC7942 to Irgarol 1051 and diuron[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122/123: 113-119
- [17] Hu XL. The process of five biochemical substances for regulating growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)  
胡小丽. 五种生化物质调控小球藻生长及其代谢的研究[D]. 镇江: 江苏科技大学硕士学位论文, 2018
- [18] Hu XL, Li D, Cheng J, Lv K, Gao K, Deng XY. A preliminary study on the growth and metabolism of *Chlorella sorokiniana* regulated by indomethacin[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(1): 418-424 (in Chinese)  
胡小丽, 李达, 成婕, 吕凯, 高坤, 邓祥元. 吲哚美辛调控小球藻生长及代谢的初步研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(1): 418-424
- [19] Liang CL, Zheng XY, Zheng ZF, Xu BQ. 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 (in Chinese)  
梁长利, 郑训艺, 郑祖凤, 许宝泉. 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

- [20] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response[J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 108(2): 111-117
- [21] Shen L, Saky SA, Yang Z, Ho SH, Chen CX, Qin L, Zhang GL, Wang YP, Lu YH. The critical utilization of active heterotrophic microalgae for bioremoval of Cr(VI) in organics co-contaminated wastewater[J]. *Chemosphere*, 2019, 228: 536-544
- [22] Yeh KL, Chen CY, Chang JS. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 64: 1-7
- [23] Liu F. Comparison of basicity of sodium bicarbonate and sodium acetate[J]. *New Courses' Study*, 2012(7): 150 (in Chinese)
- 刘峰. 碳酸氢钠与醋酸钠酸碱性的比较[J]. *新课程学习* (中), 2012(7): 150
- [24] Liu XJ, Duan SS, Li AF, Xu N, Cai ZP, Hu ZX. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(2): 239-246
- [25] Giovanardi M, Baldisserotto C, Ferroni L, Longoni P, Cella R, Pancaldi S. Growth and lipid synthesis promotion in mixotrophic *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) cultivated with glucose[J]. *Protoplasma*, 2014, 251(1): 115-125
- [26] Ip PF, Wong KH, Chen F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(11): 1761-1766
- [27] Huang PL, Li L, Li JJ, Li XY. Effects of S-metolachlor on photosynthetic characteristics of *Microcystis flos-aquae*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(8): 1885-1893 (in Chinese)
- 黄沛玲, 李玲, 李俊杰, 李雪妍. 水华微囊藻对除草剂 S-异丙甲草胺胁迫的光合活性响应[J]. *环境科学研究*, 2020, 33(8): 1885-1893
- [28] Bandara S, Ren Z, Lu L, Zeng XL, Shin H, Zhao KH, Yang XJ. Photoactivation mechanism of a carotenoid-based photoreceptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(24): 6286-6291
- [29] Pérez-Pérez ME, Couso I, Crespo JL. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Autophagy*, 2012, 8(3): 376-388
- [30] Ali HEA, El-Fayoumy EA, Rasmy WE, Soliman RM, Abdullah MA. Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(1): 227-239
- [31] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Talarek M, Bralska M, Zambrzycka E. The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae)[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(23): 19112-19123
- [32] Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(5): 373-378
- [33] Zhang X. Lipid metabolism research and transcriptome analysis of *Chlorella* sp. nitrogen starvation[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2018 (in Chinese)
- 张雪. 氮饥饿条件下小球藻(*Chlorella* sp.)油脂代谢研究及转录组分析[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2018
- [34] Popovich CA, Damiani C, Constenla D, Leonardi PI. Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(1): 1-10
- [35] Thompson GA. Lipids and membrane function in green algae[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1302(1): 17-45
- [36] Xue LL. The effects of nutrients, auxins and chemical triggers on the growth and lipid accumulation of *Dunaliella tertiolecta*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2017 (in Chinese)
- 薛璐璐. 营养元素、生长素及化学诱导剂对特氏杜氏藻生长及油脂含量的影响[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2017
- [37] Zhang ZS, Gao PT, Guo L, Wang Y, She ZL, Gao MC, Zhao YG, Jin CJ, Wang GC. Elucidating temperature on mixotrophic cultivation of a *Chlorella vulgaris* strain: different carbon source application and enzyme activity revelation[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123721
- [38] Wang L, Li YG, Sommerfeld M, Hu Q. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 289-295
- [39] Mondal M, Ghosh A, Tiwari ON, Gayen K, Das P, Mandal MK, Halder G. Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes[J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 145: 247-254
- [40] Lou SL, Lin X, Liu CL, Anwar M, Li H, Hu ZL. Molecular cloning and functional characterization of CvLCYE, a key enzyme in lutein synthesis pathway in *Chlorella vulgaris*[J]. *Algal Research*, 2021, 55: 102246