

微藻培养方法研究进展*

尚常花^{1,2}, 朱顺妮², 王忠铭², 袁振宏², 谢君^{1†}

(1. 华南农业大学新能源与新材料研究所, 农业部能源植物资源与利用重点实验室, 广东省普通高等学校生物质能源重点实验室, 广州 510642; 2. 中国科学院广州能源研究所, 广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 中国科学院可再生能源重点实验室, 广州 510640)

摘要: 微藻是一种有前景的生物柴油原料。微藻培养是微藻生物柴油生产过程的重要环节。本文就微藻培养方法的研究进展进行了阐述。对自养、异养及兼养三种培养方法进行了比较, 并对微藻培养提出了建议。

关键词: 微藻; 生物柴油; 培养方法

中图分类号: TK6

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.2095-560X.2016.02.005

Research Progress on Cultivation Methods of Microalgae

SHANG Chang-hua^{1,2}, ZHU Shun-ni², WANG Zhong-ming², YUAN Zhen-hong², XIE Jun¹

(1. Institute of New Energy and New Materials, South China Agricultural University; Key Laboratory of Energy Plant Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, P. R. China; Key Laboratory of Biomass Energy of Guangdong Regular Higher Education Institutions, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Key Laboratory of Renewable Energy, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Microalgae is a promising feedstock for biodiesel production. Cultivation of microalgae is a key step in the process of producing biodiesel using microalgae as raw material. Research progress on cultivation methods of microalgae is discussed. Phototrophic cultivation, heterotrophic cultivation and mixotrophic cultivation are compared. Suggestions about cultivation of microalgae are proposed in this article.

Key words: microalgae; biodiesel; cultivation methods

0 引言

石油的利用极大促进了社会的发展。然而, 日益减少的储量和燃烧导致的环境污染, 使得全球面临着能源短缺和环境恶化的双重危机^[1-2]。因此, 寻求清洁可持续发展的新能源引起了广泛关注。

生物柴油是一种清洁的可再生能源, 是以大豆油菜、麻风树、油棕、黄连木等高等植物、微藻油脂、动物油脂及地沟油等为原料制成的可再生柴油燃料^[1-3]。与石油柴油相比, 生物柴油具有易生物降解、可再生、对环境友好等优点, 可部分替代石油柴油^[1-2,4-5]。目前, 受原料供应不足及成本较高的双重限制, 生物柴油的实用化还有一定困难。原料成本约占生物柴油生产成本的 50%~85%^[4,6], 因此利

用廉价原料是降低生物柴油生产成本的关键之一。草本油料作物的含油量较高, 收获的种子存储和加工较简便, 但中国食用植物油脂的缺口较大, 不可能出现足量剩余植物油用来发展生物柴油。木本油料植物的含油果实一般每年只能收获一次, 而且存储的成本较高, 以其为原料来生产生物柴油受到季节限制。与其他原料相比, 微藻具有光合作用效率较高、生长较快、不占用农田、生物量较高、油脂含量较高等优点, 其油脂组成与植物油相似^[1]。

微藻制取生物柴油是目前国际新能源领域的新方向。随着现代工业生物技术的发展, 已获得更多具有高产油能力或其抗菌能力强的产油微藻资源, 提高了微藻产油的效率。本文就微藻培养的内容进行阐述。

* 收稿日期: 2016-01-29

修订日期: 2016-03-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51476177); 中国科学院可再生能源重点实验室基金项目(y507j21001)

† 通信作者: 谢君, E-mail: xiejun@scau.edu.cn

1 光能自养培养

在光能自养培养中, 微藻利用光照(自然光或人工光照)和无机物(H_2O 、无机盐和 CO_2)进行光合作用, 合成有机物, 维持自身生长。由于微藻都可以进行光合作用, 因此光能自养是广泛采用的一种微藻培养方式^[7]。在自养条件下, 微藻的油脂含量因藻种的不同变化幅度很大。GOUVEIA 等^[8]报道自养条件下 *Spirulina maxima* LB 2342 的油脂含量仅为 4.1%。TAKAGI 等^[9]报道 *Dunaliella tertiolecta* ATCC 30929 在自养条件下油脂含量高达 60.6% ~ 67.8%。

国内外学者对影响微藻油脂合成的环境因素进行了较多研究。MCLARNON-RICHES 等^[10]发现光照、温度和重金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+})可改变羊角月芽藻中油脂的脂肪酸比例。TAKAGI 等^[9]发现 NaCl 浓度为 0.5 ~ 1.0 M 时, 随浓度升高盐藻 *Dunaliella tertiolecta* 的油脂含量从 60% 增加到 67%。

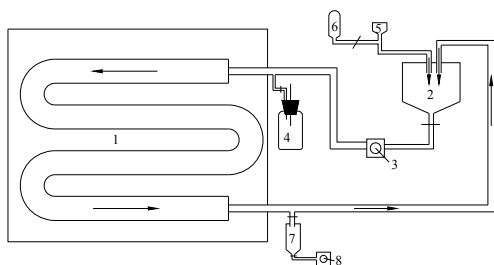
在诸多环境因素中, 氮源浓度的影响最显著。在微藻自养培养中, 氮缺乏广泛用于将微藻中代谢流向油脂合成。前人关于氮缺乏影响微藻油脂积累的报道较多。MUJTABA 等^[11]发现在氮缺乏条件下产油微藻 *Chlorella vulgaris* 培养 12 h 后油脂含量达到 43%, 而在氮源充足条件下培养 24 h 后油脂含量仅为 53%。PANCHA 等^[12]报道了氮缺乏条件对微藻 *Scenedesmus sp.* CCNM 1077 形态及细胞内生化过程的影响, 结果表明氮限制明显降低了细胞的光合活性和粗蛋白含量, 影响了细胞的形态, 增加了油脂含量(培养 15 d 后氮缺乏条件下为 27.93%, 氮源充足条件下为 18.87%)。RIOS 等^[13]发现与氮源充足条件相比较, 在氮限制条件下培养 7 d 后, 微藻 *Desmodesmus sp.* 的油脂含量最高, 为 23%。LIU 等^[14]发现氮缺乏条件下可以获得最高的油脂生产速率 $305.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 同时伴随着蛋白质、叶绿素和 DNA 等含氮化合物的降解。LI 等^[15]设计了氮缺乏、磷缺乏、氮和磷都缺乏及氮和磷都充足四个实验组来考察营养缺乏对 *Chlorella protothecoides* 油脂积累的影响, 结果表明氮和磷都缺乏条件下油脂含量最高为 55.8%, 其次是氮缺乏条件下油脂含量为 52.5%。氮缺乏不仅可用于自养过程, 而且也可用于异养和兼养过程, 是一种广泛使用的手段。虽然关于氮限制在微藻中诱导油脂积累的报道很多, 然而从分子水平对此现象进行解析的报道非常少, 有一些从蛋

白和代谢物水平研究氮缺乏的报道^[16-18]。MICHAEL 等^[19]解析了 *Chlorella vulgaris* strain UTEX 395 在氮源充足和氮缺乏条件下在转录组和蛋白组水平的变化, 重点研究了三脂酰甘油合成途径在基因和蛋白水平的变化, 为深入理解对氮限制的响应机制及改良该藻奠定了基础。RISMANI-YAZDI 等^[20]测定了 *Dunaliella tertiolecta* 的转录组, 构建了生物燃料前提分子的代谢途径, 为改良微藻奠定了基础。本实验室在前期研究中分析了氮缺乏和氮源充足条件下 *Dunaliella parva* 转录组的变化, 构建了脂肪酸、三脂酰甘油及淀粉等物质的代谢途径, 发现了重要的响应氮缺乏的转录因子基因 *wri1*, 为后继深入研究奠定了良好的基础^[21]。

光能自养培养可以在封闭式光生物反应器或者跑道式开放塘中进行。封闭式光生物反应器的优点包括: ①与跑道式开放塘相比损失的水分很少; ②培养系统可维持较长时间; ③可以实现高密度培养。跑道式开放塘的优点包括: ①蒸发降温; ②成本低。封闭式光生物反应器的缺点包括: ①难以扩大规模; ②需要控制温度; ③需要定期清理; ④微藻在光生物反应器中生长时会产生大量的溶解氧, 需要利用专门的脱气系统对溶解氧进行有效的释放; ⑤藻细胞容易附着到光生物反应器的壁上, 降低培养效率, 需要通过通气或者加大流速来缓解这一问题。跑道式开放塘的缺点包括: ①受外界温度及湿度变化影响较大; ②难以保持纯种培养。

光源和光强是影响微藻生长的重要因素。为了增加微藻的生长及降低建设成本, 研究者通过材料改良和工程设计改善在封闭式光生物反应器的改造方面做了很多尝试。目前, 封闭式光生物反应器的类型主要包括: 管道式光生物反应器(图 1)^[22]、平板式光生物反应器(图 2)^[23]、柱状气升式光生物反应器(内导流气升式反应器、光导纤维光生物反应器及磁处理气升式光生物反应器)和发酵罐式光生物反应器。全封闭管道式光生物反应器具有高度集约化生产、高光合效率、高产率等特点, 且操作简便, 易于管理。袁振宏等^[24]设计了一种高密度培养微藻的太阳能分光光合生物反应器系统, 该系统利用光纤将太阳光导入到光生物反应器, 实现微藻的高效培养。王忠铭等^[25]设计了一套利用含油废气筛选与培育微藻的装置, 用于实验室水平的微藻培养和筛选。秦磊等^[26]设计了用于跑道池培养微藻的高压微喷补碳系统, 该系统可用于户外大规模培

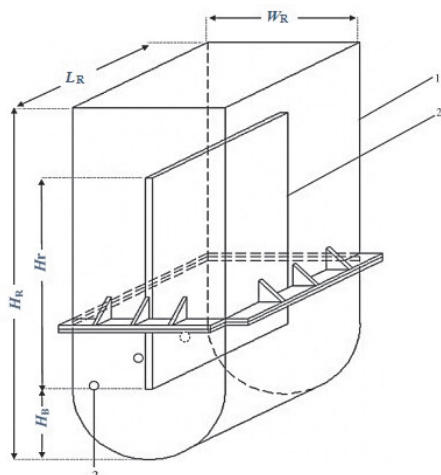
养微藻时的碳源补充，可促进微藻的生长。



1. 管道式反应器; 2. 气体分离器; 3. 离心泵; 4. CO₂发生器; 5. 培养基接收槽; 6. 净水装置; 7. 收获贮槽; 8. 离心机

图1 管道式光生物反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of tubular panel photobioreactor



1. 反应柱; 2. 垂直平板; 3. 分布器; H_R : 柱高度; L_R : 柱长度; W_R : 柱宽度; H_f : 平板高度; H_b : 径向间隙

图2 平板式光生物反应器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of flat panel photobioreactor

可用于微藻自养培养的光源包括：日光、传统的人工光源、LED光源及光纤。目前，LED光源受到广泛的关注。LED光源使用寿命长、发光效率高、耗电量少，耐受频繁的开和关闭及安全可靠性强。此外，LED光源体积小，可以随意组合，易于开发成轻便短小型照明产品，便于安装到各种形状的光生物反应器中。典型的LED的光谱范围都比较窄，因此，LED光源可以随意进行多样化的搭配组合。

2 异养培养

微藻异养培养是指在黑暗条件下微藻利用外加的碳源进行培养。该技术可以克服跑道式开放塘养殖和封闭式光生物反应器培养的缺点，具有生长更快、有利于纯种培养、产量高、便于自动化控制等优点。因此，近年来微藻异养培养技术成为研究热

点。据报道，已有近百种微藻可以进行异养生长^[27-28]。吴庆余教授等^[1,29-30]异养培养原始小球藻 (*Chlorella protothecoides*) 以生产油脂，外加的碳源是葡萄糖。异养培养的原始小球藻 (*Chlorella protothecoides*) 油脂含量可高达细胞干重的 55.20%，大约是自养细胞油脂含量 (14.57%) 的 4 倍^[29]。缪晓玲等^[31]利用异养的原始小球藻中获得的油脂，经酯交换反应生产生物柴油，其特性与传统柴油相似。目前，可用于微藻异养培养的碳源主要有糖类 (例如葡萄糖)、醋酸盐以及有机酸等。尹建云等^[32]首先用淀粉酶和糖化酶对玉米淀粉进行酶解，然后利用酶解产生的糖作为碳源，对普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 进行异养培养。DE SWAAF 等^[33]进行寇氏隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 的异养培养时，分别添加葡萄糖和醋酸作为碳源。结果表明：添加 50% (w/w) 醋酸时，多不饱和脂肪酸 DHA 含量为 $38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ，远高于添加 50% (w/v) 葡萄糖时的 DHA 产量，为 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

近期，研究人员对微藻异养生长可利用的碳源种类进行了进一步的探索。SHEN 等^[34]在氮限制条件下以葡萄糖作为碳源对微藻 *Chlorella vulgaris* NIES-227 进行异养培养，获得了很高的 COD 转化率 (1 g 葡萄糖可产 0.88 g 油脂) 及很高的脂肪酸甲酯含量 (89%)。HENA 等^[35]使用三阶段培养过程对一株高产油微藻 *Chlorella sorokiniana* DS6 在奶牛场废水中进行异养培养，用于生产生物柴油。LEITE 等^[36]对 10 株微藻进行了筛选，发现部分藻株可在含甘油或者木糖的培养基中生长，在含木糖培养基中异养生长时，其生长速率为自养条件下的 2.8 倍，且油脂产量也明显高于自养条件。木糖是造纸厂废水的主要碳源，这表明这些微藻有可能用于处理造纸厂废水同时积累油脂。

综上所述，研究人员已经对更广范围、更廉价的用于微藻异养培养的碳源进行了探索，这有利于将来降低微藻生物柴油的生产成本。

3 兼养培养

除了自养培养和异养培养，近年来兼养培养逐渐引起研究人员的关注。当对特定种类微藻同时提供 CO₂ 和有机碳源时，微藻可进行兼养生长。味精厂产生的废水具有高 COD、高 NH₃-N 及高硫酸盐等特点，直接排放会对环境造成严重污染。山东大学的纪雁^[37]利用味精废水培养普通小球藻进行兼养

生长,考察了营养物质浓度及光照强度等因素对普通小球藻生长速率及生物质组成的影响,既可以降低微藻生产成本,又可以解决有机废水造成环境污染的问题。内蒙古科技大学的廖利民^[38]研究了城市生活废水灭菌、营养盐补加对富油栅藻 XJ002 生长和油脂积累的影响。结果表明: XJ002 能够在未灭菌的城市生活废水中生长。暨南大学的沈丹丹^[39]研究了富含油脂的尖状栅藻(*Scenedesmus acuminatus*)和富含淀粉的标志链带藻(*Desmodesmus insignis*) 在奶牛场废水中的生长速度及油脂和淀粉的积累情况。中国海洋大学的吕素娟^[40]研究了二形栅藻(*Scenedesmus dimorphus*)、绿拟球藻(*Nannochloropsis sp.*)及栅藻(*Scenedesmus sp.*) 在城市生活废水中的培养情况,进一步考察了在废水中添加不同营养物质对高产油二形栅藻生长、生物量及油脂含量的影响。中国科学院广州能源研究所的陆伟东等^[41]利用奶牛场废水培养 *Chlorella sp.* 进行废水中 N 元素和 P 元素的去除及生物柴油的生产。ABREU 等^[42]利用奶酪乳清作为碳源对 *Chlorella vulgaris* 进行兼养培养,发现其生长速度比光自养条件下高,且在兼养条件下可获得最高的淀粉产量。FAROOQ 等^[43]利用啤酒厂的废水对两株小球藻 *Chlorella sp.* 进行兼养培养获得了较高的油脂产量。

近期,人们对兼养可使用的微藻种类及碳源进行了更多的探索。DOS SANTOS 等^[44]对甘蔗渣水解

液添加到 *Spirulina maxima* 的生长培养基中利用的可行性进行了观察,结果表明 *Spirulina maxima* 在自养(光照,培养基中没有添加甘蔗渣水解液)、异养(黑暗,培养基中添加了甘蔗渣水解液)及兼养(光照,培养基中添加了甘蔗渣水解液)三种条件下均可以生长。MIRZAI 等^[45]观察了 *Chlorella vulgaris* 在自养、异养及兼养三种条件下的生长和油脂积累情况,实验中分别使用廉价的废糖蜜和玉米浆作为碳源和氮源。在兼养实验中,获得了最高的生物量 2.62 g/L 和油脂产量 0.86 g/L,分别比自养高 140%和 170%,分别比异养高 300%和 1 200%。WANG 等^[46]利用高 COD 含量和高氨基氮浓度的养猪场废水来培养富含糖类的微藻 *Chlorella vulgaris* JSC-6。结果表明在兼养和异养实验中根据废水的不同稀释程度,60%~70% 的 COD 和 40%~90%的氨基氮可被去除。用 5 倍稀释的废水进行兼养时,可以获得最高生物量 3.96 g/L,糖类含量高达 58%。LIN 等^[47]观察了微藻 *Chlorella sp.* Y8-1 在自养、异养(蔗糖作为碳源)及兼养三种条件下的油脂含量,发现在兼养条件下油脂含量(35.5%)和油脂产量($0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)均为最高。

综上,由于微藻的兼养培养充分利用了自养培养和异养培养的优点,因此多数情况下,兼养培养所获得的生物量要高于自养和异养培养,表明对于可兼养的微藻而言,兼养是一种更有潜力的培养方式。

表 1 三种不同培养方式的对比

Table 1 Comparison of three different cultivation methods

培养方式	碳源	生物量	反应器	存在问题
光能自养培养	二氧化碳	低	封闭式光生物反应器或开放塘	产量低
异养培养	有机碳源	高	发酵罐	底物成本高
兼养培养	二氧化碳和有机碳源	高	封闭式光生物反应器	底物成本高

4 微藻培养发展的限制因素及建议

自养培养发展的限制因素包括:(1)生物量过低,生物质能源产量的理论上限为 38 000 加仑·英亩·年,而由于藻株、油脂含量、光照及光合效率等诸多因素的限制,目前实际的藻类生物质能源产量上限约为 4 350~5 700 加仑·英亩·年,藻类油脂产量还有很大的提升空间^[48]。(2)跑道式开放塘难以保持纯种培养。微藻的竞争者、捕食者和病原体非常多,目前对它们的了解却很少^[49-50],在微藻大规模

培养中这些生物会导致生物量下降、藻种不存及培养系统崩溃等严重问题。限制其他生物的污染的措施包括:建立快速、自动的生化检测系统,对培养体系进行实时的连续监测^[51-52];对生产藻种进行生理适应驯化和遗传改造,使其生命力旺盛并具有较强的竞争力。

异养培养发展的限制因素包括:①可异养的微藻种类有限;②异养时的生物量还有待进一步提高;③外加碳源价格较高,增加了异养的生产成本。

针对以上限制因素,本文提出如下建议:

(1) 利用基因工程育种结合细胞融合育种构建更高效的自养或异养微藻。(2) 设计构造更加合理的生物反应器, 提高生产效率。(3) 研究代谢产物积累特点, 结合数理统计方法设计优化培养条件, 提高代谢产物产量。在光自养过程中, 培养基的 pH 呈不断上升趋势, 通过补加 CO₂ 不仅可以维持培养体系 pH 的相对稳定, 还可以增强光合作用所需 CO₂ 的供应, 提高光合效率。(4) 挖掘替代碳源。使用工业废水、城市生活废水、秸秆、甘蔗渣及淀粉等价格低廉的碳源来替代葡萄糖。(5) 微藻的综合利用。目前, 微藻生物柴油的生产成本依然很高, 限制了它的商业化生产。把生产微藻生物柴油和利用微藻开发高附加值产品相结合, 实现微藻生物资源的综合利用, 才能有效降低生产成本, 实现微藻生物柴油的商业化生产。潜在的高附加值产物包括: 生物絮凝剂、类胡萝卜素、黄酮、生物聚合物、多不饱和脂肪酸、活性多糖等^[22,48,53]。此外, 还可以通过吸收发电厂排放的 CO₂ 废气、处理农业和工业废水、藻渣作为水产业的饵料等方式来降低生产成本。

参考文献:

- [1] 韩笑天, 郑立, 孙珊, 等. 海洋微藻生产生物柴油的应用前景[J]. 海洋科学, 2008, 32(8): 76-81.
- [2] 李晓倩. 蓝藻中乙醇代谢途径的构建[D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [3] 谭天伟. 固定化酶法生产生物柴油技术[J]. 中国高校科技与产业化, 2007(6): 77-80.
- [4] 黄小明, 谢文磊, 彭红. 生物柴油的现状和发展[J]. 精细石油化工, 2005(1): 59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1003-9384.2005.01.020.
- [5] 张呈平, 杨建明, 吕剑. 生物柴油的合成和使用研究进展[J]. 工业催化, 2005, 13(5): 9-13. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1143.2005.05.002.
- [6] GERPEN J V. Business management for biodiesel producers[R]. USA: U.S. Department of Energy, 2004.
- [7] YOO C, JUN S Y, LEE J Y, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide[J]. Bioresource technology, 2010, 101(1S): S71-S74. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.030.
- [8] GOUVEIA L, OLIVEIRA A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2009, 36(2): 269-274. DOI: 10.1007/s10295-008-0495-6.
- [9] TAKAGI M, KARSENKO, YOSHIDA T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2006, 101(3): 223-226. DOI: 10.1263/jbb.101.223.
- [10] MCLARNON-RICHES C J, ROLPH C E, GREENWAY D L A, et al. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids[J]. Phytochemistry, 1998, 49(5): 1241-1247. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00095-8.
- [11] MUJTABA G, CHOI W, LEE C G, et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions[J]. Bioresource technology, 2012, 123: 279-283. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.057.
- [12] PANCHA I, CHOKSHI K, GEORGE B, et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077[J]. Bioresource technology, 2014, 156: 146-154. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.025.
- [13] RIOS L F, KLEIN B C, LUZ JR L F, et al. Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp.[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2015, 175(1): 469-476. DOI: 10.1007/s12010-014-1283-6.
- [14] LIU T T, LI Y Q, LIU F, et al. The enhanced lipid accumulation in oleaginous microalga by the potential continuous nitrogen-limitation (CNL) strategy[J]. Bioresource technology, 2016, 203: 150-159. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.021.
- [15] LI Y Q, HAN F X, XU H, et al. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P)[J]. Bioresource technology, 2014, 174: 24-32. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.142.
- [16] MOELLERING E R, BENNING C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Eukaryotic cell, 2010, 9(1): 97-106. DOI: 10.1128/EC.00203-09.
- [17] XIAO Y, ZHANG J T, CUI J T, et al. Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress[J]. Bioresource technology, 2013, 130: 731-738. DOI:10.1016/j.biortech.2012.11.116.
- [18] JIA J, HAN D X, GERKEN H G, et al. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions[J]. Algal research, 2015, 7: 66-77. DOI: 10.1016/j.algal.2014.11.005.
- [19] GUARNIERI M T, NAG A, SMOLINSKI S L, et al. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga[J]. PLoS one, 2011, 6(10): e25851. DOI: 10.1371/journal.pone.0025851.
- [20] RISMANI-YAZDI H, HAZNEDAROGLU B Z, BIBBY K, et al. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels[J]. BMC genomics, 2011, 12(1): 148. DOI: 10.1186/1471-2164-12-148.
- [21] SHANG C H, BI G C, YUAN Z H, et al. Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*[J]. Algal research, 2016, 13: 318-326. DOI: 10.1016/j.algal.2015.12.012.
- [22] 袁振宏. 能源微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 335.
- [23] ISSARAPAYUP K, POWTONGSOOK S, PAVASANT P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of biotechnology, 2009, 142(3/4): 227-232. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.04.014.
- [24] 袁振宏, 杨康, 王忠铭, 等. 高密度培养微藻的太阳能分光光合生物反应器系统: 200910213692.7[P]. 2010-05-19.

- [25] 王忠铭, 霍书豪, 袁振宏, 等. 一种利用含油废气筛选与培养微藻的装置: 201120345436.6[P]. 2012-05-16.
- [26] 秦磊, 王忠铭, 舒庆, 等. 用于跑道池培养微藻的高压微喷补碳系统: 201210488980.5[P]. 中国专利: ZL201210488980.5, 2015-04-08.
- [27] GLADUE R M, MAXEY J E. Microalgal feeds for aquaculture[J]. Journal of applied phycology, 1994, 6(2): 131-141. DOI: 10.1007/BF02186067.
- [28] 马志珍. 微藻的异养培养技术及应用[J]. 国外水产, 1995(4): 3-9.
- [29] MIAO X L, WU Q Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil[J]. Bioresource technology, 2006, 97(6): 841-846. DOI: doi:10.1016/j.biortech.2005.04.008.
- [30] XIONG W, LI X F, XIANG P Y, et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2008, 78(1): 29-36. DOI: 10.1007/s00253-007-1285-1.
- [31] 缪晓玲, 吴庆余. 微藻油脂制备生物柴油的研究[J]. 太阳能学报, 2007, 28(2): 219-222. DOI: 10.3321/j.issn:0254-0096.2007.02.021.
- [32] 尹建云, 孟海华, 张学松, 等. 酶解糖异养培养微藻发酵条件的优化及生产试验[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 55-57, 61. DOI: 10.3321/j.issn:0253-990X.2006.05.014.
- [33] DE SWAAF M E, SIJTSMA L, PRONK J T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*[J]. Biotechnology and bioengineering, 2003, 81(6): 666-672. DOI: 10.1002/bit.10513.
- [34] SHEN X F, CHU F F, LAM P K, et al. Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation[J]. Water research, 2015, 81: 294-300. DOI: 10.1016/j.watres.2015.06.003.
- [35] HENA S, FATIHAH N, TABASSUM S, et al. Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement[J]. Water research, 2015, 80: 346-356. DOI: 10.1016/j.watres.2015.05.001.
- [36] LEITE G B, PARANJAPPE K, ABDELAZIZ A E M, et al. Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae[J]. Bioresource technology, 2015, 184: 123-130. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.117.
- [37] 纪雁. 利用味精废水培养普通小球藻以及养藻废水的生物强化处理[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [38] 廖利民. 基于微藻培养技术的废水资源化利用研究[D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2015.
- [39] 沈丹丹. 富油及富淀粉微藻培养与奶牛场废水处理相结合的效果研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [40] 吕素娟. 城市生活废水用于培养产油微藻[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [41] LU W D, WANG Z M, WANG X W, et al. Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures[J]. Bioresource technology, 2015, 192: 382-388. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.05.094.
- [42] ABREU A P, FERNANDES B, VICENTE A A, et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source[J]. Bioresource technology, 2012, 118: 61-66. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.055.
- [43] FAROOQ W, LEE Y C, RYU B G, et al. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity[J]. Bioresource technology, 2013, 132: 230-238. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.034.
- [44] DOS SANTOS R R, ARAÚJO O Q F A, DE MEDEIROS J L, et al. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse[J]. Bioresource technology, 2016, 204: 38-48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.077.
- [45] MIRZAIIE M A M, KALBASI M, MOUSAVI S M, et al. Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium[J]. Preparative biochemistry and biotechnology, 2016, 46(2): 150-156. DOI: 10.1080/10826068.2014.995812.
- [46] WANG Y, GUO W Q, YEN H W, et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production[J]. Bioresource technology, 2015, 198: 619-625. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.067.
- [47] LIN T S, WU J Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition[J]. Bioresource technology, 2015, 184: 100-107. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.005.
- [48] 美国能源部生物质项目署. 藻类生物质能源-基本原理、关键技术与发展路线图[M]. 胡洪营, 李鑫, 于茵, 等译. 北京: 科学出版社, 2011: 136.
- [49] BRUSSAARD C P D. Viral control of phytoplankton populations-a review[J]. The journal of eukaryotic microbiology, 2004, 51(2): 125-138. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2004.tb00537.x.
- [50] CHENG S H, AOKI S, MAEDA M, et al. Competition between the rotifer *Brachionus rotundiformis* and the ciliate *Euplotes vannus* fed on two different algae[J]. Aquaculture, 2004, 241(1/4): 331-343. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.08.006.
- [51] HOFFMAN Y, AFLALO C, ZARKA A, et al. Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum *Blastocladiomycota*), parasitic on the green alga *Haematococcus*[J]. Mycological research, 2008, 112(1): 70-81. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.09.002.
- [52] RITTMANN B E, KRAJMALNIK-BROWN R, HALDEN R U. Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy[J]. Nature reviews microbiology, 2008, 6(8): 604-612. DOI: 10.1038/nrmicro1939.
- [53] 袁振宏, 谭天伟, 雷廷宙, 等. 生物质能高效利用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 493-503.

作者简介:

尚常花(1980-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事微藻分子生物学研究。

谢君(1965-), 男, 博士, 教授, 华南农业大学新能源与新材料研究所所长, 主要从事能源植物及其生化转化研究。