

# 产油脂微藻的分离、鉴定及筛选

涂泽敏, 吴芳燕, 罗剑飞, 林炜铁

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 微藻油脂是生产生物柴油的重要原料, 同时也是生产不饱和脂肪酸的原料来源之一。本文以广州市华南理工大学校内东湖为采样点, 筛选鉴定湖中存在的微藻并研究其生长和油脂积累特性, 旨在筛选出水体中可能存在的富油微藻以便后续研究分析。研究共筛选出 6 株绿藻, 18S rDNA 鉴定显示 6 株绿藻中 DH1、DH2、DH6 均属于小球藻属, DH3、DH4、DH5 均属于栅藻属, 后分析构建了 6 株微藻进化发育树。通过藻细胞胞内油脂含量测定, 表明 DH1、DH2 与 DH6 均能较好地积累油脂, 尤其是 DH2 与 DH6 两株微藻。培养 25 d 发现其最大生物量(细胞数)分别达到  $2.14 \times 10^7$  个/mL 和  $2.74 \times 10^7$  个/mL, 油脂产量分别达到 103.89 mg/L 和 131.69 mg/L, 藻细胞油脂百分含量均超过 30%, 表明该两株微藻是潜在的较为理想的产油微藻, 可作为生物柴油制备的备用藻种资源。

**关键词:** 微藻; 分离筛选; 鉴定; 产油

文章编号: 1673-9078(2018)12-181-186

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.027

## Isolation, Identification and Screening of Oleaginous Microalgae

TU Ze-min, WU Fang-yan, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie

(School of Biology and Biological Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Microalgae oil is an important raw material for biodiesel production, and also one of the raw materials for the production of unsaturated fatty acids. In order to explore the potential of the oleaginous microalgae for future research and applications, we collected water samples from the East Lake of the South China University of Technology in Guangzhou and studied the growth and oil accumulation characteristics of microalgae. A total of six green algae were obtained. The identification of 18S rDNA suggested that microalgae DH1, DH2 and DH6 belong to the genus *Chlorella*, while strains DH3, DH4 and DH5 belong to the genus *Scenedesmus*. After analysis, the phylogenetic tree of six microalgal strains was constructed. The determination of intracellular oil content revealed that microalgae DH1, DH2 and DH6, especially DH2 and DH6 could accumulate oil very well. After 25 days of cultivation, the maximum biomass (cell number) of DH2 and DH6 reached  $2.14 \times 10^7$ /mL and  $2.74 \times 10^7$ /mL, respectively, and the oil yield reached 103.89 mg/L and 131.69 mg/L, respectively, as well as the total lipid contents were all both over 30%. These results suggest that microalgal strains DH2 and DH6 are potentially the ideal oleaginous microalgae which can be used for biodiesel production.

**Key words:** microalgae; isolation and screening; identification; oil-producing

生物质能是可再生能源的重要组成部分。随着世界经济的快速发展, 能源紧缺问题和环境污染问题日益严峻, 研究生物质能源开发利用可以缓解环境压力, 对解决能源、生态环境问题将起到十分积极有效的作用<sup>[1]</sup>。微藻是制备生物柴油的理想原料, 具有生长迅速、能够实现大规模养殖的优点<sup>[2]</sup>。伴随着燃料乙醇和生物柴油等第一代生物质能被不断消耗利用, 以及以麦秆等农林废弃物为主要原料的第二代生物燃料面临开发技术成本较高等问题, 以微藻为原料的第三代

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 菌藻共培养促微藻利用低值生物质产油脂的机制(D2154690); 中央高校基本科研业务费(N02015ZM171)

作者简介: 涂泽敏(1991-), 男, 在读硕士, 研究方向: 微生物能源

通讯作者: 林炜铁(1964-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 微生物生态学、发酵工程

生物质能将是更加有效的理性选择, 也是生物燃料未来必然的发展方向<sup>[3]</sup>。

微藻细胞中含有丰富的蛋白质、维生素和矿物质等, 其细胞一些独特的初级或次级代谢产物是生产药品、精细化学品和新型燃料的潜在资源<sup>[4]</sup>。某些微藻中富含的多不饱和脂肪酸(PUFA)是合成机体内多种功能物质的前体, 如微拟球藻中的 EPA 具有降血脂、降血压、促进脂肪代谢等作用, 可用于防治心血管疾病, 对人体健康具有重要的作用<sup>[5-7]</sup>。然而由于微藻培养及其在制备生物柴油的过程中存在着资源消耗高、回报低, 单一培养容易被害虫和病原体入侵等问题, 这些都大大限制了微藻生物燃料的商业化应用。当前能源微藻想要实现规模化培养, 总的来说主要面临着生物质资源供应不足和生产成本过高的困难, 尤其是高成本问题, 严重制约着其大规模开发应用<sup>[8]</sup>。因此

研究提高微藻产油能力,提高光生物反应器效率,通过基因工程改造微藻提高产油能力等仍然是研究者们努力的方向<sup>[9,10]</sup>。

本研究从广州东湖自然水体中筛选鉴定出一些微藻,并研究其生长及油脂积累特性,期望筛选出油脂积累较高的藻类以便后续进一步研究,同时也为该水域是否潜在富油微藻提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

主要试剂与仪器:二甲基亚砜(DMSO)、尼罗红溶液(2 g/L 尼罗红母液,稀释 100 倍使用)、DL2000Marker, 购于 Zomanbio 公司;植物基因组提取试剂盒, TAKARA; LRH-150 生化培养箱、Infinite® 200 多功能酶标仪、Eppendorf 5804R 冷冻离心机。

样本采集:含藻种的样本采自广州华南理工大学校内东湖,共设置 2 个采集点,采集水样用采样瓶装好,分离纯化在实验室中进行。

培养基:培养分离均采用 BG-11 培养基,其中分离在 BG-11 固体培养基中进行,分离后纯培养及后续培养在液体 BG-11 中进行。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 藻株富集与分离纯化

分别采集东湖两侧表面、底部水样各一份,将采集水样在布氏漏斗中用中速定性滤纸进行抽滤,然后将表层滤液及底层滤液分别以 7%和 5%接种量接种于 BG11 培养基中。一周后将培养基中的藻液再次转接至 BG11 培养基中培养。

取少量梯度稀释藻液接种于 BG11 固体培养基中划线培养,待平板中长出不同形态单菌落后将分别接种于新的固体平板中培养,直至平板中长出单一稳定的菌落,后挑取单菌落接种于液体培养基中培养用于后续实验。

#### 1.2.2 藻株显微观察

取纯培养的藻液 20 μL 置于无菌载玻片上,用结晶紫染色固定后在光学显微镜下观察微藻形态特征。参考《中国淡水藻类-系统、分类及生态》对微藻进行初步分类鉴定。

#### 1.2.3 藻株 18S rDNA 测序与进化树构建

18S rDNA 基因提取与测序:离心收集对数期藻细胞,用植物基因组试剂盒提取基因组总 DNA,电泳跑胶验证后进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL)为:基因组 DNA 1 μL,上下游引物各 0.5 μL, 2×Taq

MasterMix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 保留 1 min, 程序共设置 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

用于扩增 18S rDNA 的引物序列为:18s-F: 5'-GTA GTCATAATGCTTGCTCTC-3'; 18s-R: 5'-TCCGCAGGTT CACCTACGGA-3'。PCR 产物测序由广州艾基生物技术有限公司完成。

藻株进化树的构建:将测序序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析,下载相关序列,使用 MEGA7.0 软件,采用邻接法构建藻株进化树。

#### 1.2.4 藻株生物量的测定

培养过程中生物量变化情况以叶绿素含量及光密度-干重曲线来反应。培养条件为温度(30 °C),光照强度(~4000 lux),光照周期(12 h:12 h)。培养过程中,小球藻采用细胞计数法与叶绿素含量测定来衡量生物量积累情况,栅藻则通过叶绿素含量测定来衡量。

叶绿素含量测定:取 1 mL 藻液,12000 r/min 离心弃上清,加入 200 μL 蒸馏水混匀,再加入 1800 μL 95%无水乙醇,混匀后 75 °C 水浴 5 min,冷却后在波长 649 nm、665 nm、750 nm 处测量吸光度。叶绿素含量计算公式如下:

$$\text{叶绿素a和b} = 5.24 \times (A_{664} - A_{750}) + 22.24 \times (A_{649} - A_{750})$$

OD-干重关系:取不同浓度的藻液,测定其在 680 nm 处的吸光度值,然后取 10 mL 藻液分次置于 2 mL 已烘干至恒重的 EP 管中离心,后置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重,转移至干燥器内冷却,准确称量记录重量。以波长 680 nm 处测得 OD 值为横坐标,测量得到的细胞干重为纵坐标建立 OD<sub>680</sub>-细胞干重关系,得到 6 株藻回归方程如表 1:

表 1 微藻 OD<sub>680</sub>-细胞干重相关性方程

Table 1 Correlation equation between OD<sub>680</sub> and dry weight of

algae		
藻株	线性方程	R <sup>2</sup>
DH1	y=0.2781x+0.0019	0.9921
DH2	y=0.3543x-0.0018	0.9936
DH3	y=0.4671x-0.0043	0.9961
DH4	y=0.3578x-0.0130	0.9937
DH5	y=0.7213x+0.0056	0.9986
DH6	y=0.4745x-0.0042	0.9991

#### 1.2.5 微藻油脂含量的测定

油脂测量标准曲线的建立:采用尼罗红荧光染色法<sup>[11]</sup>,以三油精为标准品,以三油精含量为纵坐标,平均检测荧光值为横坐标建立三油精-荧光值标准曲线如图 1。该图呈较好的线性关系,表明可以通测量

尼罗红染色荧光值来间接测定藻细胞胞内中性油脂含量。

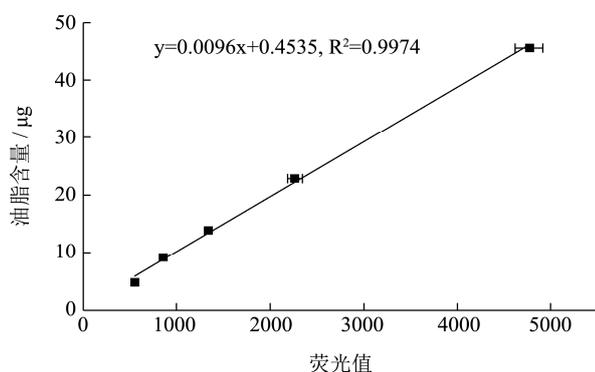


图1 三油精含量-荧光值标准曲线

Fig.1 The standard curve between triolein content and fluorescence value

微藻油脂含量测定：取适量藻液稀释，调节使体系 OD<sub>680</sub>=0.1。然后取 1.5 mL 稀释藻液，加入 480 μL DMSO, 20 μL 150 μg/mL 尼罗红染液，混匀后于 45 °C 水浴 3 min，以 480 nm 为激发波长，580 nm 为吸收波长测定荧光值。由标准曲线计算得到油脂含量。油脂百分比及油脂产量计算公式如下：

油脂百分比(%)=油脂含量(μg/mL)/藻细胞干重(mg/L)×100%

油脂产量(mg/L)=藻细胞干重(mg/L)×油脂百分比

### 1.2.6 数据统计分析

标准曲线制作，细胞生物量及油脂含量测定均进行三次平行重复，数据汇总后以 SPASS 22.0 (IBM Co. Ltd) 软件进行相关性分析，后利用 Origin Pro 2016 对数据进行整理作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微藻的分类鉴定

光学显微镜观察：光学显微镜下观察藻细胞形态，结合参考《中国淡水藻类-系统、分类及生态》对微藻进行初步分类鉴定。显微观察下观察到藻株 DH1、DH2、DH6 呈绿色球状，DH3、DH4、DH5 则为椭圆状，且均不同程度上伴有丛生现象，由图2 可看到DH3 明显伴有对生现象。

分子鉴定：提取藻株基因组 DNA，利用特异性引物进行 PCR 扩增得到微藻 18S rDNA 片段，由图 3 可得，该片段大小约为 1800 bp。

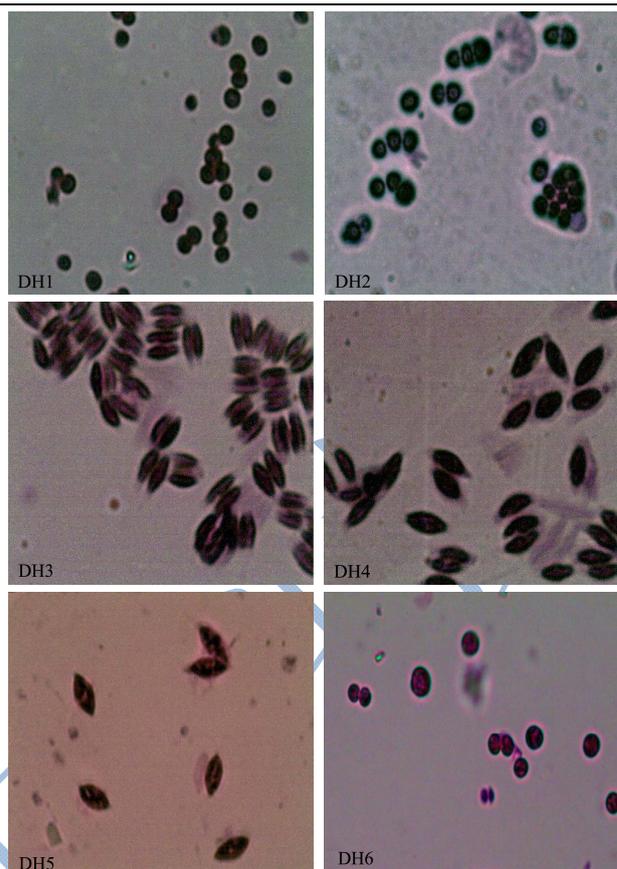


图2 光学显微镜下微藻形态特征(x100)

Fig.2 Morphology of six algae in optical microscope (x100)

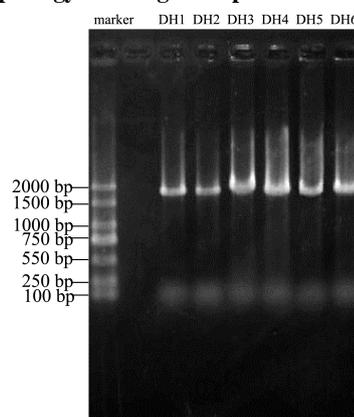


图3 PCR 扩增微藻 18S rDNA 序列

Fig.3 Amplification of 18s rDNA sequence from microalgae by PCR

对 PCR 产物测序，并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析，进一步构建系统发育树如图 4。结果表明 DH1、DH2、DH6 与 *Chlorella* sp. 18S rDNA 同源性达到 99%，DH3、DH4、DH5 与栅藻属亲缘关系最近，其与多株栅藻的 18S rDNA 的序列同源性达到 99%，确定其都为栅藻属。

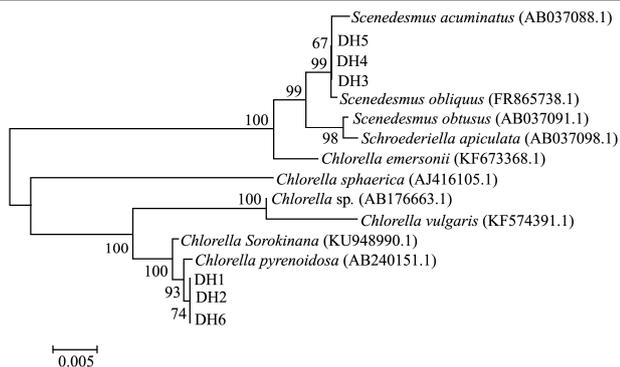


图4 藻株 18S rDNA 序列系统发育树

Fig.4 18S rDNA sequence phylogenetic tree of algae

张翼等从青岛海水和武汉南湖水中共筛选分离出 11 株小球藻和 1 株胶网藻<sup>[12]</sup>, 黄秋婷等从吉林工学院荷花池中筛选分离出 4 株栅藻和 1 株小球藻<sup>[13]</sup>。本研究从华南理工大学校内东湖中筛选分离到 6 株微藻, 18S rDNA 鉴定结合采样点筛选分离结果表明这 6 株微藻分别属于小球藻属与栅藻, 其中 DH1、DH6 和 DH3 分别筛自采样点 1 表层水样和底层水样, DH4 和 DH2、DH5 分别筛自采样点 2 表层和底层水样, 不同取样点的筛选结果差异可能与不同藻株的生长习性有关。

## 2.2 微藻生长及油脂积累特性研究

### 2.2.1 微藻生物量的测定

生物量是衡量微藻产业化的重要条件之一。而叶绿素是海洋微藻光合作用的基础, 是描述海洋微藻将无机物质转变为有机物质能力的一个重要指标, 可以作为衡量生物量积累的参考<sup>[14]</sup>。6 株微藻的生长情况如图 5 所示。

从图中可知, 小球藻和栅藻都能很好地在 BG11 培养基中适应并快速生长, 在最初的 1~3 d 内没有明显的生长停滞现象, SPASS 统计学分析显示小球藻之间 (DH1、DH2、DH6)、栅藻之间 (DH3、DH4、DH5) 生物量差异显著 ( $p < 0.05$ )。三株小球藻细胞数基本在 12~15 d 达到最高, 之后开始出现下降, 其中 DH6 细胞浓度相对于 DH1 和 DH2 来说在培养 15 d 后达到最高, 为  $2.74 \times 10^7/\text{mL}$ , 之后出现明显下降。小球藻叶绿素含量均在培养至 15 d 后达到最高, 然后开始下降, 同样地, DH6 叶绿素含量 15 d 后达到最高, 为 10.97 mg/L。15 d 后细胞数与叶绿素含量均呈现下降, 此时微藻细胞逐渐进入衰亡期, 生长代谢缓慢。三株栅藻叶绿素含量在 18 d 后达到最高, 且叶绿素含量普遍高于小球藻, 最高的栅藻 DH5 可达 16.16 mg/L。

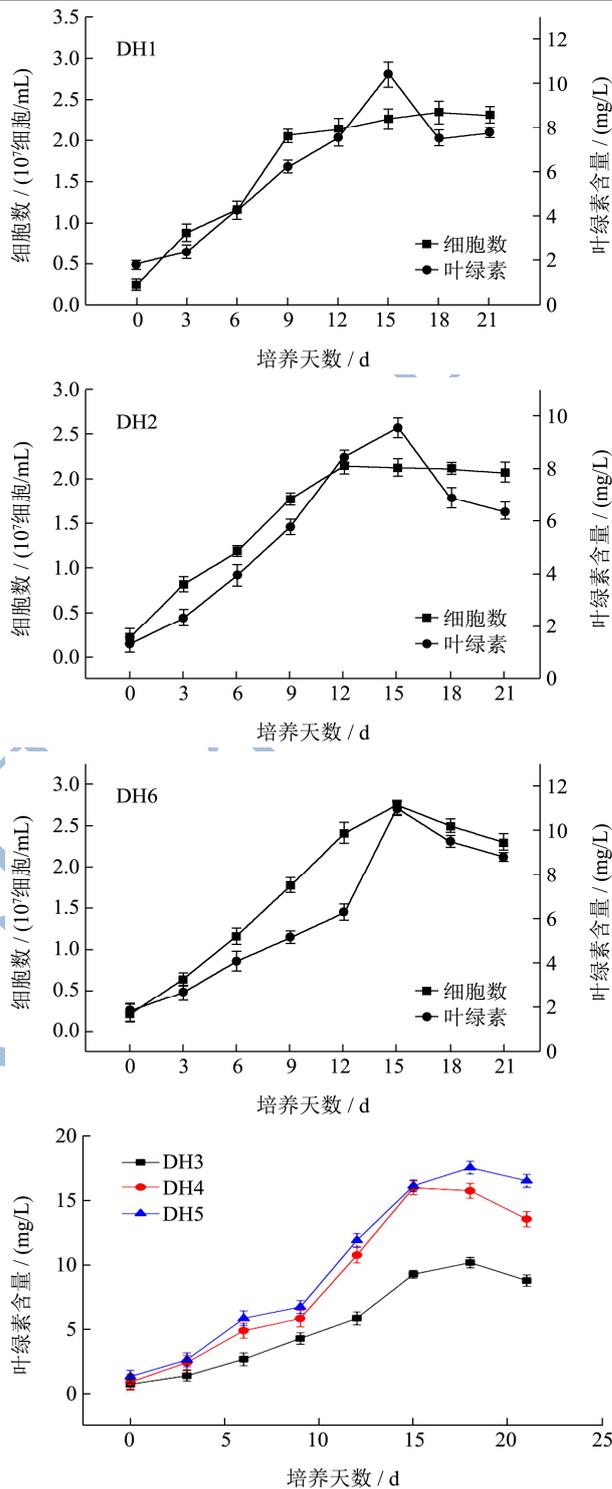


图5 藻细胞生物量积累曲线

Fig.5 Biomass curves of microalgae species

### 2.2.2 微藻油脂积累研究

油脂积累量是衡量筛选微藻能否大规模应用于微藻柴油开发的最重要指标, 本文通过对东湖水体中微藻的培养, 希望可以筛选出潜在的富油微藻, 以便进一步研究探讨。BG11 培养基中培养 25 d 后收集藻细

胞, 测量 OD<sub>680</sub> 及尼罗红染色荧光值得到胞内中性油脂含量, 整理如图 6。

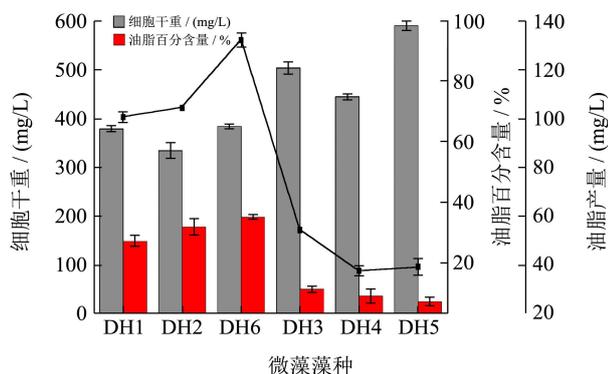


图 6 微藻油脂产量比较

Fig.6 Comparison of microalgae oil yields

由图 6 可知, 小球藻细胞干重普遍低于栅藻, 然而油脂产量及藻细胞油脂百分含量却比栅藻高, SPASS 统计学分析显示 6 株微藻细胞干重与油脂产量之间均差异显著( $p < 0.05$ ), 其中油脂产量及油脂百分比最高的为 DH6, 其产量达到 131.69 mg/L, 其次为 DH2, 油脂产量达到 103.89 mg/L, 且这两株藻细胞油脂百分比均在 30% 以上, 分别为 34.54% 和 31.33%。DH1 产量低于 DH2 和 DH6, 其油脂产量为 100.06 mg/L, 油脂百分比为 26.60%。栅藻中, DH3 油脂产量及油脂百分比均高于另外两株, 其数值分别为 58.73 mg/L 和 10.73%, 另外两株栅藻藻细胞油脂百分比均低于 10%, 最低的为 DH5, 仅为 6.56%。由此可知, 微藻生物量的积累与油脂积累并没有直接的关系, 生物量积累较高不一定积累大量油脂, 生物量低却反而可能较好地积累油脂。与其他一些研究工作相比, 本研究筛选出的 2 株小球藻产油能力处于中等水平, 如孙漫等从海南岛周围水域筛选出 105 株海洋微藻, 其中 33 株微藻油脂产量较高, 最高的藻株 XG01 油脂产量达到 221.9 mg/L, 油脂百分含量达到 38.93%<sup>[15]</sup>; 郭建东等人在淮坊不同生境中筛选出 19 株产油微藻, 其中有 8 株超过 30%, 两株超过 40%<sup>[16]</sup>; 王玉荣等人从东北地区筛选分离出 14 株产油微藻中有两株高于 40%<sup>[17,18]</sup>。本研究筛选得到的小球藻 DH2 及 DH6 在普通 BG11 培养基中可积累一定的油脂, 后期通过营养条件及培养条件的优化有可能进一步提高其油脂产量, 两者可以选作为微藻柴油研发的潜在藻种。

### 3 结论

3.1 作者通过对广州华南理工东湖自然水体的筛选, 共得到 6 株绿藻。6 株绿藻通过光学显微镜观察及基因检测得知它们分别为 3 株小球藻和 3 株栅藻。培养得知该 6 株藻种均能在 BG11 培养基中较好生长。

3.2 一般来说, 微藻生长与油脂积累存在矛盾关系, 油脂大量积累通常发生在细胞分裂受阻即藻细胞生长收到抑制时, 而生物量的积累通常与藻种、培养基营养条件、培养模式等有关<sup>[19-21]</sup>。以增加微藻生物量为基础提高藻细胞油脂含量, 即同时提高微藻生物量与油脂产量, 这是微藻生物柴油发展必须解决的问题<sup>[22]</sup>。分析本研究中微藻生物量及油脂积累情况可知, 有些微藻生物量虽高却不能很好地积累油脂, 如 DH5, 其叶绿素含量培养 21 d 后在所有微藻中最高, 达到 16.16 mg/L, 且 25 d 藻细胞干重也为最高, 达到 587.71 mg/L, 然而其油脂百分比仅为 6.56%; 有些藻种虽然生物量低, 却能有效地积累油脂, 如 DH2, 叶绿素含量最低, 仅为 9.54 mg/L, 油脂百分含量却能达到 31.33%。因此应该综合考虑生物量与油脂产量来权衡微藻的生长产油效率微藻产油能力与培养基营养条件和培养环境, 以及缺氮等有关, 不同条件下产油效果都会有所不同<sup>[23]</sup>。后续拟展开相关工作进一步研究提高其产油效率。该研究取样于华南理工校内东湖, 之前未有人做过该水体微藻相关研究, 因此本结果将为也为该水体微藻研究以及中国湖泊微藻研究提供一定参考和借鉴。

### 参考文献

- [1] Turner J A. A Realizable Renewable Energy Future [J]. Science, 1999, 285(5428): 687
- [2] 宋东辉, 侯李君, 施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 341-348  
SONG Dong-hui, HOU Li-jun, SHI Ding-ji. Exploitation and utilization of rich lipids-microalgae, as new lipids feedstock for biodiesel production-a review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(3): 341-348
- [3] Harwood J L, Guschina I A, Thomasset B, et al. The versatility of algae and their lipid metabolism [J]. Biochimie, 2009, 91(6): 679-684
- [4] Zittelli G C, Lavista F, Bastianini A, et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70(1-3): 299-312
- [5] Sukenik A, Carmeli Y, Berner T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. [J]. Journal of Phycology, 1989, 25(4): 686-692
- [6] Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp. with enriched carbon sources [J].

- Biotechnology Letters, 2003, 25(5): 421-425
- [7] Ning Z, Richmond A. Effect of light-path length in outdoor fiat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. [J]. Progress in Industrial Microbiology, 1999, 35(1-3): 351-356
- [8] Gómez C, Escudero R, Morales M M, et al. Use of secondary-treated wastewater for the production of *Muriellopsis* sp. [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(5): 2239-2249
- [9] 孔维宝,华绍烽,宋昊,等.利用微藻生产生物柴油的研究进展[J].中国油脂,2010,35(8):51-56  
KONG Wei-bao, HUA Shao-feng, SONG Hao. et al. Progress on biodiesel production using microalgae [J]. China oils and fats, 2010, 35(8): 51-56
- [10] 刘建国,庞通,李凌.微藻生物柴油研究现状与发展策略[J].海洋科学,2013,37(10):132-141  
LIU Jian-guo, PANG Tong, LI Ling. The research status, problems and developmental strategies in culture microalgal for biodiesel [J]. Marine Sciences, 2013, 37(10): 132-141
- [11] Eltgroth M L, Watwood R L, Wolfe G V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae is *Ochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi* [J]. Journal of Phycology, 2005, 41(5): 1000-1009
- [12] 张翼,廖浩,赵秀云.富油脂微藻的分离筛选与鉴定[J].湖北农业科学,2015,54(3):574-577  
ZHANG Yi, LIAO Hao, ZHAO Xiu-yun. Isolation, screening and identification of oil-rich microalgae [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(3): 574-577
- [13] 黄秋婷,史功斌,杨振.产油微藻的筛选及其产油能力的评价[J].吉林化工学院学报,2017,34(11):95-98  
HUANG Qiu-ting, SHI Gong-bing, YANG Zhen. Screening of oil-producing microalgae and evaluation of their oil production capacity [J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2017, 34(11): 95-98
- [14] Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L, et al. Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (*cyanobacteria*) [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2002, 40(6): 479-490
- [15] 孙漫,聂娟,袁维道,等.产油脂海洋微藻的筛选,鉴定及  $Fe^{3+}$  对其生长和油脂积累的影响[J].中国油脂,2012,37(12):70-73  
SUN Man, NIE Juan, YUAN Wei-dao, et al. Screening and identification of oil-rich marine microalgae and effects of  $Fe^{3+}$  on its growth and oil accumulation [J]. China Oils and Fats, 2012, 37(12): 70-73
- [16] 郭建东,杨宵宵,孙清荣,等.产油微藻的筛选及油脂含量测定[J].中国油脂,2014,6:68-71  
GUO Jian-dong, YANG Xiao-xiao, SUN Qing-rong, et al. Screening of oleaginous microalgae and determination of its oil content [J]. China Oils and Fats, 2014, 6: 68-71
- [17] 王玉荣,师文静,佟明友,等.产油微藻的分离筛选与鉴定[J].食品与生物技术学报,2016,35(1):77-81  
WANG Yu-rong, SHI Wen-jing, TONG Ming-you, et al. Isolation and characterization of oil-producing microalgae [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(1): 77-81
- [18] 师文静,廖莎,孙启梅,等.东北地区产油能源微藻的筛选和鉴定[J].生物技术通报,2015,31(8):140-146  
SHI Wen-jing, LIAO Sha, SUN Qi-mei, et al. Selection and identification of oil-producing energy microalgae in Northeast region [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 140-146
- [19] Courchesne N, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches [J]. Journal of Biotechnology, 2009, 142(1): 31-41
- [20] Jiang L, Luo S, Fan X, et al. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO [J]. Applied Energy, 2011, 88(10): 3336-3341
- [21] Kong Q X, Ling L, Martinez B, et al. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2010, 160(1): 9-18
- [22] Chen C Y, Kueiling Y, Aisyah R, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 71-81
- [23] Gao Y, Yang M, Wang C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae [J]. Bioresource Technology, 2013, 147(7): 484