

补充 CO₂ 提高胶球藻 C-169 生物量和脂肪酸产率的研究

魏东, 李露

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究在 Basal 和 BBM 培养基中补充 2% CO₂ 或空气 (0.04% CO₂) 光自养培养胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) C-169, 系统比较了细胞比生长速率、生物量干重、总脂肪酸含量和产率以及中性脂含量的差异。研究表明, 与空气培养相比, 在 Basal 和 BBM 培养基中补充 2% CO₂ 可分别显著提高细胞的比生长速率 2.6 倍和 2.3 倍。培养 13 d 后, Basal 培养基中补充 2% CO₂ 可获得最高生物量干重达 4.67 g/L, 显著高于所有其他组 ($p < 0.05$); 而 BBM 培养基中补充 2% CO₂ 可获得最高总脂肪酸含量达 37.53% 干重, 是通入空气时的 5 倍, 脂肪酸产率更是高达 77.49 mg/(L·d), 同时中性脂含量 (以荧光强度表示) 显著高于所有其他组 ($p < 0.05$)。这就说明在 Basal 培养基中补充 CO₂ 有利于细胞生物量的积累; 而在 BBM 培养基中补充 CO₂ 更有利于驱动细胞高产脂肪酸和中性脂, 其生物量是制备生物柴油的极好原料。

关键词: 胶球藻 C-169; CO₂; 生物量; 脂肪酸; 中性脂

文章编号: 1673-9078(2014)4-34-39

Enhanced Yield of Biomass and Fatty Acids from *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 by CO₂ Supplement

WEI Dong, LI Lu

(South China University of Technology, School of Light Industry and Food Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of 2% CO₂ supplement or air (contain 0.04% CO₂) on cell specific growth rate, biomass dry weight, content and yield of total fatty acids, neutral lipids content of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 grown autotrophically in Basal and BBM media were investigated in this study. Compared with the results from aeration with air, 2% CO₂ supplement significantly increased the cell specific growth rate of 2.6 times in Basal medium and 2.3 times in BBM medium, respectively. After cultured for 13 days, the maximal biomass concentration was obtained at 4.67 g/L by 2% CO₂ supplement in Basal medium, which was much higher than other groups ($p < 0.05$). The highest content of total fatty acids reached 37.53% (DW) by supplying 2% CO₂ in BBM medium, which was 5 times higher than that by inletting air. And the yield of total fatty acids was up to 77.49 mg/(L·d) while neutral lipids referred as fluorescence intensity was significantly higher than other groups ($p < 0.05$). These results indicated that 2% CO₂ supplement in Basal medium could promote cells to produce more biomass. In BBM medium, it could increase the yield of fatty acids and neutral lipids in the microalga, which was excellent raw material for biodiesel production.

Key words: *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; carbon dioxide; biomass; fatty acids; neutral lipids

随着能源短缺和环境污染问题的日益加剧, 寻找可替代化石燃料的可再生能源和环境友好型能源已成为世界各国普遍关注的问题。微藻因其光合作用效率高、生长周期短、环境适应性强、可用非农林业耕地

收稿日期: 2013-11-12

基金项目: 国家 973 项目 (2011CB200901); 国家自然科学基金项目 (31370383); 国家 863 计划项目 (2013AA065802); 国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目 (GHME2011SW04)

作者简介: 李露 (1988-), 女, 硕士生, 研究方向: 微生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 工业生物技术研究开发

和水源大规模培养而受到广泛重视。尤其是某些特殊种类的微藻, 油脂含量高、可实现大规模人工培养, 制备的藻基生物柴油具有无污染、高能量密度、燃烧性与普通柴油高度相似等特点, 成为可再生生物燃料的最佳选择之一^[1-2]。

CO₂ 作为微藻光合作用的碳源, 为酯类、多糖、蛋白质及核酸等生物分子提供碳骨架, 对藻细胞生长和油脂积累起着极其重要的调控作用。空气中 0.04% CO₂ 浓度对光自养能源微藻的生长是一个限制性因素, 适当提高培养环境中 CO₂ 浓度, 能显著提高微藻的生长速率、生物量、油脂含量和产率^[3-4], 同时也将利于环

境与能源的可持续发展。培养基为细胞生长提供必需营养元素, Basal 和 BBM 培养基营养成分相差较大, 前者营养物质丰富, 不同培养基类型对藻细胞的生长和油脂积累有着较大的影响^[5-6]。胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) C-169 是一种非运动型的单细胞绿藻, 1959 年从南极洲藻泥炭中首次分离出该藻株^[7], 属于绿藻门、胶球藻属, 直径约为 3~9 μm , 也是第一个完成基因组测序的极地真核藻种。因其细胞壁薄而易于酶解, 极大方便了藻油的提取, 具有很高的研究价值。2012 年美国能源部完成了该藻株的全基因组测序, 但目前其基础生物学性质还不够清楚。

本文以胶球藻 C-169 为对象, 系统研究光自养条件下在 Basal 和 BBM 两种培养基中补充 CO_2 对细胞比生长速率、生物量干重、脂肪酸和中性脂产生的作用, 评估 CO_2 补充对提高藻细胞生长速率和产油效率的效果, 以期能为能源微藻的基础生物学和产油机理研究提供基础数据和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) C-169 (NIES-2166) 原种, 购于日本 NIES 藻种库; 标准品十九碳饱和酸 (C19:0, 纯度>99%)、尼罗红 (Nile Red) 亲脂性荧光染料, 购于 Sigma 公司; 正己烷为色谱纯试剂、二甲基亚砜 (DMSO) 等其余试剂均为国产分析纯试剂; 6890N-5975 气质联用仪, 购自美国 Agilent 公司; Modulyod 型冷冻干燥机, 购自美国 Thermo 公司; GXZ 智能光照培养箱, 购自宁波东南仪器有限公司; CO_2 培养箱, 购自美国 Thermo 公司; Sunrise 酶联免疫检测仪, 购自奥地利 Tecan 公司; 微量 pH 计, 购自瑞士梅特勒-托利多公司; C6 Accuri 流式细胞仪, 购自美国 BD 公司。

1.2 培养基

采用优化的 Basal 培养基^[8]和 Bold's basal medium (BBM) 培养基^[9]进行比较研究。

1.3 培养条件

实验采用摇瓶培养, 在 250 mL 锥形瓶中以 10% (V/V) 接种量将预先培养的种子液接入 100 mL 培养基中, 使起始 OD_{690} 约为 0.15。分别置于光照培养箱和 CO_2 培养箱中连续光照培养, 前者无人工补充 CO_2 (空气中 CO_2 浓度为 0.04%, V/V), 后者培养箱 CO_2 浓度设置为 2%, 其余培养参数一致, 培养瓶随机放置, 培

养温度为 26.5 ± 1 $^\circ\text{C}$, 震荡速率为 230 r/min, 光照强度为 3700 ± 350 lux。

1.4 分析试与计算

1.4.1 比生长速率

每 24 h 取样一次, 3 个平行样, 使用酶联免疫检测仪在 690 nm 波长处测定胶球藻 C-169 的吸光值制作生长曲线。比生长速率 $\mu = (\ln \text{OD}_2 - \ln \text{OD}_1) / t$, 其中 OD_2 和 OD_1 分别是两次测量的 OD_{690} 值; t 为两次测量的时间间隔, 单位为 d。

1.4.2 生物量干重

收集培养结束 (13 d) 时的藻液, 在 8000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 用去离子水洗涤离心 3 次, 然后用冷冻干燥机真空冷冻干燥 36 h 制备干粉称重。

1.4.3 脂肪酸组成与含量

脂肪酸组成和含量分析采用 GC-MS 方法。脂肪酸甲酯化方法在 Bligh 和 Dyer^[10]的方法上进行了改进: 称取 20 mg 藻粉于螺口试管中, 加入 100 μL (浓度为 1 mg/mL) 的内标溶液 (C19:0 的二氯甲烷溶液)。用 N_2 吹干后加入 2 mL $\text{NaOH-CH}_3\text{OH}$ 溶液 (浓度为 0.5 mol/L), 置于 75 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中加热 15 min, 冷却至室温。再加入 2 mL $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ ($V/V=1:3$), 置于 75 $^\circ\text{C}$ 水浴中皂化 15 min, 冷却至室温后加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液和 2 mL 正己烷, 充分振荡, 3500 r/min 离心 5 min 分层。将上层正己烷相经 0.22 μm 有机系过滤器过滤到气质小瓶中。

脂肪酸分析在 Agilent 6890N GC-MS 上进行, 配备 5975 内置型质量探测器和高效毛细管柱 (DB-23, 30 mm \times 0.25 mm, 0.25 μm)。高纯氦气作为载气, 流速为 1 mL/min, 样品不分流, 进样量为 0.2 μL 。程序升温条件为: 初始柱温 130 $^\circ\text{C}$ 保持 2 min, 以 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升高到 230 $^\circ\text{C}$ 保持 3 min, 质谱的质量扫描范围为 33~400 amu。各峰型的鉴定采用 NIST05a 谱库自动检索。根据各脂肪酸相对于 C19:0 内标的峰面积, 计算各脂肪酸组分的绝对含量。

$$\text{脂肪酸}(\% \text{干重}) = \left[\frac{\text{FA}(\% \text{总脂肪酸})}{\text{C19:0}(\% \text{总脂肪酸})} \times 100(\mu\text{g}) \times 10^{-3} \right] / [\text{藻粉干重}(\text{mg}) \times 100\%]$$

1.4.4 叶绿素 a 和中性脂含量

采用流式细胞仪与尼罗红染料联用, 快速、定量测定细胞内中性脂含量 (相对荧光强度), 同时分析藻细胞体积、叶绿素荧光。Nile Red 染色方法参照 Chen 的方法并进行改进, 用 DMSO 使 Nile Red 更容易渗透到藻细胞中, 提高了检测结果的重复性^[11]。用蒸馏水将冻干藻粉重悬至浓度为 10^6 cells/mL, 在 EP 管中加入 800 μL 藻液、190 μL DMSO、10 μL 尼罗红溶液 (浓

度为 5 μg/mL), 使尼罗红终浓度为 0.05 μg/mL, 常温下避光染色 10 min 后, 用 BD C6 Accuri 流式细胞仪对染色样品进行分析。采用 488 nm 激发, 采集 FL2 通道 (575±40 nm) 黄色荧光, 荧光强度直接反映细胞内中性脂的含量; 采集 FL3 通道 (>670 nm) 红色荧光, 荧光强度与细胞内叶绿素 a 含量正相关。前向散射光 (FSC) 信号强度与细胞直径成正相关, 侧向散射光 (SSC) 强度则直接反应了细胞内颗粒结构的复杂程度。

1.4.5 数理统计方法

利用 Microsoft Office Excel 2007 进行数据处理和分析, 分别采用单因素方差分析和成对数据 t-检验来分析实验数据的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 两种培养基中补充 CO₂ 对胶球藻 C-169 生长的影响

在两种培养基中分别通入空气 (0.04% CO₂) 和 2% CO₂ 培养胶球藻 C-169, 其生长曲线和平均比生长速率见图 1。从图 1a 可见, 在培养最初的 2 d, 四组细胞生长状况无明显差别; 从第 3 d 开始, 补充 2% CO₂ 的两组藻细胞迅速进入对数期, 而 2% CO₂ 通入 Basal 培养基时培养 13 d 的胶球藻 C-169 能达到最高的细胞密度 (OD₆₉₀2.78), 是同样培养基但通空气的 5.6 倍; 通入空气培养的两组藻细胞始终处于缓慢生长状态。

从图 1b 可见, 最高平均比生长速率 (0.22 d⁻¹) 和最高生物量浓度 (4.67 g/L) 同时出现在 Basal 培养基中通入 2% CO₂ 培养 13 d 的情况下, 显著高于其他三组 (P<0.05)。说明 Basal 培养基中补充 2% CO₂ 更有利于胶球藻 C-169 生物量的积累, 生长速率也更高, 与 BBM 培养基中相比差异显著 (P<0.05), 而通入空气时两种培养基中细胞生长差异不显著 (P>0.05)。

研究还发现, 培养 13 d 后, Basal 培养基中通入 CO₂ 后的细胞形态微圆饱满, 生长旺盛且一直保持浓绿色; 而 BBM 培养基中藻细胞形态狭长瘦小, 通入 CO₂ 后细胞培养物由绿色转为黄色, 两者外观差异明显 (见图 2)。究其原因, 虽然 Basal 和 BBM 培养基是微藻常用的两种培养基, 但 Basal 培养基的氮源浓度是 BBM 的 4.2 倍, 高达 12.38 mmol/L; 磷源浓度 9.19 mmol/L, 是 BBM 的 21 倍, Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺ 等营养物质含量也远高于 BBM 培养基。因此, 在 CO₂ 驱动下, BBM 培养基中的细胞更易出现氮饥饿, 导致碳资源流向脂肪酸生成途径, 蛋白质合成减少, 油脂积累增加, 培养

物由绿色转为黄色。

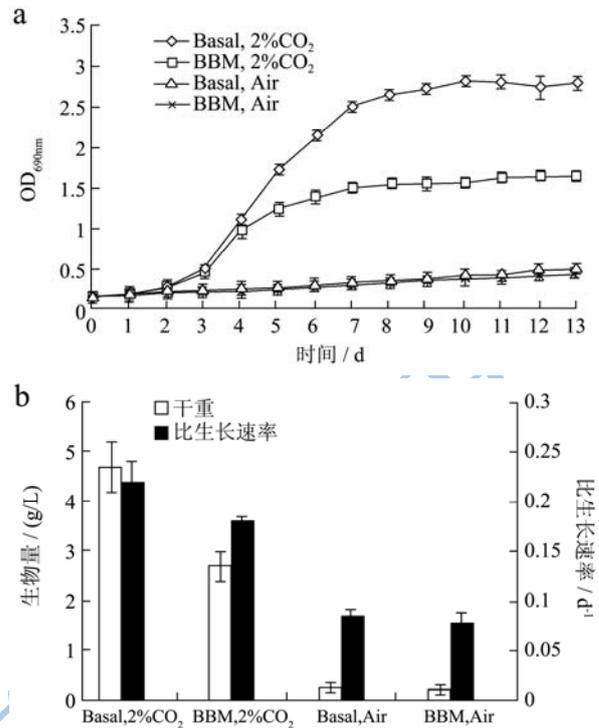


图 1 两种培养基中 CO₂ 补充和通入空气对胶球藻 C-169 生长的影响

Fig.1 Effect of CO₂ supplement or aeration with air on cell growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in two media

注: a: 对胶球藻 C-169 生长的影响, b: 对胶球藻 C-169 生物量干重的影响。

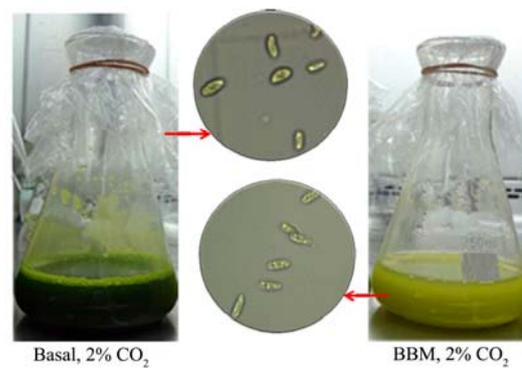


图 2 两种培养基中补充 2% CO₂ 和通入空气后胶球藻 C-169 培养物的外观差异

Fig.2 Observed difference of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 culture in two media by 2% CO₂ supplement or aeration with air

2.2 两种培养基中 CO₂ 补充对细胞生长过程 pH 的影响

两种培养基中 CO₂ 补充对胶球藻 C-169 生长过程 pH 的影响见图 3, 空气条件下两种培养基的 pH 值均

逐渐升高, 其中 Basal 培养基 pH 值升高缓慢, 在培养过程中一直处于酸性状态; 而 BBM 培养基则可能因培养过程中大量营养物质阴离子的吸收还原导致 pH 值迅速升高, 培养 13 d 后 pH 接近 9。补充 2% CO₂ 的两组藻细胞培养初期 pH 值波动较大, 藻细胞处于快速生长状态, 这是由于微藻培养过程中无机碳源始终处于 CO₂(aq)+H₂O⇌HCO₃⁻+H⁺⇌CO₃²⁻+2H⁺的动态平衡中, 藻细胞利用溶解的 CO₂ 进行光合作用, 进入对数期后光合作用急剧增强, 培养液中 pH 迅速升高, 稳定期后则因 CO₂ 的补充和藻细胞光合作用和呼吸作用逐渐相平衡, 导致 pH 值逐渐降低, 趋于稳定, 维持在 7.5~8.5 之间, 细胞进入生物量和油脂积累阶段。

2.3 两种培养基中 CO₂ 补充对胶球藻 C-169 脂肪酸产生的影响

两种培养基中 CO₂ 补充对胶球藻 C-169 脂肪酸产生的影响见表 1。由表 1 可见, 胶球藻的脂肪酸组成主要是十六碳和十八碳脂肪酸, CO₂ 补充促进了胶球藻产生大量的十八碳一烯酸, 含量可高达总脂肪酸含量的 56.90%。在补充 2% CO₂ 时, BBM 培养基中胶球藻 C-169 总脂肪酸含量占生物量干重的 37.53%, 总脂肪酸产率达 77.49 mg/(L·d), 显著高于 Basal 培养基, 极显著大于通入空气组的相应结果。未补充 CO₂ 的两组藻细胞总脂肪酸含量(仅占 6~8%干重)和产率均比较低。

表 1 两种培养基中 CO₂ 补充和通入空气对胶球藻 C-169 脂肪酸产生的影响

Table 1 Effect of CO₂ supplement or aeration with air on fatty acids production from *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in two media

脂肪酸相对含量/%	Basal, 2% O ₂	BBM, 2% CO ₂	Basal, Air	BBM, Air
16:0	16.62±1.02	8.27±0.36	14.39±1.01	14.6±0.69
16:1(Δ9)	0.40±0.01	0.13±0.01	-	-
16:2(Δ9, 12)	2.12±0.08	0.31±0.02	4.68±1.01	3.59±0.32
16:3(Δ9, 12, 15)	3.48±0.11	2.68±0.05	2.58±0.57	3.44±0.29
18:0	1.88±0.06	1.24±0.03	1.9±0.08	2.10±0.06
18:1(Δ9)	40.12±2.65	56.90±3.21	5.99±0.05	4.83±1.34
18:2(Δ9, 12)	17.85±1.26	13.52±1.21	17.65±0.77	15.70±0.73
18:3(Δ9, 12, 15)	11.27±0.88	10.81±0.83	26.27±1.24	25.80±1.12
20:0	0.15±0.02	0.18±0.03	-	-
20:1(Δ11)	0.71±0.05	-	-	-
总脂肪酸含量(干重)/%	20.12	37.53	6.59	7.47
总脂肪酸产率/[mg/(L·d)]	72.37	77.49	1.26	1.13

使用流式细胞仪 Accuri C6 分析四组藻细胞的尼罗红染色样品, 可得到 SSC~FSC 二维散点图和 FL2、FL3 单参数的柱形图。通过对散点图中部分细胞设“门”R1, 进行数据统计可得到相应通道的平均荧光强度。图 4a 是 FSC~SSC 通道信号强度的二维散点图, 通过

微藻通过光合作用可以固定水体中 CO₂ 和 HCO₃⁻ 两种形式的溶解无机碳, 经一系列代谢途径合成脂质, 提高培养环境中的 CO₂ 可以加速碳代谢同时也促进了氮代谢, 氮源供给不足导致蛋白质合成减少, 碳源流向脂质合成^[3]。BBM 培养基中氮源含量较低, 更易驱动胶球藻 C-169 高产脂肪酸, 尤其是脂肪酸组成中十八碳一烯酸。

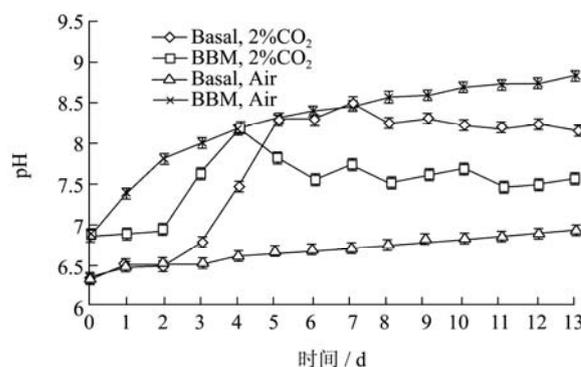


图 3 两种培养基中 CO₂ 补充和通入空气对胶球藻 C-169 生长过程中 pH 的影响

Fig.3 Effect of CO₂ supplement or aeration with air on pH in two media during cell growth of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169

2.4 荧光法评价细胞群体性质和中性脂相对含量

C6 软件分析得图 4b 中 FSC 通道和 SSC 通道平均荧光强度, 可以清晰比较四组藻细胞的形态信息。可以看出, 由于碳源充足, 补充 2% CO₂ 时细胞生长速度较快, 细胞大小即 FSC 前向散射光强度显著大于通入空气时的, 而细胞内颗粒结构的复杂程度即侧向散射光强度

则小于通入空气状态下,说明 2% CO₂ 可以促进明显促进胶球藻 C-169 的生长。

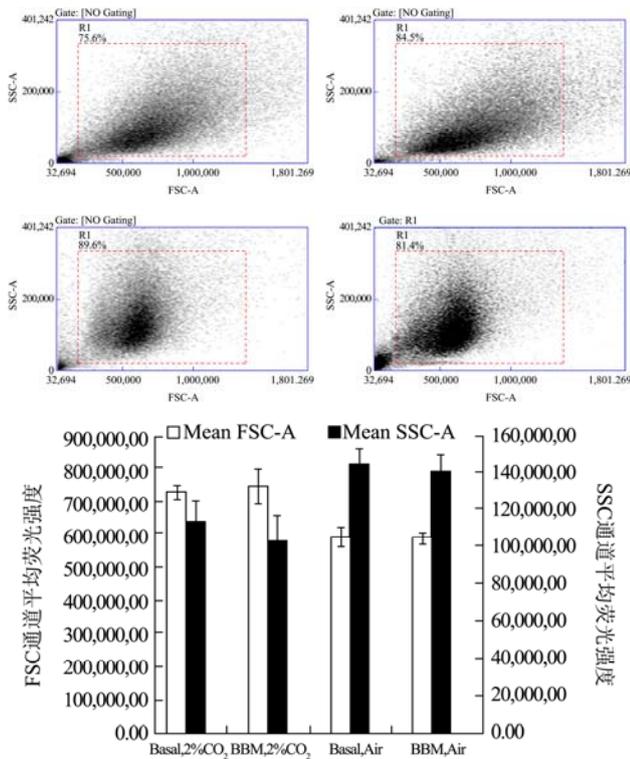


图4 两种培养基中 CO₂ 补充和通入空气对胶球藻 C-169 的细胞形态影响

Fig.4 Effect of CO₂ supplement or aeration with air on cell character of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in two media

注: a 是 FSC~SSC 通道信号强度的二维散点图, b 是 FSC 通道和 SSC 通道平均荧光强度。

对胶球藻进行 Nile Red 染色可比较不同条件藻细胞的中性脂含量。本研究采用流式细胞术与尼罗红染色联用,快速测定胶球藻 C-169 在不同条件下细胞群体性质和中性脂相对含量。从图 5 中可见,补充 2% CO₂ 到 BBM 培养基中,藻细胞中性脂荧光信号强度显著高于其他对照组且达到其他组的 6 倍以上。由此可见,通入 2% CO₂ 可以显著提高胶球藻 C-169 中性脂含量,而 BBM 培养基更有利于藻细胞中性脂的积累。从图 6 的 FL3 通道可以看出,补充 2% CO₂ 到 BBM 培养基中,胶球藻 FL3 通道的荧光强度最低,即叶绿素 a 含量显著低于其他组,说明 BBM 培养基中藻细胞更易出现氮饥饿,细胞颜色由绿变黄进入油脂积累阶段,这与图 5 中藻细胞中性脂含量的结果是一致的。

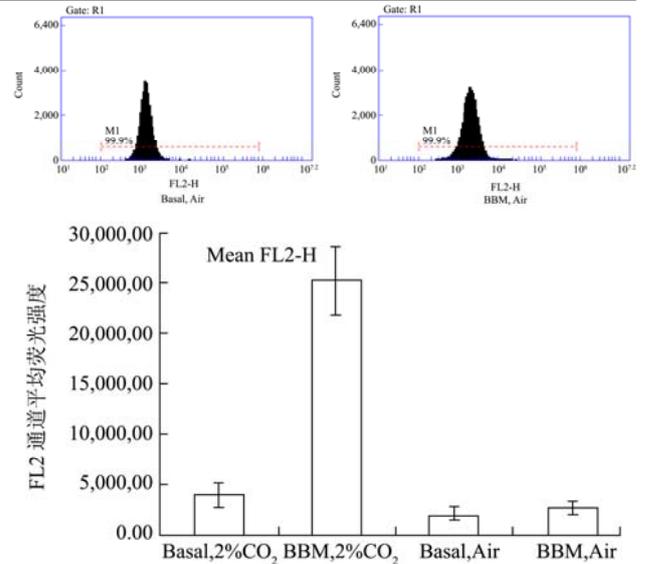
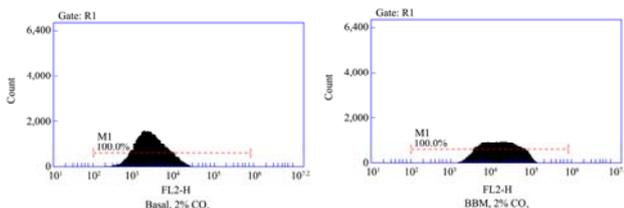


图5 两种培养基中 CO₂ 补充和通入空气对胶球藻 C-169 中性脂含量的影响

Fig.5 Effect of CO₂ supplement or aeration with air on natural lipid content of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in two media

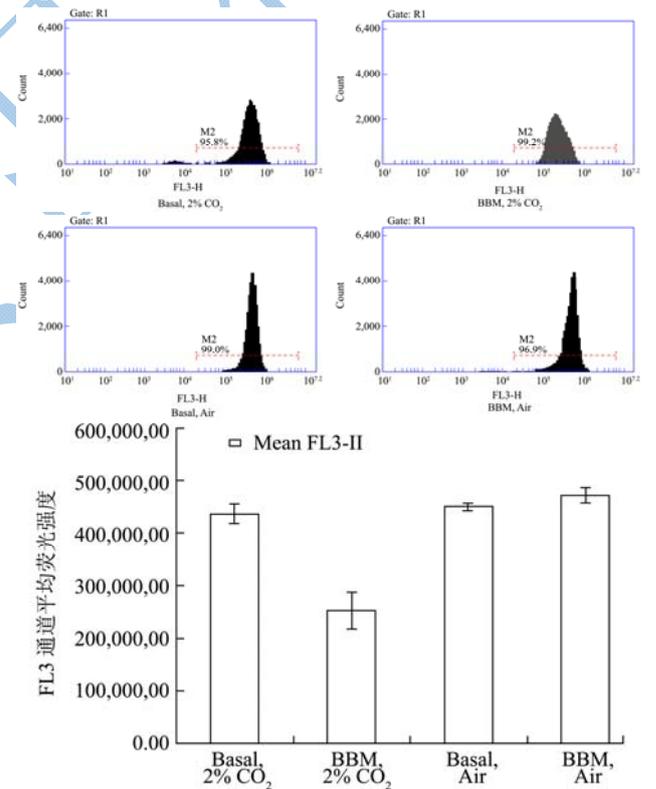


图6 两种培养基中 CO₂ 补充对胶球藻 C-169 叶绿素含量的影响

Fig.6 Effect of CO₂ supplement on and chlorophyll content of *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 in two media

有研究表明,胶球藻 C-169 在缺氮条件下的总脂肪酸含量可达富氮条件下总脂肪酸含量的 2 倍,缺氮培养可以显著提高胶球藻中十八碳一烯酸的含量及甘油三酯的含量^[12]。小球藻的研究结果表明,通入适量的 CO₂ 能显著提高藻细胞的总脂含量和产率^[13]。蛋白

核小球藻和斜生栅藻也有相似的研究结果,一定浓度的 CO₂ 胁迫可以提高其多不饱和脂肪酸的产量^[14]。这与本研究的结果相一致。

3 结论

本研究证实,提高培养环境 CO₂ 浓度可显著提高胶球藻 C-169 的生物量浓度、平均比生长速率、总脂肪酸含量和产率以及中性脂含量。同时还发现, Basal 培养基营养丰富,有利于胶球藻 C-169 的细胞生长和生物量积累,而 BBM 培养基含氮量低,补充 CO₂ 更易使藻细胞出现氮饥饿,有利于总脂肪酸和中性脂的积累。因此,可通过补充 CO₂ 和调整培养基类型实现生物量、总脂肪酸和中性脂含量的高产。

参考文献

- [1] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil [J]. *Bioresource technology*, 2006, 97(6): 841-846
- [2] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 621-639
- [3] Muradyan E A, Klyachko-Gurvich G L, Tsoglin L N, et al. Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2004, 51(1): 53-62
- [4] Lv J M, Cheng L H, Xu X H, et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6797-6804
- [5] 赵华,董晓宇,夏媛媛,等.氮源对小球藻光合作用和色素积累的影响[J].现代食品科技,2012,28(4):367-370
ZHAO H, DONG X Y, XIA Y Y, et al. Effects of nitrogen source on photosynthesis and pigment accumulation of *Chlorella* sp. TCCC45058 [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 04(28): 367-370
- [6] 杨艳婧,王冰芳,廖晓霞,等.木薯淀粉水解液对小球藻生物量和油脂含量的影响[J].现代食品科技,2009,25(11):1275-1278
YANG Y J, WANG B F, LIAO X X, et al. Effects of cassava starch hydrolysate on Cell growth and lipid accumulation of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009,25(11):1275-1278
- [7] Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, et al. The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation [J]. *Genome. Biol.*, 2012, 13: R39
- [8] Shi X M, Chen F, Yuan J P, et al. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(5): 445-450
- [9] Bold H C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydomas*, sp. Nov [J]. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1949: 101-108
- [10] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 1959, 37(8): 911-917
- [11] Chen W, Zhang C, Song L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 77(1): 41-47
- [12] Msanne J, Xu D, Konda A R, et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169 [J]. *Phytochemistry*, 2012, 75: 50-59
- [13] Widjaja A, Chien C C, Ju Y H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40(1): 13-20
- [14] Tang D, Han W, Li P, et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3071-3076