

研究报告
Research Report

微芒藻 *Micractinium* sp. 18A8 培养条件优化及碳源对含油量的影响

邓晓东¹ 蔡佳佳¹ 费小雯^{2*}

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口, 571101; 2 海南医学院理学院, 海口, 571101

* 通讯作者, feixw2000@hotmail.com

摘要 由海南分离得到一藻株经 18SrDNA 分子鉴定为微芒藻(*Micractinium* sp. 18A8)。将其培养在 BG11、SE、HSM 及其相应的 S、N、P 缺陷培养基上, 测定藻株的生长速率和油脂含量。结果显示 *Micractinium* sp. 18A8 在 -N、-P、-S 培养时含油量增加。其中, -N 或 -S 促进细胞油脂积累明显。但 -N、-P、-S 培养使微藻生长减速, 藻细胞中的糖、蛋白质含量减少, 光合效率下降。就生长而言 *Micractinium* sp. 18A8 在 HSM 培养基中生长最佳。外加碳源试验结果显示: SE-S 培养基中添加乙酸钠和葡萄糖, 在 0~30 mmol/L 乙酸钠浓度, 0~50 mmol/L 葡萄糖浓度的范围内, 藻株生长速率、含油量以及藻细胞的光合效率都是随着碳浓度的增加而增大, 但当乙酸钠浓度超过 30 mmol/L, 葡萄糖浓度超过 50 mmol/L 时, 上述指标反而降低。

关键词 微藻, *Micractinium* sp., 营养缺陷, 油脂, 光合效率

Optimum the Cultivation Station of *Micractinium* sp. 18A8 and the Effects of Carbon Source on Lipid Content

Deng Xiaodong¹ Cai Jijia¹ Fei Xiaowen^{2*}

1 Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Haikou, 571101; 2 Hainan medical college, department of biochemistry, Haikou, 571101

* Corresponding author, feixw2000@hotmail.com

DOI: 10.3969/gab.031.000597

Abstract A microalgae strain 18A8 was isolated from Hainan, China, which then identified as *Micractinium* sp. 18A8 through 18SrDNA homologous clustering analysis. Afterward, its biomass and lipid content were measured when cultured in HSM, SE, BG11, and their nitrogen, phosphorus, or sulfur deficiency mediums respectively. The results indicated that sulfur, nitrogen and phosphorus starvation distribute to the accumulation of lipid, although affects the accumulation of the biomass. Total protein, carbohydrate and chlorophyll contents of *Micractinium* sp. 18A8 will decrease when cultivated in N, P, or S free medium. Furthermore, when 30 mmol/L sodium acetate or 50 mmol/L glucose was added to SE-S medium, it was found that the biomass, lipid and chlorophyll content of the algae will reach maximum.

Keywords *Micractinium* sp., Nutrition restriction, Lipid content, Photosynthetic efficiency

鉴于化石燃料的短缺和全球变暖等因素, 人们日趋重视可再生和环保特点的生物能源的开发。生物柴油是生物能源中的一个重要组成部分, 目前用于生物柴油炼制的农产品有大豆、油菜、花生、玉米、和麻风树等。其中, 由微藻藻油提炼的生物柴油, 由于其单位面积可提供最大的生物产量, 而最具有吸

引力(Deng et al., 2009)。

微藻, 因只能在显微镜下才能辨别其形态而得名, 通常是指含有叶绿素 a 并能进行光合作用的微生物的总称。目前发现的微小类群藻类有两万余种, 广泛分布于各种水体中。微藻能像植物一样利用光合作用将空气中的二氧化碳固定, 转化生成油脂。更

基金项目: 本研究由海南省工程技术研究中心专项基金(GCXZ2011006)、海南省工程技术研究中心专项基金(GCXZ2012004)和中央级公益性科研院所基本科研研究(ITBBZX0941)共同资助

为重要的是它易于培养且生长速率快。因此比传统的林业、农业作物和其它水生植物在经济与时间成本考量上更具竞争力(Zhang et al., 1996)。虽然,微藻是替代石油的绝佳生物资源,但是并非所有的微藻都适用于生产生物柴油,并且以目前的技术水平,微藻培养存在单位面积生产能耗大、投入成本高的问题,微藻生物柴油要真正成为替代能源,降低微藻的生产能耗和成本至关重要。这些问题的解决,一方面需要各环节技术的突破,另一方面也要依赖于优良藻种的筛选培养基的优化(Song et al., 2008; Zhang and Tang, 2008)。

本课题组从海南自然水体中分离了一藻株,经过形态和分子鉴定,并且在各种培养基中进行培养,以期选择出促使藻株大量积累中性脂的最适培养基,此外从藻株的含油量、总糖和总蛋白含量浅析其相互关系,为微藻生产生物柴油提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 藻株经聚类分析鉴定为 *Micractinium* sp. 18A8

藻株 18A8 DNA 用作 PCR 的模板,经 PCR 扩增出约 1078 bp 的片段。片段随后克隆进 pMD18T 载体中,测序。通过分析表明,藻株 18A8 与 *Micractinium* sp. (TP-2008a) 的 18S rDNA 基因的相似度为 99.5%,因此,将它命名为 *Micractinium* sp. 18A8。

1.2 *Micractinium* sp. 18A8 生长曲线和含油量比较

Micractinium sp. 18A8 在 SE、HSM、BG11、中生长良好。在 HSM 培养基中的生长最快。第 10 天生长速率为 (0.41 ± 0.02) g/L,显著高于 BG11 的速率 (0.06 ± 0.004) g/L 和 SE 的速率 (0.078 ± 0.002) g/L ($p < 0.01$)。而在 -N、-P、-S 培养时, *Micractinium* sp. 18A8 的生长速率大幅降低。含油量检测是 *Micractinium* sp. 18A8 在 BG11 中为 31.2%,在 HSM 中为 23%,在 SE 中的含油量为 21.7%。而 HSM-N 培养时,油脂含量为 68%,相比 HSM 培养基油脂含量提高了 196%,SE-N 培养时,油脂含量提高了 91%,BG11-N 培养时,油脂含量提高了 123%。

硫元素缺陷条件下, HSM-S 培养时,油脂含量为 58.1%,较 HSM 油脂含量提高了 152%(图 1),SE-S 培养时,油脂含量提高了 129%,BG11-S 培养时,含油量则提高了 58%。*Micractinium* sp. 18A8 藻株在 BG11-P、SE-P 和 HSM-P 培养时,含油量分别提高了 13%、57% 和 91%。由此认为:-P 可增加藻株的含油量;-S 和 -N 能显著地提高藻株含油量(图 2)。

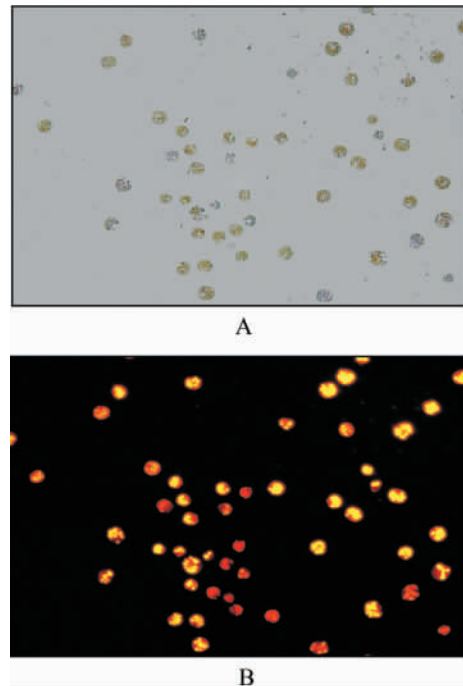


图 1 *Micractinium* sp. 18A8 在 HSM-S 培养 10 d, 藻株油脂的观察结果

注: A: 普通光学显微镜下 *Micractinium* sp. 18A8 形态; B: 荧光显微镜下 *Micractinium* sp. 18A8 形态; 黄色示油脂荧光, 红色示叶绿素荧光

Figure 1 Microscope observation results of *Micractinium* sp. 18A8 after 10 d cultivation in HSM-S medium

Note: A: The morphological observation of *Micractinium* sp. 18A8 under optical microscope; B: The observation of *Micractinium* sp. 18A8 under fluorescence microscope; Yellow fluorescence indicates the parts of oil and red indicates chlorophyll

1.3 *Micractinium* sp. 18A8 在 -N、-P、-S 培养基中组分及光合效率

将实验藻株接种到 HSM-N、HSM-P 和 HSM-S 中培养至第八天,测定其油脂、蛋白和糖含量。结果显示(表 1) *Micractinium* sp. 18A8 藻株在 -N、-P、-S 培养基中含油量增加,而糖和蛋白的含量却下降。其中,在 HSM-N 培养时蛋白的含量比 HSM 降低了 8.5%,糖的含量降低了 51.4%;在 HSM-S 时,糖的含量降低了 53%,蛋白的含量降低 43.6%;在 HSM-P 时,糖的含量降低了 40.5%,蛋白的含量减少 31.9%。由此可以推断,缺陷培养细胞油脂含量的增加,主要来源于糖的减少和蛋白合成的减少。

对藻液的叶绿素含量及光合效率测定结果如表 2 所示, HSM-N、HSM-P 和 HSM-S 培养 *Micractinium* sp. 18A8 的叶绿素含量显著降低,特别是在 -S 或 -N 的条件下,叶绿素 a 的含量仅为 HSM 的 4% 或 3.4%。微藻的光合效率也均低于对照,特别是在 HSM-S 培养条件下,光合效率只有对照的 43%。可见,缺陷培

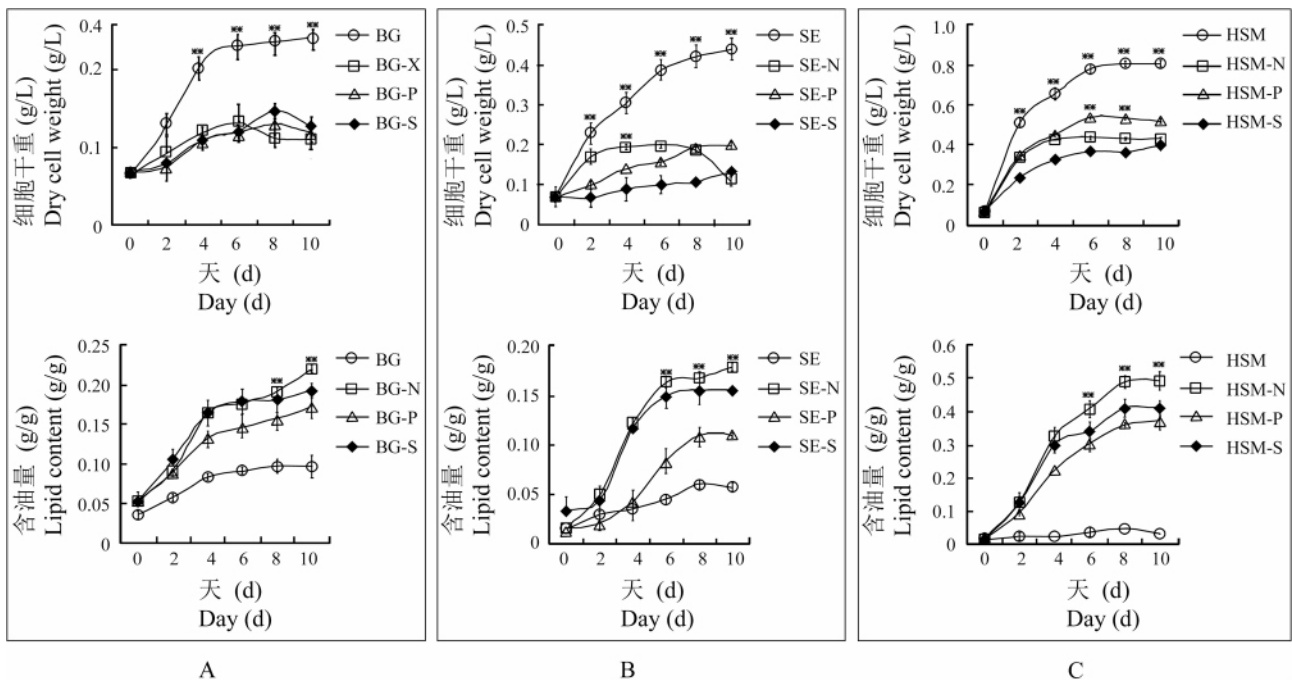


图2 *Micractinium* sp. 18A8 在 BG11, HSM 和 SE 及相应 -N,-S,-P 培养基中的生长曲线以及含油量比较

注: A: *Micractinium* sp. 18A8 在 BG11, BG11-N, BG11-P 和 BG11-S 中的生长曲线及含油量; B: *Micractinium* sp. 18A8 在 SE, SE-N, SE-P 和 SE-S 中的生长曲线及含油量; C: *Micractinium* sp. 18A8 在 HSM, HSM-N, HSM-P 和 HSM-S 中的生长曲线及含油量
 Figure 2 The growth cure and cell lipid content of *Micractinium* sp. 18A8 in the media of BG11, HSM, SE and their -N, -S, or -P medium
 Note: A: The growth cure and cell lipid content of *Micractinium* sp. 18A8 in BG11, BG11-N, BG11-P and BG11-S medium; B: The growth cure and cell lipid content of *Micractinium* sp. 18A8 in SE, SE-N, SE-P and SE-S medium; C: The growth cure and cell lipid content of *Micractinium* sp. 18A8 in HSM, HSM-N, HSM-P and HSM-S medium

表 1 *Micractinium* sp. 18A8 在 HSM 缺氮, 缺硫和缺磷培养基中油脂, 总蛋白和总糖的含量

Table 1 The content of lipid, protein and carbohydrate of *Micractinium* sp. 18A8 in HSM, HSM-N, HSM-P and HSM-S medium

	油脂(%) Lipid (%)	总蛋白(%) Protein (%)	总糖(%) Carbohydrate (%)	其它(%) Others (%)
HSM	3.62	8.19	84.11	4.08
HSM-N	52.33	4.87	40.67	2.14
HSM-P	37.44	3.83	55.22	3.51
HSM-S	65.40	3.27	28.83	2.50

注: 其它是指除了油脂, 蛋白和糖以外的藻细胞内其它物质
 Note: Others indicates the other materials except lipid, carbohydrate, and protein in algae cell

表 2 *Micractinium* sp. 18A8 在 HSM 缺氮、缺硫和缺磷培养基中叶绿素的含量和光合效率

Table 2 The chlorophyll content and photosynthetic efficiency of *Micractinium* sp. 18A8 in HSM, HSM-N, HSM-P and HSM-S medium

	叶绿素 a (μg/mL) chl a (μg/mL)	叶绿素 b (μg/mL) chl b (μg/mL)	光合效率 (μmol·O ₂ mg·chl a ⁻¹ ·oh ⁻¹)/(μmol·photon·om ⁻² ·os ⁻¹) Photosynthetic efficiency (μmol·O ₂ mg·chl a ⁻¹ ·oh ⁻¹)/(μmol·photon·om ⁻² ·os ⁻¹)
HSM	13.92±1.91 a	5.12±0.48 a	1.78±0.02 a
HSM-N	0.58±0.03 c	0.33±0.01 c	1.17±0.01 c
HSM-P	7.86±1.33 b	1.22±0.14 b	1.60±0.04 b
HSM-S	0.48±0.06 c	0.21±0.05 c	0.76±0.01 d

注: a,b,c 和 d 代表显著差异, p<0.01
 Note: a,b,c and d stands for significant difference, p<0.01

养时光合效率的下降造成微藻生长减慢。

1.4 乙酸钠和葡萄糖在一定范围内随浓度增加促进 *Micractinium* sp. 18A8 油脂积累

由于缺硫能诱导 *Micractinium* sp. 18A8 油脂的积累, 而且外加碳源具有促进油脂积累的作用。为了得到最佳的碳源优化, 本研究以乙酸钠和葡萄糖为碳源, 以 SE-S 为基础培养基, 进行最佳含油量培养条件优化, 结果如图 3 所示, 当藻株养到第 8 天, 培养基 NaAc 或葡萄糖的含量分别为 30 mmol/L 或 50 mmol/L 时, *Micractinium* sp. 18A8 的生长和细胞含油量均达到最大值, 此时, 藻株的生长速率与含油量提高了 733%

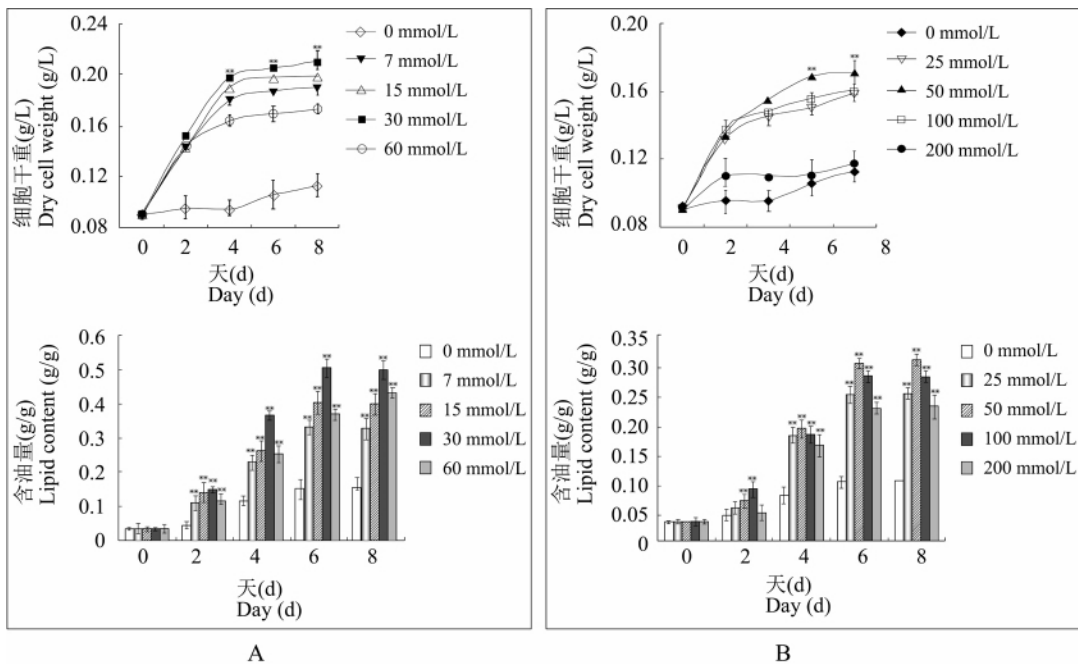


图3 *Micractinium sp. 18A8* 在不同浓度乙酸钠和葡萄糖 SE-S 中的生长曲线以及含油量

注: A: *Micractinium sp. 18A8* 在不同浓度乙酸钠 SE-S 中的生长曲线以及含油量; B: *Micractinium sp. 18A8* 在不同浓度葡萄糖 SE-S 中的生长曲线以及含油量

Figure 3 The growth curve and cell lipid content of *Micractinium sp. 18A8* in SE-S medium with addition of different concentrations sodium acetate or glucose

Note: A: The growth curve and cell lipid content of *Micractinium sp. 18A8* in SE-S medium with addition of different concentration sodium acetate; B: The growth curve and cell lipid content of *Micractinium sp. 18A8* in SE-S medium with addition of different concentration glucose

和 73% (添加 30 mmol/L NaAc), 而当培养基中葡萄糖为 50 mmol/L 时, 藻株的生长速率与含油量则分别提高了 667% 和 280%。而当培养基中 NaAc 或葡萄糖的含量分别超过 30 mmol/L 或 50 mmol/L, 藻株的生长速率与含油量反而下降。由此可见, 过高浓度的碳源将抑制藻细胞的生长和油脂积累。进而, 对各培养条件下微藻的叶绿素和放氧量进行测定并计算光合效率。结果如表 3 所示。藻株叶绿素含量和光合效率在 NaAc 不超过 30 mmol/L 或葡萄糖不超过 50 mmol/L 范围内的随 C 源浓度增加而升高, 光合效率的变化趋势与藻株的生长速率与含油量的变化趋势基本一致。这说明外加碳源能在培养基中元素缺乏时对微藻的生长和光合效率起到积极的促进作用, 也为解释其生物量和油脂含量的增加提供了证据。

2 讨论

以微藻制备生物柴油已经日益受到人们的关注 (Jia et al., 2006; Huang et al., 2008)。本研究对象 *Micractinium sp. 18A8* 是课题组从海南分离的藻株, 以前未见培养基优化等相关的报道。本文研究了 N、P 或 S 缺乏条件下 *Micractinium sp. 18A8* 的生长和油脂积

累状况。以及葡萄糖和乙酸钠对 *Micractinium sp. 18A8* 油脂和生长的影响, 并测定了总糖、总蛋白、和光合效率等。实验结果表明 *Micractinium sp. 18A8* 在 HSM 高碳培养基的生长速率显著高于 BG11 和 SE 中的生长速率, 说明较多的碳源有利于藻株生长。高碳培养基中含有乙酸钠, 微藻在进行光合自养的同时可以利用其进行异养生长。而当 N、P 或 S 元素缺乏时, *Micractinium sp. 18A8* 的生长显著受到抑制。这也是缺氮或缺硫培养尽管油脂含量提高, 但由于生长缓慢, 总的油脂产量不高的原因。由于葡萄糖或乙酸钠能够促进微藻的异养生长, 故本研究进一步探索了在 SE-S 培养条件下, 添加不同浓度的葡萄糖或乙酸钠对 *Micractinium sp. 18A8* 生长、含油量以及光合效率的影响。结果显示, 当葡萄糖或乙酸钠的浓度分别为 30 mmol/L 和 50 mmol/L 时 *Micractinium sp. 18A8* 生长量、含油量以及光合效率达到最大。本课题组以往的实验表明碳源能促进一些藻株的生长, 而科研人员在研究三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornerutum*) 时发现外加 NaAc 有效促进了藻株的生物和含油量的提高 (Fu et al., 2011)。赫冬梅等 (2012) 在研究葡萄糖和乙酸钠对湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 兼养

表 3 SE-S 添加乙酸钠和葡萄糖对 *Micractinium* sp. 18A8 叶绿素和光合效率的影响

Table 3 The chlorophyll content and photosynthetic efficiency of *Micractinium* sp. 18A8 in SE-S medium with addition of different concentrations sodium acetate or glucose

	叶绿素 a ($\mu\text{g/mL}$) chl a ($\mu\text{g/mL}$)	叶绿素 b ($\mu\text{g/mL}$) chl b ($\mu\text{g/mL}$)	光合效率 ($\mu\text{mol}\cdot\text{O}_2\text{mg}\cdot\text{chl a}^{-1}\cdot\text{oh}^{-1}$) / ($\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{om}^{-2}\cdot\text{os}^{-1}$) Photosynthetic efficiency ($\mu\text{mol}\cdot\text{O}_2\text{mg}\cdot\text{chl a}^{-1}\cdot\text{oh}^{-1}$) / ($\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{om}^{-2}\cdot\text{os}^{-1}$)
乙酸钠 (mmol/L) NaAc (mmol/L)			
0	2.08±0.02	0.66±0.03	0.79±0.01
7	2.61±0.06	1.64±0.07	0.85±0.07
15	3.31±0.18	1.81±0.12	0.95±0.08
30	2.39±0.09	1.16±0.08	0.82±0.01
60	2.03±0.08	0.47±0.03	0.75±0.02
葡萄糖 (mmol/L) Glucose (mmol/L)			
0	2.08±0.02	0.66±0.03	0.79±0.01
25	2.07±0.03	0.61±0.08	0.76±0.07
50	2.23±0.10	1.04±0.11	0.80±0.05
100	2.09±0.13	0.50±0.06	0.79±0.09
200	0.73±0.05	0.21±0.05	0.67±0.03

生长的影响时,发现随着葡萄糖和乙酸钠浓度的增加,等鞭金藻的生长和产物积累均表现出先促进后抑制的现象,葡萄糖和乙酸钠的最适浓度分别是 15 g/L 和 7.5 g/L (He et al., 2012)。说明在元素缺乏情况下,添加碳源是提高微藻生物量和含油量一种可行手段,为微藻规模化培养提供了一个新视角。

3 材料与方法

3.1 藻株与培养基

藻株 18A8 采自海南,由划线法获得。本实验所用的 HSM、BG11、SE 及其氮、磷、硫缺陷培养基配方见蔡佳佳等(2011),液体培养时以 26°C、220 r/min、110 $\mu\text{mol}\cdot\text{om}^{-2}\cdot\text{os}^{-1}$ 光照、震荡培养。

3.2 油脂的测定

参照周玉娇等(2010)的方法,制作三酰甘油含量标准曲线。以尼罗红给待测样品染色 10 min,使用 Promega 发光检测仪测定样品荧光值。

3.3 生物量的测定

参照蔡佳佳等(2011)的方法,用酶标仪藻液测定 490 nm 波长吸光值,同时取藻液样品测定其干重,并制作标准曲线。

3.4 藻株 DNA 的提取

采用改良玻璃珠法提取微藻基因组 DNA,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,通过紫外

分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,并将 DNA 溶液稀释至 50 ng/ μL (Gu et al., 2011)。

3.5 18S rDNA 基因片段的克隆及序列分析

PCR 扩增 18S rDNA 片段,回收扩增产物,进行克隆,测序,通过 NCBI 搜索同源序列,聚类分析以 MEGA 软件进行。

3.6 藻细胞蛋白,糖测定,叶绿素和放氧效率的测定

取 10 mL 对数生长期藻液,超声波破碎藻细胞,离心收集上清,参照辜博等(2011)的方法进行蛋白质和总糖测定。

3.7 藻细胞叶绿素和光合效率的测定

参照 Deng 等(2011)的方法测定叶绿素含量:待测藻液经处理后,测定其 663 nm 和 646 nm 吸光值,按以下公式计算叶绿素含量(Lichtenthaler, 1987)。

$$\text{Chla} = 12.21 (\text{OD}_{663}) - 2.81 (\text{OD}_{646})$$

$$\text{Chlb} = 20.13 (\text{OD}_{646}) - 5.03 (\text{OD}_{663})$$

式中:Chla、Chlb——叶绿素 a 和 b 的浓度。

参照 William (1993)方法进行光合效率的测定:以液相氧电极,测定藻液含氧量和氧气变化率。光合效率为光饱和时,相应的的放氧效率加上耗氧效率。

作者贡献

邓晓东负责实验的设计和操作;蔡佳佳协助部分工作;费小雯负责整个研究的设计、规划、和论文的撰写修改。

致谢

本研究由海南省工程技术研究中心专项：热带能源微藻新藻种培育及产业化研究(GCZX2011006)、海南省工程技术研究中心专项 利用紫外诱变技术选育优良微藻藻种及培养条件优化(GCZX2012004)和中央级公益性科研院所基本科研业务费：微藻油脂代谢网络的转录组研究(ITBBZX0941)共同资助,在此表示感谢。

参考文献

- Cai J.J., Fei X. W., Li Y.J., Hu X.W., Guo J.C., and Deng X.D., 2011, Nutrient elements deficiency and carbon source addition affect on the growth and lipid accumulation in *Chlorella* sp KMMCC FC-21, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 32(11): 2029-2036 (蔡佳佳, 费小雯, 李亚军, 胡新文, 郭建春, 邓晓东, 2011, 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, 热带作物学报, 32(11): 2029-2036)
- Deng X.D., Gu B., Hu X.W., Guo J.C., and Fei X.W., 2011, Photosynthetic efficiency and lipid accumulation are affected by the concentration of carbon in microalgae *Micractinium pusillum* Y-002, *African Journal of Biotechnology*, 10(55): 11600-11610
- Deng X.D., Li Y.J., and Fei X.W., 2009, Microalgae: A promising feedstock for biodiesel, *African Journal of Microbiology Research*, 3(13): 1008-1014
- Fu R., Huang C.G., and Wang H.Y., 2011, Effects of nutrients on growth and oil accumulation of *phaeodactylum tricornutum*, *Hubei Nongye Kexue* (Hubei Agricultural Sciences), 50(11): 2292-2304 (符茹, 黄长干, 王海英, 2011, 营养条件对三角褐指藻生长和油脂积累的影响, 湖北农业科学, 50(11): 2292-2304)
- Gu B., Fei X.W., Hu X.W., Guo J.C., and Deng X.D., 2011, The effect of the restriction of nutrient elements to lipid accumulation in *micractinium pusillum* Y-002, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 32(5): 789-795 (辜博, 费小雯, 胡新文, 郭建春, 邓晓东, 2011, 营养元素限制对微芒藻 Y-002 油脂积累的影响, 热带作物学报, 32(5): 789-795)
- He D.M., Wang N., Sun K.F., Huang Z.H., and Duan S.S., 2012, Effect of glucose and sodium acetate on mixotrophic growth of *Isochrysis zhanjiangensis*, *Shengtai Kexue* (Ecological Science), 2012, 31(2): 126-129 (赫冬梅, 王娜, 孙凯峰, 黄振华, 段舜山, 2012, 葡萄糖和乙酸钠对湛江等鞭金藻兼养生长的影响, 生态科学, 31(2): 126-129)
- Huang C.X., Xie G.S., and Liu R.H., 2008, The main ways of biodiesel production: A review, *Kezhaisheng Nengyuan* (Renewable Energy Resources), 26(5): 53-57 (黄彩霞, 谢贵水, 刘荣厚, 2008, 生物柴油主要制备方法的研究进展, 可再生能源, 26(5): 53-57)
- Jia H.S., and Xu Y.N., 2006, World biodiesel utilization and development strategies in china, *Zhiwushengtai Xuebao* (Journal of Plant Ecology), 30(2): 221-230 (贾虎森, 许亦农, 2006, 生物柴油利用概况及其在中国的发展思路, 植物生态学报, 30(2): 221-230)
- Lichtenthaler H.K., 1987, Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148: 350-382
- Song D.H., Hou L.J., and Shi D.J., 2008, Exploration of raw material resource high oil algae for biodiesel, *Shengwu Gongcheng Xuebao* (The journal of biological engineering), 24(3): 341-348 (宋东辉, 侯李君, 施定基, 2008, 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用, 生物工程学报, 24(3): 341-348)
- William J., 1993, Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in alga in the context of photoinhibition and diel changes, *Journal of Phycol.*, 29(6): 729-739
- Zhang D.B., and Wu Q.Y., 1996, Heterotrophic transformation of *Chlorella* cell, *Zhiwu Shenglixue Tongxun* (Plant Physiology Communication), 32(2): 140-144 (张大兵, 吴庆余, 1996, 小球藻细胞的异养转化, 植物生理学通讯, 32(2): 140-144)
- Zhang J., and Tang E.L., 2008, The application and technical progress of biodiesel, *Huagong Jishu Yu Kaifa* (Chemical Industry Technology and Development), 37(8): 23-29 (张静, 唐恩凌, 2008, 生物柴油的应用现状及技术进展, 化工技术与开发, 37(8): 23-29)
- Zhou Y.J., Li Y.J., Fei X.W., Li Y.X., and Deng X.D., 2010, UV-Irradiation of *Chlorella vulgaris* and screening of petrioliferous strains, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 31(12): 2124-2129 (周玉娇, 李亚军, 费小雯, 黎云祥, 邓晓东, 2010, 小球藻紫外线诱变及高含油藻株筛选, 热带作物学报, 31(12): 2124-2129)