

微藻油脂含量和组分及其影响因子的研究

The research on the lipid content and composition of microalgae and their impact factors

孙 珊^{1,2}, 郑 立³, 韩笑天¹, 田 黎², 邹景忠¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 青岛科技大学, 山东 青岛 266042; 3. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

中图分类号: TK6

文章标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)12-0122-07

随着全球经济发展和人口增长, 油脂与人类的关系越来越密切, 无论是作为生物柴油的原料还是加工成为保健食品, 油脂都具有至关重要的作用。目前, 油脂的主要来源仍然是植物以及动物脂肪, 但是这种传统的油脂来源已经不能完全满足人们食用、工业等生活中的各种需求^[1], 因此寻找一种成本低、来源广以及成分好的油脂原料成为亟待解决的问题。

微藻是能够进行光合作用的微生物, 它可以利用阳光、水和 CO₂ 合成自身所需要的物质^[2]。许多微藻含油量极高, 据保守估计, 每年每公顷微藻可生产 30 000~50 000 L 油脂, 而富油植物如棕榈和麻风树等每年每公顷的油脂产量仅为 1 300~2 400 L^[3]; 微藻还具有环境适应能力强、生长周期短、生物产量高^[4]和不占用农业用地^[5]等特点, 因此, 微藻油脂越来越受到国内外学者的广泛关注。

1 微藻油脂研究应用的历史和现状

微藻油脂(Microalgae oils)属于单细胞油脂, 其主要组分是甘油和脂肪酸^[6], 是由微藻在一定的条件下, 利用碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂作为碳源, 在藻体内合成的, 主要作为生物膜组分、代谢物和能量来源^[7]。

人类应用微藻的历史最早可追溯自 2 000 多年前, 当时就有中国狩猎民族利用一种胶状性蓝绿藻作为应急食物^[8]。而有计划地大量培养微藻则始于第一次世界大战期间, 有德国科学家指出某些油脂含量高的微藻可用于解决当时食用油脂供应不足的问题^[1]。随着对微藻油脂组分研究的不断深入, 20 世纪 50 年代起, 人们开始利用微藻生产各种脂类(主要为 PUFAs 多不饱和脂肪酸、色素等)并进入商业开发阶段^[8]。例如 19 世纪 70 年代, 有专家从杜

氏藻(*Dnaliella saliva*)中提取 β -胡萝卜素作为商业应用^[9]; 19 世纪 80 年代, 国外学者进行培养微藻生产 PUFAs 的研究, 发现多种海洋微藻的某些品系中含有较高的 DHA(二十二碳六烯酸)^[10]。20 世纪 80 年代, 对于微藻油脂研究进入到研究其形成机制及影响因素的阶段, 其标志为美国可再生资源国家实验室(NREL)的微藻制备生物柴油项目的研究。NREL 从 1 000 株微藻中筛选出 300 株微藻样品, 对其油脂含量和组分进行分析, 并研究了油脂生物代谢的机制, 发现在氮和硅缺乏的情况下会提高微藻油脂含量, 最终采用分子生物学和基因工程技术, 制备出高产量、高含油量的工程微藻^[11]。20 世纪 90 年代, 日本国际贸易和工业部资助了一项名为“地球研究更新技术计划”的项目, 该项目利用微藻来生物固定 CO₂, 并着力开发密闭光合生物反应器技术, 通过微藻吸收火力发电厂烟气中的 CO₂ 来生产生物质能源, 最终筛选出多株耐受高 CO₂ 浓度、生长速度快及能形成高细胞密度的藻种, 建立起了光合生物反应器的技术平台以及微藻生物质能源开发的技术方案^[12]。另外, 缪晓玲等^[13]通过改变培养方式, 利用异养方式培育出高油脂含量的小球藻。随着对微藻油脂认识的进一步深入, 微藻油脂被应用于越来越多的领域。例如在能源领域, 利用微藻油脂制备生物柴油、生物乙醇和氢气等生物燃料可以应对油价升高、环境污染和石化燃料不能持续供应等局势^[14];

收稿日期: 2009-04-01; 修回日期: 2009-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870247, 40806053); 海洋公益性行业科研专项(200805039); 国家海洋局海洋生态环境科学与工程重点实验室开放基金项目(MESE-2008-02)

作者简介: 孙珊(1984-), 女, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事海洋微藻油脂研究, E-mail: ssmm101@163.com; 韩笑天, 通信作者, 助理研究员, 电话: 0532-82898597, E-mail: xthan@ms.qdio.ac.cn

在医疗保健领域,微藻油脂中富含 PUFAs,某些藻细胞中的 EPA(二十碳五烯酸)和 DHA 含量占总脂肪酸的 30%~50%,且从微藻油脂中提取 PUFAs 具有无鱼腥味、不受季节和气候限制等优点^[15],因此从微藻油脂中提取 PUFAs 成为医疗和保健品开发的热点;在食品领域,微藻油脂成分与植物油相似,可以直接提取作为植物油的替代品,能够缓解传统的油料作物供不应求的局面^[1]。

综上所述,鉴于微藻油脂的巨大应用价值,要获得符合人类需求的油脂产品就必须加强对微藻油脂的研究,而其含量和组成在不同的微藻中有极大差异,并且受到多种因素的影响,因此,研究微藻油脂的组成及其影响因素具有非常重要的意义。

2 微藻油脂的含量及其主要组分

微藻总脂含量(干质量比)从 1%到 70%不等,在特定条件下可达到 90%^[16,17]。大多数微藻的油脂组成主要为甘油三酯($\geq 80\%$)和 C_{14} - C_{22} 的长链脂肪酸^[18],其中脂肪酸以 C_{16} 与 C_{18} 系脂肪酸为主^[19],PUFAs 为不饱和脂肪酸的主要组分,棕榈酸为饱和脂肪酸的主要组分^[8]。某些微藻还含有一些特殊的脂类,如次氯酸硫脂^[20]和卤代不饱和脂肪酸^[21]。此外,随着新的检测技术的发展,在微藻油脂中还发现一些新的化合物,如长链(C_{35} - C_{40})烯酮、半乳糖脂和醚脂等^[22]。

微藻主要可以归属于为绿藻纲(Chlorophyceae)、金藻纲(Chrysophyceae)、甲藻纲(Dinophyceae)、硅藻纲(Bacillariophyceae)、红藻纲(Rhodophyceae)、黄藻纲(Xanthophyceae)和隐藻纲(Cryptophyceae)等,不同种类微藻的油脂含量和组成差别很大,甚至同一种类的不同品系之间也存在很大的差别。

绿藻纲总脂含量比较高,占干质量的 4.2%~34.49%^[23],其中 C_{16} 高度不饱和脂肪酸和 C_{18} 高度不饱和脂肪酸的含量较高,例如 $C_{16:4(n-3)}$ 和 $C_{18:3(n-3)}$ 的含量较高,尤其是 $C_{16:4(n-3)}$ 的含量可超过 10%^[24]。硅藻纲中饱和脂肪酸以 $C_{16:0}$ 所占比例最大,不饱和脂肪酸以 $C_{16:1(n-7)}$ 、 $C_{20:5(n-3)}$ 和 $C_{16:3(n-4)}$ 含量较高^[24,25]。金藻纲总脂含量占干质量的 8.5%~46.3%^[26],脂肪酸组成的特点是有高含量的 $C_{14:0}$ 、 $C_{18:4(n-3)}$ 及 $C_{22:6(n-3)}$,尤其是对人体和动物体有益的 DHA,含量均高于 10%。此纲中除个别藻种外,均含有其特有的 $C_{22:5(n-6)}$ ^[24]。甲藻纲的脂肪酸组成特性之一是含有高含量的 $C_{22:6(n-3)}$,其 DHA 含量高于金藻,甲藻中还含有高水平的 $C_{18:5(n-3)}$,可作为光合甲藻的标价化合物^[24]。红藻纲的特点是具有高含量的 $C_{20:4(n-6)}$,而该脂肪酸在其他藻类中一般含量较

低^[27]。黄藻纲脂肪酸以 EPA 和 $C_{16:0}$ 为主,但 DHA 含量甚微^[28,29]。隐藻纲几乎都含有 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1(n-9)}$ 、 $C_{18:1(n-7)}$ 、 $C_{18:3(n-3)}$ 、 $C_{18:4(n-3)}$ 和 $C_{20:1(n-3)}$,而 C_{16} PUFAs 缺乏^[30]。

3 微藻油脂含量和组成的影响因素

3.1 培养液的营养成分对微藻油脂含量和组成的影响

培养液的营养成分特别是一些必需营养盐如氮、磷、硅等对微藻油脂的含量及组成有较大影响。

普遍认为,氮缺乏会导致微藻油脂的积累^[31,32]。在氮为限制因素时蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)油脂含量增加^[33],隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)的油脂和 DHA 的含量也较高^[34],其原因可能为氮源充足时,细胞生长旺盛,蛋白质、脂类和核酸等生物活性物质均正常合成,因此所得脂肪酸含量较低;但氮源缺乏时,蛋白质和核酸等含氮化合物的合成受到限制,而含氮元素较少的贮存脂类和绝大多数膜质仍能继续合成,因此在细胞干质量中的含量增加^[35]。氮浓度的变化对微藻脂肪酸组成有较大影响。在氮限制的情况下,极小冠盘藻(*Stephanodiscus minutulus*)的甘油三酯占总脂的比例降低同时极性脂占总脂的比例升高^[36],而三角褐指藻的 PUFAs 和 EPA 在脂肪中的含量均下降^[37]。当氮浓度升高时,隐甲藻中 DHA 占脂肪酸的百分含量增加^[34],当培养液中硝酸钠浓度为 0.5~4 mmol/L 时,球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的 PUFAs、EPA 和 DHA 含量随硝酸钠浓度的升高而升高,在 4~8 mmol/L 时变化不明显^[38]。

磷与微藻细胞生长和代谢密切相关,是构成 DNA、RNA、ATP(adenosine triphosphate)和细胞膜的必要元素^[39]。通过对磷限制条件下海洋微藻油脂含量影响的研究发现,磷限制会导致三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、角毛藻(*Chaetoceros* sp.)和鲁兹巴夫藻(*Pavlova lutheri*)的油脂含量增加,但是绿色鞭毛藻、拟球藻(*Nannochloris* sp.)和融合微藻(*Tetraselmis* sp.)的油脂含量降低^[40]。由于微藻细胞中的 PUFAs 主要是以极性脂肪酸(如磷脂)的形式存在,因此其含量受磷含量的影响显著^[41]。培养基中磷酸盐质量浓度大于 0.5 g/L 时三角褐指藻不能生长,0.05~0.5 g/L 范围内,对生物量影响不大,但在 0.1~0.5 g/L 范围内,EPA 达到最佳水平^[42]。随着磷浓度降低,凯斯勒小球藻(*C. kessler*)的 PUFAs 的含量增加^[43],蒜头藻(*Monodus subterraneus*)中 VLC-PUFA(极长链多不饱和脂肪酸)和 EPA 的含量则分别降低^[44]。

硅是硅藻生长必不可少的营养元素,除了作为细胞壁结构成分外,还参与光合色素、蛋白质、DNA的合成和细胞分裂等多种代谢和生长过程^[45]。硅缺乏会导致新吸收的碳更多被用于脂类合成,并且先前吸收的碳逐渐地由非脂类化合物转变为脂类^[46],从而促进脂肪酸在微藻体内积累。

维生素虽不是微藻生长所必需的,但由于可以做为酶的辅基,因此可以提高有关合成酶的活性,从而促进微藻生长并提高 PUFAs 含量^[26]。培养液中的微量元素也会对微藻油脂含量和组成产生影响。 Mg^{2+} 是许多酶反应的辅助因子,也是叶绿体的组成成分,有稳定核糖体、细胞膜和核酸的功能。添加一定量 Mg^{2+} 既可以促进隐甲藻生长,也可一定程度满足藻体 DHA 积累的需要^[47]。铁在浮游植物生长过程中也发挥着极为重要的作用,以溶解态的有机络合铁形式被藻体利用^[48],是藻类细胞某些氧化还原酶的载体和辅酶的组成成分,缺铁会影响多种代谢过程从而抑制藻细胞生长^[49]。在生长末期添加螯合的 $FeCl_3$ 虽然可以增加细胞密度,但是不会增加脂类的积累;在指数末期离心收集藻体并重新接种于有不同 Fe^{3+} 浓度的培养基中,高 Fe^{3+} 浓度的培养基中的脂肪酸含量则较高^[50]。

3.2 培养条件对微藻油脂含量和组成的影响

微藻对盐度的适应性不同,根据对盐度的耐受性,微藻可划分为嗜盐微藻和耐盐微藻。无论属于哪种类型,微藻都会产生一些代谢物以保护自身不受盐分伤害并且保持与环境的渗透平衡^[51]。微藻细胞内脂类组成会随环境中盐度变化而变化。当 NaCl 浓度从 0.4 mol/L 增加到 4 mol/L 时会引起杜氏盐藻(*D. salina*)中饱和脂肪酸与单不饱和脂肪酸的含量增加而多不饱和脂肪酸的含量减少^[52]。杜氏盐藻细胞中极性脂的组成受 NaCl 浓度影响较大^[53],随着 NaCl 浓度的增加,饱和脂肪酸的百分含量增加而高度不饱和脂肪的比例降低^[54]。在低盐度条件下绿色巴夫藻(*P. viridis*)中 EPA 和 PUFA ($n-3$)的含量都达到最高,随着盐度增加它们的含量逐渐减小;盐度对 DHA 含量的影响也较大,在盐度为 24 时达到最大,约为总脂的 19%,盐度过高或过低都不利于 DHA 合成^[55]。

碳为细胞生长所需的主要营养元素(占藻体干质量的 45%~50%),从理论上讲每 1 g 藻体(干质量)需要吸收 1.65~1.83 g CO_2 ^[56]。 CO_2 会使微藻油脂的含量和组成发生变化。当 CO_2 通量增加到空气通量的 1%时,微藻的油脂产量就会增加^[57]。即使在一天的时间内, CO_2 通量由 2%增加到 10%,也会使杜氏盐藻脂肪酸总量占细胞干质量的比例增加 30%^[46]。 CO_2 浓度增加会导致 PUFAs 在真核藻细

胞中的含量降低^[58],其原因可能为 CO_2 易在脂肪中溶解并且吸附作用较快^[59],因此细胞膜中脂肪酸链的不饱和程度会由于 CO_2 浓度降低而发生变化^[60]。

因为海洋是一个天然的缓冲系统,有关 pH 值对海洋微藻含量和组成成分影响的报道较少。pH 会影响光合作用中 CO_2 的可用性,在呼吸作用中影响微藻对有机碳源的利用效率,并影响培养基中微藻细胞对离子的吸收和利用,以及代谢产物的再利用和毒性^[61]。海洋微藻生长的最佳 pH 值与海水的 pH 值相近,约为 8.0。不同微藻生活的最佳 pH 值不同,偏离最佳 pH 值,微藻生长和体内有关代谢活动即受抑制^[62],例如在 pH 较低时,南极冰藻(*Chlamydomonas* sp.)细胞膜中的脂肪酸饱和度增加以降低膜脂的流动性^[63]。

温度和光照强度的变化对微藻的生化组分有一定影响^[51]。高温会增加蛋白质的含量,同时降低脂类和碳水化合物的含量^[64],但是这种变化会因藻种的不同而有差异。温度变化也会导致微藻脂肪酸组分的变化^[65]。在温度降低的情况下,许多微藻 PUFAs 的含量增加^[66],可能是因为藻类会通过生产更多的 PUFAs 来保持细胞膜的流动性^[67],或是因为细胞内大量的氧分子能够增加去饱和以及延长 PUFAs 的酶的活性^[68,69]。然而低温也会导致微藻生物量降低,从而影响 PUFAs 总产量,因此,在生产过程中可以在最适温度下培养一段时间获得较高生物量后再转入低温使其积累较高的 PUFAs^[70]。PUFAs 的不饱和度随温度的变化因藻种的不同而有差异,目前还没有一致的规律^[71]。

光照强度也是微藻培养中影响其生长和生化组分变化的重要元素之一。光照强度与海洋浮游植物脂肪酸含量之间的关系因种而异,但大部分种类在低光照强度时具有最高水平的 EPA,而 DHA 则通常随光照强度降低而减少^[72]。对小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)和球等鞭金藻的研究发现,低光照条件下两种微藻的脂肪含量多而高光照条件下则相反^[73],在对其他饵料微藻的研究中也得到了相似的结果^[74]。也有实验表明,增加光照强度能够促进脂肪酸含量的增加,如小球藻(*C. vulgaris*)和眼虫藻(*Euglena gracilis*)中多不饱和脂肪酸 $C_{16:2(n-6)}$ 、 $C_{16:3(n-6)}$ 、 $C_{16:4(n-3)}$ 、 $C_{18:2(n-6)}$ 和 $C_{18:3(n-3)}$ ^[75],以及纤细角毛藻(*C. gracilis*)中的 $C_{16:2(n-4)}$ 、 $C_{16:3(n-4)}$ ^[76] 含量都会随光照强度增强而增加。然而更多的研究显示,生长在高光照强度下的微藻,其不饱和脂肪酸的比例降低,如 Materassi 研究的两种绿藻的 $C_{16:2(n-6)}$ 和 $C_{18:3(n-3)}$ ^[77],纤细角毛藻中的 $C_{16:2(n-7)}$ 、 $C_{18:1(n-9)}$ 、 $C_{18:2(n-6)}$ 、 $C_{18:4(n-3)}$ 、 $C_{20:4(n-6)}$ 和 $C_{22:6(n-3)}$ ^[76] 等含量均在高光照强度下降



低,这种变化也许跟细胞内参与光和作用的细胞器的变化有关。已知 PUFAs 主要存在于极性脂(磷脂和甘油酯)中,磷脂的含量相对稳定,甘油酯的相对数量与细胞的光合活力密切相关^[78]。低光照强度下,为了增加光吸收和光的利用效率,膜脂及光和色素的合成速率维持在较高水平。而当光照强度超过饱和和光照强度时,细胞内参与光和作用的细胞器含量减少,光的吸收能力和利用效率随之下降^[79,80],膜脂合成速率较低,因而 PUFAs 含量减少。

在户外微藻大规模培养中,光照强度和温度两个因素是密切相关的,因为它们都来自于太阳的辐射^[81]。Voltolina 等^[50]发现在光照强度和温度不同的情况下,在户外(28°50'N;111°56'W)培养的牟氏角毛藻(*C. muelleri*)油脂含量冬季最高,其次为春季,夏季最低。

3.3 培养方式对微藻油脂含量和组成的影响

微藻的培养方式可分为光能自养型、兼养型和异养型三种,培养方式的不同对微藻油脂含量与组成有较大影响。

光能自养型微藻通过光合作用进行繁殖,而其主要限制因素为光照不足及光分布不均导致的光合效率较低^[82]。早在第二次世界大战后,人们就采用人工循环跑道式开放池的形式户外大规模培养自养型微藻^[83],目前这种循环设备仍广泛应用于日本、印尼和中国台湾等国家和地区^[84]。开放池培养成本相对较低,但微藻生长所达到的细胞密度较低,某些情况下易于被当地其他微藻侵染,水分蒸发量大^[12]。为了获得更高的生物产率并保证在温和条件下的单种培养,人们又采用了封闭式反应器培养自养型的微藻^[85]。为了提供充足的光照,所设计的反应器需要有较大的表面积、较短的光程和较小的黑暗区域,因此目前常采用的封闭式反应器有管式、平板式和柱状 3 种^[86,87,88]。

兼养培养是微藻在利用光能和 CO₂ 的同时,以有机碳(如葡萄糖、醋酸盐等)作为补充碳源和能源的一种培养方法,是光和有机物的联合作用。目前,已经有 8 个门 66 个属近百种微藻被筛选出来能够进行兼养生长,包括蓝藻门、绿藻门、硅藻门等,其中有一些已能达到很高的产量^[89]。在兼养条件下向培养液中添加不同的碳源,其 PUFAs 的产量不同,向 *N. saprophila* 培养液中分别加入乙酸、乙醇和葡萄糖,每克细胞收获的 EPA 量分别为 14.3、73、10.4 mg^[90]。

异养型微藻与其他微生物相似,培养在无光照的普通搅拌罐式反应器中^[91]。由于异养生长可以消除光的限制,因此异养培养可以大规模提高藻细胞密度和产量,利用发酵技术使得微藻产品大规模生产^[41,92]。例如原壳小球藻(*C. protothecoides*)在一

定的异养条件下产生的油脂总量可达到 55.2%,是自养条件下油脂含量的 4 倍^[93]。Chor 等^[94]于 1996 年对两种硅藻作了异养效果的实验,发现,培养方式的不同导致了 EPA 等不饱和脂肪酸含量和种类不同。全部品系中异养型微藻的总脂占干质量的比例明显高于自养型微藻。Rattanapoltee 等^[95]对一种小球藻进行自养和异养比较发现,异养细胞的油脂含量高于自养细胞,分别为 32.85%,15.37%,而碳水化合物、蛋白质和水分的含量则低于自养细胞。

4 微藻油脂及其影响因素研究的展望

目前对微藻油脂的研究还处于起步阶段,在已知存在的 10 000 余种微藻中,只有几千种微藻被培养收集,只对其中几百种微藻的化学组成进行了研究,而仅有少数几种微藻可以工业化规模培养^[96]。因此,对微藻油脂及其关键影响因素的研究还需进一步深化,尤其是结合分子生物技术开发工程微藻,利用工业废水废气培养微藻生产油脂等方面具有广阔的发展前景。

不同微藻的油脂组成是由自身基因表达所决定的,通过基因工程等分子生物学方法使特定基因高效表达就可以大量获得人类所需的油脂产品。例如,Dunahay 等^[97]最早于 20 世纪 90 代开始利用转基因硅藻生产油脂制备生物柴油的研究。然而,与大量转基因的细菌、酵母和高等植物相比,只有几种微藻成功地进行了基因转化,且主要集中于绿藻、硅藻和鞭毛藻三类^[98],因此利用转基因微藻生产油脂的研究还处于起步阶段,具有很大的发展空间。

目前微藻培养的成本较高,据估计,当前微藻生产生物柴油的成本为 3 000 美元/t^[2],因此为使微藻油脂能够在工业中得到切实的应用,迫切需要降低成本。利用工业废水、废气培养微藻进行油脂生产一方面能够处理废水、废气等而起到环境保护的作用,另一方面能够降低油脂生产成本。例如,可以利用发电站燃烧石化燃料所排放的 CO₂ 来增加微藻油脂含量^[99~101],而这种 CO₂ 来源成本很低可以忽略不计。我国新奥集团通过微藻固定 CO₂ 并制备生物质能源项目,以微藻为原料,进行了生物柴油和生物燃气的中试^[102]。因此可以在低成本下提高微藻油脂含量的同时,又解决环境问题,是一个很有前途的发展方向。

总之,微藻油脂的研究在不断趋向成熟,且将成为新世纪油脂工业的一个发展方向,并在促进人类保健方面、解决人类能源问题中起到越来越重要的作用。

参考文献:

[1] 薛飞燕,张棚,谭天伟.微生物油脂的研究进展及展望

- [J]. 生物加工过程, 2005, **3**(1): 23-27.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. **Biotechnol.** 2007, **25**(3): 294-306.
- [3] Williams P J L B. Biofuel; microalgae cut the social and ecological costs [J]. **Nature**, 2007, **450**(7 169): 478.
- [4] 缈晓铃, 吴庆余. 微藻生物质可再生能源的开发利用 [J]. 可再生能源, 2003, **3**(109): 13-16.
- [5] 嵇磊, 张利雄, 姚志龙, 等. 利用藻类生物质制备生物燃料研究进展 [J]. 石油学报, 2007, **23**(6): 1-5.
- [6] 张矗, 李云昌, 梅德圣, 等. 油菜油脂研究进展 [J]. 植物学通报, 2007, **24**(4): 435-443.
- [7] 颜治, 陈晶. 微生物油脂及其开发利用研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2003(7): 13-15.
- [8] Harwood J L, Guschina I A. The versatility of algae and their lipid metabolism [J]. **Biochimie**, 2009, **91**: 679-684.
- [9] Raja R, Hemaiswarya S, Kumar N A, *et al.* A perspective on the biotechnological potential of microalgae [J]. **Crit Rev Microbiol**, 2008, **34**(2): 77-88.
- [10] 徐建祥. 利用微藻培养生产 DHA 的进展 [J]. 食品工业科技, 2003, **24**(11): 88-90.
- [11] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, *et al.* A Look Back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program; Biodiesel from Algae [R]. U. S. the National Renewable Energy Laboratory, 1998.
- [12] 徐旭东. 微藻燃料 [EB/OL]. <http://www.newenergy.org.cn/Html/00811/1140822686.html>. 2008-11-04.
- [13] 缈晓玲, 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.
- [14] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production [J]. **Science**, 2007, **315**(5 813): 801-804.
- [15] 孙婷, 杜伟, 陈新, 等. 我国生物柴油产业化现状及前景 [J]. 生物产业技术, 2007, **2**(11): 33-39.
- [16] Andersen R A. Diversity of eukaryotic algae [J]. **Biodivers Conserv**, 1992, **1**(4): 267-292.
- [17] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, *et al.* Commercial applications of microalgae [J]. **J Biosci Bioeng**, 2006, **101**(2): 87-96.
- [18] Metting F B. Biodiversity and application of microalgae [J]. **J Inorg Biochem**, 1996, **17**(5-6): 477-489.
- [19] Guil-Guerrero J L, Navarro-Juárez R, López-Martínez J C, *et al.* Functional properties of the biomass of three microalgal species [J]. **J Food Eng**, 2004, **65**(4): 511-517.
- [20] Erwin J A. Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms [M]. New York: Academic Press, 1973. 197-232.
- [21] Dembitsky V M, Srebnik M. Natural halogenated fatty acids; their analogues and derivatives [J]. **Prog Lipid Res**, 2002, **41**(4): 315-367.
- [22] Guschina I A, Harwood J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae [J]. **Prog Lipid Res**, 2006, **45**(2): 160-186.
- [23] 曹春晖, 孙世春, 麦康林, 等. 30 株海洋绿藻的总脂含量和脂肪酸组成 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, **30**(3): 428-434.
- [24] 李荷芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究 [J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(1): 34-40.
- [25] 黄鸿洲, 康燕玉, 梁君荣, 等. 五种底栖硅藻(鲍鱼饵料)的脂肪酸组成分析 [J]. 植物生理学通讯, 2007, **3**(2): 349-354.
- [26] 孙利芹, 杨林涛. 环境因子对球等鞭金藻脂肪酸含量和组成的影响 [J]. 食品研究与开发, 2006, **27**(5): 11-13.
- [27] 李春颖, 仇雪梅. 海洋微藻脂肪酸组成的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008(4): 63-65.
- [28] 俞建江, 李荷芳, 周汉秋. 10 种海洋微藻总脂、中性脂和极性脂的脂肪酸组成 [J]. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 481-488.
- [29] 蒋霞敏, 郑亦周. 14 种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究 [J]. 水生生物学报, 2003, **27**(3): 243-247.
- [30] Zhukova N V, Aizdaicher N A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae [J]. **Phytochemistry**, 1995, **39**(2): 351-356.
- [31] Evans C T, Ratledge C. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS14 [J]. **J Gen Microbiol**, 1984, **130**(7): 1 704-1 705.
- [32] Yoon S H, Rhee J A. Quantitative physiology of *Rhodotorula glutinis* for microbial lipid production [J]. **Process Biochem**, 1983, **18**(5): 2-4.
- [33] Spoehr H A, Milner H W. The chemical composition of *Chlorella*: Effect of environmental conditions [J]. **Plant Physiol**, 1949, **24**: 120-149.
- [34] Jara A de la, Mendoza H, Martel A, *et al.* Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptecodinium cohnii* [J]. **Appl Phycol**, 2003, **15**(5): 433-438.
- [35] 林学政, 李光友. 环境因子对微藻脂类的影响 [J]. 黄渤海海洋, 1999, **17**(4): 54-59.
- [36] Lynn S G, Kilham S S, Kreeger D A, *et al.* Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae) [J]. **Phycol**, 2000, **36**: 510-522.
- [37] Kemain A L, Somkuti G A, Hunter-Cevera J C, *et al.* Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture [M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. 253-259.
- [38] Grima E M, Sánchez Pérez J A, García Sánchez J L, *et al.* EPA from *Isochrysis galbana*. Growth conditions and productivity [J]. **Process Biochem**, 1992, **27**(5): 299-305.
- [39] Wang B, Li Y Q, Wu N, *et al.* CO₂ bio-mitigation using microalgae [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2008, **79**(5): 707-718.

- [40] Reitan K I, Rainuzzo J R, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae [J]. **Phycol**, 1994, **30**(6): 972-979.
- [41] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 不同营养因子对微藻 3 种培养方式产生 EPA 的影响 [J]. **食品研究与开发**, 2006, **27**(8): 185-188.
- [42] Yongmanitchai W, Ward O P. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production [J]. **Process Biochem**, 1989, **24**(4): 117-125.
- [43] El-Sheek M M, Rady A A. Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri* [J]. **Phyton**, 1995, **35**: 51-139.
- [44] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* [J]. **Phytochemistry**, 2006, **67**(7): 696-701.
- [45] Werner D. The Biology of Diatoms [M]. London: Black well scientific publications, 1977. 110-149.
- [46] Muradyan E A, Klyachko-Gurvich G L, Tsoglin L N. Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration [J]. **Russ J Plant Physiol**, 2004, **51**(1): 53-62.
- [47] 陈峰, 王菊芳, 梁世中. 几种无机盐对隐甲藻生长和 DHA 产量的影响 [J]. **湛江海洋大学学报**, 2001, **21**(4): 19-21.
- [48] Hutchins D A, Witter A E, Butlert A, *et al.* Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species [J]. **Nature**, 1999, **400**(6 747): 858-861.
- [49] Stewart W D P. Algal physiology and biochemistry [M]. London: Black Well Scientific Publications, 1974. 610-633.
- [50] Voltolina D, Sánchez-Saavedra M P, Torres-Rodríguez L M. Outdoor mass microalgae production in Bahia Kino, Sonora, NW Mexico [J]. **Aquacultural Engineering**, 2008, **38**(2): 93-96.
- [51] Richmond A. CRC Handbook of Microalgal Mass culture [M]. Florida, Boca Raton: CRC Press, 1986. 69-106.
- [52] Xin-Qing X, Berdall J. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalgae from an Antarctic hypersaline lake [J]. **Phytochemistry**, 1997, **45**(4): 655-658.
- [53] Peeler T C, Stephenson M B, Einsphar K J, *et al.* Lipid characterization of enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity [J]. **Plant Physiol**, 1989, **89**: 970-976.
- [54] Fujii S, Uenaka M, Nakayama S, *et al.* Effect of sodium chloride on the fatty acids composition in *Boeckelovia hooglandii* (Ochromonadales, Chrysophyceae) [J]. **Phycol Res**, 2001, **49**(1): 73-77.
- [55] 蒋霞敏, 柳敬海, 邢晨光. 不同生态条件对绿色巴夫藻生长与脂肪酸组成的影响 [J]. **水生生物学报**, 2007, **31**(1): 88-93.
- [56] Douchal J, Straka F, Lívanský K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor [J]. **Appl Phycol**, 2005, **17**(5): 403-412.
- [57] Riebesell U, Revill A T, Holdsworth D G, *et al.* The effects of varying CO₂ concentration on lipid composition and carbon isotope fractionation in *Emiliania huxleyi* [J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 2000, **64**(24): 4 179-4 192.
- [58] Stewart W D P. Algal Physiology and Biochemistry [M]. Berkeley: University of California Press, 1974. 236-265.
- [59] Mitz M A. CO₂ biodynamics: a new concept of cellular control [J]. **Theor Biol**, 1979, **80**(4): 537-551.
- [60] Tsuzuki M, Ohnuma E, Sato N, *et al.* Effects of CO₂ concentration during growth on fatty acid composition in microalgae [J]. **Plant Physiol**, 1990, **93**: 851-856.
- [61] Borowitzka M A, Borowitzka L J. Micro-algal Biotechnology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [62] 徐年军, 张学成. 温度、光照、pH 值对后棘藻生长及脂肪酸含量的影响 [J]. **青岛海洋大学学报**, 2001, **31**(4): 541-547.
- [63] Tatsuzawa H, Takizawa E, Wada M, *et al.* Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. [J]. **J Phycol**, 1996, **32**(4): 598-601.
- [64] Stadler T, Mellion J, Verdus M C, *et al.* Algal Biotechnology [M]. London: Elsevier Applied Science, 1988. 303-314.
- [65] Satu N, Murata N. Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: The central role of diacylmonoalactosylglycerol in thermo-adaption [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1980, **619**(2): 353-365.
- [66] Oliveira M A S, Monteiro M P C, Robbs P G, *et al.* Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures [J]. **Aquacult Int**, 1999, **7**(4): 261-275.
- [67] Richmond A E. Microalgaculture [J]. **Crit Rev Biotechnol**, 1986, **4**(4): 368-438.
- [68] Chen F, Johns M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana* [J]. **Appl Phycol**, 1991, **3**(3): 203-209.
- [69] Singh A, Ward O P. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) [J]. **Adv appl Microbiol**, 1997, **45**: 271-312.
- [70] 蒋汉明, 翟静, 张媛英, 等. 温度对海洋微藻生长及脂肪酸组成的影响 [J]. **食品研究与开发**, 2005, **26**(6): 9-12.
- [71] James C M, Al-Hinty S, Salman A E. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes [J]. **Aquaculture**,

- 1989, **77**(4): 337-351.
- [72] Thompson P A, Harrison P J, Whyte J N C. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton [J]. **J Phycol**, 1990, **26**(2): 278-288.
- [73] 石娟, 潘克厚. 不同光照条件对小新月菱形藻和等鞭金藻 8701 生长及生化成分的影响 [J]. **中国水产科学**, 2004, **11**(2): 121-128.
- [74] Emdadi D, Berland B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri* [J]. **Mar chem**, 1989, **26**(3): 215-225.
- [75] Hoppe H A, Leving T, Tanaka Y. Marine Algae in Pharmaceutical Science [M]. New York: De Gruyter, 1979. 473-523.
- [76] Mortenson S H, Borsheim K Y, Rainuzzo J K, *et al.* Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity [J]. **Exp Mar Biol Ecol**, 1988, **122**(2): 173-185.
- [77] Shelef G, Soeder C J, Balaban M, *et al.* Algal Biomass: Production and Use [M]. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. 619-626, 625-653.
- [78] Sukenik A, Carmeli Y, Berner T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. [J]. **J Phycol**, 1989, **25**(4): 686-692.
- [79] Sukenik A, Bennett J, Falkowski P G. Light saturated photosynthesis limitation by electron transport or carbon fixation? [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1987, **891**(3): 205-215.
- [80] Berner T, Dubinsky Z, Wyman K, *et al.* Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) [J]. **J Phycol**, 1989, **25**(1): 70-78.
- [81] Nalewajko C, Voltolina D. Effects of environmental variables on growth rates and physiological characteristics of Lake Superior phytoplankton [J]. **Can J Fish Aquat Sci**, 1985, **43**(6): 1 163-1 170.
- [82] Grobbelaar J U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures [J]. **Appl Phycol**, 2000, **12**(3-5): 201-206.
- [83] Becker E W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 293.
- [84] Yuan-Kun L. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential [J]. **Appl Phycol**, 2001, **13**(4): 307-315.
- [85] Lee Y K. Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend Trends [J]. **Biotechnol**, 1986, **4**(7): 186-189.
- [86] Janssen M, Tramper J, Mur L R, *et al.* Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2002, **81**(2): 193-210.
- [87] Carvalho A P, Meireles L A, Malcata F X. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances [J]. **Biotechnol Prog**, 2006, **22**(6): 1 490-1 506.
- [88] Chisti Y. Microalgae as sustainable cell factories [J]. **Environ Eng Man J**, 2006, **5**: 261-274.
- [89] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 有机碳源和氮源对三角褐指藻生长的影响 [J]. **水生生物学报**, 2008, **32**(2): 252-257.
- [90] Tan C K, Johns M R. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila* [J]. **Hydrobiologia**, 1991, **215**(1): 13-19.
- [91] Eriksen N T. The technology of microalgal culturing [J]. **Biotechnol Lett**, 2008, **30**(9): 1 525-1 536.
- [92] Wen Z Y, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae [J]. **Biotechnology Advances**, 2003, **21**(4): 273-294.
- [93] Yoon S H, Rhee J A. Quantitative physiology of *Rhodotorula glutinis* for microbial lipid production [J]. **Process Biochem**, 1983, **18**(5): 2-4.
- [94] Tan C K, Johns M R. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production [J]. **Appl Phycol**, 1996, **8**(1): 59-64.
- [95] Rattanapoltee P, Chulalakasanankul W, James A E, *et al.* Comparison of autotrophic and heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production [J]. **Biotechnol**, 2008, **136**(1): S412.
- [96] Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace [J]. **Biomol Eng**, 2003, **20**(4-6): 459-466.
- [97] Dunahay T G, Jarvis E E, Dais S S, *et al.* Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering [J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 1996, **57/58**: 223-231.
- [98] León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, *et al.* Transgenic microalgae as green cell-factories [J]. **Trends in Biotechnology**, 2004, **22**(1): 45-52.
- [99] Sawayama S, Inoue S, Dote Y, *et al.* CO₂ fixation and oil production through microalga [J]. **Energy Convers Manage**, 1995, **36**(6-9): 729-731.
- [100] Yun Y S, Lee S B, Park J M, *et al.* Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients [J]. **J Chem Technol Biotechnol**, 1997, **69**(4): 451-455.
- [101] 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.
- [102] 张祝钦. 新奥微藻制生物柴油中试成功 [EB/OL]. <http://www.newenergy.org.cn/Html/00812/12160823998.html>, 2008-12-16.

(本文编辑:张培新)