产油微藻胁迫培养策略研究综述

聂煜东[1,2,3*],耿媛媛[1],张贤明[1],蒋光明[1] (1.重庆工商大学,废油资源化技术与装备教育部工程研究中心,重庆 400067；2.重庆理工大学化学化工学院,重庆 400054；3.中国科学院生态环境研究中心,环境水质学国家重点实验室,北京 100085)

摘要：围绕微藻的胁迫培养,介绍了不同胁迫手段影响下产油微藻的生长及产油特点,对比了不同胁迫手段下微藻产油效果及各手段优劣势,在此基础上进一步综述了各因素胁迫在微藻油脂合成代谢中的作用机理,并给出了各胁迫手段在实际生产中的选用建议.以期通过该综述,对微藻生物柴油产业化中相关胁迫策略的选择提供借鉴.

关键词：生物柴油；产油微藻；胁迫培养；代谢机理

中图分类号：X17　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-6923(2021)08-3853-14

A review on stress cultivation strategies of oleginous microalgae. NIE Yu-dong[1,2,3*], GENG Yuan-yuan[1], ZHANG Xian-ming[1], JIANG Guang-ming[1] (1.Engineering Research Center for Waste Oil Recovery Technology and Equipment of Ministry of Education, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China；2.School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China；3.State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China). *China Environmental Science*, 2021,41(8)：3853~3866

Abstract：Several stress culture methods as well as their effects on the growth and lipid production of the oleaginous microalgae were firstly introduced in this paper. How the stress culture method affects the lipid synthesis and the metabolic process were then discussed. Finally, a series of suggestions in each stress culture method were given for the practical application. This review is expected to give a guideline in selection of cultivate strategy in the industrialization of microalgae biodiesel production.

Key words：biodiesel；oleaginous microalgae；stress cultivation；metabolic mechanism

为应对全球变暖等环境恶化问题并解决能源需求,开发可再生,环境友好型替代能源进而实现能源多元化成为人们的共识[1].当前,以生物柴油为代表的生物质能源越来越受到人们的关注.基于不同的原料来源,生物柴油的发展可划分为三代.以玉米,大豆等农作物为原料转化的生物柴油属于第一代生物质能源,但其不仅直接消耗粮食,同时会由于占用耕地而间接影响粮食产量[2-3].

以油棕,麻风树等非粮食类油料植物制备的生物柴油属于第二代生物质能源,其对耕地无直接影响,且对环境的影响小,但转化率低,经济可行性差制约了其发展[4].以微藻衍生的生物柴油属于第三代生物质能源,目前已应用于航空燃料[5].与玉米,大豆,油棕等相比,微藻光合效率更高,因而在生物量,油脂和生物柴油产率方面更具潜在优势[6];微藻生物柴油相比普通柴油而言,氧,硫含量低,燃烧时产生的一氧化碳和硫化物较少,并且无芳香烃污染;此外,微藻作为生物柴油的原料,能够有效减少用于粮食生产的耕地压力[7-8].因此,微藻生物柴油被认为是极具潜力的环保型化石燃料替代能源.

然而,当前微藻产油成本仍然不能满足微藻生物柴油的大规模商业推广,其中微藻油脂产率是影响产油成本的关键因素之一,其主要取决于微藻种类及其培养环境[9-10].从藻种方面看,小球藻,栅藻,布朗葡萄藻,三角褐藻等被认为是最具产油潜力的能源微藻(表 1),然而常规培养下其油脂产率仍然不能满足需求[11].构建基因工程藻种提高其产油能力固然是一种选择,但适合用于改造的藻种不多,相关基因表达调控机制未完全明确,且缺乏具体的生物学工具(如有效的核转变,启动子和选择标记以及转基因的稳定表达等)[12];此外,基因工程藻种在使用过程中存在一定生态风险.因此,通过控制培养环境促进微藻油脂合成成为提高微藻油脂产率,降低微藻生物柴油成本的有效途径之一[13].例如,提高或降低培养基中营养元素含量,被证明有助于微藻油脂积累[14-15];提高或降低光强,升高或降低温度,改变培养

收稿日期：2021-01-12

基金项目：重庆市科委基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0734)；重庆市教委自然科学项目(KJ1600620);高层次人才启动项目(1856003)；重庆工商大学重点平台开放项目(KFJJ2018064)

* 责任作者, 助理研究员, nieyudong@126.com

环境的 pH 值,提高盐度等手段也常被用来诱导微藻油脂积累[16-18].这类改变培养条件的手段通常会对微藻生长造成胁迫,一定程度上刺激了胞内油脂合成.这些胁迫主要可分为三类,包括以改变碳氮磷等营养元素为代表的营养胁迫,以改变温度,光照,pH 值等为代表的环境胁迫,以及以不同胁迫方式耦合而来的联合胁迫.本文从影响产油微藻生长的主要因素出发,对相关胁迫培养策略进行了综述,并对微藻胁迫培养促进生物油脂合成的机理进行了概述;最后结合实际案例,对未来微藻胁迫产油的策略选择进行了建议和展望.

表 1 常见淡水和海水微藻的油脂含量[19-20]

Table 1 The lipid content of the normal freshwater and seawater microalgae

藻种	含油量(%干重)	生长环境
葡萄藻属	25.9~75.0	淡水
角毛藻	14.6~39.8	淡水
浮水小球藻	19.6~63	淡水
绿球藻属	19.3	淡水
杜氏藻	23.1	淡水
斜生栅藻	11.0~55.0	淡水
四尾栅藻	1.9~18.4	淡水
莱茵衣藻	21	淡水
普通小球藻	14~22	淡水
栅藻属	19.6~21.1	淡水
眼虫藻	14~20	淡水
蛋白核小球藻	10~30	淡水
原始小球藻	40~58	淡水
布朗葡萄藻	25~75	海水/淡水
菱形藻	45~47	海水/淡水
微拟球藻	31~68	海水/淡水
扁藻	15~23	海水/淡水
筒柱藻	16~37	海水
隐甲藻	20%	海水
裂壶藻	50~77	海水
巴夫藻	30.9	海水
微绿球藻	22.7~29.7	海水
盐生杜氏藻	6	海水
等鞭金藻	7.0~40.0	海水
钝顶螺旋藻	4.0~16.6	海水
南极冰藻	29.0~65.0	海水
三角褐指藻	18.0~57.0	海水

1 主要胁迫培养手段

当前,大部分微藻的油脂产率仍不够理想,为进一步提高微藻的产油能力,根据影响微藻生长和产油的因素,相应的开发出了包括营养胁迫,环境胁迫及营养-环境联合胁迫等微藻胁迫培养手段(表 2).

表 2 各种胁迫培养手段特点

Table 2 Features of the diverse stress cultivaton methods

胁迫类型		藻株	胁迫效果	特点
碳胁迫	无机碳	斜生栅藻[21]	10% vol CO_2 培养下生物量为 1.84g/L,油脂含量约为藻细胞干重 19.9%~24.4%	1.可促进生物质产量和油脂合成 2.过高 CO_2 浓度会导致藻细胞的氧化损伤 3.可用于回收废气中 CO_2 4.能够用于驯化微藻,提高其固碳效率
		蛋白核小球藻[21]	30%,50% vol CO_2 培养下油脂含量和多不饱和脂肪酸含量分别为 26.02%,26.75%;64.99%,67.06%	
		节旋藻[22]	15% vol CO_2 驯化后生物量和油脂含量分别提高了 37.9%和 32.5%	
		三角褐指藻[23]	0.15% vol CO_2 培养下油脂含量增加了 15.76%	
		杜氏盐藻[24]	10% vol CO_2 培养下两株杜氏盐藻生物量分别达到 2.8,3g/L,油脂含量分别提高了约 2 倍和 2.3 倍	
		球等鞭金藻[25]	10% vol CO_2 培养下油脂含量约为 45.15%	
		等鞭金藻[25]	10% vol CO_2 培养下油脂含量约为 47.15%	
		微拟球藻[25]	10% vol CO_2 培养下油脂含量约为 41.20%	
		硅藻,绿藻[26]	5% vol CO_2 培养下藻细胞油脂含量增加了 11.21%	
	有机碳	普通小球藻[27]	15g/L 的葡萄糖作为外加碳源,油脂含量为 1.025g/L	1.有机碳源的添加能促进微藻生长和油脂合成 2.其成本较无机碳源高 3.可用于回收废水中的有机物
		小球藻[28]	2g/L 的有机碳添加至培养基中,生物量增加了 1.79~1.86 倍	
		微拟球藻[29]	10g/L 蔗糖渣添加于培养基后微藻脂肪酸含量为 170.51mg/g ,是对照组的 1.22 倍	
		眼虫藻[30]	4g/L 甘露醇和木糖醇添加后,生物量分别是对照组的 4.64 倍和 3.18 倍,油脂含量分别是对照组的 1.82 和 1.49 倍	
氮胁迫		魏氏真眼点藻[31]	3mmol 碳酸氢铵为氮源时,藻细胞油脂含量高达 59.24%	1.是藻细胞油脂积累最常见和有效的手段 2.饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的品质好 3.一定程度上会抑制藻细胞的生长
		蛋白核小球藻[32]	6mmol/L 硝酸钠培养条件下藻细胞油脂含量约为 39.3%	
		埃氏小球藻[33]	0.75g/L 的硝酸钠为氮源时,生物量为 3.2g/L,油脂含量为 40.36%,油脂产量是标准氮浓度下的 1.4 倍	
		普通小球藻[34]	4.5mmol/L 的硝酸钠为氮源时,生物量达 3.8g/L,油脂含量达 48.32%	

续表 2

胁迫类型	藻株	胁迫效果	特点
磷胁迫	凯氏小球藻[35-36]	无磷酸二氢钾培养基中油脂含量是对照组的 1.02 倍	1.可促进藻细胞油脂积累 2.通过影响碳的流向来调控代油脂的合成 3.不同磷形态对胁迫产油效果有影响
磷胁迫	莱茵衣藻[37]	0.4g/L 磷浓度培养条件下十六(烷)酸含量占据所有脂肪酸成分的 56%	
磷胁迫	等鞭金藻[38]	0.25mg/L 磷源培养条件下饱和脂肪酸含量为正常磷含量 15mg/L 的 1.33 倍	
磷胁迫	三角褐指藻[39]	1.8μmol/L 和 18μmol/L 一水磷酸二氢钠培养条件下总脂肪酸含量分别为 49.9%,81.1%	
磷胁迫	球等鞭金藻[39]	1.8μmol/L 和 18μmol/L 一水磷酸二氢钠培养条件下总脂肪酸含量分别为 116.6%,80.7%	
磷胁迫	角毛藻[39]	1.8μmol/L 和 18μmol/L 一水磷酸二氢钠培养条件下总脂肪酸含量分别为 96.0%,49.8%	
磷胁迫	单胞藻[39]	0μmol/L 磷酸氢二钾培养条件下细胞内 TAG 含量是 175μmol/L 的 6~7 倍	
光胁迫 光强 高光	单针藻[17]	400 与 40μmol/(m^2·s)培养条件下油脂含量分别为 33.03%,22.90%	1.光照强度的高低能否对微藻生物量和油脂含量的积累取决于藻株 2.光照胁迫涉及能耗问题
光胁迫 光强 高光	小球藻[17]	400 与 40μmol/(m^2·s)培养条件下油脂含量分别为 43.47%,30.70%	
光胁迫 光强 高光	斜生栅藻[40]	200~500μmol/(m^2·s)光照培养条件下油脂含量逐渐增加,在 500μmol/(m^2·s)获得最大油脂含量为 38.0%	
光胁迫 光强 低光	微拟球藻属[17]	2000μmol/(m^2·s)时生物量最低,油脂含量约为 35%,在 10000μmol/(m^2·s)时生物量最高,但油脂含量约为 19%	
光胁迫 光照周期	栅藻[41]	光暗周期 L:D=18:6 时,藻细胞浓度最大 6.5×10^{7}cells/mL,油脂含量为 31.3%	
光胁迫 光质	小球藻[42]	小球藻的最适生长光质条件为蓝光,白光,黄光,绿光和红光;最佳产油条件为蓝光,白光,绿光,黄光和红光.在蓝光胁迫下小球藻的藻细胞密度和油脂含量均达最高,分别为 2.3×10^{7}cells/mL,28.37%,在蓝光下,所得到脂肪酸转化得到的生物柴油燃烧性能最佳	
光胁迫 光质	衣藻[43]	100μmol/(m^2·s)蓝光和红光培养条件下,生物量分别为 0.335g/L 和 0.1988g/L 油脂含量分别为 29.86%,27.52%,红蓝光(1:2)油脂含量最高,达到 35.25%	
光胁迫 光质	棕囊藻属[44]	0.37 与 1.59W^{-2}UV-B 照射下,多不饱和脂肪酸的含量分别是 56%,48%	
光胁迫 光质	三角褐指藻[45]	60μmol/(m^2·s)PAR+13.73W/m^{2}UVAR+1.04W/m^{2}UVBR 照射下,藻细胞内多不饱和脂肪酸含量为 34.30%	
光胁迫 光质	金色奥杜藻[46]	UV-R 照射 8d 后,多不饱和脂肪的含量为 27.0%~28.0%	
温度胁迫 高温胁迫	四尾栅藻[47]	40℃培养 1d,油脂含量增加到 33.5%,油脂产率在第 1d 达到最大值 23.2mg/(L·d)	1.高温利于非极性脂合成,低温利于极性脂合成 2.不同藻种对温度的要求各异
温度胁迫 高温胁迫	尖状藻[48]	35℃培养条件下油脂含量为 22.72%,其中,中性脂含量为 59%	
温度胁迫 高温胁迫	球等鞭金藻[49]	15℃培养条件下,获得最佳蛋白质含量和碳水化合物含量;30℃培养条件下,油脂含量达 50%	
温度胁迫 低温胁迫	球等鞭金藻[49]	在 15 与 30 ℃培养条件下,多不饱和脂肪酸分别为 82.1%,58.1%	
温度胁迫 低温胁迫	巴夫藻[50]	培养温度从 20~25 ℃时,总脂肪酸含量逐渐降低,从 2.2pg/cell 下降至 1.4pg/cell	
温度胁迫 低温胁迫	三角褐指藻[51]	培养温度从 25℃降低到 10℃时,多不饱和脂肪的含量增加,最高产量可达 12.4mg/L	
pH 值胁迫	南极冰藻[52]	在 160mmol/L 碳酸氢钠 pH 值为 9.5 培养条件下时,获得最佳生物量为 1.32g/L,油脂含量为 327mg/g	1.是最简单的胁迫手段 2.不同的藻种最适 pH 值不同 3.通过影响营养盐形态影响细胞代谢
pH 值胁迫	三角褐指藻[53]	pH 值从 8.2~8.5 时,藻细胞密度增加了 3 倍	
pH 值胁迫	西盘藻[54]	pH 值为 9.4 时,生物量和甘油三酯含量最大,分别为 1.08g/L,6.2%	
盐胁迫	杜氏盐藻[55]	盐浓度从 3mol/L 下降至 2mol/L 时,油脂含量从 350g/kg 增加至 430g/kg	1.高盐胁迫下能促进藻细胞油脂积累 2.高盐环境下能保持培养物无菌,避免污染 3.盐胁迫依赖于藻种,只适合耐盐株
盐胁迫	栅藻属[56]	200mmol/L 氯化钠添加于培养基中藻细胞油脂含量是正常培养条件下的 1.09 倍	
盐胁迫	微拟球藻[57]	在盐浓度为 20~40g/L 培养条件下,在 20g/L 获得最大油脂产率分别为 45.05mg/(L·d),在 40g/L 获得最小油脂产率,为 38.57mg/(L·d)	
盐胁迫	隐甲藻属[58]	当氯化钠浓度为 9g/L 时,生物量和 DHA 含量最大,分别为 2.51g/L,131.55mg/L	
盐胁迫	双对栅藻 FACHB-78[59]	在盐度为 10‰条件下,甘油三酯浓度和含量均达最大值,分别为 250.88mg/L 和 22.41%,比正常培养时提高了 97.05%和 82.09%	
其他胁迫 阻断剂	莱茵衣藻[60]	培养基中添加了 10μg/mL 的丁苯吗啉 1h 后,藻细胞内油脂含量至少是对照组的 4 倍	1.在几个小时之内诱导细胞 TAG 积累 2.丁苯吗啉,布雷菲德菌素 A 价格较贵 3.叠氮化钠有剧毒,可能会对环境造成污染
其他胁迫 阻断剂	莱茵衣藻[61]	75μg/mL 雷菲德菌素 A 处理 4h 后藻细胞 TAG 含量是未添加布雷菲德菌素 A 组的 1.3 倍	
其他胁迫 阻断剂	绿藻[62]	20μmol/L 叠氮化钠抑制藻细胞对氮元素的利用,使得藻细胞处于氮胁迫环境进而积累油脂	
其他胁迫 固定剂	褐小球藻[63]	周期性添加 50mg/L MEA 于培养基中增加了微藻固碳效率,蛋白质含量和油脂含量分别是对照组的 1.07 倍,1.49 倍	1.MEA 可以促进微藻的固碳作用,但浓度过高会抑制微藻生长 2.过高 MEA 具有腐蚀性
其他胁迫 固定剂	栅藻[64]	培养基中添加 100mg/L MEA 使得微藻生物量提高了 16.7%	
其他胁迫 固定剂	海洋微拟球藻[65]	1%吐温 80 添加于培养基中,微藻生物量提高了 1.89 倍,多不饱和脂肪酸含量增加了 37%	
其他胁迫 固定剂	单针藻[66]	在光胁迫条件下添加 1,10 和 100μmol/L 褪黑素,藻细胞中性油脂含量分别比对照组提高 1.32,1.24,1.16 倍,且最高油脂含量可达 49.6%	

续表 2

胁迫类型		藻株	胁迫效果	特点
联合胁迫	缺氮和温度胁迫	莱茵衣藻[67]	在无氮与高温 30℃联合胁迫下,最大油脂产率达 115.75mg/(L·d)	
	缺氮和盐胁迫		在无氮与高盐 200mmol/L 联合胁迫下,最大油脂产率达 131.86mg/(L·d)	
	高温与盐胁迫		在高温 30℃与高盐 200mmol/L 联合胁迫下,最大油脂产率达 121.28mg/(L·d)	
	高 pH 值值与盐胁迫		在 pH 值为 10 与高盐 200mmol/L 联合胁迫下,最大油脂产率达 111.42mg/(L·d)	
	低温和低光照胁迫	短角毛藻[68]	在低温(3℃和 7℃)与低光(10,25,75,150μmol/(m^2·s))联合胁迫下,多不饱和脂肪酸含量为分别为 1.66,1.59,1.08,1.21,1.64,1.21,1.23,1.55fg/μm^3	
		海链藻[68]	在低温(16℃和 20℃)与低光(10,25,75,150μmol/(m^2·s)联合胁迫下,多不饱和脂肪酸含量为 2.57,0,2.74,2.2,1.88,2.17,0,2.39fg/μm^3	
		塔胞藻[68]	在低温 3℃与低光 150μmol/(m^2·s)联合胁迫下,多不饱和脂肪酸含量为分别为 8.75fg/μm^3	
	缺氮和缺磷胁迫	等鞭金藻[38]	在无氮无磷培养条件下饱和脂肪酸的含量为 36.90%,是正常氮磷培养条件下的 1.4 倍	

2 营养胁迫

微藻生长及其油脂组成与培养基中营养成分密切相关,培养基中碳,氮,磷等营养元素的胁迫作用,会直接影响藻细胞的代谢过程,从而让更多的物质和能量进入油脂代谢,促使微藻油脂快速积累.虽然营养胁迫对不同藻种的胁迫效果有所差异,但其总体来说仍被认为是促进微藻油脂积累最常用和有效的方法之一,且营养胁迫不仅会影响油脂的产量,还会调节极性脂质和非极性脂质的相对比例,因此其对油脂的量和质有同步影响.

2.1 碳胁迫

碳是构成微藻细胞的基本元素之一,在藻细胞的光合作用和呼吸代谢两个过程中起至关重要的作用.碳源主要分为无机碳源(CO^2,HCO_3^-,CO_3^{2-}等)和有机碳源(葡萄糖,乙酸,甘油等)两大类,其很大程度上影响着微藻脂肪酸的组成和代谢.CO_2 对微藻生长及油脂积累有十分重要的作用.郭琪等[69]利用 5% vol CO_2,10% vol CO_2 培养两株栅藻,结果表明 10% vol CO_2 浓度使栅藻 FACHB-1545 和栅藻 FACHB-1600 培养 18d 后最大生物量分别是空气组的 2.3 倍和 1.6 倍,最大油脂产率是空气组的 1.48 和 1.26 倍.部分微藻如小球藻,微拟球藻等可利用有机碳源进行异养或兼性培养,如 Patidar 等通过外加 5g/L 葡萄糖,20g/L 果糖,获得最大油脂含量,分别为 39.06%,26.71%[70],但有机碳源的价格使得该方法推广受到限制.近些年来,为解决有机碳源胁迫产油成本问题,以废水中的有机物(糖类,淀粉,乙酸盐)作为微藻碳源受到研究人员的广泛关注.刘香华等[27]考察了 3 种碳源(葡萄糖,$NaHCO_3$,乙酸钠)对小球藻生长和产油的胁迫影响,研究结果表明葡萄糖相对于其它两种无机碳源更能促进微藻的生长和油脂积累.综上,控制碳源含量和形态是碳胁迫微藻生长和产油的重要途径.

碳胁迫条件下微藻油脂积累的主要机制如图 1 所示,在 15% vol CO_2 的胁迫下,丙酮酸脱氢酶(PDHC)和乙酰辅酶 a 羧化酶(ACC)相关的基因表达均增加,丙酮酸盐转化为丙酮酸进而由乙酰辅酶 a 通向丙二酰辅酶 a 的通路增强;中间代谢物丙酮酸盐能更多地流向了丙二酰辅酶 a 和丙二酰载体蛋白,并与较短的碳链反应生成较长的碳链,强化了脂肪酸的合成通路.此外,碳胁迫下催化第一步碳链加氢反应的 3-酮脂酰基载体蛋白还原酶的基因上调,增强了脂肪酸的氢化过程,使脂肪酸的不饱和度下降,其与碳链加长过程的增强共同促进整个脂肪酸的合成代谢,最终提高了藻细胞内油脂含量,同时也改变了油脂的成分[22].

综上所述,在高碳胁迫条件下,藻细胞内油脂代谢途径会发生变化,进而诱导藻细胞积累更多油脂.基于提高微藻油脂产率的目的,可通过控制碳源形态和含量,并结合藻细胞光合活性和油脂代谢途径的相关基因表达调控来进一步强化高碳胁迫对微藻生长和油脂积累的促进作用.

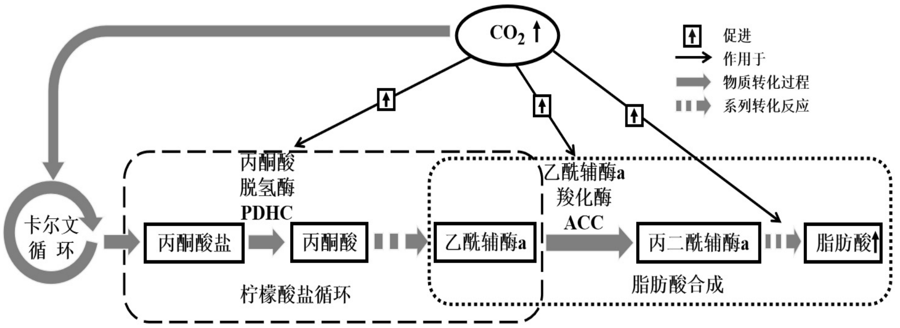

图 1　碳胁迫下藻细胞油脂积累的代谢途径[22,71]

Fig.1　Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under carbon stress

2.2　氮胁迫

氮是微藻合成叶绿素,生物大分子如蛋白质,核酸及含氮脂质等物质的基本元素,是微藻细胞生长最重要的营养元素之一.此外,对于诸多微藻物种,脂质含量与氮源浓度之间存在线性关系.例如,苏怡等[31]通过分别控制 $NaNO_3$,NH_4HCO_3,$(NH_2)_2CO$ 的浓度为 18,9,6,3mmol 四个梯度对真眼点藻属,魏氏藻属,眼点拟微绿球藻进行培养,发现氮浓度与油脂含量具有显著相关性.这是由于氮胁迫能够影响藻细胞的其他代谢途径,进而间接影响微藻脂质代谢.相关研究表明真核微藻光合固碳量的 40%与氮素经三羧酸循环共同合成蛋白质,然而在氮缺乏条件下,三羧酸循环代谢速率下降,从而促使本应进入三羧酸循环的碳源转而流向脂肪酸代谢[72-73].进一步的工作表明,微藻对不同氮源的利用能力存在差异,例如 NH_4Cl 为氮源的中肋骨条藻生长和产油情况优于 $NaNO_3$ 和尿素[74].因此,缺氮或氮源形态的控制均能够影响微藻的生长及油脂积累.

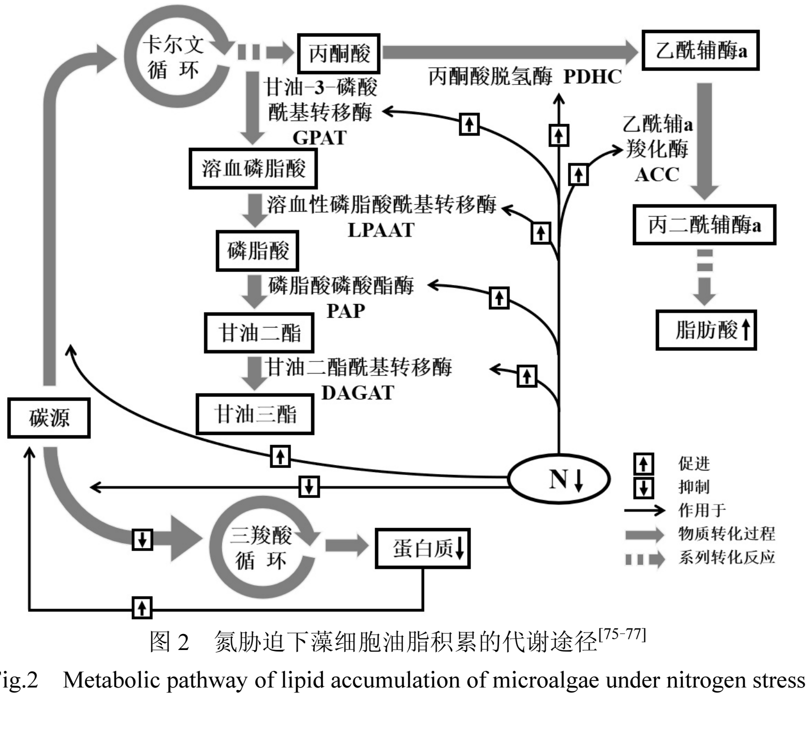

图 2　氮胁迫下藻细胞油脂积累的代谢途径[75-77]

Fig.2　Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under nitrogen stress

氮胁迫条件下微藻油脂积累的主要机制如图 2 所示.一方面,氮胁迫降低了蛋白质对碳源的竞争,更多碳源进入了卡尔文循环,为后续甘油三酯和脂肪酸积累奠定了物质基础[75];另一方面,细胞内源性含氮化合物如蛋白质或叶绿素降解,为油脂代谢提供了碳源和能量[76].在缺氮条件下,参与脂质积累的相关代谢酶的表达会上调,如与催化脂肪酸合成密切相关的乙酰辅酶 a,以及甘油三酯合成相关的几种酶,如甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT),甘油二酯酰基转移酶(DAGAT),磷脂酸磷酸酯酶(PAP),溶血性磷脂

酸酰基转移酶(LPAAT)等,这些酶活性的变化进一步促进了碳源向油脂的转化[77].

总体来说,在氮胁迫条件下,微藻油脂含量显著增加,其主要原因是在氮胁迫条件下细胞内碳源的重新分配,促使本该流向蛋白质合成的碳源转而流向油脂合成.因此,在使用氮胁迫的过程中,可通过调整氮的含量和形态来营造合适的缺氮环境,同时结合碳源的供给,将更多的碳源引导至油脂代谢.

2.3 磷胁迫

磷是影响微藻生长和产油的主要营养元素之一,是构成磷脂,DNA,RNA,ATP 等的必要元素,参与微藻的细胞分裂,物质合成,能量传递及信号传导等各种代谢活动[20].磷主要分为无机磷(PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}等)和有机磷(ATP,2-磷-甘油酸等)两类.研究表明,磷浓度及其形态对微藻脂质含量有一定影响[78]. Mandal 等[79]在磷浓度为 0.06~0.1g/L 的情况下培养栅藻,油脂含量从 29.5%下降至 10%, Arora[35]和 Chu 等[36]通过对小球藻无磷限制培养也得到相似的结果.然而,Reitan 等[39]将微拟球藻和扁球藻在磷浓度为 0.05~0.09mg/L 培养基中培养,发现油脂含量均有所降低.因此,对于不同藻种,磷胁迫对其产油效果的影响各不相同,采用磷胁迫时,除需要优化磷的形态和浓度外,还需针对性的选择合适藻种.

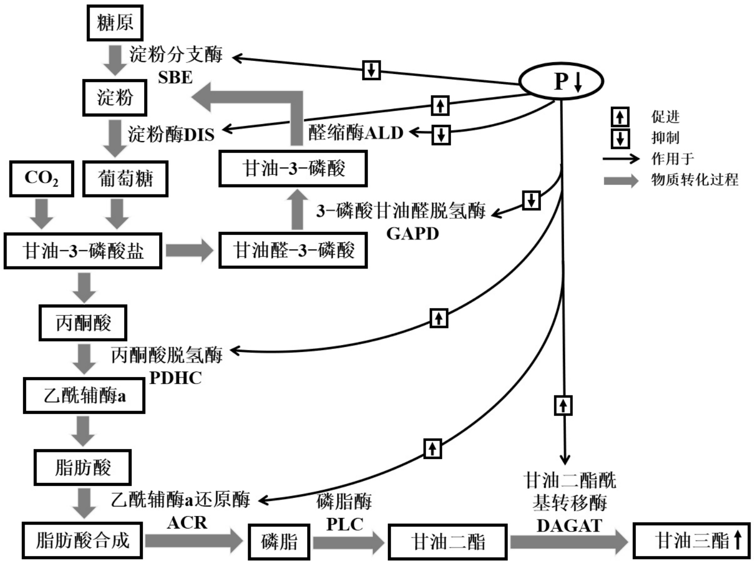

图 3 磷胁迫下藻细胞的油脂代谢途径[71,80-81]

Fig.3 Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under phosphorus stress

磷胁迫条件下藻细胞油脂积累的机制如图 3 所示,磷酸盐通过淀粉分支酶(SBE)和淀粉酶(DIS)的活性进而影响淀粉和油脂合成途径之间的碳流流向[80].淀粉合成与脂质合成具有共同的碳前体(甘油-3-磷酸盐),通过磷胁迫降低 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPD),醛缩酶(ALD)等关键酶活性从而阻断淀粉合成途径,可以增加脂质积累的代谢通量.同时,参与编译 DAGAT 和丙酮酸激酶的基因会上调,进而进一步促进了葡萄糖向油脂的转化[81].

综上所述,缺磷胁迫对微藻油脂合成具有促进作用,但同时也存在藻种在磷缺乏时含油量下降的情况,因此不同藻种在磷胁迫下其产油特征具有一定差异性.在采用缺磷胁迫培养微藻时首先要选择合适的藻种,同时要考虑到磷形态对微藻的影响.此外,由于磷胁迫培养下微藻油脂积累主要是通过抑制淀粉合成相关酶的活性,从而使更多的碳流向油脂代谢而来,因此缺磷胁迫中适当提高碳源供给,能够进一步促进油脂的合成.

3 环境胁迫

环境因素在影响微藻生长的同时,也影响微藻的代谢过程,从而导致包括油脂在内的细胞营养物质的含量变化.

3.1 光胁迫

光照是微藻生长和代谢的能量来源,是影响其生长速率和油脂积累最主要的因素之一.其中,光照强

度,光暗周期,光照波长是调控光照的三个主要方向.光照强度主要影响微藻的光合电子传递链,一定范围内,随着光强的增加,藻细胞的生物量也增加,当光照强度超过一定范围时,则会抑制藻细胞的生长,甚至导致藻细胞死亡[17].光照强度对微藻细胞内油脂含量的影响与微藻藻种有关.如小球藻在 200μmol/(m^2·s)胁迫下能获得最大生物量,在 400μmol/(m^2·s)胁迫下生物量受到抑制,油脂含量显著增加[82],但微拟球藻在低光强 2000Lux 胁迫下会诱导油脂积累,在高光强 10000Lux 胁迫下生物量增加了 2.8 倍[83].光暗周期同样会对微藻生物量和油脂含量产生影响,Ahmad 等通过对不同光照下栅藻进行培养,发现12:12(光:暗)下的生物量最大,24:0(光:暗)下生物量最低[41].然而,Wahidin 等[84]分别将微拟球藻在12:12(光:暗),18:6(光:暗)和 24:0(光:暗)下培养时,在18:6(光:暗)下时可以获得最大的生物量和油脂含量,因此光暗周期对微藻产油的胁迫影响也是因藻种而异.尹继龙等[42]发现光照波长也会对微藻生长和产油有着显著的影响,小球藻在蓝光胁迫下油脂含量最高, Das 等[85]也得到了相似的结果.总之,通过光照影响微藻生长及产油时,可同时通过光强,光暗比以及光质进行调节.

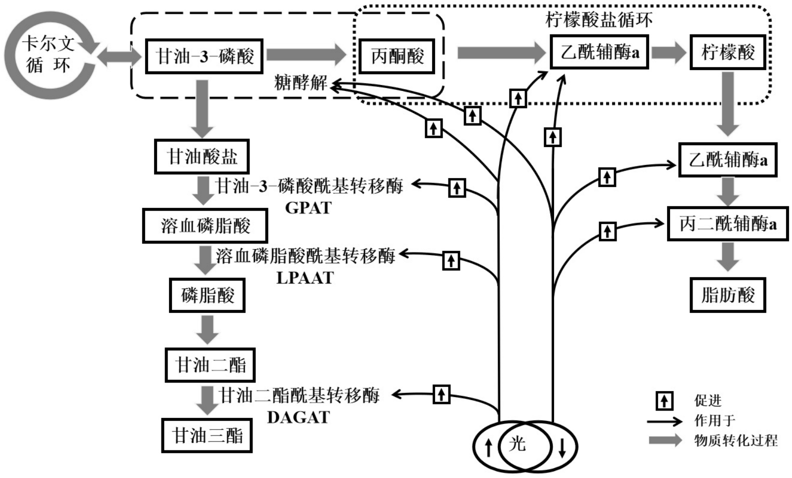

图 4　光胁迫下藻细胞的油脂代谢途径[86,88]

Fig.4　Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under light stress

光照胁迫影响油脂合成的主要机理如图 4 所示.在微藻的可耐受范围内,高光强通过提升光合作用促进微藻生长,同时通过提高 GPAT,LPAAT,DAGAT 等活性促进甘油三酯的合成,通过促进糖酵解,柠檬酸盐循环等增加了乙酰辅酶 a 的表达,进而在丙二酰辅酶 a 等的催化下进行脂肪酸的大量合成[86].脂肪酸的生物合成需要三磷酸腺苷(ATP)和还原型氢(NADPH),糖酵解和磷酸戊糖这两种途径为脂肪酸的生物合成提供 ATP 和 NADPH.Wang 等[87]研究表明在高光照胁迫条件下,糖酵解和磷酸戊糖这两种途径的表达会上调,因此促进了脂肪酸的合成.Wang 等[87]同时研究了低光照胁迫对微藻产油的影响,低光照胁迫对脂肪酸的合成同样具有一定促进作用,低光照胁迫下,糖酵解,卡尔文循环,三羧酸循环等碳循环会产生更多的乙酰辅酶 a,同时对丙二酰辅酶 a 等脂肪酸合成关键酶活性具有一定促进作用,因此有效地促进了脂肪酸的合成.

实际上,每种藻对光照的需求各异,光照强度,光照周期,光质等胁迫对微藻生长和油脂积累的影响效果还与藻种有关,因此在光胁迫时需要选择与其相适应的藻种.光胁迫对微藻油脂积累的影响主要通过调节其光合作用来实现,这涉及到过程中的一系列物质转化及细胞器间的物质转移过程[86],进一步找到光胁迫过程中调控光合作用的关键点,对于开发相应的光胁迫辅助措施从而促进油脂的合成至关重要.

3.2　温度胁迫

温度是影响微藻生长和油脂合成的重要因素之一.一般情况下,微藻的最佳生长温度为 20~30℃之间,在适宜温度范围之内,升高温度可以促进微藻光合作用相关酶的活性及功能,从而加快微藻生长,温度过高或过低时,微藻生长代谢率将急剧下

降,从而导致微藻生物量的减少[88-89].微藻对温度胁迫的应激与细胞膜系统的稳定性有很大相关性[90]. Richmond 等[91]研究表明低温胁迫下微藻为维持细胞膜的流动性以提高其对低温的耐受性,会大量合成不饱和脂肪酸.类似地,韩飞等[47]研究表明四尾栅藻在 40℃高温胁迫下,迅速将藻细胞内的多糖转化为油脂,以此抵抗不利环境,进而提高微藻自身的抗逆性.总之,温度适宜时将有利于微藻的生物量增长,而温度不利时将在一定程度上刺激油脂的合成.

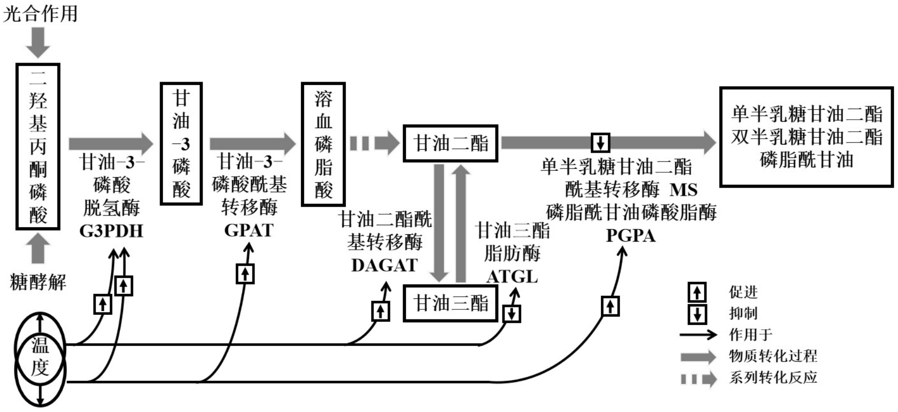

图 5 温度胁迫下藻细胞油脂积累代谢途径[92-93]

Fig.5 Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under temperature stress

温度胁迫对微藻油脂积累的影响机理如图 5 所示.其中,溶血磷脂酸的合成是胞内油脂生物合成的关键步骤.在低温胁迫下,催化甘油-3-磷酸转化为溶血磷脂酸的GPAT增加,同时催化甘油二酯向单半乳糖甘油二酯,双半乳糖甘油二酯及磷酯酰甘油等转化的关键酶如半乳糖甘油二酯酰基转移酶(MS)和磷脂酰甘油磷酸脂酶(PGPA)活性增加,使得极性脂及油脂含量增加[92].在高温胁迫下,甘油-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)和 DAGAT 的表达增加,G3PDH 能将二羟丙酮磷酸转化为甘油-3-磷酸,其中,二羟丙酮磷酸是最终转化为 TAG 或极性脂的第一步;与此同时,高温胁迫下甘油三酯脂肪酶(ATGL)表达下调,使得 TAG 转化为甘油二酯的量减少,因此 TAG 和总酯含量增加[93].

总的来说,高温和低温胁迫均能够促进微藻油脂的积累,高温条件下偏向于合成 TAG,而低温条件下更偏向于极性脂的合成.因此,在应用温度胁迫调控微藻油脂合成时,不但能够控制微藻油脂的量,还能够影响微藻油脂的质,这是温度胁迫较其他胁迫独有的特点.在实际工艺中合理利用温度胁迫的这个特点,有助于生物柴油最终品质的提升.

3.3 pH 值胁迫

环境 pH 值同样是影响微藻生长代谢的重要因素之一.Peng 等[52]研究表明南极冰藻在 pH 值为 7.5~9.5 的范围内,pH 值的增加会促进藻细胞的生长和油脂的积累.Gardne 等[53]认为不同藻种具有不同的最适 pH 值.例如南极冰藻等在较高的 pH 值下可以积累更多的油脂[52],而栅藻在 pH 值超过 6 时,脂质含量会随 pH 值的增加而下降[94].因此,选择与藻种相适宜的 pH 值范围对于微藻油脂积累十分重要.

pH 值胁迫对微藻生长及油脂积累的影响机理主要包括两个方面.首先,pH 值对环境中各元素的形态有着直接的影响.例如水样中碳形态的分布受 pH 值的直接影响,而碳的形态又进一步影响着微藻的生长和油脂积累[95];pH 值还会对某些营养元素的形态具有调控作用,如磷酸盐,铁和铵等,这同样影响微藻的生长和产油[96-97].其次,pH 值对微藻细胞的增殖和分化有着重要影响.Bartley 等[98]研究表明高 pH 值胁迫能够诱导细胞从增殖阶段转换至生物质生产阶段.即在该胁迫条件下,藻细胞会将部分细胞增殖分裂的能量转化到胞内 TAG 合成代谢中.碱性 pH 值胁迫下微藻的油脂积累主要是由于藻细胞分裂减缓,因此微藻在该 pH 值条件下通过牺牲细胞密度及膜脂含量,促进了胞内 TAG 的积累[99].

总而言之,在利用 pH 值胁迫微藻产油时,首先要根据藻种来选择合适的胁迫 pH 值;其次要将 pH

值与碳氮磷等元素的形态变化联系起来,从而更好地促进微藻生物量和油脂产率;最后要注意 pH 值对微藻的生理影响,在实际调控 pH 值时注意将其维持在一个合理范围内.

3.4　盐度胁迫

盐度是影响微藻生长和代谢产物积累的重要因素之一.有研究表明盐胁迫使螺旋藻细胞对强光的敏感性增强,会导致其光合放氧能力显著下降[100].类似地,鱼腥藻的净光合放氧速率和呼吸速率随 NaCl 浓度的升高而降低,使得鱼腥藻的生长被抑制[101].另一方面,有研究表明高盐度虽会抑制生物量,但却能促进藻细胞大量积累油脂.Miyasaka 等[102]的研究表明莱茵衣藻 HS-5 在高盐浓度下会积累大量的油脂,同样 Ben-Amotz 等[103]的研究表明盐胁迫下的杜氏盐藻细胞会大量合成甘油,且胞内甘油含量与外部盐浓度成正相关.

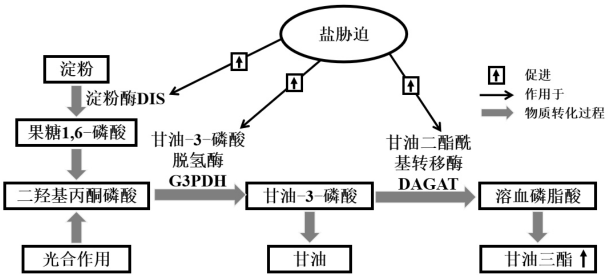

图 6　盐胁迫下油脂积累代谢途径[104-107]

Fig.6　Metabolic pathway of lipid accumulation of microalgae under salt stress

盐胁迫对微藻产油的影响机理如图 6 所示,其被认为是微藻细胞内碳流由淀粉向脂类转变的重要调节因素之一.微藻在盐胁迫条件下会产生一些代谢物质以保护自身不受盐分伤害,同时维持自身与外界的渗透压平衡,因此在盐胁迫条件下,油脂含量增加,淀粉的含量则降低[104].有研究发现在高盐胁迫下与油脂合成相关的关键物质乙酰辅酶 a 上调,而与淀粉合成相关的关键酶焦磷酸化酶表达下调,与此同时,盐胁迫下 DIS 的活性上升,使得胞内淀粉更快的分解为葡萄糖,进而转化为果糖 1,6-二磷酸和二羟基丙酮磷酸,在 G3PDH 和 DAGAT 的作用下,依次转化为甘油-3-磷酸和溶血磷脂酸;甘油-3-磷酸转化为甘油后成为 TAG 的前体物,而溶血磷脂酸经过 Kennedy 代谢后同样转化为 TAG[105-107].由于盐胁迫下 G3PDH 和 DAGAT 的活性也会上升,因此油脂得到进一步积累.

盐胁迫的成本较低且操作简便,但在使用时需注意将盐浓度控制在合理范围内.低浓度盐胁迫下生物量较高,但油脂积累不明显;高浓度盐胁迫下微藻胞内的油脂合成将得到大幅提升,但生物量会受到一定抑制;而盐浓度一旦超过了微藻的耐受性,将可能导致微藻的生物量大幅下降甚至死亡.此外,由于不同微藻对盐的耐受性不同,因此在实际操作时需根据藻种相应的选择其盐浓度范围.

4　其他胁迫

除碳,氮,磷等营养胁迫以及光,温度,pH 值,盐度等环境胁迫外,近年来,各种天然或人工合成的外源分子胁迫也引起了广泛关注,例如阻断剂,固定剂等.

阻断剂主要指的是能够抑制微藻胞内代谢过程的物质,通过抑制部分代谢能够让更多的碳源及能量流向油脂代谢,从而获得更高的油脂产率.研究表明,丁苯吗啉,布雷菲德菌素 A,叠氮化物等均属于这类物质,其能够影响微藻细胞内基本功能代谢,进而诱导甘油三酯大量积累.例如,Kim 等[60-61]研究发现在培养基中分别添加丁苯吗啉和布雷菲德菌素 A,经过丁苯吗啉处理 1h 后的莱茵衣藻细胞 TAG 含量至少是未添加组的 4 倍,添加了布雷菲德菌素 A 的培养基中 TAG 含量是未添加对照组的 1.3 倍. Zalogin 等[62]研究表明 20μmol/L 的叠氮化钠会抑制藻细胞硝酸盐还原酶的产生,影响微藻对氮的利用,形成胞内的缺氮环境,从而增加藻细胞油脂的合成.阻断剂的最大特点是见效较快,且由于投加量较小,因此成本较低;但在实际使用过程中要注意其毒性的影响,避免二次污染.

固定剂是一类能够与二氧化碳等微藻营养物质结合,并加快营养物质被微藻利用的小分子物质.如氢氧化钠,一乙醇胺(MEA),二乙醇胺(DEA)等均可强化微藻固碳进而促进微藻生长和油脂积累.Rosa 等[63]在培养基中周期性的添加 50mg/LMEA,油脂含量和蛋白质含量分别增加了 30.8%和 44%.Sun 等[64]探索 MEA 对微藻生长及代谢的影响时,发现当 MEA 浓度从 0 增加至 100mg/L 时,生物质较常规培养提高了 16.7%,但当 MEA 浓度增加至 150mg/L 时,微藻生长和胞内代谢活动均受到抑制.

醇胺类固定剂在实际使用时浓度不能过高,否则会生成具有毒性的中间体氨基甲酸盐,对微藻生长产生抑制作用;同时过高浓度的醇胺对设备具有严重腐蚀作用.此外,固定剂在实际使用中也具一定的局限性,如该类物质具有明显的时效性,固碳效果随着培养时间的延长而逐渐下降,因此在实际使用中需要注意及时补充固定剂.

除上述两类外源分子外,随着研究人员对该领域研究的深入,更多的胁迫物质,手段及思路被发现或提出.例如 Taoka 等[65]在培养基中添加表明活性剂如吐温 80,通过影响细胞膜通透性使更多的营养物质进入胞内,结果表明 1%的吐温 80 使生物量提高了 1.89 倍,多不饱和脂肪酸含量增加了 37%.李大菲等[66]在胁迫条件下添加抗氧化剂褪黑素用以消除胁迫过程中产生的氧化损伤,结果显示在 1,10 和 100 μmol/L 的褪黑素投加量下,藻细胞中性油脂含量分别比对照组提高 1.32,1.24,1.16 倍.总而言之,上述诸多手段为微藻胁迫产油提供了除营养胁迫和环境胁迫外的更多选择.

5 联合胁迫

以上各类胁迫在特定环境条件下应用于诱导微藻脂质合成时,均取得了较好效果.目前,在当前国内外不多的微藻生物柴油应用案例中,也大多采取突出单一胁迫效果的策略,例如荷兰 Algae Link 公司通过新型光生物反应系统控制微藻生长的光学条件,以此促进产油微藻的生长及产油代谢;以色列锡姆公司利用废弃中的高浓二氧化碳促进微藻的生长和产油;我国的新奥科技在内蒙采用煤化工高纯二氧化碳尾气培养微藻,降低了能源微藻培养成本并促进了微藻油脂积累[108].然而,上述单一胁迫手段虽对微藻油脂含量或油脂产率具有明显效果,但油脂产率仍然不能满足扩大化生产的要求,项目离实现盈利尚有差距.多项研究表明,多种胁迫策略相结合将比单一胁迫更有利于微藻脂质的生成[109].

Pal 等[110]对微拟球藻进行培养时,发现在氮源充足的培养环境下,添加 40g/L 氯化钠同时增强光照至 700 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$,甘油三酯含量较单一胁迫增加了 25%.Kwak 等[67]通过 3 株不同的莱茵衣藻,分别研究氮饥饿与高温度胁迫,氮饥饿和盐胁迫,高温和盐胁迫,高 pH 值和盐胁迫相结合的策略,研究结果表明不同策略之间的胁迫效果存在一定差异,但两种不同条件的联合胁迫均比单一胁迫更加明显地促进油脂的积累.因此,根据实际环境情况灵活选用胁迫方式,并采取多胁迫联合的策略,可以达到最大限度提高微藻油脂产量的目的,从而降低微藻产油成本.

6 结论与建议

6.1 结论

综上,各类胁迫培养均能不同程度地提升藻细胞油脂产率,但使用特点,方式及作用机理等各有差异.采用包括碳,氮,磷在内的营养胁迫时,可通过调控营养物质的形态和含量来控制效果,通过营养的胁迫让更多碳素流向油脂代谢,从而提高油脂的产率.采用光胁迫时,可通过调节光强,光照周期,光质等影响其光合作用,进一步影响一系列物质转化及细胞器间的物质转移,最终达到促进油脂合成的目的.采用温度胁迫时,根据高低温对油脂成分的不同影响,可调控微蕴生物柴油的品质.而在采用 pH 值胁迫培养微藻时,需要与营养盐形态结合起来考虑,且要注意 pH 值需维持在合理的范围内.盐胁迫与 pH 值胁迫类似,需要根据藻种来选择合理的盐度范围.

总而言之,无论是传统的营养胁迫和环境胁迫,还是各种新型的各类胁迫手段,归根结底是围绕着物质和代谢两方面来进行.因此,如何加大碳素供应,如何让更多碳素流向油脂合成代谢,是微藻产油胁迫中的最关键问题.

6.2 建议

针对未来微藻产油的相关研究以及实际应用中的胁迫策略选择,本文建议一是开发和采用更高效率的新型胁迫培养手段;二是针对性的建立和采用多胁迫联合的策略.通过这两个方向的努力,进一步提升微藻的产油效率,从而降低微藻生物柴油成本,最终实现微藻生物柴油的产业化.

参考文献:

[1] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products [J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(2):557-577.

[2] 李 华,王伟波,刘永定,等.微藻生物柴油发展与产油微藻资源利用 [J]. 可再生能源, 2011,29(4):84-89.

Li H, Wang W B, Liu Y D, et al. Development of microalgae biodiesel and utilization of oil-producing microalgae resources [J]. Renewable Energy, 2011,29(4):84-89.

[3] Borowitzka M, Moheimani N. Sustainable biofuels from algae [J]. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 2013,18(1): 13-25.

[4] Milano J, Ong H C, Masjuki H H, et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation [J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2016,5(8):180-197.

[5] Yang X Y, Guo F, Xue S, et al. Carbon distribution of algae-based alternative aviation fuel obtained by different pathways [J]. Renewable and Sustainable Energy Revview, 2016,54:1129-1147.

[6] Ullah K, Ahmad M, Sharma V K, et al. Algal biomass as a global source of transport fuels:Overview and development perspectives [J]. Progress in Natural Science: Materials International, 2014,24(4):329-339.

[7] 李方芳.微藻固定 CO_2 生产生物柴油的研究 [D]. 武汉:武汉科技大学, 2012.

Li F F. Research on the production of biodiesel by fixing CO_2 by microalgae [D]. Wuhan: Wuhan University of Science and Technology, 2012.

[8] Huang G H, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology [J]. Applied Energy, 2010,87(1):38-46.

[9] Griffiths M J, Hille R P, Harrison S T L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions [J]. Journal of Applied Phycology, 2012,24(5):989-1001.

[10] Breuer G, Lamers P P, Martens D E, et al. starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains [J]. Bioresource Technology, 2012,124:217-226.

[11] Carruthers D N, Godwin C M, Hietala D C, et al. Biodiversity improves life cycle sustainability metrics in algal biofuel production [J]. Environmental Science & Technology, 2019,53(15): 9279-9288.

[12] 董学卫.富油微藻繁育技术优化与蓝藻产不饱和脂肪酸的基因工程 [D]. 南宁:广西大学, 2018.

Dong X W. Optimization of breeding technology of oil-rich microalgae and genetic engineering of cyanobacteria to produce unsaturated fatty acids [D]. Nanning: Guangxi University, 2018.

[13] Klassen V, Blifernez-Klassen O, Hoekzema Y, et al. A novel one-stage cultivation/fermentation strategy for improved biogas production with microalgal biomass [J]. Journal of Biotechnology, 2015,215:44-51.

[14] Paliwal C, Mitra M, Bhayani K, et al. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae [J]. Bioresource Technology, 2017,244(Pt2): 1216-1226.

[15] Chen B, Wan C, Mehmood M A, et al. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review [J]. Bioresource Technology, 2017,244(Pt2):1198-1206.

[16] An M, Mou S, Zhang X, et al. Temperature regulates fatty acid desaturases at a transcriptional level andmodulates the fatty acid profile in the Antarctic microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L [J]. Bioresource Technology, 2013,134:151-157.

[17] He Q, Yang H, Wu L, et al. Effect of light intensity on pH ysiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae [J]. Bioresource Technology, 2015,191:219-228.

[18] Yang J, Cao J, Xing G, et al. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341 [J]. Bioresource Technology, 2015,175:537-544.

[19] Mata T M, Martins A A, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010,14(1):217-232.

[20] 薛　敏.氮磷培养条件对栅藻 SP-01 的生长和代谢产物的影响 [D]. 广州:中山大学, 2012.

Xue M. Effects of Nitrogen and phosphate on the growth and metabolism of *Scenedesmus* SP-01 [D].Guangzhou SUN YAT-SEN University, 2012.

[21] Tang D, Han W, Li P, et al. CO_2 biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO_2 levels [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3):3071-3076.

[22] 卢鸿翔.核诱变及碳胁迫促进微藻光合作用及生长固碳的机理研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2018.

Lu H X. Study on the mechanism of nuclear mutagenesis and carbon stress on promoting photosynthesis and carbon fixation of microalgae [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.

[23] Wu S, Gu W, Huang A, et al. Elevated CO_2 improves both lipid accumulation and growth rate in the glucose-6-phosphate dehydrogenase engineered phaeodactylum tricornutum [J]. Microbial Cell Factories, 2019,18(1):161.

[24] Moghimifam R, Niknam V, Ebrahimzadeh H, et al. The influence of different CO_2 concentrations on the biochemical and molecular response of two isolates of *Dunaliella* sp. (ABRIINW-CH2 and ABRIINW-SH33) [J]. Journal of Applied Phycology, 2020,32(1): 175-187.

[25] 李　林,郑　立,郑明刚,等.富碳培养对海洋富油微藻油脂积累特性的影响 [J]. 水生生物学报, 2013,37(6):1013-1019.

Li L, Zheng L, Zheng M G, et al. Effects of carbon-rich culture on the oil accumulation characteristics of marine oil-rich microalgae [J]. Acta Hydrobiology, 2013,37(6):1013-1019.

[26] 郝晓地,吴宇涵,胡沅胜.CO_2 对可沉微藻油脂含量的影响 [J]. 中国给水排水, 2018,34(11):1-5.

Hao X D, Wu Y H, Hu Y S. The influence of CO_2 on the oil content of sinkable microalgae [J]. China Water & Wastewater, 2018,34(11):1-5.

[27] 刘香华,刘　雷,曾慧卿.不同碳源及光照对小球藻生长和产油脂的影响 [J]. 安全与环境学报, 2012,12(3):6-10.

Liu X H, Liu L, Zeng H Q. Effects of different carbon sources and light on the growth and oil production of *Chlorella* [J]. Journal of Safety and Environment, 2012,12(3):6-10.

[28] Xie Z, Lin W, Liu J, et al. Mixotrophic cultivation of Chlorella for biomass production by using pH-stat culture medium: Glucose-acetate-phosphorus (GAP) [J]. Bioresource Technology, 2020,313: 123506.

[29] Manzoor M, Jabeen F, Younis T, et al. Sugarcane bagasse hydrolysate

as organic carbon substrate for mixotrophic cultivation of *Nannochloropsis* sp. BR2 [J]. Waste and Biomass Valorization, 2021:2321-2331.

[30] Zhu J, Wakisaka M. Effect of two lignocellulose related sugar alcohols on the growth and metabolites biosynthesis of *Euglena gracilis* [J]. Bioresource Technology, 2020,303:122950.

[31] 苏 怡,高保燕,黄罗冬,等.不同氮源及氮浓度对真眼点藻纲微藻生长及油脂积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2017,41(3):677-691.
Su Y, Gao B Y, Huang L D, et al. Effects of different nitrogen sources and nitrogen concentrations on the growth and lipid accumulation of microalgae in the class Euphorbiaceae [J]. Acta Hydrobiological Sciences, 2017,41(3):677-691.

[32] 赵 艳,汪 成.低氮胁迫对蛋白核小球藻生化组分和絮凝性能的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2019,25(3):143-151.
Zhao Y, Wang C. Effects of low nitrogen stress on the biochemical components and flocculation performance of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2019,25(3):143-151.

[33] 程蔚兰,邵雪梅,宋程飞,等.氮胁迫对埃氏小球藻生长及油脂积累的影响 [J]. 生物技术通报, 2017,33(11):160-165.
Cheng W L, Shao X M, Song C F, et al. Effects of nitrogen stress on the growth and lipid accumulation of *Chlorella escherichia* [J]. Biotechnology Bulletin, 2017,33(11):160-165.

[34] 吴琼芳.不同氮素浓度下产油普通小球藻的光合生理及生化特征研究 [D]. 广州:暨南大学, 2016.
Wu Q F. photosynthetic physiological and biochemical characteristics of *Chlorella vulgaris* under different nitrogen concentrations [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016.

[35] Arora N, Patel A, Pruthi P A, et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production [J]. Bioresource. Technology, 2016,213:79-87.

[36] Chu F F, Chu P N, Cai P J, et al. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency [J]. Bioresource technology, 2013,134:341-346.

[37] Qari H A, Oves M. Fatty acid synthesis by *Chlamydomonas reinhardtii* in phosphorus limitation [J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2020,52(1):27-38.

[38] Yu S J, Hu H, Zheng H, et al. Effect of different phosphorus concentrations on biodiesel production from *Isochrysis zhangjiangensis* under nitrogen sufficiency or deprivation condition [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019,103(12):5051-5059.

[39] Reitan K I, Rainuzzo J R, Olsen Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae [J]. Journal of Phycology, 1994,30(6):972-979.

[40] 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.

[41] Ahmad Latiffi N A, Radin Mohamed R M S, Apandi N M, et al. Experimental assessment on effects of growth rates *microalgae scenedesmus* sp. in different conditions of pH, temperature, light intensity and photoperiod [C]//Key engineering materials. Trans Tech Publications Ltd, 2017,744:546-551.

[42] 尹继龙,唐小红,郑洪立,等,等.不同光质对小球藻光自养培养积累油脂的影响 [J]. 生物加工过程, 2014,12(5):62-68.
Yin J L, Tang X H, Zheng H L, et.al. Effect of light wavelengths on lipid accumulation of Chlorella vulgaris in photoautotrophic culture [J]. Bioprocessing, 2014,12(5):62-68.

[43] 孙建瑞,赵君峰,符丹丹,等.不同光质对衣藻(Chlamydomonas sp.212)生长及油脂积累的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2020,26(4):1016-1022.
Sun J R, Zhao J F, Fu D D, et al. Effects of different lights on the growth and lipid accumulation of *Chlamydomonas* sp. 212 [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020,26(4):1016-1022.

[44] Skerratt J H, Davidson A D, Nichols P D, et al. Effect of UV-B on lipid content of three Antarctic marine phytoplankton [J]. Phytochemistry, 1998,49(4):999-1007.

[45] Liang Y, Beardall J, Heraud P. Effect of UV radiation on growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) [J]. Phycologia, 2006,45(6):605-615.

[46] Guihéneuf F, Fouqueray M, Mimouni V, et al. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of applied Phycology, 2010,22(5):629-638.

[47] 韩 飞.高温胁迫与超声刺激促进微藻油脂积累的过程及机理 [D]. 济南:山东大学, 2016.
Han F. The process and mechanism of high temperature stress and ultrasonic stimulation promoting oil accumulation in microalgae [D]. Jinan: Shandong University, 2016.

[48] Chokshi K, Pancha I, Trivedi K, et al. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions [J]. Bioresource Technology, 2015,180:162-171.

[49] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of Isochrysis galbana TK1 [J]. Journal of Applied Phycology, 1997,9(5):451-457.

[50] Tatsuzawa H, Takizawa E. Changes in fatty acid composition of *Pavlova lutheri* (Prymnesiophyceae) affected by culturing conditions [J]. Fisheries Science, 1995,61(2):363-364.

[51] Jiang H, Gao K. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2004,40(4):651-654.

[52] Peng L, Lan C Q, Zhang Z, et al. Control of protozoa contamination and lipid accumulation in *Neochloris oleoabundans* culture: effects of pH and dissolved inorganic carbon [J]. Bioresource Technology, 2015,197:143-151.

[53] Gardner R D, Cooksey K E, Mus F, et al. Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom phaeodactylum tricornutum [J]. Journal of Applied Phycology, 2012,24(5):1311-1320.

[54] Gardner R, Peters P, Peyton B, et al. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta [J]. Journal of Applied Phycology, 2011,

23(6):1005-1016.

[55] Takagi M, 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.

[56] Pancha I, Chokshi K, Mishra S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 107 [J]. Bioresource Technology, 2015,179:565-572.

[57] Mitra M, Patidar S K, George B, et al. A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production [J]. Algal Research, 2015,8:161-167.

[58] Jiang Y, Chen F. Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Crypthecodinium* cohnii [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999,23(6):508-513.

[59] 王　埒,孙　昕,李鹏飞,等.双对栅藻 FACHB-78 甘油三酯积累的盐胁迫条件优化 [J]. 中国环境科学, 2019,39(12):5248-5253.
Wang X, Sun X, Li P F, et al. Optimization of salt stress condition for accumulation of triglycerides in *Scenedesmus bijuga* FACHB-78. [J]. China Environmental Science, 2019,39(12):5248-5253.

[60] Kim H, Jang S, Kim S, et al. The small molecule fenpropimorph rapidly converts chloroplast membrane lipids to triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015,6:54.

[61] Kim S, Kim H, Ko D, et al. Rapid induction of lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A [J]. PLoS One, 2013,8(12):e81978.

[62] Zalogin T R, Pick U. Inhibition of nitrate reductase by azide in microalgae results in triglycerides accumulation [J]. Algal Research, 2014,3:17-23.

[63] Rosa G, Moraism G, Costa J A V. Fed-batch cultivation with CO_2 and monoethanolamine: influence on *Chlorella fusca* LEB 111 cultivation, carbon biofixation and biomolecules production [J]. Bioresource Technology, 2019,273:627-633.

[64] Sun Z, Zhang D, Yan C, et al. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO_2 from flue gas by monoethanolamine [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2015,90(4):730-738.

[65] Taoka Y, Nagano N, Okita Y, et al. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 111(4):420-424.

[66] 李大菲,赵永腾,余旭亚.褪黑素对单针藻油脂积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2018,42(2):421-427.
Li D F, Zhao Y T, Yu X Y. The effect of melatonin on the accumulation of lipids in mononeedle algae [J]. Chinese Journal of Hydrobiology, 2018,42(2):421-427.

[67] Kwak H S, Kim J Y H, Woo H M, et al. Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production [J]. Algal Research, 2016,19:215-224.

[68] Boelen P, van Dijk R, Damsté J S S, et al. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production [J]. AMB Express, 2013,3(1):26.

[69] 郭　琪,郑凌凌,沈　伟,等.不同二氧化碳浓度培养对两株栅藻碳固定速率及油脂积累的影响 [J]. 水生生物学报, 2016,40(2):414-418.
Guo Q, Zheng L L, Shen W, et al. Effects of culture with different carbon dioxide concentrations on the carbon fixation rate and lipid accumulation of two *Scenedesmus* strains [J]. Acta Hydrobiology, 2016,40(2):414-418.

[70] Patidar S K, Mitra M, George B, et al. Potential of *Monoraphidium minutum* for carbon sequestration and lipid production in response to varying growth mode [J]. Bioresource Technology, 2014,172:32-40.

[71] Bajhaiya A K, Dean A P, Zeef L A H, et al. PSR1is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Physiology, 2016,170(3):1216-1234.

[72] Berges J A, Harrison P J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton [J]. Limnology and Oceanography, 1995,40(1):82-93.

[73] Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, et al. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom phaeodactylum tricornutum under nitrogen stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015,112(2):412-417.

[74] 乔　倩,王朝晖,郭　鑫.不同氮源对中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)生长的影响 [J]. 生态学杂志, 2016,35(8):2110-2116.
Qiao Q, Wang Z H, Guo X. Effects of nitrogen sources on the growth of Skeletonema costatum [J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(8):2110-2116.

[75] Guerra L T, Levitan O, Frada M J, et al. Regulatory branch points affecting protein and lipid biosynthesis in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Biomass and Bioenergy, 2013,59:306-315.

[76] 冯　佳,朱顺妮,许　瑾,等.氮胁迫下绿球藻 GIEC-38 光合固碳富集油脂机理研究 [J]. 太阳能学报, 2020,41(2):13-19.
Feng J, Zhu S N, Xu J, et.al. Gene expression related to photosynthetic carbon-sequestration and lipid enrichment of *Chlorococcum* sp. GIEC-38 under nitrogen deficiency stress [J]. Acta Energies Solaris Sinica, 2020,41(2):13-19.

[77] Nagappan S, Devendran S, Tsai P C, et al. Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae [J]. Process Biochemistry, 2020,91:1-14.

[78] Kamalanathan M, Gleadow R, Beardall. Impacts of phosphorus availability on lipid production by *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research, 2015,12:191-196.

[79] Mandal S, Mallick N. Microalga Scenedesmus obliquus as a potential source for biodiesel production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009,84(2):281-291.

[80] Yao C, Jiang J, Cao X, et al. Phosphorus enhances photosynthetic storage starch production in a green microalga (Chlorophyta) *Tetraselmis subcordiformis* in nitrogen starvation conditions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018,66(41):10777-10787.

[81] Yang F, Xiang W, Li T, et al. Transcriptome analysis for phosphorus starvation-induced lipid accumulation in *Scenedesmus* sp [J].

Scientific Reports, 2018,8(1):1-11.

[82] 陈爱玲.氮,磷,硫及光对类波氏真点藻油脂积累的调控和转录组学分析 [D]. 广州:暨南大学, 2018.

Chen A L, The regulation and transcriptomics analysis of oil accumulation by nitrogen, phosphorus, sulfur and light on *Euphorbia bodhii*-like algae [D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.

[83] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation [J]. Bioresource Technology, 2012,110:510-516.

[84] Wahidin S, Idris A, Shaleh S R. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. [J]. Bioresource Technology, 2013,129:7-11.

[85] Das P, Lei W, Aziz S S, et a1. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light [J]. Bioresource Technology, 2011,102(4):3883-3887.

[86] Alboresi A, Perin G, Vitulo N, et al. Light remodels lipid biosynthesis in *Nannochloropsis gaditana* by modulating carbon partitioning between organelles [J]. Plant Physiology, 2016,171(4):2468-2482.

[87] Wang B, Jia J. photoprotection mechanisms of *Nannochloropsis oceanica* in response to light stress [J]. Algal Research, 2020,46: 101784.

[88] Ahlgren G. Temperature functions in biology and their application to algal growth constants [J]. Oikos, 1987,49(2):177-190.

[89] Salvucci M E, Crafts-Brandner S J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis [J]. physiologia plantarum, 2004,120(2):179-186.

[90] Staehelin L A. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes [J]. Photosynthesis Research, 2003,76(1-3):185-196.

[91] Richmond A E, Soeder C J. Microalgaculture [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1986,4(3):369-438.

[92] Shin H S, Hong S J, Yoo C, et al. Genome-wide transcriptome analysis revealed organelle specific responses to temperature variations in algae [J]. Scientific Reports, 2016,6(1):1-11.

[93] Cao J Y, Kong Z Y, Ye M W, et al. Comprehensive comparable study of metabolomic and transcriptomic profiling of *Isochrysis galbana* exposed to high temperature, an important diet microalgal species [J]. Aquaculture, 2020,521:735034.

[94] Mandotra S K, Kumar P, Suseela M R, et al. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities [J]. Bioresource Technology, 2016,201:222-229.

[95] 白丽菊,侯 博,江 波,等.化学吸收剂强化微藻固碳研究进展 [J]. 化工进展, 2020,39(2):111-119.

Bai L J, Hou B, Jiang B, et al. Research progress of CO_2 fixation by chemical absorbents enhanced microalgae [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020,39(2):111-119.

[96] Azov Y, Goldman J C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982,43(4):735-739.

[97] Nguyen B T, Rittmann B E. Predicting dissolved inorganic carbon in photoautotrophic microalgae culture via the nitrogen source [J]. Environmental Science & Technology, 2015,49(16):9826-9831.

[98] Bartley M L, Boeing W J, Dungan B N, et al. PH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis* salina and invading organisms [J]. Journal of Applied Phycology, 2014,26(3):1431-1437.

[99] Guckert J B, Cooksey K E. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle Inhibition [J]. Journal of Phycology, 1990,26(1):72-79.

[100]巩东辉,乔 辰,王志忠,等.影响螺旋藻抗御强光能力的主要环境因子研究 [J]. 内蒙古科技大学学报, 2007,26(4):349-354.

Gong D H, Qiao C, Wang Z Z, et al. Research on main environmental factors affecting *Spirulina's* anti-glare ability [J]. Journal of Inner Mongolia University of Science and Technology, 2007,26(4):349-354.

[101]欧阳叶新,施定基,黄开耀,等.鱼腥藻 7120 响应 NaCl 胁迫的光合特性 [J]. 水生生物学报, 2003,27(1):74-80.

Ouyang Y X, Shi D G, Huang K Y, et al. photosynthetic characteristics of *Anabaena* 7120 in response to NaCl stress [J]. Acta Hydrobiology, 2003,27(1):74-80.

[102]Miyasaka H, Ikeda K. Osmoregulating mechanism of the halotolerant green alga *Chlamydomonas*, strain HS-5 [J]. Plant Science, 1997, 27(1):91-96.

[103]Ben-Amotz A, Avron M. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva* [J]. Plant Physiology, 1973,51(5):875-878.

[104]Kaplan D, Richmond A E, Dubinsky Z, et al. CRC Handbook of Microalgal Mass Culture [J]. 1986.

[105]Ho S H, Nakanishi A, Kato Y,et al. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4 [J].Scientific Reports, 2017,7:45471.

[106]Chen H, Lu Y, Jiang J G. Comparative analysis on the key enzymes of the glycerol cycle metabolic pathway in *Dunaliella salina* under osmotic stresses [J]. PLoS One, 2012,7(6):e37578.

[107]Driver T, Trivedi D K, McIntosh O A, et al. Two glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Chlamydomonas* have distinct roles in lipid metabolism [J]. Plant Physiology, 2017,174(4):2083-2097.

[108]王慧岭,刘敏胜.微藻生物能源产业化若干问题的思考 [J]. 生物产业技术, 2016,(3):14-16.

Wang H L, Liu M S. Thinking on several issues of industrialization of microalgae bioenergy [J]. Bioindustry Technology, 2016,(3):14-16.

[109]Roleda M Y, Slocombe S P, Leakey R J G, et al. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy [J]. Bioresource Technology, 2013,129:439-449.

[110]Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, et al. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011,90(4):1429-1441.

作者简介: 聂煜东(1987-),男,江西宜春人,助理研究员,博士,主要从事微藻生物柴油开发、水污染治理与水体修复等相关研究.发表论文 20 余篇.