

微藻能源的研究进展

Advances in the research of Microalgae Bioenergy

张英伟¹, 刘 炜²

(1. 旭阳煤化工集团, 北京 100070; 2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

中图分类号: TK6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0132-07

近年来, 随着石油资源日趋枯竭、全球性能源短缺及环境污染等问题日益严重, 开发绿色、清洁的生物燃料代替传统石化燃料, 已成为国际研究热点。在生物燃料的众多原料中, 微藻具有光合作用效率高、含油量高、生长周期短、油脂面积产率高等特点, 被认为是最有潜力替代石油的生物物质资源^[1]。微藻的营养需求非常简单, 对环境适应能力强, 经过生物冶炼不仅能生产出生物柴油、优质航空汽油等多种生物燃料, 而且还能开发出平台化合物、高蛋白食品或饲料等产品, 可广泛应用于工农业和交通领域^[2]。本文重点针对微藻的筛选和工程改造进行了综述。

1 能源微藻的优势与问题

廉价的原料成本以及其来源的广泛性是油脂原料选择的关键因素^[3]。植物由于占用耕地面积、生长周期长、受气候影响等诸多问题, 而不能成为生物燃料油脂供应的长久之策^[4,5]。而微藻具有“不与农争地, 不与人争粮”的明显优势^[2]。微藻可利用天然海水作为培养基, 对于淡水资源十分缺乏的中国来说具有独特的吸引力。发展海洋微藻产业可以充分利用我国广阔的海域、盐碱滩涂等非耕国土资源。据计算, 我国盐碱地达 1 000 万 hm^2 , 如果用 1/3 的盐碱地养殖微藻, 所生产的生物柴油就可以满足全国的燃油需求^[6]。

微藻可直接利用阳光、 CO_2 及 N、P 等简单营养物质在胞内合成大量油脂 (主要是甘油三酯)。其光合作用效率高, 生长周期短, 倍增时间约 3~5 d, 有的藻种甚至一天可以收获两季, 且微藻脂类含量是陆地植物远远达不到的^[6]。研究表明高等植物种子脂肪酸含量为干重的 15%~20%, 而微藻脂肪酸含量在氮元素缺乏时可达细胞干重的 80%^[7], 表 1 比较了植物和微藻的油脂含量^[8]。田原宇^[10]曾经做过测算,

在 1 年的生长期, 1 hm^2 玉米能产 172 L 生物质燃油, 1 hm^2 大豆能产 446 L, 1 hm^2 油菜籽能产 1 190 L, 1 hm^2 棕榈树能产 5 950 L, 而 1 hm^2 微藻能产 9.5×10^4 L^[9]。现在的柴油价格大约是每吨 7 000 元, 而按照现在的发展速度, 2014 年微藻生物柴油的成本可降至 6 500 元/a 以下。这意味着在未来的数年之内, 微藻有望代替现在的麻风树和黄连木, 成为生物柴油的主要原料。

另外, 微藻每年可固定的 CO_2 大约占全球净光合产量的 40%^[11]。我国 CO_2 减排任务非常繁重, 中国煤炭行业的产能目前在 $30 \times 10^8 \sim 31 \times 10^8$ t, 1 t 煤产生 2.5 t 的二氧化碳排放, 因此, 碳吸收和碳利用是今后一个很重要的方向^[12]。微藻通过光自养生长过程, 大规模吸收工业废气中的 CO_2 , 在实现 CO_2 减排的同时, 生产大量的氧气和油脂 (1 t 藻约可固定 2 t CO_2), 既可大幅度降低能源微藻培养成本, 又可从清洁能源发展机制 (Clean development mechanism, CDM) 中获得收益。由于生物柴油的市场需求量极大 (我国每年需求的柴油量约 1 亿 t, 如全部通过光

表 1 各种生物原料油脂含量的比较

原料	油脂产量 ($\text{L}/(\text{hm} \cdot \text{a})$)
大豆	450.70
麻芥	582.16
向日葵	957.75
麻风树	1896.71
油椰子	5962.44
藻类	9389.67~37558.69

收稿日期: 2010-11-19; 修回日期: 2011-02-19

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KGCXZ-YW-801); 国家自然科学基金 (20872075)

作者简介: 张英伟 (1971-), 男, 河北保定人, 主要从事焦炭化工产品的研发, 电话: 010-63701616-408, E-mail: zhangyw@risun-group.com; 刘炜, 通信作者, 电话: 0532-80662766, E-mail: liuwei@qibet.ac.cn

自养培养的能源微藻来生产,约需要 3 亿 t 干藻粉,可吸收约 6 亿 tCO₂,因此微藻能源产业的发展为缓解我国 CO₂ 减排的压力带来了新的希望^[13]。

然而,微藻产业发展中还存在成本高、生产效率低等若干瓶颈问题,严重制约了产业化发展。其根本原因是由于目前微藻产业规模小,很多关键技术及相关的理论基础方面研究不足,产业化开发缺乏基础研究支撑和技术优化与系统集成^[13]。目前,微藻产业亟待解决以下问题:优质能源微藻的选育和基因工程构建;低成本、高密度培养体系的建立;高效、低成本光生物反应器的开发;高效率、低成本的采收技术;微藻的高效能源转化技术等。以上关键技术的不断突破,必将大大促进微藻生物柴油的产业化进程。

2 微藻的种类

微藻是一类细胞结构简单、生物速度快的原核或真核光合微生物。微藻种类繁多,真核微藻包括绿藻、硅藻等,而原核微藻主要指蓝藻^[14-15]。微藻广泛分布于淡水、海水和陆地中,预计全球微藻种类超过 50 000 种,但现在已经鉴定的微藻只有 30 000 种^[16]。在过去的几十年中,微藻研究已在全球掀起一股热潮,世界各地还逐步建立了相应的藻类保藏中心。葡萄牙科英布拉大学(University of Coimbra)的淡水微藻保藏中心保存了来自全球超过 4 000 多株的淡水微藻;德国哥廷根大学(Goettingen University)保存的藻类中 77%为绿藻,8%为蓝藻;日本的 NIES 拥有超过 2 150 多株约 700 种的藻类^[2]。这些中心保存的微藻可供各国学者进一步探索微藻的广泛用途。

3 高脂微藻的筛选

很多微藻都富含丰富的脂类物质,但不同微藻油脂含量有明显差异。高产油率是提高微藻生物柴油效率与降低成本的必要条件。以高产油率为标准,油藻需满足两个基本要求:较高的含油量和较快的生长速率^[17]。美国能源部 1978 年就立项支持利用藻类制备生物柴油的研发工作,从海洋和湖泊中分离了 3 000 多种藻类,从中筛选出 300 多种生长快、含油高的硅藻、绿藻和蓝藻等藻种^[18]。近年来,各国学者也纷纷利用各种方法筛选微藻,表 2 列举了不同种类微藻的油脂含量^[2]。从表 2 中可以看出,一些微藻油脂含量可达干重的 75%,但产率很低,如布朗葡

萄藻(*Botryococcus braunii*);其他多数微藻,如小球藻(*Chlorella*),隐甲藻(*Cryptochodinium*),细柱藻(*Cylindrotheca*),杜氏藻(*Dunaliella*),金藻(*Isochrysis*),微球藻(*Nannochloris*),微拟球藻(*Nannochloropsis*),新绿藻(*Neochloris*),菱形藻(*Nitzschia*),三角褐(*Phaeodactylum*),紫球藻(*Porphyridium*),扁藻(*Tetraselmis*)等,含油量在 20%到 50%之间,但相应的产率较高。

各类微藻中脂肪酸的组成也是筛选能源微藻的一项重要指标,因为脂肪酸组成的不同将直接影响后期微藻燃料的品质^[2]。Thomas 等^[19]分析了 7 种淡水微藻中的脂肪酸组成,研究表明,这 7 种微藻都能合成 C14:0, C16:0, C18:1, C18:2, 和 C18:3 脂肪酸;其他一些链长的脂肪酸具有种属特异性,如纤维藻(*Ankistrodesmus* sp.)中产生的 C16:4 和 C18:4 脂肪酸,金藻(*Isochrysis* sp.)中产生的 C18:4 和 C22:6 脂肪酸,以及微球藻和菱形藻(*Nannochloris* sp.)中产生的 C16:2、C16:3 和 C20:5 脂肪酸。

在众多微藻中,硅藻因其藻体细胞内较高的脂肪含量,被认为是最有可能实现产业化生产油脂的藻类之一^[20],这不仅是由于硅藻中极高的油脂含量,还因为其中包含了大量多不饱和脂肪酸^[21]。近 30 年来,对硅藻脂肪酸含量及组成的研究也在不断进行中^[22]。Dunstan 等^[23]研究了 14 种海洋硅藻脂肪酸组成,测得海洋硅藻主要脂肪酸分别为:14:0、16:0、16:1、20:5(EPA),并且 22:6(DHA)的相对含量也在 4%左右。李荷芳等^[24]研究新月菱形藻、三角褐指藻、舟形藻、牟氏角毛藻的脂肪酸组成,也得到了相同的结论。

此外,产油微藻的筛选还要综合考虑其他因素,例如是否可利用容易获得的、简单的营养物质生长,或者是否能在特殊的环境下生长等。

4 环境因子对微藻脂类积累的影响

研究表明温度、盐度等诸多因素都能影响微藻油脂的积累和组成。Rao 等^[25]发现不同的盐度对微藻的总脂含量会产生不同的影响。缪锦来等^[26]已经在实验中证明,盐度的提高有利于 2 种绿藻 *Pyramidomonas* sp.和 *Chlorophyceae* L-4 积累脂肪。这可能是因为高渗透压的环境下,微藻需要降低脂肪含量来减弱膜的流动性,以免更多有害离子流入细胞内。但盐度对微藻脂类积累的影响因藻种的

表 2 不同种类微藻的油脂含量及产率

微藻种类	油脂含量 (%, 细胞干质量)	油脂产率 (mg/(L · d))	生物量的定容产率 (g/(L · d))	生物质的地域产率 (g/(m ² · d))
纤维藻(<i>Ankistrodesmus</i> sp.)	24.0~31.0	—	—	11.5~17.4
布朗葡萄藻(<i>Botryococcus braunii</i>)	25.0~75.0	—	0.02	3.0
牟氏角毛藻(<i>Chaetoceros muelleri</i>)	33.6	21.8	0.07	—
钙质角毛藻(<i>Chaetoceros calcitrans</i>)	14.6~16.4/39.8	17.6	0.04	—
浮水小球藻(<i>Chlorella emersonii</i>)	25.0~63.0	10.3~50.0	0.036~0.041	0.91~0.97
原始小球藻(<i>Chlorella protothecoides</i>)	14.6~57.8	1214	2.00~7.70	—
小球藻(<i>Chlorella sorokiniana</i>)	19.0~22.0	44.7	0.23~1.47	—
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0~58.0	11.2~40.0	0.02~0.20	0.57~0.95
小球藻(<i>Chlorella</i> sp.)	10.0~48.0	42.1	0.02~2.5	1.61~16.47/25
蛋白核小球藻(<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	2.0	—	2.90~3.64	72.5/130
小球藻(<i>Chlorella</i>)	18.0~57.0	18.7	—	3.50~13.90
绿球藻(<i>Chlorococcum</i> sp.)	19.3	53.7	0.28	—
寇氏隐甲藻(<i>Cryptocodinium cohnii</i>)	20.0~51.1	—	10	—
盐生杜氏藻(<i>Dunaliella salina</i>)	6.0~25.0	116.0	0.22~0.34	1.6~3.5/20~38
杜氏藻(<i>Dunaliella primolecta</i>)	23.1	—	0.09	14
杜氏藻(<i>Dunaliella tertiolecta</i>)	16.7~71.0	—	0.12	—
杜氏藻(<i>Dunaliella</i> sp.)	17.5~67.0	33.5	—	—
后棘藻(<i>Ellipsoidion</i> sp.)	27.4	47.3	0.17	—
纤细裸藻(<i>Euglena gracilis</i>)	14.0~20.0	—	7.70	—
雨生红球藻(<i>Haematococcus pluvialis</i>)	25.0	—	0.05~0.06	10.2~36.4
球等鞭金藻(<i>Isochrysis galbana</i>)	7.0~40.0	—	0.32~1.60	—
富油金藻(<i>Isochrysis</i> sp.)	7.1~33	37.8	0.08~0.17	—
单胞藻(<i>Monodus subterraneus</i>)	16.0	30.4	0.19	—
单胞藻(<i>Monallanthus salina</i>)	20.0~22.0	—	0.08	12
微小绿藻(<i>Nannochloris</i> sp.)	20.0~56.0	60.9~76.5	0.17~0.51	—
微拟球藻(<i>Nannochloropsis oculata</i>)	22.7~29.7	84.0~142.0	0.37~0.48	—
微拟球藻(<i>Nannochloropsis</i> sp.)	12.0~53.0	37.6~90.0	0.17~1.43	1.9~5.3
富油新绿藻(<i>Neochloris oleoabundans</i>)	29.0~65.0	90.0~134.0	—	—
菱形藻(<i>Nitzschia</i> sp.)	16.0~47.0	8.8~21.6	16.0~47.0	8.8~21.6
卵泡藻(<i>Oocystis pusilla</i>)	10.5	—	—	40.6~45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	—
路氏巴夫藻(<i>Pavlova lutheri</i>)	35.5	40.2	0.14	—
三角褐指藻(<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	18.0~57.0	44.8	0.003~1.9	2.4~21
紫球藻(<i>Porphyridium cruentum</i>)	9.0~18.8/60.7	34.8	0.36~1.50	25
斜生栅藻(<i>Scenedesmus obliquus</i>)	11.0~55.0	—	0.004~0.74	—
四棘栅藻(<i>Scenedesmus quadricauda</i>)	1.9~18.4	35.1	0.19	—
栅列藻属(<i>Scenedesmus</i> sp.)	19.6~21.1	40.8~53.9	0.03~0.26	2.43~13.52
骨条藻(<i>Skeletonema</i> sp.)	13.3~31.8	27.3	0.09	—
中肋骨条藻(<i>Skeletonema costatum</i>)	13.5~51.3	17.4	0.08	—
钝顶螺旋藻(<i>Spirulina platensis</i>)	4.0~16.6	—	0.06~4.3	1.5~14.5/24~51
极大螺旋藻(<i>Spirulina maxima</i>)	4.0~9.0	—	0.21~0.25	25
假微型海链藻(<i>Thalassiosira pseudonana</i>)	20.6	17.4	0.08	—
干扁藻(<i>Tetraselmis suecica</i>)	8.5~23.0	27.0~36.4	0.12~0.32	19
融合微藻 (<i>Tetraselmis</i> sp.)	12.6~14.7	43.4	0.30	—

不同而有所差异。韦芳三等^[27]报道盐藻的总脂肪含量在盐度 40 时最大, 100 时最小, 并且当盐度大于 40 时, 总脂肪含量随盐度的增加呈现微略变小的趋势。

温度是影响微藻脂肪含量和脂肪酸种类的重要因素之一, 不同藻种的脂肪酸最适合成温度不同^[28]。蒋汉明等^[29]研究了不同温度下, 三角褐指藻和等鞭金藻生长及脂肪酸组成。结果表明, 低温有利于三角褐指藻积累多不饱和脂肪酸, 但含量在 10~20℃之间差异不显著; 然而等鞭金藻中多不饱和脂肪酸含量在 20℃时达到最大。Zhu 等^[30]发现当温度从 30℃降到 15℃时, *Isochrysis galbana* 中二十二碳六烯酸(DHA)和亚麻酸 18:3(n-3)的含量明显升高, 并达最高水平, 而饱和及单不饱和脂肪酸的含量下降。

Spoehr 和 Milner^[31]最早证明, 氮缺乏可诱导 *Chtorella Pyrenoidosa* 中脂类含量的增加。该现象后来在许多其他藻类中得到了证实。在多数情况下, 中性脂(主要是甘油三酯)因氮缺乏在细胞中增加。Liliana 等^[32]研究表明氮短缺或受限时, 会加快微藻细胞内油脂的积累, *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 在氮缺乏条件下, 油脂含量可达到 60%, 比对照提高了 20%以上。Thomas 等^[19]证明在缺乏氮和盐胁迫的条件下, 可促使所有检测微藻的 C18:1 脂肪酸的增加, 并能使布朗葡萄藻(*B. braunii*)中产出 C20:5 脂肪酸。

Melinda 等^[33]分析表明, 硅缺乏可使微藻细胞油脂含量占细胞干重的比例平均增长 24%到 41%。

刘志媛^[34]研究了铁对几种不同代谢类型微藻的生长和油脂积累的影响。在指数生长后期向培养基中补加 Fe^{3+} , 使得绿藻门的小球藻的总脂含量提高到干物质重的 56.6%, 是低铁培养基中小球藻的 3~7 倍; 在高铁培养基中属于金藻门球等鞭金藻的总脂含量和细胞生长均高于低铁培养基中的。

另外, 光照和 CO_2 浓度也能影响微藻的脂类合成。Liliana 等^[32]研究表明, 增加光强度能促使 *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 的饱和脂肪酸(14:0 和 16:0)和单不饱和脂肪酸(16:1n7 和 18:1n9)含量增加。Chiu 等^[35]研究发现 2% CO_2 与通入空气相比可以提高微绿球藻的比生长速率和生物量, 而更高浓度的 CO_2 则会抑制微绿球藻的生长。

5 工程微藻研究进展

当前, 国内外有许多科学家在探索筛选新藻种

的同时, 致力于通过研制“工程微藻”实现规模化养殖, 降低成本, 为获取油脂资源提供一条可靠的途径。利用基因工程改造微藻脂肪酸调控途径, 可大大提高微藻脂肪酸的合成能力, 从而实现高油微藻制备生物燃料的目的。

脂肪酸合成是油脂合成的基础, 微藻脂肪酸合成过程涉及很多酶(图 1), 本文重点对脂肪酸生物合成阶段涉及的限速酶——乙酰辅酶 A 羧化酶和脂肪酸胞外分泌相关的硫酯酶进行讨论。

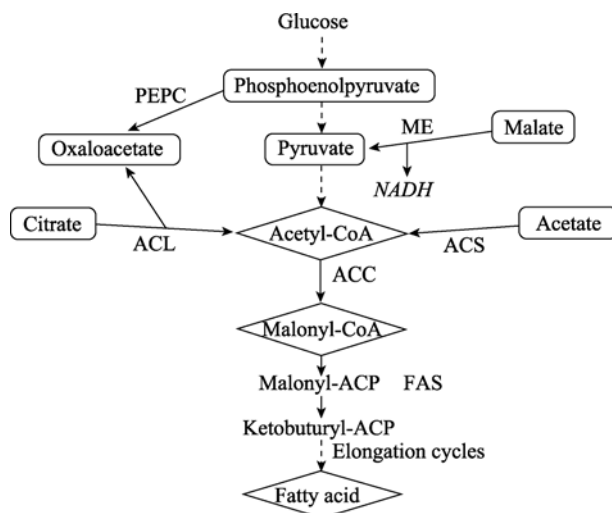


图 1 脂肪酸合成途径^[36]

5.1 乙酰辅酶 A 羧化酶研究进展

乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, 简写 ACC, EC 6.4.1.2), 能催化生物体中脂肪酸合成的第一步反应^[37], 即由乙酰辅酶 A(acetyl-CoA)转化生成丙二酸单酰辅酶 A(malonyl-CoA)的反应, 为脂肪酸和许多次生代谢产物的合成提供底物^[38], 是脂肪酸合成的限速酶。ACC 酶最早是由 Wakil^[39]发现的, 随后, 分别从菠菜、鼠和酵母细胞中获得了 ACC 酶^[40]。ACC 对大多数生物来说是必须的, 因其具有为脂肪酸的合成提供碳源, 限制脂肪酸的合成并控制油脂沉积等功能, 备受国内外专家学者的普遍关注^[41]。

随着分子生物学的发展, 迄今已从多种生物体中克隆了 ACC 酶基因, 包括大肠杆菌、产油微生物、拟南芥、大豆、油菜、小麦等^[42]。早在 1993 年, Cronan 课题组就克隆了大肠杆菌 ACC 酶的 *accA* 和 *accD* 基因, 并与其他两个亚基组成一个复合体共同发挥作用^[43-44]。Davis 等^[45]在大肠杆菌中同时表达了内源 ACC 酶基因和内源硫酯酶基因 *tesA* 后, 脂肪酸合成

速率提高 6 倍(6.6 nmol),而在单独表达 ACC 时,由于受到底物反馈抑制作用脂肪酸产量较低,仅为 0.08 nmol。Lu 等^[46]在大肠杆菌中表达内源 ACC 同时,分别表达了植物硫脂酶和内源硫脂酶基因,解除了反馈抑制,提高了工程菌脂肪酸合成能力。在 5 L 发酵罐培养 35 h 时,胞内游离脂肪酸可到 2.5 g/L。上述研究主要是基于内源 ACC 功能的研究,但研究表明,如果异源表达 ACC 可有效避免底物抑制作用^[47],提高 ACC 活性,这一策略在类黄酮生产中得以充分的验证^[48]。美国再生能源国家实验室(NREL)于 1995 年将乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)基因转化小环藻成功,实验室条件下脂质含量可达 60% 以上,户外生产也可达 40% 以上,这是一个重要突破^[49]。Dunahay 等^[50]也将 ACCCase 基因转化入硅藻 *C. cryptica* 和 *N. saprophila* 中,但并未产生明显的脂积累。

5.2 硫脂酶基因研究进展

硫脂酶(thioesterase, EC: 3.1.2),广泛存在于动植物、微生物体内,在脂肪酸合成过程中催化水解脂酰-CoA 或脂酰基-ACP 生成 CoASH 或 ACP,同时释放出游离脂肪酸的反应^[51],是细胞脂肪酸合成、降解和转运的关键酶^[52]。机体代谢产生的脂肪酸是以胞内脂形式贮存,还是以游离形式存在,就取决于硫脂酶活性的大小^[53]。Voelker 等^[51]在大肠杆菌 β -氧化缺陷菌株中表达了加州月桂 *Umbellularia californica* 的中长链乙酰-乙酰硫脂酶基因(*AtFatA*),细胞液中游离脂肪酸含量提高了 4 倍。Liu 等^[54]在蓝藻中过表达大肠杆菌硫酯酶基因 *tesA* 以及外源植物(*U. californica*、*C. hookeriana* 和 *C. camphorum*)的硫酯酶基因 *TE*,可明显提升蓝藻脂肪酸产量和胞外分泌能力,改造后的工程蓝藻胞外脂肪酸含量可达 133 ± 12 mg/day/L,高达细胞干重的 50%。

6 展望

由于富含色素、蛋白、多糖以及不饱和脂肪酸等生物活性物质,微藻不仅可以转化为高品质的生物柴油、航空燃料沼气、燃料乙醇等生物燃料,还可直接或经加工后用于化工、食品、医药和饲料工业等。目前,微藻已实现规模化制备高附加值脂肪酸,如二十碳五烯酸(EPA)、花生四烯酸(ARA)、二十二碳六烯酸(DHA)等重要原料^[55];培养的富含虾青素及油脂的雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)可以

实现生物柴油和虾青素的联产^[56]。此外,利用微藻生产脂肪醇、异戊二烯等平台化学品和海藻纤维等生物基材料将成为今后微藻产业中的新兴热门产品。微藻产业将非常具有商业应用前景。

然而,我国微藻产业尚处于起步阶段,还存在成本过高、难以规模放大等若干瓶颈问题,尚有许多关键技术有待突破,相关工程技术需要集成。随着对藻种选育研究和微藻的工程改造继续深入,培养条件、培养方式等的不断改进,提取、分离和转化等过程工艺的不断完善,微藻产品将具有更低的生产成本,从而获得更大的市场竞争力。

参考文献:

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306.
- [2] Mata T, Martins A, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14(1): 217-232.
- [3] Canakci M H, Sanli. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(5): 431-441.
- [4] Scarlat N, Dallem J F, Pinilla F G. Impact on agricultural land resources of biofuels production and use in the European Union[C] //Bioenergy: challenges and opportunities. International conference and exhibition on bioenergy, 2008.
- [5] E and RF. Gallagher Review of the indirect effects of biofuels production[C]. Renewable Fuels Agency, 2008.
- [6] 欣雨. 可再生能源——海洋微藻[J]. 技术与市场, 2010, 17(1): 56-57.
- [7] Metting F. Biodiversity and application of microalgae[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1996, 17(5): 477-489.
- [8] National algal biofuels technology roadmap[R]. U.S. department of energy, 2009.
- [9] 郑言. 海洋微藻: 化解能源危机的一把钥匙[J]. 中国新能源, 2009, 5: 26-28.
- [10] 高永钰. 微藻生物炼柴油[J]. 第一财经日报, 2010 年 7 月 1 日.
- [11] Miyamoto K. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production (FAO

- Agricultural Services Bulletin-128)[M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997.
- [12] 宋雪莲. 专吃二氧化碳“微藻制油”未来有多大? [J]. 中国经济周刊, 2010, 34:47-48.
- [13] 黄英明, 王伟良, 李元广, 等. 微藻能源技术开发和产业化发展思路与策略[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 907-913.
- [14] Li Y, Horsman M, Wang B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*[J]. Applied microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 629-636.
- [15] Li Y, Horsman M, Wu N, et al. Biofuels from microalgae[J]. Biotechnology Progress, 2008, 24(4): 815-820.
- [16] Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology[J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16: 159-160.
- [17] 姚茹, 程丽华, 徐新华, 等. 微藻的高油脂化技术研究进展[J]. 化学进展, 2010, 22(6): 1221-1232.
- [18] 宋东辉, 侯李君, 施定基. 生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 341-348.
- [19] Thomas W, Tornabene T, Weissman J. Screening for lipid yielding microalgae: Activities for 1983. Final Subcontract Report [M]. U S A: Solar Energy Research Institute. 1984: 17-38.
- [20] 王兆凯. 基于海洋硅藻的生物燃油生产[J]. 渔业现代化, 2008, 35(002): 60-63.
- [21] Renaud S, Parry D, Thinh L. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia[J]. Journal of Applied Phycology, 1994, 6(3): 337-345.
- [22] 徐芳, 蔡昭铃, 丛威, 等. 微藻培养生产多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 重庆工学院学报, 2005, 19(1): 96-100.
- [23] Dunstan G, Volkman J K, Barrett S M, et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) [J]. Phytochemistry, 1993, 35(1): 155-161.
- [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(001): 34-40.
- [25] Rao A, Dayananda C, Sarada R, et al. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(3): 560-564.
- [26] 缪锦来, 王波, 阚光锋, 等. 环境因子对 2 种南极绿藻脂肪含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 4-11.
- [27] 韦芳三, 李纯厚, 戴明, 等. 盐度变化对盐藻生物量和总脂含量的影响[J]. 湖南农业科学, 2011, 1: 134-136, 139.
- [28] 石娟, 潘克厚. 不同培养条件对微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 79-85.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Spoehr H, Milner H. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions[J]. Plant physiology, 1949, 24(1): 120-149.
- [32] Rodolfi L, Zittelli G C, Bassi N. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 102(1): 100-112.
- [33] Melinda J. Griffiths, Susan T L. Harrison. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21: 493-507.
- [34] 刘志媛. 铁对几种不同代谢类型微藻的生长和油脂积累的影响[D]. 青岛: 中国科学院研究所博士毕业论文, 2008.
- [35] Chiu S, Kao C Y, Tsai M T, et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 833-838.
- [36] Courchesne N, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 141(1-2): 31-41.
- [37] 谢禄山, 谭晓风. 乙酰辅酶 A 羧化酶基因研究综述[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 89-95.
- [38] Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in

- plants[J]. Progress in Lipid Research, 2002, 41(2): 182-196.
- [39] Wakil S. A malonic acid derivative as an intermediate in fatty acid synthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 1958, 80(23): 6465-6465.
- [40] Thampy K, Wakil S. Activation of acetyl-CoA carboxylase-Purification and properties of a Mn^{2+} -dependent phosphatase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(10): 6318-6323.
- [41] Kurth D, Gago G M, de la Iglesia A, et al. ACCase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria[J]. Microbiology, 2009, 155(8): 2664-2675.
- [42] Zhang H, Yang Z, Shen Y, et al. Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase[J]. Science, 2003, 299(5615): 2064-2067.
- [43] Cronan J. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases[J]. Progress in Lipid Research, 2002, 41(5): 407-435.
- [44] Li S J, Cronan J E. Growth rate regulation of escherichia coli acetyl coenzyme a carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(2): 332-340.
- [45] Davis M, Solbiati J, Cronan J. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37): 28593-28598.
- [46] Lu X, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 333-339.
- [47] Chang M, Keasling J. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes[J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2(12): 674-681.
- [48] Leonard E, Lim K H, Saw P N, et al. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(12): 3877-3886.
- [49] 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[C]. National Renewable Energy Laboratory, Report, 1998.
- [50] Dunahay T G, Jarvis E E, Dais S S, et al. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 57: 8223-8231.
- [51] Voelker T, Davies H. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(23): 7320-7327.
- [52] Hunt M, Alexson S. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism[J]. Progress in Lipid Research, 2002, 41(2): 99-130.
- [53] Voelker T, Jones A, Cranmer A M, et al. Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier protein thioesterases suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds[J]. Plant Physiology, 1997, 114(2): 669-677.
- [54] Liu X, Brune D, Vermaas W, et al. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107: 13189-13194.
- [55] 郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(003): 110-116.
- [56] 李道义, 李树君, 刘天舒, 等. 微藻能源产业化关键技术的研究进展[J]. 农业机械学报, 2010, 41: 160-166.

(本文编辑: 康亦兼)