

微藻生产生物燃料的工程策略研究进展

黄箫喃, 葛志强*

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:总结了微藻生产生物燃料的环境影响因素,着重论述适宜藻类培养和提高燃料产率的工程策略进展,对微藻生物燃料生产商业化的可行性进行了展望。

关键词:微藻;生物燃料;工程策略;环境因素

中图分类号:S216.3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2015)09-0021-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2015.09.005

Research progress of engineering strategies for biofuels from microalgae

HUANG Xiao-nan, GE Zhi-qiang*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The environmental factors affecting the production of biofuels from microalgae are summarized. The engineering strategies suitable for microalgae cultivation and enhancement of biofuel productivity are focused on. The prospects for development of economically viable microalgae-based biofuel production processes are also proposed.

Key words: microalgae; biofuel; engineering strategy; environmental factors

生物燃料,特别是生物柴油和生物乙醇作为最重要的新型替代能源,已成为现代化学工业研究的前沿和重要领域之一,其优势在于无毒、生物安全及低二氧化碳排放。然而,目前大部分商业用生物燃料是由大豆、葵花籽和油菜籽等富油作物生产的,或者是由玉米、甘蔗等糖类和淀粉类谷物作为生物质发酵而来。而这些原料是全球人类和牲畜赖以生存的,如果长期依赖于这些原料生产生物燃料将会大大威胁人类的粮食安全。因此,近年来新开发的微藻生产生物燃料成为了该领域的研究热点。在合适的条件下,微藻具有积累大量高能化合物,从而转化为生物柴油和乙醇的能力。目前可用来生产生物柴油的微藻主要包括衣藻(*Chlamydomonas*)^[1]、葡萄藻(*Botryococcus*)^[2]、小球藻(*Chlorella*)^[3]、栅藻(*Scenedesmus*)^[4]和微拟球藻(*Nannochloropsis*)^[5]等。其中衣藻^[6]、小球藻^[7]和栅藻^[4]也可用来发酵生产乙醇。尽管微藻种类繁多,细胞组成和生长速度不同,但微藻的快速生长与油脂和碳水化合物的生产却不是同步的。因此,为了从工程策略上促进油脂和碳水化合物的积累,促进微藻生产生物燃料,必须适时引入适当环境压力。其中温度、pH、光强、二氧化碳浓度、营养物浓度以及盐度等环境因素被认为是影响并决定着微藻细胞的组成及生物燃料生产的关键因素,近年来通过改善工程操作策略实现微藻生产生物燃料的精细控制取得了明显的进展。

1 微藻生产生物燃料的环境影响因素

1.1 pH

pH 可以影响微藻的生长、新陈代谢和离子吸收等生物过程。通常,藻类的最适生长 pH 在中性。随着藻类生长过程中对于无机碳的吸收,pH 会大幅度上升。最新研究表明,不仅最适生长 pH 是因种类而异的,微藻生产生物燃料过程中适宜生物质累积的 pH 也是随藻类不同而变化。Khatoun 等^[8]发现微拟球藻生长的最适 pH 是 7.5,而绿色鞭毛藻的则是 8.5。Moheimani 等^[9]研究表明,对于绿色鞭毛藻和小球藻来说,生物质和油脂积累的最适 pH 分别是 7.5 和 7.0。为了获得微藻生物燃料产业化,应该对 pH 适当控制^[3],实现不仅促进藻类生长,同时改善油脂和碳水化合物累积的利益最大化。

1.2 光强

光是微藻进行光合作用的能量来源,其强度通过影响光合作用来影响微藻的生长、二氧化碳的固定以及细胞的组成。光强达到饱和前,微藻生长速率和生物质累积率随着光照强度变大而增长,其程度因种类而异。Gonçalves 等^[10]研究发现,随着光强从 36 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 增长到 180 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,且辐照时间从 10 h 增长到 24 h,小球藻(*C. vulgaris* CCAP 211/11B) 的单位生长率从 0.314 d^{-1} 增长到 1.25 d^{-1} 。在光强及照射时间累积到一定程度后,

收稿日期:2015-03-09

作者简介:黄箫喃(1989-),女,硕士生;葛志强(1963-),男,博士,副教授,研究方向为制药工程、药物制剂、化学工程等,通讯联系人,022-87401546,gezhiq@tju.edu.cn。

微藻细胞表面会发生光抑制^[11]。Braun 等^[5]考察了照射及黑暗时间比对瓜迪亚纳河微拟球藻生长和生物质积累的影响,得出 12:12 的照射黑暗时间比为最佳。光照性质对于微藻生产生物燃料过程同样有影响。Okumura 等^[2]的研究显示,适当 LED 辐照可以改善藻类生物质生产和油脂积累。因此,给予适宜光强,平衡照射黑暗周期,筛选最适照射波长是优化微藻生产生物燃料的重要步骤。

1.3 温度

温度可影响藻类生长速率、细胞大小、生物化学组成和营养需求。微藻生长温度范围十分宽泛,随着种类、地域和时节不同而变化。Venkata 等^[12]发现,随着温度从 30℃ 上升到 35℃,四尾栅藻油脂产率从 20.2% 下降到 14.3%; Wu 等^[13]的研究显示,眼点微拟绿球藻的油脂比例会随着温度从 15℃ 升高到 20℃ 而下降; Ho 等^[14]发现,链带藻属 F2 在 25~40℃ 其油脂合成会保持稳定。由此可知,微藻的最优生长温度或其最适油脂/碳水化合物累积温度会随着种类不同而有所不同。对于同一种微藻,适宜油脂累积的温度通常会阻滞其细胞生长。因此,微藻生长及生物燃料生产过程中对温度的筛选和平衡需根据微藻种类、温度、气候和节气等做出相应调整。

1.4 盐度

盐度(通常指 NaCl 浓度)可改变藻类细胞生物

化学组成并影响油脂/碳水化合物在微藻中的累积比例。将微藻培养在不同的盐浓度下可以产生不同的生长速率和生物化学组成。Yeesang 等^[15]报道葡萄藻属中的 3 种微藻(SK、TRG、KB)的油脂比例随着盐度升高相应降低;而 Bartley 等^[16]发现,盐度高达 34 PSU 的盐湖水中,盐湖微拟球藻的油脂比例达到 36% 的细胞干重。此外, Ho 等^[1]研究发现,可以通过调整盐度来改善微藻中油脂/碳水化合物的累积比例和脂肪酸的组成。然而,盐度的影响很大程度限制于微藻种类,其机制也相对复杂,很难得出升高或者降低盐度对于生物燃料生产的单一确定影响。因此,近年来文献中报道在微藻生产生物燃料过程中,随生产阶段变化调整盐度和引入盐度梯度的方法较为常见。

1.5 营养物质

在微藻培养基所含元素(碳、氢、氧、氮、磷、硫、镁和钾等)中,氮元素对于油脂和碳水化合物累积的影响是最关键的。大量研究表明,微藻在氮元素限制和缺乏的环境压力下倾向于将碳分子转化成高能油脂和碳水化合物^[4,17]。Pancha 等^[4]发现通过 3 d 缺氮培养,栅藻(CCNM1077)中油脂质量分数达到 27.93%,碳水化合物质量分数达到了 45.74%。Cao 等^[17]报道了在 2 d 的低氮培养下,生物质产率达到最高 3.07 g/(L·d),且其油脂质量分数达到了 22.48%。除了能够引发并促进油脂/碳水化合物累

(上接第 20 页)

- [19] Giles E Eperon, Samuel D Stranks, Henry J Snaith, *et al.* Formamidinium lead trihalide: A broadly tunable perovskite for efficient planar heterojunction solar cells [J]. *Energy Environ Sci*, 2014, 7: 982–988.
- [20] Pang Shuping, Hu Hao, Zhang Jiliang, *et al.* NH₂CH=NH₂PbI₃: An alternative organolead iodide perovskite sensitizer for mesoscopic solar cells [J]. *Chem Mater*, 2014, 26(3): 1485–1491.
- [21] Burschka Julian, Norman Pellet, Michael Grätzel, *et al.* Sequential deposition as a route to high-performance perovskite-sensitized solar cells [J]. *Nature*, 2013, 499: 316–319.
- [22] Liu Mingzhen, Michael B Johnston, Henry J Snaith. Efficient planar heterojunction perovskite solar cells by vapour deposition [J]. *Nature*, 2013, 501: 395–398.
- [23] Docampo Pablo, James M Ball, Henry J Snaith, *et al.* Efficient organometal trihalide perovskite planar-heterojunction solar cells on flexible polymer substrates [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2761.
- [24] Dianyi Liu, Timothy L Kelly. Perovskite solar cells with a planar heterojunction structure prepared using room-temperature solution processing techniques [J]. *Nature Photon*, 2014, 8: 133–138.
- [25] Guo Yunlong, Liu Chao, Kento Inoue, *et al.* Enhancement in the efficiency of an organic-inorganic hybrid solar cell with a doped

P3HT hole-transporting layer on a void-free perovskite active layer [J]. *J Mater Chem A*, 2014, 2: 13827–13830.

- [26] Bing Cai, Yedi Xing, Zhou Yang, *et al.* High performance hybrid solar cells sensitized by organolead halide perovskites [J]. *Energy Environ Sci*, 2013, 6: 1480–1485.
- [27] Jin Hyuck Heo, Yong Hui Lee, Hi-jung Kim, *et al.* Efficient inorganic-organic hybrid heterojunction solar cells containing perovskite compound and polymeric hole conductors [J]. *Nature Photonics*, 2013, 7: 486–491.
- [28] Olga Malinkiewicz, Aswani Yella, Yong Hui Lee, *et al.* Perovskite solar cells employing organic charge-transport layers [J]. *Nature Photonics*, 2014, 8: 128–132.
- [29] Jeffrey A Christians, Raymond C M Fung, Prashant V Kamat, *et al.* An inorganic hole conductor for organo-Lead halide perovskite solar cells. Improved hole conductivity with copper iodide [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(2): 758–764.
- [30] Eran Edri, Saar Kirmayer, David Cahen, *et al.* High open-circuit voltage solar cells based on organic-inorganic lead bromide perovskite [J]. *J Phys Chem Lett*, 2013, 4(6): 897–902.
- [31] Martin A Green, Anita Ho-Baillie, Henry J Snaith. The emergence of perovskite solar cells [J]. *Nature Photonics*, 2014, 8: 506–514. ■

积,研究显示,氮元素的含量也可以影响脂肪酸和碳水化合物的性质^[18],从而改善生物燃料的生产。

2 改善微藻生产生物燃料的工程操作策略

尽管微藻具有快速生产和油脂/碳水化合物累积产率高的优良性质,培养系统和生产过程的过高成本始终阻碍着微藻生产生物燃料的商业化发展,因此经济可行的培养和生产过程亟待开发。从上述研究中可以发现,微藻通常在生长速率受限的环境压力下才会累积高能化合物,因此,很难同时实现微藻生长和生产的提高。因此,应用工程策略优化微藻生产生物燃料过程,同时提高生物质产率和油脂/碳水化合物比例,降低培养和生产成本具有巨大的应用潜力及商业价值。

2.1 连续操作

连续操作培养基于不断替换新鲜培养基、有效稀释细胞密度、降低其细胞浊度、减小微藻摄取光源的阻碍,从而将生物质产率和生长速率保持在较高的水平,有效提高生物燃料的产率。同时,连续操作的成本较低、操作简易,十分适宜工业应用中藻类的大规模培养^[19]。Zhang等^[20]在连续操作工艺下引入生活废水替代合成培养基BG11培养二形栅藻(*Scenedesmus dimorphus*),将培养规模从批量操作的1.5-L(1.5 L)扩大到100-L(100 L),获得的最高生物质从244 mg/L增加到276 mg/L,证明了连续操作工艺的有效、成本低、经济环保;Wen等^[21]在恒化装置中应用一步连续操作法培养蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* XQ-20044),装置中包含蠕动泵和十环泵头,其氮源输入率范围为0.78 ~ 4.56 mmol/(g·d),最终获得了近批量操作1.5倍的高油脂产率[144.93 mg/(L·d)]。由此看出,在微藻生产生物能源中,连续操作是一种能够同时获得藻类快速生长和油脂的高产量的工程策略。但是在连续操作培养中需要注意,由于长期同外界接触,应避免微藻发生变异或感染其他菌种,同时在稀释培养基的过程中应保持油脂累积比例,以获得生物能源的最终高产率。

2.2 半连续操作

半连续操作可以通过将藻类生长保持在指数期改善生物燃料产率,有效避免指数前期低生物分离率,免除后期平稳阶段光的限制。此外,半连续操作的长期培养更加容易预测,符合微藻生物燃料的工业生产的需求。Feng等^[22]从7种微藻中筛选出有价值生产生物能源的生物体斜生栅藻(*Scenedesmus*

obliquus),并将室外半连续工艺操作应用于这种藻类培养和累积脂质中,规模从室内的0.5 L玻璃罐扩大到室外的80 L平板型光生物反应器,最终室外半连续培养的日间细胞干重4.36 g/L,油脂比例49.6%,生物质产率525 mg/(L·d)和脂质产率183 mg/(L·d),皆远高于室内培养;Ashokkumar等^[23]探索了铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生产生物柴油的上游和下游过程。在成功从罐中分离后,藻类通过半连续操作方式大规模培养在20 m²室外开放池塘中。结合两步法收获过程,每隔3 d就收获40%生物质,日间干生物质产率达到28 g/(m²·d)。优化脂质提取率达到21.3%,且其中有11.7%的游离脂肪酸(碘和酯的质量分数分别高达72%和99.2%),两步法同时处理后生物柴油产率达90.1%,根据半连续培养操作面积和体积生物质产率预测,铜绿微囊藻年干生物质产率为84.1 t,由此说明,半连续操作应用于微藻生产生物燃料中切实有效,能够提高微藻生长和油脂/蛋白质累积。

2.3 流加式操作

流加式作为传统的培养操作方式,近年来也应用在微藻制备生物燃料中。Sun等^[24]利用流加式操作培养普通小球藻(*Chlorella vulgaris*),并在过程中引入产生的丙三醇,证实其培养效果远好于葡萄糖。流加式操作和两级操作相结合,应用5 L的搅拌罐生物反应器,最终油脂产量和比例分别达到了1 663.02 mg/L和36.39%,是生物柴油生产的合适原料;Praveenkumar等^[25]利用流加式培养操作为小球藻(*Chlorella* sp. KR-1)提供葡萄糖养料并且在暗循环阶段供给空气,获得了高达561 mg/(L·d)生物质产率和168 mg/(L·d)脂肪酸甲酯产率。在流加式培养条件下不仅获得了这种小球藻的最大生长,并且将非理想的KR-1相关菌种产生控制到最低。通过分析,小球藻KR-1在流加式培养下累积出的脂质中脂肪酸性质(包含碘、十六烷等)符合微藻生产生物柴油的关键标准,说明流加式操作不仅能够提升生物质产率和油脂/碳水化合物产量,还可以调控优化油脂/碳水化合物种类,使其易于下游提取过程。然而,流加式操作并非适用于所有微藻培养,例如,其存在的长期培养引起的光摄入受限导致生物质产率减低以及户外大型操作的实用性等问题需要进一步的研究。

2.4 两级操作

研究表明,工程策略优化微藻制备生物燃料的

重点是解决获得高油脂/碳水化合物产率和高生长速率所需的优选条件的冲突。两级培养操作可以通过为藻类生长和油脂/碳水化合物累积提供不同的条件来解决这类问题,从而极大程度地提高生物燃料产率。在两级操作中,通常在第一级阶段获取最大生物质产率,其后通过引入或者增大环境压力(氮饥饿、改变辐照强度、增加盐度或 pH)的措施来促进油脂/碳水化合物在第二阶段的累积。以 Abedini 等^[26]的研究为例,其应用包括了养分充足和氮饥饿的两级工艺操作培养来提高普通小球藻的油脂产量。在过程的第一阶段(养分充足),最高生物质产量高达 $(0.158 \pm 0.011) \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$,在第二阶段(氮源缺乏)的培养条件下,油脂和脂肪酸比例持续增长,在第六天达到了最高 42.50%,比起没有应用两级操作培养第十天达到的 25.05%,增长了 170%,且脂肪酸比例增长了 367%;Álvarez-Díaz 等^[27]利用两级操作策略培养镰形纤维藻来生产生物燃料,在第一阶段中给予充足光强、氮磷元素以促进生物质生长直至静止期;第二阶段在氮磷缺乏且光强减弱的条件下其油脂比例从 36.54% 增大到了 45.94%。近期文献充分说明两级操作促进了油脂在生物质中的累积,同时缩短了培养时间,降低了生产成本,大幅度提高了微藻的经济和能源价值。尽管作为相对有效的工程策略操作,两级操作仍然需要在降低商业规模化成本、降低所需能量和提高工程有效性等方面做出相应改善。

2.5 梯度操作

梯度操作作为近年来的新兴工程策略在微藻生产生物能源的应用中受到高度关注。梯度操作的概念同样发源于解决高油脂/碳水化合物累积率和生物质生长率所需最优条件的冲突。以盐度为例,高盐培养条件下可以促进油脂/碳水化合物累积,但是却降低了生长速率。引入梯度操作,逐步增大环境压力,使生物质随时间形成适应,从而达到在获得高油脂/碳水化合物比例的同时保持优化生长率的理想条件。近年来,梯度操作适用的环境压力主要集中于盐度和辐照,pH 和温度梯度操作还亟待研究。以盐度梯度操作为例,Ho 等^[1]报道了盐度阶梯式升高的工艺操作来培养海洋衣藻(*Chlamydomonas* sp. JSC4)以提高油脂累积以及改善油脂质量,不仅获得了高达 $223.2 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 的油脂产率和 59.4% 细胞干重的油脂比例(据报道高于以往大部分淡水和海水菌种的产率),同时从菌种 JSC4 中获得的油脂大部分是由饱和脂肪酸和单一不饱和脂肪酸组成

的,是生产生物柴油的理想前期产物,说明盐度梯度工艺在平衡生物质累积和油脂/碳水化合物产率累积条件,改善微藻制备生物燃料过程上是切实有效的新兴工程策略。关于辐照梯度,一般在文献中形容为光照黑暗循环(light-dark cycles),根据 Ponraj 等^[28]的研究,其为蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)的培养引入辐照梯度,其周期分别为光照黑暗比 24:0,16:8 和 8:16,考察后发现其优化条件下获得的生物质产率和油脂产率分别为 $39.41 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 和 $42 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。至今,关于利用梯度操作提高油脂/碳水化合物产率的文献报道还非常少,尤其是关于 pH 和温度等因素。作为一种很有潜力的改善微藻生产生物燃料的工程操作策略,梯度操作还需要更深入和广泛的研究。

3 结论与展望

利用微藻生产生物燃料是替代传统燃料生产的极具前景的方法之一,然而,现今应用在燃料生产和微藻培养的一些操作还不具有规模扩大化和经济可行性。通过考察分离出的不同种类微藻的环境影响因素,筛选其适宜的生产工程策略是改善生物燃料生产过程的有效措施。基因修饰和微藻新陈代谢的有效调控等新手段的引入也将在未来微藻生产生物燃料中起到重要作用。综上所述,应用工程策略,高效促进生长的同时大幅度改善油脂/碳水化合物积累量,提高生物燃料产量,将微藻生产生物燃料规模化商业化是我国乃至世界上微藻生物燃料的发展趋势。

参考文献

- [1] Ho S H, Nakanishi A, Ye X, *et al.* Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7:97.
- [2] Okumura C, Saffreana N, Rahman M A, *et al.* Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for biofuel production [J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2015, 34(1):269-275.
- [3] Kirrolia A, Bishnoi N R, Singh R. Response surface methodology as a decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae *Chlorella* spp. for biodiesel production [J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3):1133-1147.
- [4] Pancha I, Chokshi K, George B, *et al.* Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 156:146-

- 154.
- [5] Braun R, Farre E M, Schurr U, *et al.* Effects of light and circadian clock on growth and chlorophyll accumulation of *Nannochloropsis gaditana*[J]. *Journal of Phycology*, 2014, 50(3): 515–525.
- [6] Fouchard S, Hemschemeier A, Caruana A, *et al.* Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 6199–6205.
- [7] Kim K H, Choi I S, Kim H M, *et al.* Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 153: 47–54.
- [8] Khatoon H, Abdu Rahman N, Banerjee S, *et al.* Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 95: 11–18.
- [9] Moheimani N R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(2): 387–398.
- [10] Gonçalves A L, Simões M, Pires J C M. The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater[J]. *Energy Conversion and Management*, 2014, 85: 530–536.
- [11] Nikolaou A, Bernardi A, Meneghesso A, *et al.* A model of chlorophyll fluorescence in microalgae integrating photoproduction, photoinhibition and photoregulation [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 194: 91–99.
- [12] Venkata Subhash G, Rohit M V, Devi M P, *et al.* Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169: 789–793.
- [13] Wu L F, Chen P C, Lee C M. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 506–510.
- [14] Ho S, Chang J, Lai Y, *et al.* Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 156: 108–116.
- [15] Yeesang C, Cheirsilp B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3034–3040.
- [16] Bartley M L, Boeing W J, Corcoran A A, *et al.* Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 54: 83–88.
- [17] Cao J, Yuan H, Li B, *et al.* Significance evaluation of the effects of environmental factors on the lipid accumulation of *Chlorella minutissima* UTEX 2341 under low-nutrition heterotrophic condition[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 177–184.
- [18] Wase N, Black P N, Stanley B A, *et al.* Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(3): 1373–1396.
- [19] Fon Sing S, Isdepsky A, Borowitzka M A, *et al.* Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 47–54.
- [20] Zhang S S, Liu H, Fan J F, *et al.* Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* with domestic secondary effluent and energy evaluation for biodiesel production[J]. *Environmental Technology*, 2014, 36(7): 929–936.
- [21] Wen X, Geng Y, Li Y. Enhanced lipid production in *Chlorella pyrenoidosa* by continuous culture [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 297–303.
- [22] Feng P, Yang K, Xu Z, *et al.* Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 173: 406–414.
- [23] Ashokkumar V, Agila E, Salam Z, *et al.* A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 172: 186–193.
- [24] Sun Y, Liu J, Xie T, *et al.* Enhanced lipid accumulation by *Chlorella vulgaris* in a two-stage fed-batch culture with glycerol[J]. *Energy & Fuels*, 2014, 28(5): 3172–3177.
- [25] Praveenkumar R, Kim B, Choi E, *et al.* Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 171: 500–505.
- [26] Abedini Najafabadi H, Malekzadeh M, Jalilian F, *et al.* Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 311–317.
- [27] Álvarez-Díaz P D, Ruiz J, Arbib Z, *et al.* Lipid production of microalga *Ankistrodesmus falcatus* increased by nutrient and light starvation in a two-stage cultivation process[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(4): 1471–1483.
- [28] Ponraj M, Din M F M. Effect of light/dark cycle on biomass and lipid productivity by *Chlorella pyrenoidosa* using Palm Oil Mill Effluent (POME) [J]. *National Institute of Science Communication and Information Resources*, 2013, 72(11): 703–706. ■