

氮源种类及浓度对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂产率和二十碳五烯酸含量的影响

陆向红, 张秋红, 卢美贞, 窦晓, 黄晨蕾, 贾俊乾, 计建炳

浙江工业大学 浙江省生物质燃料利用技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

陆向红, 张秋红, 卢美贞, 等. 氮源种类及浓度对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂产率和二十碳五烯酸含量的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1865-1869.

Lu XH, Zhang QH, Lu MZ, et al. Effects of nitrogen sources and concentration on growth density, lipid yield and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis oculata*. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1865-1869.

摘要: 氮源是影响微藻生长和油脂积累的重要因素, 文中通过单因素试验比较了 NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 及其浓度对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂产率、二十碳五烯酸(EPA)含量的影响。结果表明: NH_4^+ 更易被眼点拟微绿球藻利用, 能更好地促进微藻生长和油脂积累; 氮浓度的增加有利于微藻的生长和藻类脂肪酸的去饱和, 但不利于微藻油脂的积累。在实验考察的氮源种类和浓度范围内, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 是促进眼点拟微绿球藻生长和油脂积累、EPA 生成的适宜氮源, 其适宜的浓度为 5.29 mmol/L。

关键词: 眼点拟微绿球藻, 生长密度, 油脂产率, 二十碳五烯酸含量

Effects of nitrogen sources on growth density, lipid yield and eicosapentaenoic acid of *Nannochloropsis oculata*

Xianghong Lu, Qihong Zhang, Meizhen Lu, Xiao Dou, Chenlei Huang, Junqian Jia, and Jianbing Ji

Zhejiang Province Key Laboratory of Biofuel, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Nitrogen source is one of the important factors that affect the microalgae growth and lipid accumulation. We studied the effects of various nitrogen sources (i.e. NaNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl and $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) and amount on the growth density, lipid yield, and eicosapentaenoic acid (EPA) content of *Nannochloropsis oculata* by single factor

Received: June 17 2013; **Accepted:** September 10, 2013

Supported by: Science Technology Department of Zhejiang Province (No. 2009R50012-11), Project of Education Department of Zhejiang Province (No. Y201224695).

Corresponding author: Xianghong Lu. Tel/ Fax: +86-571-88320646; Email: luxh@zjut.edu.cn

浙江省科技厅项目 (No. 2009R50012-11), 浙江省教育厅项目 (No. Y201224695) 资助。

网络出版时间: 2013-10-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131017.1241.001.html>

experimental method. The results show that *N. oculata* preferred NH_4^+ as nitrogen source rather than NO_3^- and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. NH_4^+ could promote the growth and lipid accumulation of *N. oculata*. With the increase of nitrogen concentration, the biomass and the content of polyunsaturated fatty acid (PUFA) increased, but the content of lipid decreased. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ was the most suitable for growth, accumulation of lipid and EPA of *N. oculata* among the four investigated nitrogen sources. The optimal concentration was 5.29 mmol/L.

Keywords: *Nannochloropsis oculata*, growth density, lipid yield, eicosapentaenoic acid content

眼点拟微绿球藻的培养周期短, 油脂产量高, 同时富含花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸等具有保健功能的多不饱和脂肪酸^[1]。因此, 眼点拟微绿球藻是生产生物柴油和多不饱和脂肪酸的重要原料, 值得人们重视和研究。

微藻的生长、油脂产量和脂肪酸组成与培养条件有很大关系。潘庭双等^[2]研究了 NaNO_3 、 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4NO_3 对 *N. oculata* 生长的影响; Li 等^[3]报道了 NaNO_3 、 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 对 *N. oleoabundans* 细胞生长和油脂产率的影响; 胡章喜等^[4]研究了 NO_3^- 、 NH_4^+ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、氨基酸对赤潮异弯藻、凯伦藻、球形棕囊藻、角毛藻生长的影响。前人的研究表明: 1) 不同的藻种对氮的种类和浓度需求不同^[2-7]; 2) 微藻最容易利用铵态氮, 铵态氮有利于微藻油脂积累, 但是随着 NH_4^+ 被利用, 培养液的 pH 逐渐下降, 抑制微藻的生长^[6], 因而高浓度的铵盐反而会抑制微藻的生长。 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 是弱酸弱碱盐, NH_4^+ 被吸收利用后, 培养液的 pH 略有下降, 可以高浓度使用。 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源对眼点拟微绿球藻生长、油脂产率和 EPA 含量方面的研究鲜有报道, 因此, 本文研究并比较了 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 与其他氮源及其浓度对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂产率和 EPA 含量的影响, 以期筛选出适于眼点拟微绿球藻生长和油脂积累的氮源种类及浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用眼点拟微绿球藻来自中国科学院典型培养物保藏委员会下属的海藻种质库(中国青岛, chl-3), 经涂布平板的方法纯化之后, 保存待用。

1.2 实验过程

1.2.1 眼点拟微绿球藻的扩种

按照窦晓等^[8]报道的扩种方法对眼点拟微绿球藻进行扩种。

1.2.2 实验设计

1) 藻种的准备: 取 4 L 培养至对数期的眼点拟微绿球藻, 按窦晓等^[8]报道的方法得到脱除培养盐的藻泥, 向藻泥中加入 100 mL 去离子水, 振荡,

混合均匀待用。

2) 培养液的配制: 在相同的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度下, 设计 4 组实验: A 组为对照组, B、C、D 组为实验组。对照组 A 的培养液为改良后的 F/2^[8]; 实验组 B、C、D 的培养液分别用 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 替代改良 F/2 培养液中的 NaNO_3 , 方案见表 1。

3) 接种及培养: 在 1 L 的锥形瓶中, 按上述设计方案配制培养液, 将 5 mL 眼点拟微绿球藻藻液接种至 1 L 培养液中, 培养条件和方法同窦晓等^[8]报道的一样。

表 1 不同实验组培养液中的氮源种类及浓度

Table 1 Nitrogen source and concentration in different culture medium

Group No.	A	B	C	D
	NaNO_3 (mmol/L)	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (mmol/L)	NH_4Cl (mmol/L)	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (mmol/L)
1		0.67	1.33	1.33
2		1.33	2.00	2.65
3	2.65	2.00	2.65	5.29
4		2.33	3.98	6.62
5		2.66	5.31	7.94

1.3 分析方法

1.3.1 眼点拟微绿球藻细胞密度及生物量的测定

按照窦晓等^[8]报道方法测定眼点拟微绿球藻的生长密度。为减小粘附在藻细胞壁上的培养盐对生物量的影响, 采收后的藻细胞用去离子水离心洗涤 3 次, 获得的藻泥 70 °C 烘干至恒重, 称重。为简化操作, 避免高温干燥对油脂及脂肪酸组成的影响, 微藻的生物量通过(1-1)式计算得到, 此式由实验测得, 其中, y 为干重(g/L), x 为吸光度。

$$y=0.9097x-0.0142 \quad (1-1)$$

1.3.2 眼点拟微绿球藻油脂产率的测定

藻液加入硫酸铝钾絮凝剂, 3 500 r/min 离心 3 min, 弃去上层清液, 得到藻泥, 采用改良酸法^[9]提取微藻中的油脂, 利用式(1-2)计算得到微藻

的油脂产率:

$$Y_{Lipid} = \frac{C_{Lipid}}{T} \times 1000 \text{ mg/g} \quad (1-2)$$

式中: Y_{Lipid} —油脂产率, mg/(d·L);

C_{Lipid} —油脂含量, g/L; T —培养时间, d。

1.3.3 眼点拟微绿球藻藻油成分的分析

按照窦晓等^[8]报道的分析方法对眼点拟微绿球藻藻油成分进行定性和定量分析。

2 结果与分析

2.1 氮源种类及浓度对眼点拟微绿球藻生长的影响

图 1 结果显示, 在实验所考察的浓度范围内, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时, 随着其浓度的增加, 眼点拟微绿球藻生长密度增加, 当 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度增加到 2.00 mmol/L, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 浓度增加到 5.29 mmol/L 后, 氮源浓度对眼点拟微绿球藻生长的影响很小; 眼点拟微绿球藻的生长密度随着 NH_4Cl 浓度的增加, 先增加后急剧下降, 在 2.65 mmol/L 时, 生长密度达到最大。尽管相比于其他形式的氮, 微藻更容易利用铵态氮, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NaNO_3 ^[6] 必须分别经过水解过程和还原过程转化为铵态氮后才能更好地被利用, 铵根离子跟氨在水溶液中存在互相转化, 氨在微藻细胞内不能积累过多,

否则会使微藻中毒, 氨中毒使微藻的呼吸作用降低, 蛋白质合成受阻, 进而抑制微藻的生长。因此, 任何形态的氮都存在适宜的氮源浓度。综合考虑, 确定以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源培养眼点拟微绿球藻时的适宜浓度分别为 2.00、2.65 和 5.29 mmol/L。

以适宜浓度的 NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源做对比试验, 考察氮源种类对眼点拟微绿球藻生长的影响, 其生长曲线见图 2。图 1、2 显示, 以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时, 眼点拟微绿球藻达到稳定期的时间与 NaNO_3 为氮源时相近, 但比以 NH_4Cl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时要长。这主要是因为铵态氮更容易利用, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NaNO_3 的利用必须先分别经尿素酶^[10-11]和硝酸还原酶^[12]酶解后才能被眼点拟微绿球藻利用; 以 NH_4Cl 为氮源时, 随着 NH_4^+ 的吸收利用, 培养液的 pH 逐渐下降, 过低的 pH 会影响代谢中相关酶的活性, 从而抑制微藻的生长, 生长密度偏低; 而 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 是弱碱弱酸盐, NH_4^+ 的利用对溶液 pH 的影响很小。 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 的利用虽然要经过水解过程, 生长速率偏低, 但是 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 水解后对培养液的 pH 影响很小^[2], 并且水解的过程中会产生 CO_2 , 能促进微藻的生长^[13]; 因此相对于 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时, 眼点拟微绿球藻的生长密度

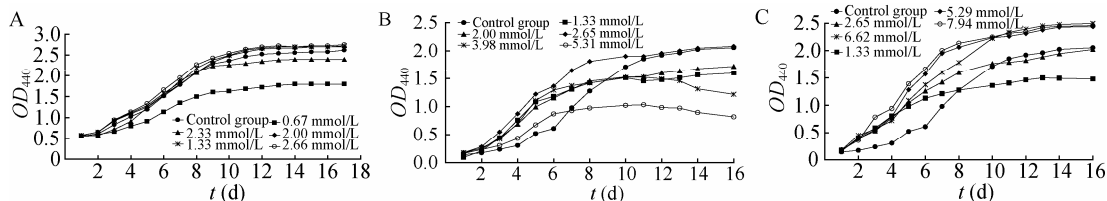


图 1 氮源浓度对眼点拟微绿球藻生长密度的影响

Fig.1 Effects of nitrogen source concentration on the growth density of *N. oculata*. (A) $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. (B) NH_4Cl . (C) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

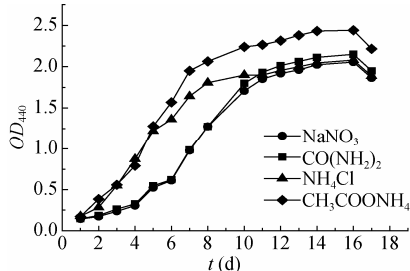


图 2 氮源种类对眼点拟微绿球藻生长密度的影响

Fig.2 Effects of nitrogen sources on the growth density of *N. oculata*.

较高。由公式(1-1)知: 眼点拟微绿球藻的生物量与其生长密度成正比。综上所述, 确定 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时, 眼点拟微绿球藻的生长密度较高。由公式(1-1)知: 眼点拟微绿球藻 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为适于眼点拟微绿球藻生长的氮源。

2.2 氮源种类及浓度对眼点拟微绿球藻的油脂产率和 EPA 含量的影响

2.2.1 氮源的浓度对眼点拟微绿球藻的油脂产率和 EPA 含量的影响

一般认为, 氮浓度的增加有利于微藻的生长, 不利于油脂的积累, 且积累的脂肪酸主要是饱和

脂肪酸^[14]。油脂产率是衡量微藻生物柴油经济性的指标，它同微藻的生物量和油脂含量均相关，因此，最大化油脂产率是提升微藻生物柴油可行性的基本条件^[15]。本文以油脂产率和 EPA 含量为目标，考察了氮浓度对油脂积累和 EPA 生成的影响，结果见表 2。结果显示，在实验浓度范围内，眼点拟微绿球藻的油脂产率随着 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度的增加而增加，当 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度增加到 2.33 mmol/L 后，再增加 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度对油脂产率的影响很小；随着 NH_4Cl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 浓度的增加，眼点拟微绿球藻的油脂产率先增加后下降， NH_4Cl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 浓度分别为 2.65 mmol/L 和 5.29 mmol/L 时，眼点拟微绿球藻的油脂产率最高。

表 2 还显示氮源浓度也会影响藻油中的 EPA 含量，在实验浓度范围内， $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时，藻油中的 EPA 含量随着氮源浓度的增加先增加后略有下降，当 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度为 2.33 mmol/L， $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 浓度为 5.29 mmol/L 时，EPA 含量达到最高； NH_4Cl 为氮源时，藻油中的 EPA 含量随着氮源浓度的增加而增加。这与魏东等^[16]报道的结果相似：在氮缺乏时，眼点拟微绿球藻脂肪酸去饱和酶 FAD 活性下降。

综合考虑眼点拟微绿球藻的油脂产率和 EPA 含量，确定 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 的适宜浓度分别为 2.33、2.65、5.29 mmol/L。

2.2.2 氮源种类对眼点拟微绿球藻的油脂产率和 EPA 含量的影响

以适宜浓度的 NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 和

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源，考察了氮源种类对眼点拟微绿球藻的油脂产率和 EPA 含量的影响，其结果见表 3。

结果显示，在 4 种氮源中，以 NH_4Cl 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源，眼点拟微绿球藻具有较高的油脂产率，但以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时，EPA 含量较高，而以 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时的 EPA 产率略低于 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时的 EPA 产率。考虑到以 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时，眼点拟微绿球藻既有较高的 EPA 产率，还有较高的油脂产率，这不仅能满足微藻生物柴油生产的需要，而且在生物柴油生产的同时还能够获得较多的具有高附加值的 EPA，因此确定 5.29 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为眼点拟微绿球藻积累油脂和 EPA 的适宜氮源和浓度。

2.3 显著性分析

从表 4 中可以看出氮源种类对眼点拟微绿球藻生物量有显著影响，氮源浓度对其生物量的影响不显著；氮源种类和浓度对眼点拟微绿球藻的油脂产率都不显著；眼点拟微绿球藻藻油中的 EPA 含量与氮源种类和浓度极显著相关。因此，培养眼点拟微绿球藻时，选择合适的氮源种类和浓度，能够大幅度地提高藻油中 EPA 的含量。

3 结论

氮源的种类和浓度会影响眼点拟微绿球藻的生长、油脂积累和 EPA 的生成。氮源种类对眼点拟微绿球藻的生长有显著影响， $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时，眼点拟微绿球藻的生长速率快，生物量高，

表 2 氮源浓度对眼点拟微绿球藻油脂产率和 EPA 含量的影响

Table 2 Effects of nitrogen sources concentration on the lipid yield and EPA content of *N. oculata*

	NaNO_3	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (mmol/L)				
		0.67	1.33	2.00	2.33	2.66
Lipid yield (mg/(d·L))	42.0±0.7	39.0±0.4	47.9±0.9	51.2±1.5	59.0±1.1	59.6±0.9
EPA content (%)	15.5±0.5	7.7±0.2	13.4±0.6	15.7±0.9	16.9±0.2	16.1±1.0
	NaNO_3	NH_4Cl (mmol/L)				
		1.33	2.00	2.65	3.98	5.31
Lipid yield (mg/(d·L))	44.7±1.1	47.7±1.3	49.7±0.6	58.4±0.8	11.2±0.5	10.9±0.7
EPA content (%)	10.3±0.3	5.5±0.8	9.0±0.3	9.0±0.7	9.8±0.7	10.8±0.4
	NaNO_3	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (mmol/L)				
		1.33	2.65	5.29	6.62	7.94
Lipid yield (mg/(d·L))	44.7±1.1	42.9±1.3	56.9±0.4	58.2±0.6	47.6±0.8	50.7±1.9
EPA content (%)	10.3±0.3	5.1±0.9	6.9±0.5	12.8±1.0	11.8±0.8	11.8±0.2

表 3 氮源种类对眼点拟微绿球藻油脂产率、EPA 含量和 EPA 产率的影响

Table 3 Effects of nitrogen sources on the lipid yield, EPA content and EPA yield of *N. oculata*

	NaNO_3	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	NH_4Cl	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$
Lipid yield (mg/(d·L))	44.7±1.1	49.5±0.3	58.4±0.8	58.2±0.6
EPA content (%)	10.3±0.3	16.9±1.2	9.0±0.7	12.8±1.0
EPA yield (mg/(d·L))	4.6±0.3	8.4±1.2	5.3±0.7	7.4±1.0

表 4 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NH_4Cl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 及其浓度对眼点拟微绿球藻油脂产率和 EPA 含量影响的方差分析

Table 4 Effects of $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ and concentration on the lipid yield and EPA content of *N. oculata*

Biomass						
Error sources	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
A	2.26	2	1.13	6.261	0.023	4.46
B	0.49	4	0.12	0.678	0.626	3.84
Error	1.44	8	0.18			
Total	4.19	14				
Lipid yield						
Error sources	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
A	825.31	2	412.65	1.754	0.234	4.46
B	639.07	4	159.77	0.679	0.625	3.84
Error	1882.1	8	235.26			
Total	3346.4	14				
EPA Content						
Error sources	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
A	75.75	2	37.88	19.359	0.001	4.46
B	104.30	4	26.08	13.327	0.001	3.84
Error	15.65	8	1.96			
Total	195.70	14				

A: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; B: the concentration of $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

并且随着其浓度的增加,眼点拟微绿球藻的生长速率变快,生物量增大。氮源种类和浓度对眼点拟微绿球藻油脂产率的影响不显著,但会对 EPA 含量产生显著影响。以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 为氮源时, EPA 含量较高,并且随着 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 浓度的增加, EPA 含量先增加后略有下降。综合考虑生长速率、生物量、油脂产率和 EPA 含量,选 5.29 mmol/L 的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 作为眼点拟微绿球藻培养的适宜氮源和浓度。

REFERENCES

- [1] Brown MR, Jeffery SW, Volkman JK, et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 1997, 151: 315–331.
- [2] Pan TS, Hu XJ, Hou GJ, et al. Effect of nitrogen application on the growth of *Nannochloropsis oculata*. *J Anhui Agric Sci*, 2001, 29(4): 548–555 (in Chinese).
潘庭双, 胡贤江, 侯冠军, 等. 氮对微绿球藻生长的影响. *安徽农业科学*, 2001, 29(4): 548–555.
- [3] Li YQ, Wang B, Wu N, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81: 629–636.
- [4] Hu ZX, Xu N, Duan SS. Effects of nitrogen sources on the growth of *Heterosigma akashiw*, *Karenia* sp., *Phaeocystis globosa* and *Chaetoceros* sp. *Ecol Environ Sci*, 2010, 19(10): 2452–2457 (in Chinese).
胡章喜, 徐宁, 段舜山. 不同氮源对 4 种海洋微藻生长的影响. *生态环境学报*, 2010, 19 (10): 2452–2457.
- [5] Zhang QT, Dong SL, Hu GK, et al. Effects of different nitrogen on growth of microalgae. *Mar Sci*, 2005, 29(2): 8–11 (in Chinese).
张青田, 董双林, 胡桂坤, 等. 不同氮源对微藻增殖的影响. *海洋科学*, 2005, 29(2): 8–11.
- [6] Jiang HM, Gao KS. Effects of nitrogen sources and concentration on the growth and fatty acid composition of *Phaeoda-ctylum tricornutum*. *Acta Hydrobiol Sin*, 2004, 28(5): 545–551 (in Chinese).
蒋汉明, 高坤山. 氮源种类及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响. *水生生物学报*, 2004, 28(5): 545–551.
- [7] Liu PH, Hao ZD, Yang X, et al. Effects of nitrogen sources on growth and total lipid contents of *Coelastrum reticulatum* and *Scenedesmus* sp.. *Ecol Environ Sci*, 2012, 21(8): 1429–1433 (in Chinese).
刘平怀, 郝宗娣, 杨勋, 等. 不同氮源对 2 种微藻生长及总脂含量的影响. *生态环境学报*, 2012, 21(8): 1429–1433.
- [8] Dou X, Lu XH, Lu MZ, et al. Effects of carbon source and concentration on the growth density, lipid accumulation and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(3): 358–369 (in Chinese).
窦晓, 陆向红, 卢美贞, 等. 碳源种类及 C/N 对眼点拟微绿球藻生长密度、油脂含量和脂肪酸组成的影响. *生物工程学报*, 2013, 29(3): 358–369.
- [9] Ma S, Fu LL, Wang M, et al. Comparison of extraction methods of crude fat from microalgae. *China Oils Fats*, 2010, 35(5): 77–79 (in Chinese).
马帅, 付莉莉, 汪萌, 等. 从微藻中提取粗脂的方法比较. *中国油脂*, 2010, 35(5): 77–79.
- [10] Leftley JW, Syrett. Urease and ATP: amidolyase activity in unicellular algae. *J Gen Microbiol*, 1973, 77: 109–115.
- [11] Bekheet IA, Syrett PJ. Urea-degrading enzymes in algae. *Br Phycol J*, 1977, 12(2): 137–143.
- [12] Water Environment Federation. *Nutrient Removal*, WEF MOP 34. McGraw Hill Professional, 2010: 13–15.
- [13] Hu HH, Gao KS. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(5): 421–425.
- [14] Lin Q, Lin JD. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 1615–1621.
- [15] Xu J, Zhang CW, Li AF, et al. Isolation and selection of freshwater microalgae for oil production in south China. *Renew Energy Res*, 2011, 29(1): 66–71 (in Chinese).
许瑾, 张成武, 李爱芬, 等. 华南地区淡水产油微藻藻株的分离与筛选. *可再生能源*, 2011, 29(1): 66–71.
- [16] Wei D, Zhang XC, Sui ZH, et al. Effects of nitrogen sources and N/P ration on cell growth, total lipid content and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. *Mar Sci*, 2000, 24(7): 46–51 (in Chinese).
魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响. *海洋科学*, 2000, 24(7): 46–51.

(本文责编 陈宏宇)