能源小球藻异养培养条件优化研究

黄 佳[1]，张文君[1]，刘 珺[1]，李彦鹏[1,2]

（1. 长安大学环境科学与工程学院，西安 710054；
2. 长安大学旱区地下水文与生态效应教育部重点实验室，西安 710054）

摘要：对影响小球藻生长的 4 个主要因素即葡萄糖，KNO_3，KH_2PO_4 及 $MgSO_4$ 进行单因素实验，探讨不同添加量对生物量的影响。并通过正交实验确定各因素对小球藻影响程度的大小，得到了异养培养的最佳优化条件：在 BG11 培养基的基础上，葡萄糖浓度为 20 g/L, C∶N（质量比）为 3:1，KH_2PO_4 浓度为 0.05 g/L，$MgSO_4$ 浓度为 0.15 g/L 时，小球藻的最大生物量可达到 4.45 g/L. 该研究为小球藻的异养培养提供了依据。

关键词：环境生物学；小球藻；异养；优化

中图分类号：Q914　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-2850(2015)24-2530-09

Study on the heterotrophic cultivation optimization of *Chlorella* sp.

HUANG Jia[1], ZHANG Wenjun[1], LIU Jun[1], LI Yanpeng[1,2]

(1. *School of Environmental Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an* 710054, *China*;
2. *Key Laboratory of Subsurface Hydrology and Ecological Effect in Arid Region of Ministry of Education, Chang'an University, Xi'an* 710054, *China*)

Abstract: To examine the effect of glucose, KNO_3, KH_2PO_4 and $MgSO_4$ on the growth of *Chlorella* sp., single factor and orthogonal experiments were employed to determine the optimum condition of heterotrophic cultivation. Results showed that on the basis of BG11 culture medium with the condition of glucose 20 g/L, C:N 3:1 (mass ratio), KH_2PO_4 0.05 g/L, $MgSO_4$ 0.15 g/L, *Chlorella* sp. obtained the maximum biomass 4.45g/L .The research provided basis for heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp.

Key words: environmental biology; *Chlorella* sp.; heterotrophic; optimization

0 引言

小球藻（*Chlorella* sp.）为绿藻门小球藻属单细胞绿藻，是一种普生性球形单细胞淡水藻类，直径 3～8 μm，出现在 20 多亿年前，是地球上最早的生命之一，具有高效的光合效率，不仅可以利用光能自养，而且可以利用有机碳进行异养生长，其繁殖速度快，生物量大，分布极广[1]。小球藻含有丰富的蛋白质、脂质、多糖、食用纤维、维生素、微量元素和活性代谢产物，具有防治消化性溃疡、抗肿瘤，增强免疫、抗辐射、降血脂等保健和药理作用[2]。

近年来，由于突出的能源危机，寻找生物燃料替代化石燃料成为亟待解决的问题[3]。微藻是生产生物柴油的良好原料，小球藻因其环境适应能力强、光合效率高、生长周期短、生物量大等优点，成为首选藻类[4]。要得到优质的藻类并且加以利用，首先需要得到大量的藻体[5]。这里通过对小球藻进行异养培养，考察葡萄糖，KNO_3，KH_2PO_4 及 $MgSO_4$ 对小球藻生物量及生长速率的影响，并通过正交实验，对其培养条件进行优化。

作者简介：黄佳（1991—），女，硕士研究生，主要研究方向：水资源处理与应用
通信联系人：李彦鹏，教授，主要研究方向：环境多相流理论与工艺. E-mail: liyanp01@chd.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 藻种

小球藻（*Chlorella* sp.）购自中国科学院野生生物种质库淡水藻种库。

1.2 培养基与培养条件

本实验在 BG11 液体培养基[6]的基础上进行优化。

100 mL 培养液装量于 250 mL 锥形瓶，接种量 10%，培养温度 25℃，于生化培养箱中培养，光照强度 3 000～3 500 lx，光暗周期 12 h∶12 h，每天手摇 3～5 次，在无菌接种箱内取样。

1.3 仪器与设备

实验用的仪器有紫外可见分光光度计 UV-2450（苏州岛津制作所）、LRH-150 生化培养箱（上海一恒科技有限公司）、无菌接种箱 WJ-ZJ（南京优尼生物科技有限公司）、光照强度计 SmartAR823+（广州横高精艺科技发展有限公司）、离心机 80-2B（湖南星科科学仪器有限公司）以及显微镜 Motic BA400（北京信诺莱伯仪器公司）。

1.4 实验方法

1.4.1 生物量测定

浊度比色法[7]：每天定时取样，用紫外分光光度计在 540 nm 波长下测藻液吸光度（OD_{540}）。

细胞密度法[6]：在显微镜下用血球计数板法。采用 25×16 型血球计数板，细胞密度：N= (80 个小格内细胞个数/80) ×400×10^4 ×稀释倍数。每组测量 3 次，取平均值。

细胞干重法[8]：用移液管取不同密度均匀小球藻液 2 mL，放入已称重（质量为 W_1）的离心管中进行离心，8 000 r/min 下离心 5 min，除去上清液，用蒸馏水洗涤藻细胞，重复离心、洗涤 3 次后，80℃烘干至恒重，用电子天平称重（质量为 W_2），测定藻体干重（W）。每组测量 3 次，取平均值。

根据下式可得藻体的干重：

$$W=（W_2-W_1）\times 1\,000/V,$$

其中，W_1 为离心管重量（g）；W_2 为离心干燥后总重量（g）；1 000 为 1 L 的藻液；V 为所取藻液体积（mL）。

1.4.2 比生长速率测定

比生长速率可用来评价藻体在一定时期内的总体生长情况。该指标的计算以浊度比色法测定的吸光值为基础，公式如下[9]：

$$\mu=（\ln N_2-\ln N_1）/（T_2-T_1），$$

其中，μ 为比生长速率(d^{-1})；N_1 为 T_1 时刻的细胞密度(10^6 cells·mL^{-1})；N_2 为 T_2 时刻的细胞密度(10^6 cells·mL^{-1})。

1.4.3 正交实验

在小球藻生长过程中，所需要的营养元素有 15～20 种，水体的大多数元素均能满足它的需要，不会成为限制性因子。C，N，P 是小球藻生长的主要营养元素[10]，Mg 是影响其生长的主要微量元素[11]。本实验中，利用正交实验优化了培养基中葡萄糖，C:N，KH_2PO_4 及 $MgSO_4$ 浓度，确定了它们对小球藻生长影响程度的大小。采用 L_9（3^4）正交表进行四因素三水平正交实验，如表 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 OD_{540} 分别与藻体细胞密度及干重的线性关系

将藻体的吸光度与相应的细胞密度及干重进行一元线性拟合，分别建立了 OD_{540} 与密度及干重的线性关系，如图 1 所示。由图 1 可得：小球藻细胞数 N（$\times 10^6$cells·mL^{-1}）= 19.45×OD_{540}−1.816 5（R^2 = 0.981 1）；藻体干重 DW（g/L）=0.434 8×OD_{540}−0.050 7（R^2=0.962 9）. 通过上式，用测得的吸光度值可直接得到对应的藻细胞密度及干重（若测得的 OD 值大于 0.8，则需要稀释[12]）。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Levels of factors

因子 X_i	因子描述	水平		
		1	2	3
A	葡萄糖/（g/L）	10	15	20
B	C:N（质量比）	2:1	3:1	4:1
C	KH_2PO_4/（g/L）	0.05	0.08	0.12
D	$MgSO_4$/（g/L）	0.050	0.075	0.150

2.2 葡萄糖浓度对小球藻生长的影响

葡萄糖是小球藻异养培养的较好碳源，它可以直接利用有机葡萄糖中的碳。在培养基中分别添加 5，10，15，20，25 g/L 的葡萄糖，其异养生长曲线如图 2 所示。根据单因素方差分析法可知，不同浓度的葡萄糖对小球藻生长有着显著影响（P<0.05），图 3～图 4 为不同浓度下小球藻生物量的变化情况。

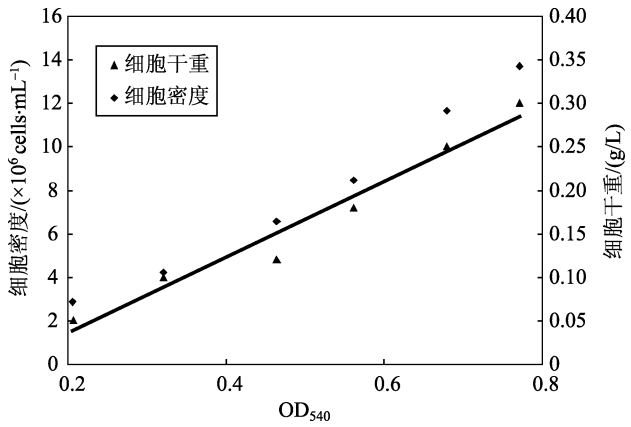


图 1 OD_{540} 与小球藻细胞密度和细胞干重的线性关系

Fig. 1 Linear relationship of the cell numbers and dry weight of *Chlorella* sp. with OD_{540}

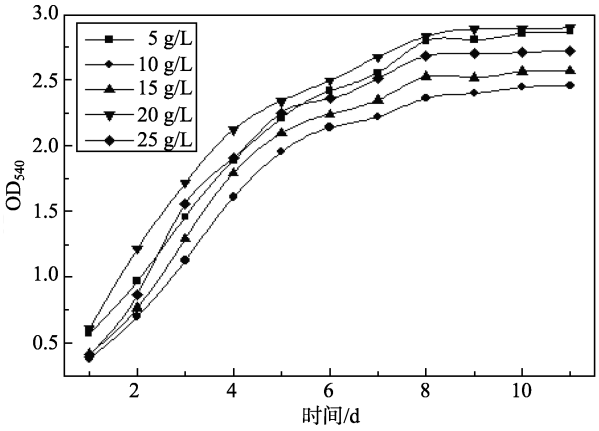


图 2 不同葡萄糖浓度对小球藻生长影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of glucose on growth of *Chlorella* sp.

由图 2 可以看出，随着时间的推移，小球藻不断生长，第 2 天开始进入对数生长期，第 8 天进入稳定期。由图 3、图 4 可知，细胞密度及干重在第 9 天达到最大值，此后不再明显增加。当葡萄糖浓度为 20 g/L 时，小球藻生长情况最好，细胞累积量和干重分别达到 106.548×10^6 cells·mL^{-1} 和 2.737 g/L，这和张丽君等[11]研究最适葡萄糖浓度为 10 g/L 的结果不一致，可能是由于培养条件、藻种差异性等原因引起的。当葡萄糖浓度继续增加至 25 g/L 时，生物量反而减小，说明过高的浓度抑制了藻类生长[12]，葡萄糖浓度若过低，满足不了小球藻的生长需求。因此，可得葡萄糖浓度 20 g/L 为其最适生长条件。表 2 给出了不同浓度葡萄糖对小球藻生长速率的对比。

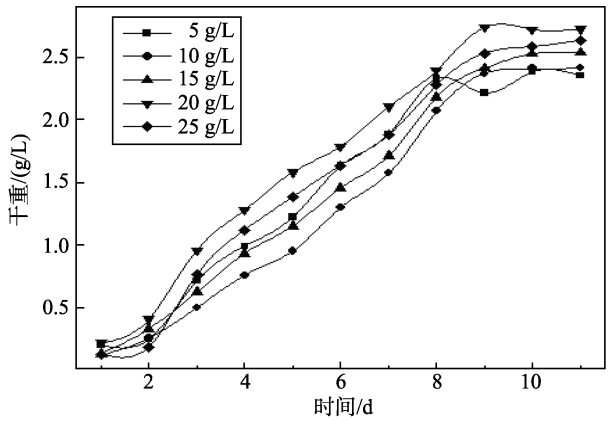


图 3 不同葡萄糖浓度对小球藻细胞干重的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of glucose on biomass dry weight of *Chlorella* sp.

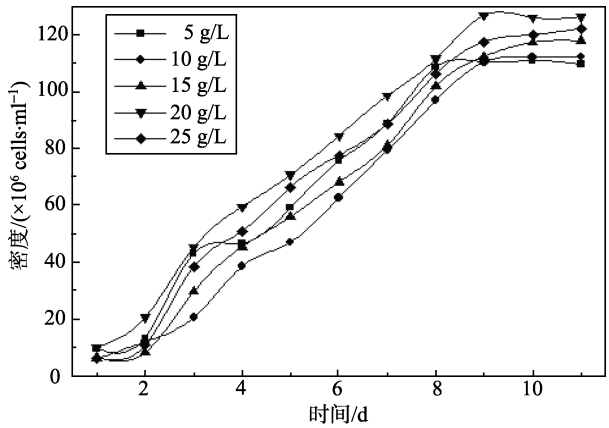


图 4 不同葡萄糖浓度对小球藻细胞密度的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of glucose on cell density of *Chlorella* sp.

表 2 不同浓度葡萄糖的测定结果

Tab. 2 Measured results with different concentrations of glucose

葡萄糖浓度/（g/L）	N_1/（×10⁶ cells·mL⁻¹）	N_2/（×10⁶ cells·mL⁻¹）	细胞累积量/（×10⁶ cells·mL⁻¹）	比生长速率/d⁻¹	最大细胞干重/（g/L）
5	13.220	110.462	97.242	0.303	2.329
10	11.818	110.400	98.582	0.319	2.367
15	8.034	112.345	104.311	0.377	2.524
20	20.384	126.932	106.548	0.382	2.737
25	10.562	117.596	107.034	0.344	2.584

2.3 KNO_3 浓度对小球藻生长的影响

氮是微藻类生长重要的营养元素。SHI 等[13]研究了 3 种氮源即 KNO_3、氨水和尿素对 *Chlorella* protothecoides 异养生长的影响，本实验用 KNO_3 作为小球藻生长的氮源，在培养基中分别添加 0.8，1.2，1.6，3.2，6.4 g/L 的 KNO_3，其异养生长曲线如图 5 所示，根据单因素方差分析法可知，不同浓度的 KNO_3 对小球藻生长有着显著影响（P<0.05），图 6～图 7 为不同浓度下小球藻生物量的变化情况。

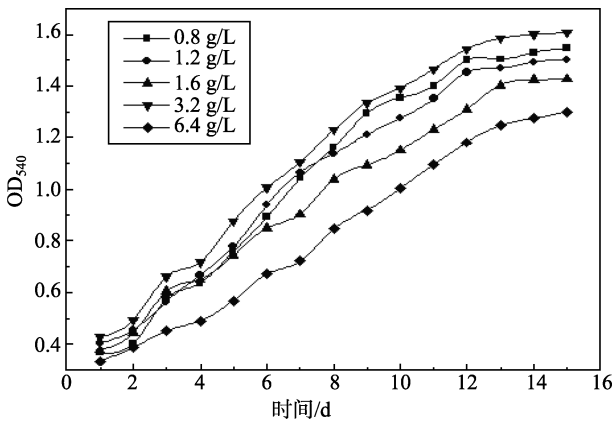


图 5 不同 KNO_3 浓度对小球藻生长影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of KNO_3 on growth of *Chlorella* sp.

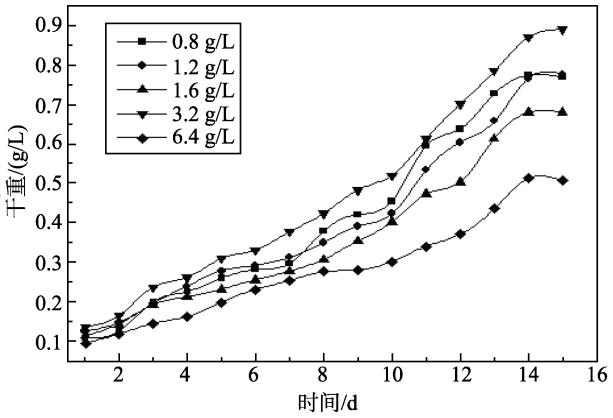


图 6 不同 KNO_3 浓度对小球藻细胞干重的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of KNO_3 on biomass dry weight of *Chlorella* sp.

由图 5 可以看出，小球藻的生长在不同浓度的 KNO_3 中呈现较明显的差异。从第 3 天开始进入对数生长期，KNO_3 浓度为 0.8 g/L 和 1.2 g/L 的藻液，从第 12 天开始进入稳定期，而浓度为 1.6，3.2，6.4 g/L 的藻液，从第 13 天开始陆续进入稳定期，说明高浓度的 KNO_3 可以延长小球藻的对数生长期。由图 6～图 7 可以看出，小球藻最终生物量的大小按顺序为 3.2 g/L>0.8 g/L>1.2 g/L>1.6 g/L>6.4 g/L. 由此说明，提高氮浓度，可以提高小球藻生物量，当 KNO_3 浓度为 3.2 g/L 时，细胞累积量及干重达到最大值，分别为 25.799×10^6 cells·mL^{-1} 和 0.870 g/L，再增加浓度，反而抑制了微藻的生长[14]。因此，KNO_3 浓度为 3.2 g/L 为其最适生长条件。表 3 给出了不同浓度 KNO_3 对小球藻生长速率的对比。

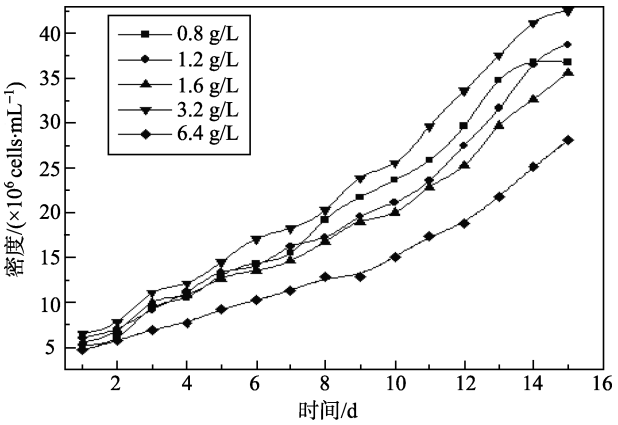


图 7 不同 KNO_3 浓度对小球藻细胞密度的影响

Fig. 7 Effect of different concentrations of KNO_3 on cell density of *Chlorella* sp.

表 3 不同浓度 KNO_3 的测定结果

Tab. 3 Measured results with different concentrations of KNO_3

KNO_3 浓度/（g/L）	N_1/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	N_2/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	细胞累积量/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	比生长速率/d^{-1}	最大细胞干重/（g/L）
0.8	6.022	29.653	23.631	0.159	0.773
1.2	7.033	27.471	20.438	0.136	0.657
1.6	6.839	25.234	18.395	0.131	0.614
3.2	7.811	33.610	25.799	0.160	0.870
6.4	5.711	18.828	13.117	0.119	0.512

2.4 KH_2PO_4 浓度对小球藻生长的影响

磷是微藻生长的一个重要限制因子，不同的藻类对磷浓度有不同的要求。本实验采用 KH_2PO_4 作为小球藻生长的磷源。在培养基中分别添加 0.04，0.08，0.12，0.16，0.20 g/L 的 KH_2PO_4，其异养生长曲线如图 8 所示，图 9～图 10 为不同浓度下小球藻生物量的变化情况。

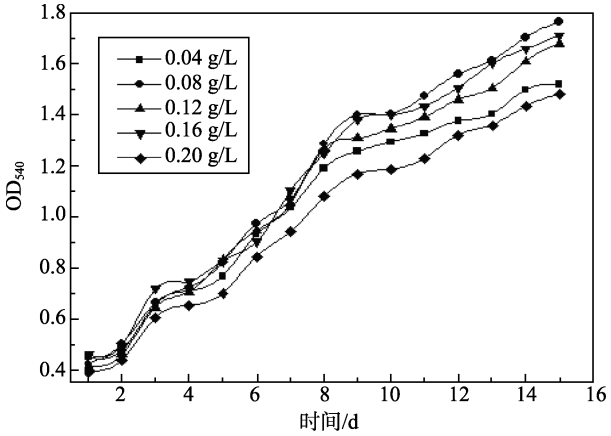


图 8 不同 KH_2PO_4 浓度对小球藻生长影响

Fig. 8 Effect of different concentrations of KH_2PO_4 on growth of *Chlorella* sp.

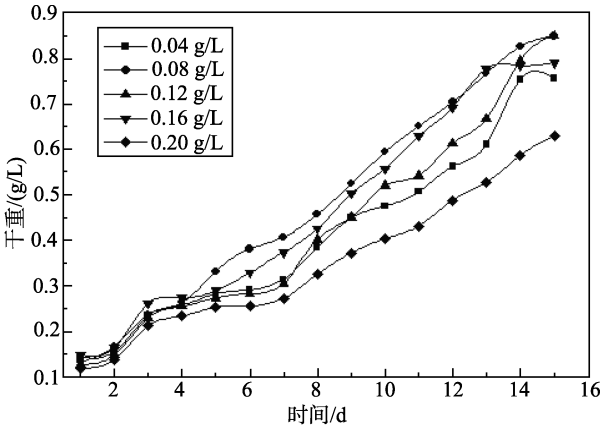


图 9 不同 KH_2PO_4 浓度对小球藻细胞干重的影响

Fig. 9 Effect of different concentrations of KH_2PO_4 on biomass dry weight of *Chlorella* sp.

由图 8～图 10 可以看出，不同浓度的 KH_2PO_4 对小球藻生长的影响具有显著差异。在前 4 天，不同浓度的 KH_2PO_4 对小球藻生长没有产生明显影响，说明此时处于调整期。从第 5 天开始，小球藻进入对数生长期，生物量随着时间的延长不断增加。当 KH_2PO_4 浓度由 0.04 g/L 增加至 0.08 g/L 时，小球藻生物量有明显的增加，待浓度进一步增加时，生物量减少，达到 0.2 g/L 时，最小，说明高浓度的磷酸盐抑制了小球藻的生长，这和季祥等[5]的研究结果相一致。当 KH_2PO_4 浓度为 0.08 g/L 时，为小球藻生长的最适宜浓度，此时细胞干重和细胞累积量分别达到 0.127 g/L 和 21.501×10^6 cells·mL^{-1}. 表 4 给出了不同浓度 KH_2PO_4 对小球藻生长速率的对比。

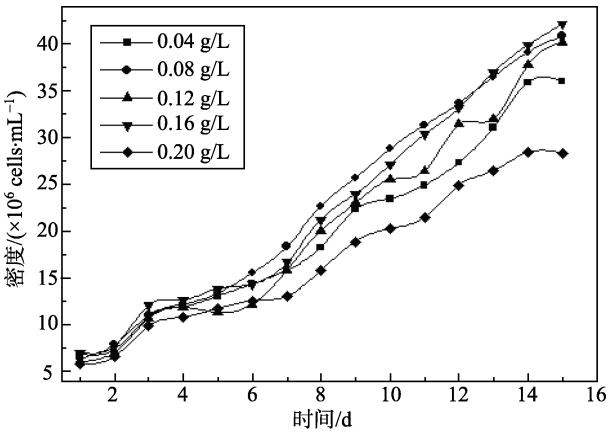


图 10 不同 KH_2PO_4 浓度对小球藻细胞密度的影响

Fig. 10 Effect of different concentrations of KH_2PO_4 on cell density of *Chlorella* sp.

表 4 不同浓度 KH_2PO_4 的测定结果

Tab. 4 Measured results with different concentrations of KH_2PO_4

KH_2PO_4 浓度/（g/L）	N_1/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	N_2/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	细胞累积量/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	比生长速率/d^{-1}	最大细胞干重/（g/L）
0.04	11.954	27.386	15.432	0.159	0.104
0.08	12.207	33.708	21.501	0.136	0.127
0.12	11.876	31.471	19.595	0.131	0.122
0.16	12.674	33.221	20.547	0.150	0.120
0.20	10.865	24.955	14.090	0.119	0.104

2.5 $MgSO_4$ 浓度对小球藻生长的影响

镁是小球藻生长所需的微量元素，这里使用 $MgSO_4$. 在培养基中分别添加 0.04，0.08，0.12，0.16，0.20 g/L 的 $MgSO_4$，其异养生长曲线如图 11 所示，图 12～图 13 为不同浓度下小球藻生物量的变化情况。

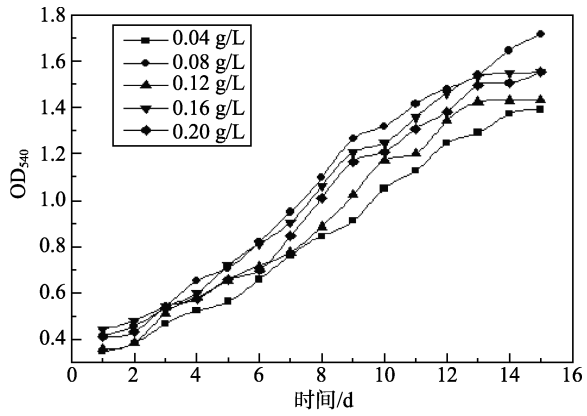


图 11 不同 $MgSO_4$ 浓度对小球藻生长影响

Fig. 11 Effect of different concentrations of $MgSO_4$ on growth of *Chlorella* sp.

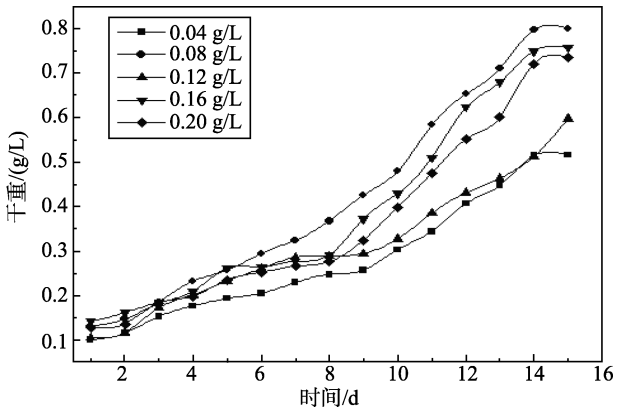


图 12 不同 $MgSO_4$ 浓度对小球藻细胞干重的影响

Fig.12 Effect of different concentrations of $MgSO_4$ on biomass dry weight of *Chlorella* sp.

由图 11 可以看出，不同浓度的 $MgSO_4$ 对小球藻的生长具有重要影响。在前 4 天，不同浓度的 $MgSO_4$ 对小球藻生长没有产生明显影响，从第 5 天开始，小球藻进入对数生长期。图 12 和图 13 表明，生物量随着时间的延长不断增加，且不同浓度的 $MgSO_4$ 对生物量的影响从第 9 天开始产生显著差异。浓度由 0.04 g/L 增加至 0.08g/L 时，小球藻生物量有显著的增加，且大小按顺序排列为 0.08 g/L>0.16 g/L>0.2 g/L>0.12 g/L>0.04 g/L. 当 $MgSO_4$ 浓度为 0.08g/L 时，为小球藻生长的最适宜浓度。表 5 给出了不同浓度 $MgSO_4$ 对小球藻生长速率的对比。

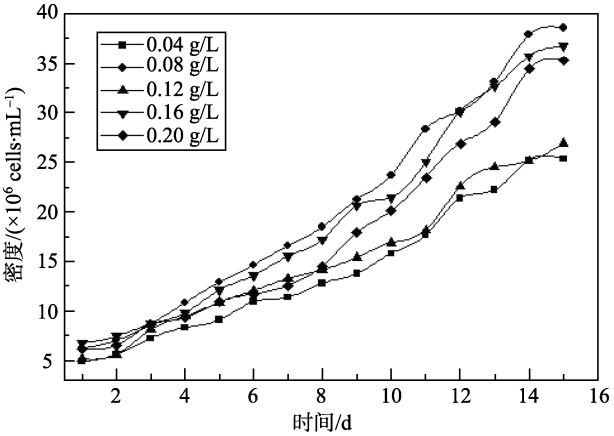


图 13 不同 $MgSO_4$ 浓度对小球藻细胞密度的影响

Fig. 13 Effect of different concentrations of $MgSO_4$ on cell density of *Chlorella* sp.

表 5 不同浓度 KH_2PO_4 的测定结果

Tab. 5 Measured results with different concentrations of KH_2PO_4

$MgSO_4$浓度/(g/L)	N_1/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	N_2/（$\times10^6$ cells·mL^{-1}）	细胞累积量/（10^6 cells·mL^{-1}）	比生长速率/d^{-1}	最大细胞干重/（g/L）
0.04	8.336	22.232	13.896	0.109	0.447
0.08	10.826	34.124	23.298	0.134	0.710
0.12	9.445	24.524	15.079	0.106	0.463
0.16	9.815	32.638	22.823	0.124	0.679
0.20	9.309	29.137	19.828	0.127	0.601

2.6 不同营养元素对小球藻生长的影响

按表 1 设计进行四因素三水平正交实验，结果如表 6 所示。

表 6 正交实验及结果

Tab. 6 Orthogonal experiment and results

实验序号	*A*（葡萄糖）	*B*（C:N）	*C*（KH_2PO_4）	*D*（$MgSO_4$）	藻体干重/(g/L)
1	1	1	1	1	2.63
2	1	2	2	2	4.33
3	1	3	3	3	3.65
4	2	1	2	3	4.21
5	2	2	3	1	4.412
6	2	3	1	2	4.13
7	3	1	3	2	4.25
8	3	2	1	3	4.45
9	3	3	2	1	3.46
极差	0.714	0.700	0.367	0.736	

由表 6 可知，第 8 组实验的小球藻长势最好，干重可达到 4.45 g/L. 4 种因素对小球藻生长的影响按极差大小排列为 $MgSO_4$>葡萄糖>C:N>KH_2PO_4，说明 $MgSO_4$ 对小球藻生长影响最为显著。当 C:N 从 2:1 增加至 3:1 时，生物量增加，但是达到 4:1 时生物量又随之下降。张丽君等[11]认为碳氮质量比维持在 4～5 之间是一种比较优化的控制条件，本实验得到优化条件为 3:1，相差不大，可能与实验的条件等因素差异

化有关。因此，较好的水平组合为 $A_3B_2C_1D_3$，即葡萄浓度为 20 g/L，C:N 为 3:1，KH_2PO_4 浓度为 0.05 g/L，$MgSO_4$ 浓度为 0.15 g/L.

3 结论

小球藻作为未来生物燃料的重要来源，开发利用前景广阔。如何用低成本、高产量、易控制的异养培养方式生产出富含多种营养成分的小球藻是大规模生产的关键[11]。研究在 BG11 培养基的基础上，分别添加小球藻生长所需的营养元素，通过单因素以及正交实验，寻找最佳的培养条件。

1）小球藻生长测得的 OD_{540} 与细胞密度及干重具有良好的线性关系。这一关系可为小球藻细胞密度及干重的测量提供依据。

2）在单因素实验中，葡萄糖，KNO_3，KH_2PO_4 及 $MgSO_4$ 的浓度对小球藻生长的影响具有显著差异。随着营养元素浓度的增加，小球藻生物量也随之增加，但是高浓度的营养元素反而会抑制小球藻的生长。当葡萄糖浓度为 20 g/L，KNO_3 浓度为 3.2 g/L，KH_2PO_4 浓度为 0.08 g/L，$MgSO_4$ 浓度为 0.08 g/L 时，分别可以达到最大的细胞密度及干重。

3）葡萄糖，C:N，KH_2PO_4，$MgSO_4$ 4 种因素中，$MgSO_4$ 对小球藻的影响程度最大，其次是葡萄糖。经过正交实验得到小球藻生长的优化条件，即葡萄糖 20 g/L，C:N 为 3:1，KH_2PO_4 0.05 g/L，$MgSO_4$ 0.15 g/L，在此条件下，小球藻的干重可达到 4.45 g/L.

[参考文献] (References)

[1] 薛荣，陆向红，卢美珍，等. 絮凝法采收小球藻的研究[J]. 可再生能源，2012，30（9）：80-84.
XUE R, LU X H, LU M Z, et al .The study on recovery of *Chlorella* by flocculation method[J]. Renewable Energy Resources, 2012, 30(9): 80-84. (in Chinese)

[2] 张全斌，徐祖洪. 几种褐藻中褐藻多糖硫酸酯的分离及分析[J]. 海洋科学，1996（3）：55-58.
ZHANG Q B, XU Z H. Isolation and analysis of fucoidans from various brown algae[J]. Marine Science, 1996(3): 55-58. (in Chinese)

[3] 黄冠华，陈峰，任庆功. 应用小球藻制备生物柴油[J]. 太阳能学报，2010，31（9）：1085-1091.
HUANG G H, CHEN F, REN Q G. Research on biodiesel production from *Chlorella vulgaris*[J]. Acta Energiae Solaris Sinica, 2010, 31(9): 1085-1091. (in Chinese)

[4] 周华伟，林炜铁，陈涛. 小球藻的异养培养研究及应用前景[J]. 氨基酸和生物资源，2004，27（4）：69-73.
ZHOU H W, LIN W T, CHEN T. The heterotrophy and applications of *Chlorella*[J]. Amino Acids& Biotic Resources, 2004, 27(4): 69-73. (in Chinese)

[5] 季祥，张智慧，张雪艳，等. 小球藻培养条件的优化[J]. 安徽农业科学，2009，37（34）：16763-16764，16834.
JI X, ZHANG Z H, ZHANG X Y, et al .Culture of *Chlorella* spp. and optimization of growth condition[J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2009, 37(34): 16763-16764, 16834. (in Chinese)

[6] 张正洁，汪苹. 自养小球藻培养条件的优化[J]. 北京工商大学学报：自然科学版，2011，29（1）：54-58.
ZHANG Z J, WANG P. Optimization of culture conditions of *Chlorella* sp.[J]. Journal of Beijing Technology and Business University: Natural Science Edition, 2011, 29(1): 54-58. (in Chinese)

[7] BECKER E W. Measurement of algal growth in micro algae biotechnology & microbiology[M]. Cambridge Town, England: Cambridge University Press, 1994.

[8] 马建敏，苏秀燕，马顷，等. 营养条件对污水中小球藻生长及产能效应的影响[J]. 环境科学与技术，2012，35（4）：27-32.
MA J M, SU X Y, MA Q, et al. Effects of nutritional conditions on the growth and energy efficiency of *Chlorella vulgaris* in

the wastewater[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(4): 27-32. (in Chinese)

[9] 江淮真，张维，刘天中，等. 氮、磷浓度对小球藻生长及油脂积累的影响[J]. 食品工业科技，2011，32（6）：204-207，211.
JIANG H Z, ZHANG W, LIU T Z, et al. Effect of nitrogen and phosphorus concentrations on cell growth and lipid accumulation of *Chlorella* sp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 204-207, 211. (in Chinese)

[10] 于贞，王长海. 小球藻培养条件的研究[J]. 烟台大学学报（自然科学与工程版），2005，18（3）：206-211.
YU Z, WANG C H. Optimization of culture conditions of *Chlorella* spp.[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2005, 18(3): 206-211. (in Chinese)

[11] 张丽君，杨汝德，肖恒. 小球藻的异养生长及培养条件优化[J]. 广西植物，2011，21（4）：353-357.
ZHANG L J, YANG R D, XIAO H. The hetertrophic culture of *Chlorella* and optimization of growth condition[J]. Guihaia, 2011, 21(4): 353-357. (in Chinese)

[12] 闫海，周洁，何宏胜. 小球藻的筛选和异养培养[J]. 北京科技大学学报，2005，27（4）：408-412.
YAN H, ZHOU J, HE H S. Isolation and heterotrophic culture of *Chlorella* sp.[J]. Journal of University of Science and Technology Beijing, 2005, 27(4): 408-412. (in Chinese)

[13] SHI X M, ZHANG X W, CHEN F. Heterophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3-5): 312-318.

[14] SHI X M, LIU H J, ZHANG X W, et al. Production of biomass and Lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. Process Biochemistry, 2009, 34(4): 341-347.