

气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 作为生物柴油 生产原料的特性研究

封雍婕, 崔娜, 赵鹏

(昆明理工大学 生命科学与科技学院, 昆明 650500)

摘要:为了拓展生物柴油原料来源,以气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 为研究对象,通过测定其生长曲线、生物量、油脂产率、沉降率等,对其作为生物柴油生产原料的特性进行研究。结果表明,培养后气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 的生物量为 4.14 g/L, 油脂含量为 39.43%, 油脂产率为 181.38 mg/(L·d), 2 h 的自然沉降率为 65.28% (可大幅浓缩水体,降低微藻的采收成本)。此外,该微藻能够产生 γ -氨基丁酸(GABA),含量为 9.50 mg/g。气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 具有成为生物柴油原料的潜力,具有微藻油脂的开发价值。

关键词:气生微藻; 油脂; 生物柴油; 沉降率; γ -氨基丁酸

中图分类号: Q939.97; TQ517 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)01-0089-06

Characteristics of an aerial microalgae *Heveochlorella* sp. Yu as feedstock for biodiesel

FENG Yongjie, CUI Na, ZHAO Peng

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology,
Kunming 650500, China)

Abstract: In order to expand the source of biodiesel feedstock, the characteristics of aerial microalgae *Heveochlorella* sp. Yu as raw material for biodiesel were studied by measuring its growth curve, biomass, lipid productivity, sedimentation rate, etc. The results showed that the microalgae biomass after cultivation was 4.14 g/L, the lipid content was 39.43%, and the lipid productivity was 181.38 mg/(L·d). The natural sedimentation rate of aerial microalgae *Heveochlorella* sp. Yu within 2 h was 65.28% (which could greatly concentrate the water body and reduce the harvesting cost of microalgae). In addition, aerial microalgae *Heveochlorella* sp. Yu could produce γ -aminobutyric acid (GABA) with a content of 9.50 mg/g. The aerial microalgae *Heveochlorella* sp. Yu had the potential to be used as a feedstock for biodiesel and had the development value of microalgae lipid.

Key words: aerial microalgae; lipid; biodiesel; sedimentation rate; γ -aminobutyric acid

近年来,微藻产生的油脂和生物活性物质受到国内外研究者的广泛关注^[1-2]。微藻油脂作为第三代生物柴油的原料,具有环境友好、可持续再生等

优点,但由于其产率低和微藻采收成本高,制约了微藻生物柴油的大规模工业化生产^[3]。微藻油脂积累能力受微藻菌株差异性影响较大,常见产油微藻如: *Endogenous chlorella* sp. 培养后生物量为 2.14 g/L, 油脂含量为 10.80%, 油脂产率为 21.60 mg/(L·d)^[4]; *Chlorella sorokiniana* CY-1 培养后生物量为 1.68 g/L, 油脂含量为 15.07%, 油脂产率为 18.08 mg/(L·d)^[5]; *Scenedesmus obliquus* 培养后生物量为 2.32 g/L, 油脂含量为 25.00%, 油脂产率

收稿日期: 2021-01-26; 修回日期: 2021-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(21666012, 22065018)

作者简介: 封雍婕(1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻资源开发(E-mail) 2422399347@qq.com。

通信作者: 赵鹏, 副教授, 博士(E-mail) zhaopeng_ca@163.com。

为 41.37 mg/(L·d)^[6]。因此,选择合适的微藻菌株是提高微藻油脂积累能力的关键。

微藻因其在培养基中浓度低,体积小,细胞表面带负电荷等原因,其采收成本高,占生物柴油生产总成本的 20%~30%,严重制约了微藻生物柴油的商业化^[7]。因此,选择合适的采收方法,降低微藻的采收成本,是实现微藻生物柴油可持续发展的关键。目前,常见的微藻采收方法有离心法、过滤法、气浮法等^[8-9]。但这些方法都存在能耗高、步骤多、成本高等缺点。近年来,絮凝法开始运用于微藻采收。絮凝法有化学絮凝法、生物絮凝法和自发絮凝法^[9-10]。添加化学絮凝剂(化学絮凝法)或生物絮凝剂(生物絮凝法)虽然能提高微藻采收效率,却增加了工艺步骤和添加剂成本,并容易造成水体二次污染^[11]。自发絮凝法是一种很好的微藻采收方法,在培养结束后,微藻细胞自发絮凝沉降,整个过程中无需添加任何外源添加剂,具有无毒、无二次化学污染、成本低等优点^[12]。研究发现,细胞外聚合物(EPS)是影响微藻自发絮凝的关键因素之一^[13]。EPS是一种由微生物分泌的胞外高分子聚合物,主要包括多糖和蛋白质,可以改善细胞黏附力,促进絮凝物形成,对絮凝有积极作用。EPS可以分为可溶性 EPS(S-EPS),松散附着 EPS(LB-EPS)和紧密黏附 EPS(TB-EPS)3类^[3]。各类 EPS 对微藻自发絮凝会产生不同程度的影响。

具有自发絮凝能力的微藻菌株有 *Scenedesmus obliquus* AS-6-1、*Chlorella vulgaris* JSC-7、*Ankistrodesmus falcatus* SAG202-9 及 *Ettlia texensis* SAG79.80 等^[13-16],但是这些菌株的油脂积累能力并不理想。因此,找寻同时具有自发絮凝能力与较高油脂积累能力的微藻菌株将有利于降低微藻油脂的生产成本。

目前,微藻油脂的研究对象主要集中在水生微藻,而对气生微藻研究颇少。气生微藻主要存在于树木、岩石和土壤的表面^[17]。研究表明,气生微藻不仅能够积累油脂,还能分泌大量的 EPS 来适应陆地生活^[18]。气生微藻的多样性为找寻同时具有自发絮凝和高油脂积累能力的微藻菌株提供了可能。

微藻也是生物活性物质的来源之一^[17]。 γ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白氨基酸,主要存在于动物、植物与微生物中,在微藻中鲜有报道^[19]。GABA 作为生物体的信号分子,调节多种生理信息,对多种精神疾病也有一定的疗效,具有较高的药用价值^[20-21]。

本文对气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 的生物

量、油脂含量、油脂产率、沉降率以及 GABA 含量进行检测,旨在开发具有高油脂积累能力、细胞自发絮凝能力和生物活性物质潜力的微藻,拓宽可为生物柴油生产提供油脂原料的微藻菌株资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu (GenBank: MK829186),由昆明理工大学生物炼制课题组提供。Tris-醋酸-磷酸盐(TAP)培养基,pH 调至 7.0 后 121℃ 高温灭菌 20 min。实验所用试剂均为分析纯。

恒温光照振荡摇床,90plus PALS Zeta 电位分析仪,冷冻干燥机,超低温冰箱,高效液相色谱仪,高速冷冻离心机,Specord Plus 分光光度仪,血细胞计数板,GC-MS 分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 微藻的培养

将微藻接种到含有 300 mL TAP 培养基的 500 mL 锥形瓶中,初始细胞浓度为 4.00×10^6 个/mL,于 25℃、150 r/min 恒温摇床上进行培养。

1.2.2 生长曲线的绘制和生物量的测定

通过血细胞计数板对微藻细胞计数并绘制微藻的生长曲线。

将微藻培养至稳定期后,于 $13\ 000 \times g$ 离心 5 min,去除上清液后,用去离子水反复冲洗沉淀并离心,重复 3 次后得湿藻体,冷冻干燥后称重,计算生物量(以每升培养基中所含干藻体的质量表示)。

1.2.3 油脂的提取及油脂产率的测定

取 1.2.2 获得的干藻体,采用 Bligh & Dyer 法^[22]提取油脂,按式(1)、式(2)分别计算微藻油脂含量和油脂产率。

$$C_L = m_L / m_A \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_L 为油脂含量; m_L 为提取油脂的质量,mg; m_A 为干藻粉的质量,mg。

$$P_L = m_A C_L / (VT) \quad (2)$$

式中: P_L 为油脂产率,mg/(L·d); V 为培养基体积,L; T 为培养时间,d。

1.2.4 微藻油脂脂肪酸组成分析及相关指标测定

取 100 mg 微藻油脂,加入 2 mL 3% 硫酸-甲醇溶液,充分混合后,于 70℃ 水浴中冷凝回流 4 h,再加入 2 mL 正己烷,置于室温且转速为 100 r/min 的摇床上振荡萃取 4 h,静置后取上清液(微藻油脂脂肪酸甲酯)用 0.45 μ m 有机相滤膜过滤,进行 GC-MS 分析(分析条件见文献[23])。采用面积归一化法对脂肪酸进行定量。

微藻油脂脂肪酸甲酯的十六烷(CN)值和冷滤点(CFP)等相关指标按照 Ramos 等^[24]的方法进行测定。

1.2.5 微藻沉降率的测定

在自然条件下,将培养至稳定期的藻液移至英霍夫沉降管(Imhoff Cones)中,沉降2 h后,取藻液液面下5 cm的藻液样于1 cm光程750 nm波长下进行比色,按式(3)计算沉降率(η)。

$$\eta = (D_a - D_b) / D_a \times 100\% \quad (3)$$

式中: D_a 为开始沉降时藻液的光密度; D_b 为沉降2 h时藻液的光密度。

1.2.6 不同类型EPS的去除

根据 Zhao 等^[25]的方法去除EPS。藻液于2 500 × g离心15 min,获得的上清液为可溶性EPS(S-EPS)溶液。将沉淀(微藻细胞)重新悬浮在0.05%的氯化钠溶液中,于6 000 × g离心15 min,获得的上清液为松散附着EPS(LB-EPS)溶液。然后,将沉淀重复悬浮过程,在磁力搅拌器混合搅拌30 min后,于11 000 × g离心20 min,得到的上清液为紧密黏附EPS(TB-EPS)溶液。每步的沉淀用蒸馏水重悬测定微藻沉降率,可得到不同类型EPS对微藻沉降的影响。

1.2.7 Zeta电位的测定^[3]

采用Zeta电位分析仪测定微藻液的Zeta电位。

1.2.8 GABA含量的测定

采用高效液相色谱(HPLC)法测定微藻中的GABA含量^[26]。

2 结果与讨论

2.1 微藻的油脂产率

微藻在不同的生长阶段,积累油脂的能力有很大差异。大量实验认为,微藻在稳定期前期油脂积累能力较强^[27]。按照1.2.1和1.2.2的方法绘制气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 的生长曲线,结果见图1。由图1可见,气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 在第9天进入稳定期。

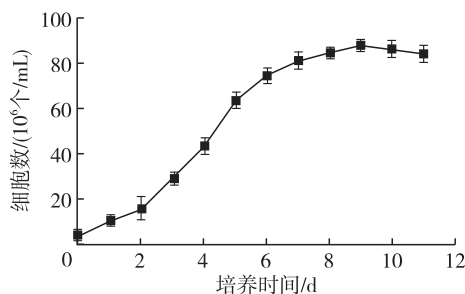


图1 *Heveochlorella* sp. Yu 的生长曲线

按1.2.1方法将气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu

培养9 d,测定其生物量和油脂产率,结果见表1。

表1 不同微藻的生物量、油脂含量以及油脂产率

藻种	生物量/ (g/L)	油脂 含量/%	油脂产率/ (mg/(L·d))	参考 文献
<i>Heveochlorella</i> sp. Yu	4.14	39.43	181.38	本研究
<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX-265)	3.50	42.00	108.00	[5]
<i>Chlorella</i> <i>sorokiniana</i> CY-1	1.68	15.07	18.08	[6]
<i>Aphanothece</i>	5.00	8.00	5.00	[28]
<i>Neochloris</i> <i>oleabundans</i>	0.09	56.00	38.00	[29]
<i>Thraustochytrium</i> <i>striatum</i>	0.45	38.00	171.00	[30]
<i>Micractinium</i> sp. (ME05)	0.76	22.70	40.00	[31]
<i>Chlorella vulgaris</i>	1.21	23.00	35.00	[32]
<i>Scenedesmus</i> <i>obliquus</i>	2.32	25.00	41.37	[7]
<i>Chlorella</i> <i>sorokiniana</i>	2.54	26.00	47.20	[7]

由表1可见, *Heveochlorella* sp. Yu 的生物量为4.14 g/L,油脂含量为39.43%。微藻的生物量和油脂含量并无关联,且往往不是同步增加的,如: *Aphanothece* 具有5.00 g/L的生物量,而油脂含量仅为8.00%^[28]; *Neochloris oleabundans* 则具有56.00%的油脂含量,但生物量仅为0.09 g/L^[29]。因此,将油脂产率作为衡量微藻油脂生产能力的综合性指标已经成为广大科研者的共识。由表1还可看出,与其他研究相比, *Heveochlorella* sp. Yu 显示出较高的油脂产率(181.38 mg/(L·d)),具有较好的开发潜力。

2.2 微藻油脂脂肪酸组成

Heveochlorella sp. Yu 油脂脂肪酸组成及含量见表2。

表2 *Heveochlorella* sp. Yu 油脂脂肪酸组成及含量 %

脂肪酸	含量	脂肪酸	含量
C14:0	0.29 ± 0.03	C20:1	0.38 ± 0.05
C16:0	26.19 ± 0.85	C22:0	0.24 ± 0.06
C16:1	0.04 ± 0.01	C22:1	0.13 ± 0.04
C18:0	3.93 ± 0.43	其他	1.89 ± 0.77
C18:1	31.72 ± 2.68	SFA	31.04 ± 1.27
C18:2	28.95 ± 1.51	MUFA	32.28 ± 2.65
C18:3	5.84 ± 0.47	PUFA	34.79 ± 1.91
C20:0	0.40 ± 0.07		

从表 2 可以看出, *Heveochlorella* sp. Yu 油脂的主要脂肪酸是棕榈酸(C16:0)、油酸(C18:1)和亚油酸(C18:2),均为 16~18 个碳原子的脂肪酸,符合生产生物柴油的要求。十六烷(CN)值是评价生物柴油燃料性能和抗爆的指标,按照生物柴油标准《生物柴油调合燃料(B5)》(GB 25199—2017)规定 B5 普通柴油 CN 值不低于 45。经测定, *Heveochlorella* sp. Yu 油脂脂肪酸甲酯的 CN 值为 50.91,完全符合国家标准。凝固点(CFPP)是衡量生物柴油低温下防冻性能的重要指标,CFPP 值越低,则生物柴油的低温流动性越好,越利于运输和储存。根据所处的气候环境不同,各国对 CFPP 值有不同的规定。经测定, *Heveochlorella* sp. Yu 油脂脂肪酸甲酯的 CFPP 值为 -15.66°C ,低温流动性较好,能够满足绝大部分国家标准中的规定。

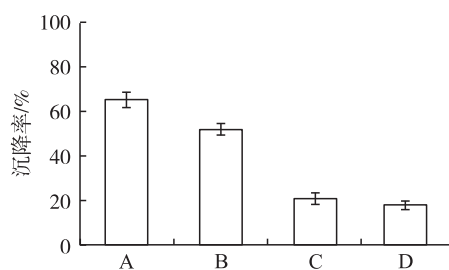
2.3 微藻沉降率

采用絮凝法采收微藻,可使水体大幅浓缩,为下一步采用成熟的采收技术如离心等创造了较好的条件,有利于降低采收成本。已有许多研究者对微藻的絮凝进行了大量研究,如: Tan 等^[33]报道 *Scenedesmus dimorphus* 的自然沉降率为 40%,加入高岭土絮凝剂后沉降率达到 93%; Zhu 等^[34]在 *Chlorella vulgaris* 中加入 250 mg/L 壳聚糖后沉降率达到 91.9%; Rahul 等^[35]在 *Botryococcus* sp. 藻液中加入 60 mg/L 阳离子菊粉后沉降率为 88.6%; Reyes 等^[36]向藻液中加入 1 500 mg/L 硫酸铁后, *Scenedesmus spinosus* 的沉降率达到了 61.6%。添加絮凝剂,微藻的沉降率有了很大的提升,但增加了絮凝的工艺步骤、微藻采收成本及水体二次污染。Salim 等^[37]发现具有自发絮凝的微藻 *Ettlia texensis* 在 3 h 内的自然沉降率可达 90%,但油脂含量仅有 5.9%。实验发现, *Heveochlorella* sp. Yu 在 2 h 内的自然沉降率为 65.28%,随着沉降时间的延长可达到 90% 以上(数据未列)。虽然 *Heveochlorella* sp. Yu 的自发絮凝能力相比 *Ettlia texensis* 略逊一筹,但其却具有较高的油脂含量,能在降低采收成本的同时兼顾油脂积累,具有生物柴油原料的开发价值。

EPS 与微藻的自发絮凝密切相关,微藻细胞可通过 EPS 连接聚集在一起形成细胞团块,加速细胞的絮凝沉降^[13,37]。为了进一步了解不同类型的 EPS 在微藻自发絮凝中的作用,在本实验中依次去除各类型 EPS,测定微藻细胞沉降率的变化,结果如图 2 所示。

由图 2 可见:去除 S-EPS 后, *Heveochlorella* sp. Yu 的沉降率由 65.28% 下降为 52.03%;进而去除

LB-EPS 后,沉降率下降为 20.73%;最后去除 TB-EPS 后,沉降率下降为 17.85%。S-EPS 与微藻细胞结合较弱,往往溶于藻液中,因此对微藻细胞的黏附性影响不大。Pellicer - Nacher 等^[38]认为 TB-EPS 较 LB-EPS 更具有黏连细胞的能力,有助于提高细胞絮凝能力。而本研究表明 LB-EPS 在微藻自发絮凝中起主要作用,可能是菌株差异所导致本研究中的 LB-EPS 具有特殊的多糖组分,尚需后续进一步的分析。



注: A.原始; B.去除S-EPS; C.去除S-EPS 和 LB-EPS; D.去除S-EPS、LB-EPS 和 TB-EPS。

图 2 去除不同 EPS 后 *Heveochlorella* sp. Yu 的沉降率

微藻细胞表面带有相同的电荷,会使细胞难以相互聚集,影响絮凝沉降。按 1.2.1 方法培养 *Heveochlorella* sp. Yu 9 d,调节藻液 pH 后,测定藻液的 Zeta 电位和沉降率,结果如表 3 所示。

表 3 pH 对微藻 Zeta 电位和沉降率的影响

项目	初始	调 pH 后
pH	7.05 ± 0.62	3.42 ± 0.91
Zeta 电位/mV	-10.00 ± 0.84	-5.00 ± 0.57
沉降率/%	65.28 ± 0.94	72.89 ± 1.38

由表 3 可见, *Heveochlorella* sp. Yu 自发絮凝时的 Zeta 电位为 -10.00 mV,调节 pH 为 3.42 后,微藻细胞表面 Zeta 电位变为 -5.00 mV,沉降率上升为 72.89%,说明微藻细胞表面 Zeta 电位接近于零,有利于 *Heveochlorella* sp. Yu 的自发絮凝。

2.4 GABA 含量

不同生物体 GABA 含量见表 4。由表 4 可见: *Heveochlorella* sp. Yu 的 GABA 含量为 9.50 mg/g; *Monoraphidium* sp. QLZ-3 在自然培养情况下 GABA 含量可达 10.97 mg/g^[38];发芽的蚕豆在缺氧-NaCl 胁迫培养 4 d 后, GABA 的含量为 6.92 mg/g^[39]; *Monoraphidium* sp. QLY-1 在缺氮且添加茉莉酸和独角金内酯的条件下, GABA 的含量为 21.00 mg/g^[40]; *Haematococcus pluvialis* 通过两阶段培养和盐胁迫的方法,达到 38.57 mg/g 的 GABA 含量^[26]。GABA 的含量差异较大,主要是由于物种和培养条件的不同所致。

表4 不同生物体 GABA 含量

生物体	GABA 含量/(mg/g)	培养条件	参考文献
<i>Heveochlorella</i> sp. Yu	9.50	TAP 培养基	本研究
<i>Monoraphidium</i> sp. QLZ - 3	10.97	胡桃壳提取物培养	[38]
发芽的蚕豆	6.92	缺氧 - NaCl 胁迫	[39]
<i>Monoraphidium</i> sp. QLY - 1	21.00	缺氮, 添加茉莉酸和独角金内酯	[40]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	38.57	两阶段培养法 + 盐胁迫	[26]

3 结论

将气生微藻 *Heveochlorella* sp. Yu 培养后油脂产率可达 181.38 mg/(L · d), 2 h 自然沉降率为 65.28%, 且 GABA 含量为 9.50 mg/g。 *Heveochlorella* sp. Yu 在具有较高油脂产率的同时又含有生物活性物质 GABA, 且具有自发絮凝能力, 可大幅浓缩水体, 为后续的采收减低负荷, 具有为生物柴油生产提供油脂原料的开发潜力。

参考文献:

- [1] KUMAR G, SHOBANA S, CHEN W H, et al. A review of thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuels: chemistry and processes [J]. *Green Chem*, 2017, 19: 44 - 67.
- [2] MAHLIA T M I, SYAZMI Z A H S, MOFIJUR M, et al. Patent landscape review on biodiesel production: technology updates [J/OL]. *Renew Sust Energ Rev*, 2020, 118: 109526 [2021 - 01 - 26]. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109526>.
- [3] GRIFFITHS M J, HARRISON S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production [J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21(5): 493 - 507.
- [4] FAROOQ W, LEE Y C, RYU B G, et al. Two - stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 230 - 238.
- [5] CHEAH W Y, SHOW P L, JUAN J C, et al. Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation [J]. *Energ Convers Manage*, 2018, 164: 188 - 197.
- [6] ANSARI F A, SINGH P, GULDHE A, et al. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation [J]. *Algal Res*, 2017, 21: 169 - 177.
- [7] WU Z, ZHU Y, HUANG W, et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 110: 496 - 502.
- [8] UDUMAN N, QI Y, DANQUAH M K, et al. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae - based fuels [J/OL]. *J Renew Sus Energ*, 2010, 2(1): 012701 [2021 - 01 - 26]. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>.
- [9] LEE J Y, YOO C, JUN S Y, et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(1): S75 - S77.
- [10] KUMAR V, NANDA M, VERMA M. Application of agar liquid - gel transition in cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 243: 163 - 168.
- [11] ŞIRIN S, TROBAJO R, IBANEZ C, et al. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity - induced flocculation [J]. *J Appl Phycol*, 2012, 24: 1067 - 1080.
- [12] HORIUCHI J I, OHBA I, TADA K, et al. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control [J]. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(4): 412 - 415.
- [13] XU H C, JIANG H L, YU G H, et al. Towards understanding the role of extracellular polymeric substances in cyanobacterial *Microcystis* aggregation and mucilaginous bloom formation [J]. *Chemosphere*, 2014, 117: 815 - 822.
- [14] GUO S L, ZHAO X Q, WAN C, et al. Characterization of flocculating agent from the self - flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS - 6 - 1 for efficient biomass harvest [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 145: 285 - 289.
- [15] SALIM S, BOSMA R, VERMUE M H, et al. Harvesting of microalgae by bio - flocculation [J]. *J Appl Phycol*, 2011, 23: 849 - 855.
- [16] SALIM S, VERMUE M H, WIJFFELS R H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy - efficient harvesting by bio - flocculation [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 118: 49 - 55.
- [17] ABURAI N, OHKUBO S, MIYASHITA H, et al. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan [J]. *Algal Res*, 2013, 2(3): 237 - 243.
- [18] LI X, WANG M, XIAO X, et al. Two stages of N - deficient cultivation enhance the lipid content of microalga *Scenedesmus* sp. [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2015, 92: 503 - 512.

- [19] ZHANG Q, XIANG J, ZHANG L, et al. Optimizing soaking and germination conditions to improve γ -aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice [J]. *J Funct Foods*, 2014, 10: 283–291.
- [20] COHEN B I. The significance of ammonia / γ -aminobutyric acid (GABA) ratio for normality and liver disorders [J]. *Med Hypotheses*, 2002, 59 (6): 757–758.
- [21] PARK D H, MIRABELLA R, BRONSTEIN P A, et al. Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence [J]. *Plant J*, 2010, 64(2): 318–330.
- [22] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Phys*, 1959, 37(8): 911–917.
- [23] ZHAO P, YU X, LI J, et al. Enhancing lipid productivity by co-cultivation of *Chlorella* sp. U4341 and *Monoraphidium* sp. FXY-10 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(1): 72–77.
- [24] RAMOS M, FERNADEZ C, CASAS A, et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 261–268.
- [25] ZHAO F Y, XIAO J M, DING W, et al. An effective method for harvesting of microalga: coculture-induced self-flocculation [J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2019, 100: 117–126.
- [26] DING W, CUI J, ZHAO Y, et al. Enhancing *Haematococcus pluvialis* biomass and γ -aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2019, 285: 121334 [2021-01-26]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121334>.
- [27] GAO F, YANG H L, LI C, et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 282: 118–124.
- [28] RICHARDSON J W, OYTLAW J L, ALLISON M. The economics of microalgae oil [J]. *AgBioForum*, 2010, 13: 119–30.
- [29] GOUVEIA L, OLIVERA A C. Microalgae as a raw material for biofuels production [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36: 269–274.
- [30] XIAO R, LI X, ZHENG Y. Comprehensive study of cultivation conditions and methods on lipid accumulation of a marine protist, *Thraustochytrium striatum* [J]. *Protist*, 2018, 169: 451–465.
- [31] ONAY M, SONMEZ C, OKTEM H A, et al. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 169: 62–71.
- [32] LIANG Y N, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 1043–1049.
- [33] TAN D Y, ZHANG H Y, SUN S Y, et al. Rapid flocculation-sedimentation of microalgae with organosilane-functionalized halloysite [J]. *Appl Clay Sci*, 2019, 177: 37–42.
- [34] ZHU L D, LI Z H, ERKKI H. Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction [J/OL]. *Biotechnol Biofuel*, 2018, 11 (1): 183 [2021-01-26]. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>.
- [35] RAHUL R, KUMAR S, JHA U, et al. Cationic inulin: a plant based natural biopolymer for algal biomass harvesting [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 868–874.
- [36] REYES J F, LABRA C. Biomass harvesting and concentration of microalgae *Scenedesmus* sp. cultivated in a pilot photobioreactor [J]. *Biomass Bioenerg*, 2016, 87: 78–83.
- [37] SALIM S, SHI Z, VERMUE M H, et al. Effect of growth phase on harvesting characteristics, autoflocculation and lipid content of *Eutlia texensis* for microalgal biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 138: 214–221.
- [38] PELLICER-NACHER C, DOMINGO-FELEZ C, MUTLU A G, et al. Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass [J]. *Water Res*, 2013, 47(15): 5564–5574.
- [39] YIN Y Q, CHENG C, FANG W M. Effects of the inhibitor of glutamate decarboxylase on the development and GABA accumulation in germinating fava beans under hypoxia-NaCl stress [J]. *RSC Adv*, 2018, 8 (36): 20456–20461.
- [40] SONG X T, ZHAO Y T, HAN B Y, et al. Strigolactone mediates jasmonic acid-induced lipid production in microalga *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions [J/OL]. *Bioresour Technol*, 2020, 306: 123107 [2021-01-26]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123107>.