

高效固碳藻种产油条件优化

徐雪宁, 孙东红*, 崔坤淼, 李凯丽, 李容兆, 杨 菡, 董泓楷, 孙小惠

鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台

收稿日期: 2023年5月22日; 录用日期: 2023年7月13日; 发布日期: 2023年7月19日

摘 要

本实验以潜在固碳能源栅藻为对象, 采用含有三种不同氮素的培养基(三种氮素分别为硝酸钠、硝酸铵、尿素)对其进行培养条件的优化, 通过细胞计数、OD值测定以及对其产油率的测定, 优化适合栅藻生长和高效产油的培养条件。结果表明: 栅藻在含有硝酸钠的培养基中生长速度最快, 细胞密度最大, 产油率最高; 在含有硝酸铵的培养基中生长状况次之; 在含有尿素的培养基中生长速度最慢, 细胞密度最小, 产油率最低。

关键词

栅藻, 培养条件优化, 脂质的提取

Optimization of Oil Production Conditions for High Efficiency Solid Carbon *Scenedesmus* sp.

Xuening Xu, Donghong Sun*, Kunmiao Cui, Kaili Li, Rongzhao Li, Han Yang, Hongkai Dong,
Xiaohui Sun

School of Life Science, Ludong University, Yantai Shandong

Received: May 22nd, 2023; accepted: Jul. 13th, 2023; published: Jul. 19th, 2023

Abstract

This experiment to potential solid carbon energy *Scenedesmus* sp. as the object, containing three different nitrogen mediums (three nitrogen were nitrate sodium, ammonium nitrate and urea) for optimization of culture conditions and by cell counting, the OD value was measured, and the oil yield rate of determination and optimization for culture conditions of *Scenedesmus* sp. growth and high

*通讯作者。

文章引用: 徐雪宁, 孙东红, 崔坤淼, 李凯丽, 李容兆, 杨菡, 董泓楷, 孙小惠. 高效固碳藻种产油条件优化[J]. 自然科学, 2023, 11(4): 657-667. DOI: 10.12677/ojns.2023.114079

oil production. The results showed that the growth rate of *Scenedesmus* sp. in the medium containing sodium nitrate was the fastest, the cell density was the highest, and the oil production rate was the highest. Its growth in the medium containing ammonium nitrate was the second. In the medium containing urea, its growth rate was the slowest, the cell density was the lowest, and the oil production rate was the lowest.

Keywords

Scenedesmus sp., Optimization of Culture Conditions, Extraction of Lipids

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

能源作为世界关注的焦点，当今人类使用最多的自然资源包括煤炭、天然气和石油等[1]。但这些资源均属于不可再生资源，并且现代工业生产以及人类取暖燃烧过多的煤炭、天然气和石油，放出过多的二氧化碳等温室气体，这些温室气体进入大气造成严重的温室效应，致使全球气候变暖、南北极冰雪融化、海平面上升[2]，间接导致一些生活在南北极的动物(如北极熊、企鹅等)的栖息地受到破坏，使这些生活在寒带的动物濒临灭绝。需要解决以上问题，就应该大力发展其他可再生、清洁、无污染的新型可再生能源[3]。生物柴油正是满足这样需求的理想替代品，具有无毒、可降解、可再生的特性，它的使用可以减少对化石燃料的燃烧和利用[4]，生物柴油是以生物油脂为原料，通过分解、转脂化等过程形成长链脂肪酸甲酯[5]，用于代替普通柴油。目前，世界各国大多利用动物脂肪、作物和微藻等生物质原料生产生物柴油[6]。其中，利用微藻生产生物柴油具有周期短、不与农作物争地、不受气候条件限制等诸多优势[7]，因而具有较好的应用前景[8]。而栅藻作为迄今为止已知产油率最高的藻类[9]，对其生长培养条件的优化顺带提上议事日程，因此研究适合其生长繁殖的最适条件成为当前研究的热点[10]。栅藻是常见的淡水藻类，可以作为水质评价的指示生物[11]，也可作为鱼类或家禽的饲料，可以进行大规模的培养，具有个体小、繁殖快、培养方便的特点。目前，对于脂质提取方法的报道较多，如氯仿/甲醇法[12]、索氏提取法和超临界萃取法等。但现存方法仍有一定的局限性，如氯仿/甲醇法尽管提取效率相对较高，却存在对人体和环境较大的危害：空气中氯仿浓度达到较高时，人会感到疲劳、无力、酒醉感、失眠、烦躁、精神错乱，食欲减退，消化障碍，接触一年以后，会发生肝肿大中毒性肝炎；人吸入极高浓度的氯仿可导致心脏骤然停搏而休克死亡[13]。三氯甲烷对环境有危害，在地下水中有蓄积作用。其污染行为主要体现在饮用水中，但对食品及蔬菜也可能造成污染，破坏敏感水生生物的呼吸系统。饮水中的三氯甲烷大部分是经过有机物氯化而形成的。大气中的三氯甲烷部分是由于三氯乙烯在光化作用下降解而成。因此，自来水厂进行水处理时，先除去水中的悬浮物，再加氯处理能直接减少三氯甲烷的生成。根据 EPA 调查结果发现，加氯处理后的饮用水 95%~100% 含有三氯甲烷，平均浓度为 20 μg/L，最高达 311 μg/L；索氏抽提法则相对耗时，经典索氏抽提法测定脂肪是将样品放在抽提筒内，以水浴蒸馏冷凝的乙醚进行回流浸提，一般要十几个小时[14]。有机溶剂用量大，不适合热不稳定物质的提取[15]：在恒温水浴中抽提，控制每分钟滴下乙醚 80~150 滴，或每小时回流 8~12 次，并视含量高低抽提 6~12 h。提取过程中，若溶剂蒸发损耗太多，可从冷凝器上口小心加入适量的新溶剂补充，抽提室温以 15℃~25℃ 为宜[16]。而目前常用的超临界二氧化碳萃取法对于亲水性、相对分子质量较大的物质的提取效率偏低[17]。

张诗怡等的实验[18]通过对比实验和分析斜生栅藻的生长量、产油量、产油率,得出斜生栅藻产油率最高的水解液含量,通过正交实验,得出产油率最高的环境条件。实验结果表明,pH值对斜生栅藻产油的影响最大。其实验需要配制不同浓度的水解液,实验步骤繁琐,耗时长。但其以生活中常见且难以转化的蔗渣作为廉价碳源,培养斜生栅藻吸收转化蔗渣水解液中的糖类及纤维素,既可以制备廉价碳源培养基,又可以培养斜生栅藻生产微生物油脂,节约成本,充分利用资源,做到可持续利用,值得我们学习。

安梅的实验[19],设置“两步培养法”和每天限量添加氮源的方法培养斜生栅藻,通过测定斜生栅藻的生物量、油脂含量、脂肪酸成分、色素、糖以及蛋白质等指标,分析了不同氮形态和供氮方式、紊流能量耗散率以及添加植物激素对斜生栅藻生物量和油脂含量的影响,构建了一种以少量多次供氮为基础的方法,为同时提高斜生栅藻生长和油脂含量提供了经济、可行的培养工艺。测量角度广,深度强,并且通过添加三种植物激素(IAA、DA6和BR),探索出这三种激素对斜生栅藻的生长和产油均表现出“低浓度促进,高浓度抑制”的作用。但其耗水量大,且在此条件下,斜生栅藻中叶黄素的含量较低,不利于促进叶黄素的生产。

本文以栅藻为试材,研究了该藻的高效培养方法[20],比较了不同的干燥法、不同细胞破碎法、不同溶剂和不同提取过程及其复合处理的微藻脂质提取方法的提取效率,旨在建立栅藻的高效培养方法及其脂质的高效提取方法[21][22]。鉴于实验室实验材料有限,故用分光光度计在波长560nm的条件下对其进行OD值的测定,用血球计数板每隔2天对其进行细胞密度的测定,用氯仿/甲醇法对栅藻进行产油率的测定,三种测定项目来判断适合高效固碳藻类产油率高的最适优化条件。结果表明:栅藻在含有硝酸钠的培养基中生长速度最快,细胞密度最大,产油率最高;在含有硝酸铵的培养基中生长状况次之;在含有尿素的培养基中生长速度最慢,细胞密度最小,产油率最低。

2. 数据与方法

2.1. 藻种

栅藻(*Scenedesmus* sp.)藻种由鲁东大学藻类研究所提供。

2.2. 主要仪器与设备

本实验所用到的仪器较精细,详见表1。

Table 1. Main instruments and equipments

表 1. 主要仪器与设备

仪器名称	型号	生产厂家
台式离心机	TGL-16C 型	上海安亭科学仪器厂制造
快速混匀机	SK-1 型	金坛市恒丰仪器厂
电子天平	FC204 型	上海精科天平厂
超声波反应器	KQ-500B 型	昆山市超声仪器有限公司
电热鼓风干燥箱	DGL-2001 型紫外可见分	山东省龙口市先科仪器公司
光光度计	UV-2000 型	尤尼柯(上海)仪器有限公司

2.3. 栅藻的培养

在灭菌完毕的3只锥形瓶内加入1.7L的蒸馏水进行再次灭菌,并且分别标号为1、2、3。将溶解完并且灭菌完毕的硝酸钠、硝酸铵、尿素各3g分别加入1、2、3号锥形瓶内。向3只锥形瓶内再次各自加入40mg的磷酸二氢钾、4mg的柠檬酸铁。

培养基配制完毕, 灭菌完毕以后, 各自向三只锥形瓶内分别加入 300ml 的栅藻液, 正好使藻液和培养基的数量一共为 2 L, 分别向三只锥形瓶通入空气, 对栅藻在 20 度、正常太阳光照条件下进行培养, 每隔两天取少量藻液进行测试, 具体操作如下: 用酒精棉球将一胶头滴管擦拭几遍, 用胶头滴管在瓶中取出 7 ml 左右的藻液测定 OD 值[23]和细胞密度, 待细胞生长至稳定期时测产油率。

2.4. 栅藻生长状况的测定

2.4.1. OD 值的测定

每隔两天定时取 7 ml 藻液, 在波长 560 nm 下用分光光度计测定 OD 值[24]。

2.4.2. 细胞密度的测定

实验原理: 当待测的细胞悬液中细胞分布均匀时, 可通过测定一定的体积悬液中所含细胞的数目, 并由此计算出每毫升细胞悬液中含有细胞的数目。

具体操作:

使用擦镜纸将计数板及盖片擦拭干净后, 将盖片盖在计数板上。吸出少许的细胞悬液, 滴在盖片边缘, 并使悬液充满于盖片和计数板之间, 静置 2 min 后, 进行计数。

2.5. 油脂的提取与测定

脂类物质不溶于水, 易溶于有机溶剂, 因此测定脂含量时常用有机溶剂萃取法。依据相似相溶原理, 极性糖脂用极性醇类提取, 非极性油脂用非极性提取。采用溶剂浸提法[25]与氯仿甲醇法[26]探究不同的提取溶剂(乙醚、石油醚、乙醚石油醚混合液和氯仿甲醇水混合液)对提取效率的影响。研究发现, 乙醚溶脂能力较强, 使用最多, 但是它沸点低, 易燃易爆并且可以饱和一定的水分, 含有一定水分的乙醚会提取出糖等一些非脂类物质, 所以在使用乙醚做提取液时要求无水条件, 样品也需要预先烘干。石油醚溶脂能力相对要弱, 但是吸水能力弱。但是这两种有机溶剂只能提取游离存在的脂类, 对于结合态脂类需要预先破坏其与非脂物质的结合才能进行提取, 使用条件比较受局限。氯仿甲醇水混合液提取效率最高, 提取过程简便易行, 可以允许一定量水分的存在, 因此本实验使用氯仿甲醇水混合液作为抽提试剂进行提取。

一般来说, 浸提温度越高, 溶剂扩散速度越快, 浸提的速度也就越快[27], 因此适宜的提高浸提温度能加快浸提过程, 但是温度过高会破坏细胞内的活性成分, 而且在实际操作时还要考虑所用溶剂沸点的影响。综合多方面因素考虑, 最终决定使用 60℃作为浸提温度, 此时能获得最高的脂提取率。

浸提时间也能在一定程度上影响提取效率, 浸提时间太短, 浸提溶剂无法充分发挥自身的作用, 而浸提时间过长则会往浸提液中引入过多杂质。

2.5.1. 藻粉制取

培养至稳定期, 取藻液离心, 6000 rpm 离心 5 分钟, 离心结束后, 弃去上清液, 将离心后的藻体取出后于 60℃烘箱中烘干, 之后用药匙刮下置于冰箱中冷冻保存。

2.5.2. 取样

使用一个干净的玻璃皿, 在电子天平上称重, 记下读数 a, 然后将移入藻粉后再次称重, 记下读数 b, 由量差法求得藻粉质量 $b - a$ 。

2.5.3. 破碎

将藻粉放入超声波反应器中破碎 12 min, 破碎后取少量制成装片, 在显微镜下观察是否破碎完全。

2.5.4. 提取

将研磨完全的藻粉移入离心管, 分别加入 0.8 ml 水、2 ml 甲醇、1 ml 氯仿, 快速混匀器上混匀 10 min,

60℃恒温水浴锅中振荡提取 5 h, 4000 rpm 离心 5 min 后, 取上清, 残液重复抽提 3 次, 合并上清液。

2.5.5. 分层

往上清液中加入 1 ml 氯仿、1 ml 水, 快速混匀 1 min 后, 静置分层。

2.5.6. 干燥

分层后上层为水相, 含盐类和水溶性的物质, 下层为氯仿层, 收集氯仿层于一干燥至恒重为 m 的称量瓶中, 60℃蒸去多余氯仿, 电热鼓风干燥箱中烘干。

2.5.7. 称量

取出烘干的称量瓶置于干燥皿中, 待冷却后快速称重为 n 。

2.5.8. 计算

$$\text{油脂得率}\% = \frac{\text{栅藻粗提油脂的质量}}{\text{栅藻藻粉的质量}} \times 100\% = \frac{n-m}{b-a} \times 100\%$$

2.6. 栅藻固碳量的计算

2.6.1. 滤纸的准备

按照抽滤泵的过滤口的大小将滤纸裁剪为合适的尺寸, 做好标号。

将已裁好的滤纸放入一个干净的培养皿中, 将培养皿放入电热鼓风干燥箱中, 并使培养皿的盖子半盖。开启电热鼓风干燥箱, 设置温度在 60℃, 烘干时间为 1 小时。

当烘干时间到达 1 小时后, 关闭电源, 使其温度自然下降至约室温, 打开电热鼓风干燥箱的门后, 先快速轻轻一拨, 使培养皿的盖子盖好, 再将培养皿拿出。

打开电子天平, 预热 1 小时, 清零后, 快速称量滤纸。在称量过程中, 要用镊子夹取滤纸, 速度要快, 防止沾染水蒸气或其他杂物, 在电子天平的读数稳定时, 及时读取数据并做好记录备用。

2.6.2. 干燥藻液

当栅藻生长到一定时期时, 可进行藻液的干燥。将备好的滤纸放在抽滤口, 轻轻放下过滤杯, 取 20 ml 藻液加入过滤杯中, 开启抽滤泵。当抽滤完成后, 关闭抽滤泵, 取出带有藻体的滤纸。

2.6.3. 烘干带有藻体的滤纸

将带有藻体的滤纸放入干净的培养皿中, 将培养皿放入电热鼓风干燥箱中, 并使培养皿的盖子半盖。开启电热鼓风干燥箱, 设置温度在 60℃, 烘干时间为 1 小时。

2.6.4. 带有藻体的滤纸快速称量

当烘干时间到达 1 小时后, 关闭电源, 使其温度自然下降至约室温, 打开电热鼓风干燥箱的门后, 先快速轻轻一拨, 使培养皿的盖子盖好, 再将培养皿拿出。打开电子天平, 预热 1 小时, 清零后, 快速称量。等读数稳定后, 及时准确读数并做好记录。

2.6.5. 计算干重

用带有藻体的滤纸的重量减去滤纸的重量, 即为 20 ml 藻液所获得的藻体重量。随后即可求得每升藻液中含有多少藻体, 得到的干重量记为 A 。

2.6.6. 计算栅藻的固碳量

栅藻的固碳量记为 B

$C:CO_2 = 12:44 = A/2:B$

得 $B = 11A/6$

3. 结果分析

在本次实验中，栅藻在培养 28 天内生长状态良好。以 28 天为周期，每隔两天测一次栅藻的 OD 值与细胞数目，并以此绘制时间和 OD 曲线、时间和细胞密度曲线，发现栅藻在前 10 天生长处于指数期。栅藻在刚开始接种的前几天处于细胞生长指数期，这是因为栅藻适应刚刚接种到的新的培养环境的缘故，营养物质充足，条件适宜，故藻细胞增长迅速，曲线斜率也上升很快。OD 值是利用可见光透过有色液体的透射率来对细胞密度进行快速测定的一种简易方法，可以直接通过 OD 值换算出藻细胞的细胞密度，但是会有一定的误差。28 天中所测的 OD 值与细胞数见下表 2。

3.1. 不同氮素营养种类对栅藻生长状况的影响

在含有硝酸钠的培养基中，栅藻的 OD 值与细胞密度的变化见表 2。

Table 2. Changes in the OD value and cell density of *Scenedesmus* sp. in a culture medium containing sodium nitrate
表 2. 在含有硝酸钠的培养基中栅藻的 OD 值与细胞密度的变化

硝酸钠/时间(d)	OD 值	细胞密度(10^4 个/ml)
1	0.524	272
4	0.913	512
7	1.189	842
10	1.675	1364
13	1.494	1224
16	1.720	1690
19	1.774	1704
22	1.864	1952
25	1.971	2272
28	2.050	2464

在含有硝酸铵的培养基中，栅藻的 OD 值与细胞密度的变化见表 3。

Table 3. Changes in the OD value and cell density of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing ammonium nitrate
表 3. 在含有硝酸铵的培养基中栅藻的 OD 值与细胞密度的变化

硝酸铵/时间(d)	OD 值	细胞密度(10^4 个/ml)
1	0.395	175
4	0.879	236
7	0.902	443
10	1.300	689
13	1.116	635
16	1.144	906
19	1.178	1136
22	1.153	1224
25	1.053	416
28	0.828	448

在含有尿素的培养基中，栅藻的 OD 值与细胞密度的变化见表 4。

Table 4. Changes in OD value and cell density of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing urea
表 4. 在含有尿素的培养基中栅藻的 OD 值与细胞密度的变化

尿素/时间(d)	OD 值	细胞密度(10^4 个/ml)
1	0.464	150
4	0.836	230
7	0.902	443
10	1.013	373
13	0.991	576
16	0.925	379
19	0.615	424
22	0.354	192
25	0.354	80
28	0.269	48

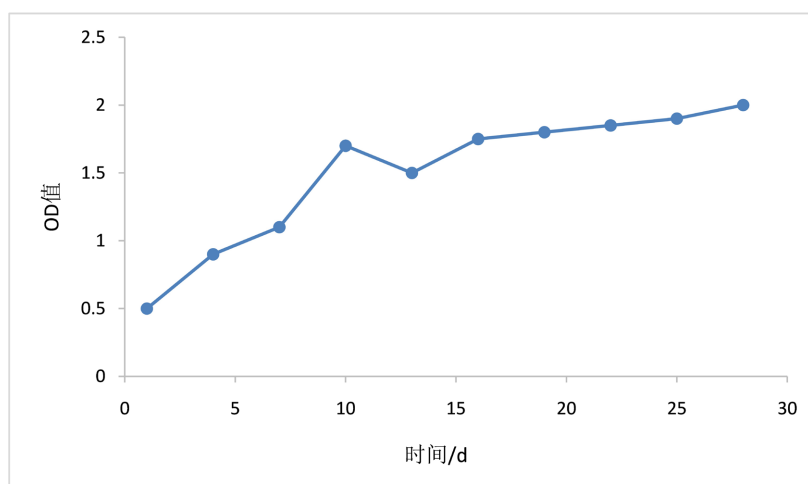


Figure 1. Change curve of the OD value with time of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing sodium nitrate
图 1. 在含有硝酸钠的培养基中栅藻 OD 值随时间的变化曲线

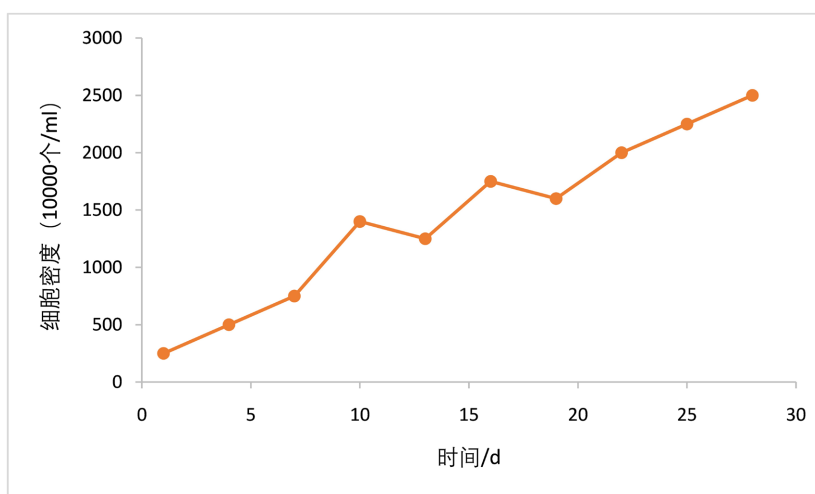


Figure 2. Growth kinetics curve of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing sodium nitrate
图 2. 在含有硝酸钠的培养基中栅藻生长动力学曲线

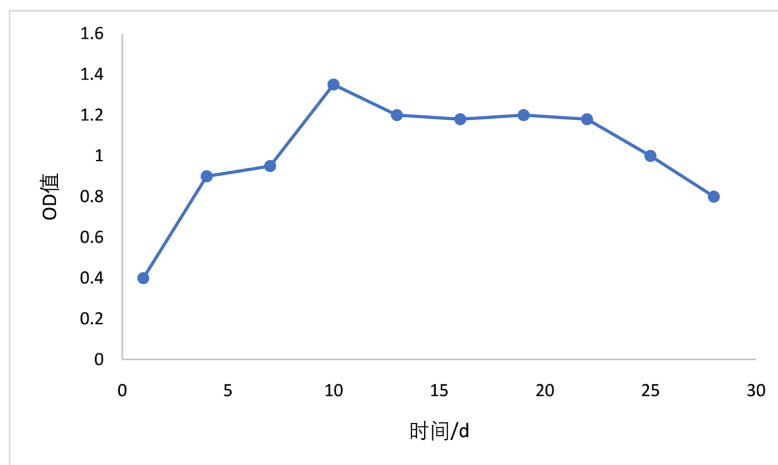


Figure 3. Change curve of the OD value with time of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing ammonium nitrate
图 3. 在含有硝酸铵的培养基中栅藻 OD 值随时间的变化曲线

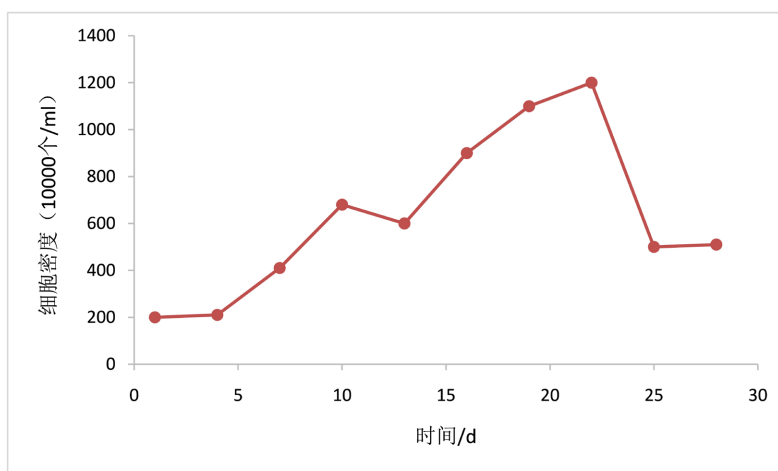


Figure 4. Growth kinetics curve of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing ammonium nitrate
图 4. 在含有硝酸铵的培养基中栅藻生长动力学曲线

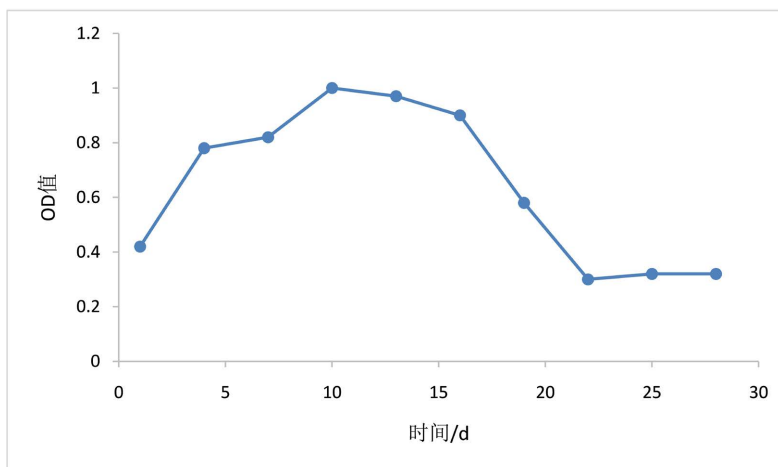


Figure 5. Change curve of the OD value with time of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing urea
图 5. 在含有尿素的培养基中栅藻 OD 值随时间的变化曲线

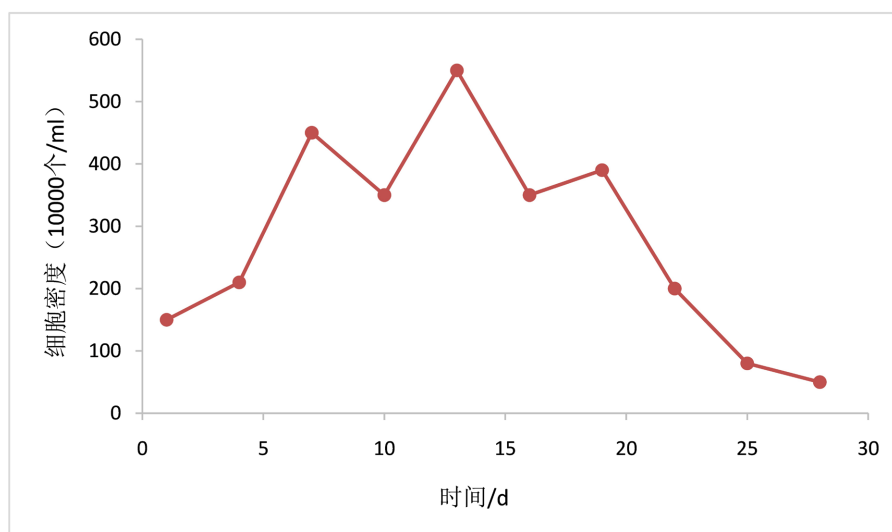


Figure 6. Growth kinetics curve of *Scenedesmus* sp. in culture medium containing urea
图 6. 在含有尿素的培养基中栅藻生长动力学曲线

分析图 1、图 2 可知, 在含有硝酸钠的培养基中, 栅藻细胞的 OD 值、细胞密度均随着时间的延长而呈现总体逐渐上升的趋势; 栅藻细胞在含有硝酸钠的培养基中快速大量分裂增殖, OD 值细胞密度得以快速增加, 其生长呈直线上升。分析图 3、图 4、图 5、图 6 可知, 在含有硝酸铵、尿素的培养基中, 栅藻细胞的 OD 值、细胞密度随着时间的延长前期均呈现上升趋势, 后期均呈现下降趋势; 比较三个条件下栅藻的生长曲线后, 发现当在含有硝酸钠的培养基中, 栅藻的生长曲线几乎为直线上升, 而在含有硝酸铵和尿素的培养基中, 栅藻生长曲线先上升后下降, 其中, 在含有硝酸钠的培养基中的生长最好。实验表明, 栅藻的最适生长条件为含有硝酸钠的氮[18]素培养基。

3.2. 氮素种类对栅藻中油脂含量的影响

经多次重复实验测得培养基中含有硝酸钠、硝酸铵、尿素条件下生长的栅藻产油率分别约为 16.7%、13.3%、3%, 本实验进行了栅藻脂类的粗提, 浸提时间也能在一定程度上影响提取效率, 本实验浸提了 24 个小时, 浸提时间太短, 浸提溶剂无法充分发挥自身的作用, 而浸提时间过长则会往浸提液中引入过多杂质, 提取出了光合色素成分和一些脂溶性成分, 因此产油率要相对较高。

通过对细胞产油率的测定可以得知, 栅藻在含有硝酸钠的培养基中生长最好, 次之是在含有硝酸铵的培养基中生长较好, 在含有尿素的培养基中生长最差。实验表明, 最适合栅藻生长的最适条件是含有硝酸钠的氮素培养基。

3.3. 不同氮素种类对栅藻固碳效果的影响

由实验结果可得: 栅藻在含有硝酸钠、硝酸铵、尿素的培养基中的干重分别是: 1.270 g/d.L、0.250 g/d.L、0.117 g/d.L。

计算出其对应的二氧化碳固定量分别是: 2.323 g/d.L、0.458 g/d.L、0.214 g/d.L。

通过在分别含有不同氮[19]素的三种培养基中栅藻的固碳量结果可知: 栅藻在含有硝酸钠的培养基中固碳量最高, 固碳量为 2.323 g/d.L; 在含有硝酸铵的培养基中固碳量次之, 固碳量为 0.458 g/d.L; 在含有尿素的培养基中固碳量最低, 固碳量为 0.214 g/d.L。故再次证明含有硝酸钠作为氮素的培养条件最适合栅藻的生长。

4. 结论与讨论

本实验采取对栅藻 OD 值、细胞密度、最终产油率以及其固碳量的测定来选出适合栅藻生长的最适条件。最终实验结果证明, 栅藻在含有硝酸钠的培养基中细胞生长速度最快, 细胞密度最大, 产油量最高, 固碳量最高; 在含有硝酸铵的培养基中生长状况次之; 在含有尿素的培养基中细胞生长速度最慢, 细胞密度最小, 产油量最低, 固碳量最低。故含有硝酸钠作为氮素的培养条件最适合栅藻的生长。

本课题的研究对栅藻产油生产工艺上时间的缩短和成本投入的降低有一定参考意义。

致 谢

感谢邹宁教授、孙东红老师在本人完成该论文期间提供的技术指导、资金等帮助。

参考文献

- [1] 刘江梅. 中国自然资源的现状及其可持续利用途径探讨[J]. 陕西教育学院学报, 2001, 17(4): 33-35.
- [2] 《2021 年中国温室气体公报》发布[J]. 中国环境监察, 2023(1): 6.
- [3] 刘明明. “双碳”目标下可再生能源发展规划实施的用地困境及其纾解[J]. 中国人口·资源与环境, 2022, 32(12): 21-30.
- [4] 吴佳铭. 藻群协同作用对微藻油脂产量的影响与机制[D]: [硕士学位论文]. 长春: 长春理工大学, 2020.
- [5] 李晓宇. 长链不饱和脂肪酸甲酯燃烧链起始反应及键能理论研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 清华大学, 2017.
- [6] 王浩然, 李露, 程玉帅. 制取生物柴油的催化剂的研究进展[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2023, 43(5): 120-122.
- [7] 赵青云, 韩飞, 石向星, 叶斌华, 焦永刚, 钟凯强. 微藻生物柴油固碳减排和经济效益研究[J/OL]. 工业水处理: 1-17. <https://doi.org/10.19965/j.cnki.iwt.2022-1132>, 2023-02-07.
- [8] 曾思钰. 生物柴油的研究进展及应用前景[J]. 安徽化工, 2023, 49(1): 48-50.
- [9] 张诗怡, 邵波. 斜生栅藻产微生物油脂的研究[J]. 节能, 2020, 39(8): 52-56.
- [10] 崔元捷. 栅藻 YZL17 初步扩大培养研究[D]: [硕士学位论文]. 石家庄: 河北经贸大学, 2022.
- [11] 位文倩. 混合培养对栅藻脂质积累的影响机制研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西安建筑科技大学, 2021.
- [12] 陆翠珍, 李英. 测定食品脂类的几种常用方法[J]. 食品安全导刊, 2013(4): 74-75.
- [13] 张有铭, 陈文德. 氯仿对人体的危害[J]. 职业与健康, 1992(4): 44.
- [14] 魏红, 钟红舰, 汪红. 索氏抽提法测定粗脂肪含量的改进[J]. 中国油脂, 2004, 29(6): 52-54.
- [15] 张婷婷, 梁燕, 彭灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业, 2021, 30(13): 40-43.
- [16] 山璞. 索氏抽提法检测脂肪应注意的问题[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 1138.
- [17] 宋美玲. 超临界二氧化碳萃取沙棘籽油的工艺研究[J]. 食品工程, 2023(1): 22-24.
- [18] 张诗怡, 邵波. 斜生栅藻产微生物油脂的研究[J]. 节能, 2020, 39(8): 52-56.
- [19] 安梅. 斜生栅藻产油工艺的优化研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020. <https://doi.org/10.27409/d.cnki.gxbnu.2020.001378>
- [20] 李小妹. 提高栅藻的生物量和油脂含量[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建师范大学, 2014.
- [21] 于荣清, 刘义, 田思琪, 杨云喜, 李伟, 曹毅, 乔代蓉. 产油脂微藻的分离鉴定及培养条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 897-900.
- [22] 黄英明, 王伟良, 李元广, 谢静莉, 范建华, 陶黎明. 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.
- [23] 朱艳蕾. 细菌生长曲线测定实验方法的研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 108-112.
- [24] 焦锐, 邹翔, 王英. 分光光度法测定海产藻类中甘露醇的含量[J]. 连云港师范高等专科学校学报, 2016, 33(1): 106-108.
- [25] 金波, 薛博. 溶剂浸提法提取花生红衣中红色素的工艺研究[C]//沈阳市科学技术协会. 第十七届沈阳科学学术

年会论文集: 2020 年卷. 沈阳: 沈阳市科学技术协会, 2020: 1291-1297.

- [26] 吴鸿敏, 王文特, 任雪梅, 范丽, 傅骏青, 田洪芸. 氯仿-甲醇法和酸水解法测定禽蛋中脂肪的方法比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7472-7475.
- [27] 刘奕辰. 水提醇沉提取银杏叶多糖工艺浸提温度的试验研究[J]. 山东畜牧兽医, 2019, 40(2): 10-11.