

Effects of Different Light Quality on Growth Rate and Accumulation of Organics in *Botryococcus braunii*

Xudan Zhu, Lan Ye, Jianxiang Xu, Huahong Huang, Erpei Lin*

Forestry and Biotechnology College, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an
Email: *zjulep@hotmail.com

Received: Sep. 21st, 2012; revised: Sep. 25th, 2012; accepted: Dec. 20th, 2012

Copyright © 2013 Xudan Zhu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: In this study, the influence of different light qualities on growth and organics contents of *Botryococcus braunii* 357 were investigated. Seven light qualities including white, red, blue, mixed light 1 (red:blue = 4:1), mixed light 2 (red:blue = 2:1), green and yellow were used. The results showed that the cell density and biomass of *B. braunii* 357 were higher under blue light than the other lights, which were 1.31 (OD₆₈₀) and 2.56 g·L⁻¹, respectively. The highest polysaccharide content was observed under white light, reaching to 0.94%; the highest soluble protein was shown under red light, reaching to 0.51%. The content of Chlorophyll and carotenoids under mixed light1 was up to 1.84% and 1.07%, which were significantly higher than other light. Total lipids and total hydrocarbons of *B. braunii* 357 under mixed light 1 were 25.02% and 25.10% respectively, which were significantly higher than the other light quality. These results will facilitate photobioreactor's development, growth regulation and large scale cultivation of *B. braunii* in the future.

Keywords: *Botryococcus braunii*; Light Quality; Growth Rate; Organics

不同光质对布朗葡萄藻生长、有机物质积累的影响

朱旭丹, 叶 岚, 许建香, 黄华宏, 林二培*

浙江农林大学林业与生物技术学院, 临安
Email: *zjulep@hotmail.com

收稿日期: 2012年9月21日; 修回日期: 2012年9月25日; 录用日期: 2012年12月20日

摘 要: 本论文以布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)357株为材料,研究了7种光质白光、红光、蓝光、混光1(红:蓝 = 4:1)、混光2(红:蓝 = 2:1)、绿光及黄光对藻细胞生长和胞内几种有机物质含量的影响。结果表明:在7种光质培养下,细胞密度和生物量在蓝光下最高,OD₆₈₀和干重分别可达到1.31和2.56 g·L⁻¹,高于其他光质;多糖含量在白光下最高,其含量达到0.94%;可溶性蛋白含量在红光最高,为0.51%;叶绿素和类胡萝卜素的含量则在混光1下最高,分别达到1.84%和1.07%;在混光1下的总脂和总烃含量最高,分别为25.02%、25.10%,高于其他光质。这些结果将为布朗葡萄藻光生物反应器的开发,及其生长调控与大规模培养提供依据。

关键词: 布朗葡萄藻; 光质; 生长; 有机物质

1. 引言

随着全球能源短缺和环境问题的日益严峻,寻找
*通讯作者。

和开发清洁、可再生的生物能源,已成为重要的研究课题。藻类,尤其微藻,种类繁多、分布极其广泛,与农作物相比,具有光合作用效率高、环境适应能力

强、生长周期短、生物产量高、可以保持碳平衡等特点^[1]。利用微藻制备生物能源具有良好的前景和战略意义。布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*), 隶属于绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、绿球藻目(Chlorococcales)、葡萄藻科(Botryococcaeae)、葡萄藻属(*Botryococcus*), 是一种世界性分布的淡水单细胞微藻^[2]。布朗葡萄藻又被称为“油藻”, 含有较高的胞外多糖、脂肪酸, 尤其是含烃量最高可达细胞干重的85%, 且其所产烃的组成和结构与石油极其相似^[2,3]。由于具有生产石油替代品应用价值, 布朗葡萄藻的研究日益受到重视^[4]。

目前, 有关布朗葡萄藻的研究主要集中在培养条件、烃类提取方法、以及生长和代谢的调控^[5-13]。如 Ranga RA 等对在露天跑道池和环形池中培养的布朗葡萄藻的生长、烃类含量进行了系统的分析和比较, 发现在培养 18 d 后, 其生物量和烃类含量都会增加, 其最高的生物量和烃类含量分别达到 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 28%, 添加 0.1% 的 NaHCO_3 能够提供生物量和烃类的含量^[5]。Magota A 等通过研究发现, 利用己烷从布朗葡萄藻中提取烃类时, 预先进行热处理能够减少提取过程中烃类的损耗, 平均的烃类提取效率能够达到 90%^[6]。在生长代谢调控方面的研究主要与培养基中营养成分相关。Song L 等对铁、锰、钼和镍这四种微量元素在布朗葡萄藻培养中的作用进行了系统研究, 找到了培养基中这四种微量元素的最佳浓度和组合, 认为这些元素能够促进葡萄藻的生长^[7]。胡章喜等研究发现硝态氮对布朗葡萄藻 764、765 的生长、总脂和总烃含量有明显的促进, 是这两株葡萄藻培养较为理想的氮源^[12]。

光照条件是调节藻类生长代谢的基本因子之一, 研究表明光照强度、光质对藻类的生长、形态结构、光合作用和物质代谢都具有重要的作用, 大多数生物合成过程能通过改变光照条件进行调节^[14-17]。沈银武等对中华植生藻的研究发现, 白光和黄光下生长最快, 在黄光下叶绿素等色素含量最高, 而在绿光下固氮酶活性最高^[14]。杜晓凤等以微绿球藻为材料, 研究了光照强度对生长和有机物质积累的影响, 发现在 1000~10,000 lx 的范围内, 微绿球藻的生长、可溶性蛋白、类胡萝卜素的含量随着光照强度的增加而增加^[15]。但光照条件, 特别是光质对布朗葡萄藻生长及物质积累影响的研究尚未开展, 有待深入探讨。因此, 本研究以 *B. braunii* 357 为材料, 分析了红、蓝等 7

种不同光质对的生长、有机物质积累的影响, 期望通过本研究为布朗葡萄藻的光生物反应器的开发, 及其生长调控与大规模培养提供依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验藻种

布朗葡萄藻 FACHB-357 株由中国淡水藻种库提供。

2.2. 培养基

实验采用 BG-11 培养基, 配方参考 Rao AR 等^[13]。

2.3. 培养方法

将培养至对数生长期的藻种转接含新鲜无菌培养基的三角瓶中, 使其初始 OD₆₈₀ 约为 0.1, 用可透过无菌空气的封口膜包扎, 分别置于白光、黄光(590 nm)、绿光(518 nm)、蓝光(463 nm)、红光(620 nm)、混光 1(红光:蓝光 = 4:1, 634 nm)、混光 2(红光:蓝光 = 2:1, 633 nm) 7 种不同的 LED 光源下进行培养(所用灯具由杭州汉徽光电科技有限公司提供), 光照强度约 $85\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光暗周期 16:8, 温度 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 实验设置 3 个平行。

2.4. 测定指标和测试方法

2.4.1. 细胞生长的测定

每隔 48 h 取样, 用紫外分光光度计测定藻液在 680 nm 波长处的吸光值, 测到平台期为止, 用 OD₆₈₀ 变化表征细胞的生长情况。

2.4.2. 生物量测定

在生长末期, 取一定体积的藻液, 10,000 rpm 离心 10 min, 收集藻细胞, 双蒸水洗涤两次后 10,000 rpm 离心 5 min, 称重后计算鲜重; 将藻体 80°C 干燥 1 d, 称重计算其干重, 以单位体积鲜重和干重来表示其生物量。

2.4.3. 多糖含量的测定

采用蒽酮法进行多糖测定^[18]。准确称取 $0.10 \pm 0.01\ \text{g}$ 藻粉于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 在快速混匀器上混匀后, 加入 0.5 mL 蒽酮乙酸乙酯 (2%) 和 5 mL 浓硫酸, 充分混匀, 沸水浴 5 min, 冷却

至室温后, 在 620 nm 波长下测其 OD 值。以葡萄糖为对照做标准曲线, 测得藻细胞多糖含量, 每种光质至少采用三个平行实验。

2.4.4. 可溶性蛋白含量的测定

准确称取 0.10 ± 0.01 g 藻粉于 10 mL 离心管中, 加入 2 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于 -20°C 冰箱中反复冻融三次, 再加入 2 mL 蒸馏水, 离心收集上清, 残渣加适量蒸馏水重复离心, 合并上清液, 定容到 10 mL, 每种光质采用三个平行。以牛血清蛋白为对照做标准曲线, 采用 Bradford 法测定蛋白含量 [19]。

2.4.5. 叶绿素含量的测定

准确称取 0.10 ± 0.01 g 藻粉于具塞试管中, 加入 1 mL 蒸馏水, 在混匀器上混匀后, 置于 -20°C 冰箱中反复冻融三次。加入 5 mL, 80% 的丙酮, 混匀后置于 4°C 冰箱内提取过夜, 8000 rpm 离心 5 min, 取上清于 25 mL 容量瓶中定容, 用 Arnon 法测定色素含量 [20]。

2.4.6. 总脂含量测定

参照胡章喜等 [12] 的干重法。称取一定量干藻粉用蒸馏水悬浮, 加入 6 mL 甲醇/氯仿混合液(2:1, 体积分数)振荡 2 h, 离心, 将氯仿层转移至预先称重的螺口试管中, 60°C 下用氮气将氯仿吹干, 称重。螺口试管前后质量之差即为总脂质量, 按照以下公式计算总脂百分含量:

$$\text{总脂百分含量} = (\text{总脂质量} / \text{藻粉质量}) \times 100\%$$

2.4.7. 总烃的测定

参照胡章喜 [12] 的方法。称取一定质量的藻粉, 加入 15 mL 正己烷在研钵中充分混匀, 然后离心, 收集正己烷提取液。将沉淀物重复上述过程 2 次以上, 收集所有的正己烷提取液, 转移至预先称重的螺口试管中, 然后在室温下用氮气将正己烷吹干, 称重。螺口试管前后质量之差即为总烃质量, 用以下公式计算总烃百分含量:

$$\text{总烃百分含量} = (\text{总烃} / \text{干藻重}) \times 100\%$$

2.5. 数据分析

使用 Excel 和 SPSS11.5 软件对所有数据进行统计分析。

3. 结果分析

3.1. 不同光质对布朗葡萄藻细胞密度的影响

布朗葡萄藻 357 在 7 种不同光质下表现出不同的生长规律(图 1)。在培养的初期(8 d), 各个光质下布朗葡萄藻 357 的生长差异不明显; 8 d 后, 绿光和黄光下其生长明显比其他光质下的慢, 并在整个生长周期维持较慢的生长速度; 12 d 后, 在蓝光、红光、白光和混光 2 下布朗葡萄藻 357 进入对数生长期, 而在对数生长的中期开始, 混光 2 下布朗葡萄藻 357 的生长明显变慢, 而蓝光下的生长最快, 到生长末期 OD680 最高达到 1.31。而就单色光来讲, 布朗葡萄藻 357 在蓝光下生长最快, 红光较快, 绿光次之, 黄光下最慢。这说明蓝光有利于布朗葡萄藻 357 的生长。苗红利等在中肋骨条藻 [21], 以及 Jean-Luc Mouget 等在硅藻多伽哈斯来藻(*Haslea ostrearia*) [22] 的研究中也有类似的结果, 发现蓝光的效果最好, 红光和绿光效果较差。

3.2. 不同光质对布朗葡萄藻的生物量的影响

布朗葡萄藻 357 在红、蓝等 7 种光质下生长 48 d 后, 分别测定其单位体积的鲜重和干重(图 2)。实验结果表明, 布朗葡萄藻 357 在白光和蓝光下的鲜重最高, 分别达到 $21.46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著高于其他光质 ($p < 0.05$), 但这两者间没有显著差异, 鲜重的结果基本反映了生长曲线的生长规律。干重检测结果表明, 布朗葡萄藻 357 在蓝光下的干重最高, 达到 $2.56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 白光下的干重次之, 达到 $2.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著高于

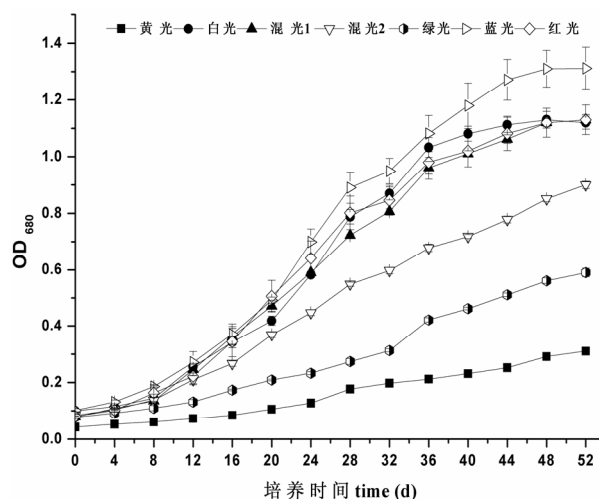


Figure 1. OD₆₈₀ of *B. braunii* 357 under different light qualities
图 1. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的 OD₆₈₀

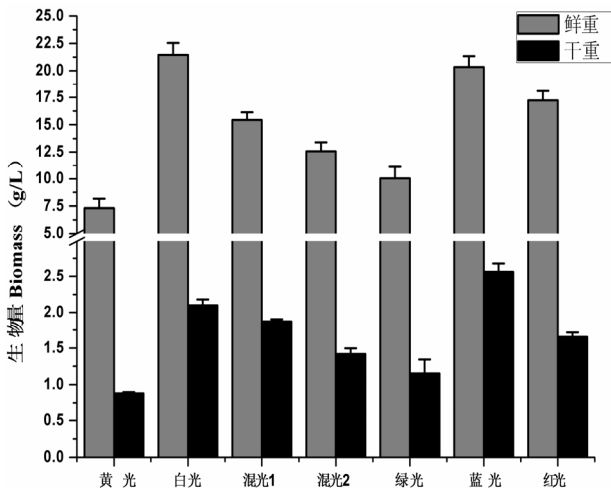


Figure 2. The biomass of *B. braunii* 357 under different light qualities
图 2. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的生物量

其他光质($p < 0.05$)。这些结果表明, 蓝光可能更有利于葡萄藻生物量的积累。

3.3. 不同光质对藻细胞有机物质含量的影响

将在不同光质下培养 48d 的葡萄藻 357, 收集烘干后用于藻体有机物质含量的测定。由图 3 可以看出, 白光和蓝光下多糖含量较高, 干重含量分别为 0.94% 和 0.91%, 黄光下多糖最低, 为 0.43%, 而其他光质下多糖含量也显著低于白光和蓝光($p < 0.05$)。这与藻生长速率、生物量的结果基本一致, 说明白光和蓝光下有利于藻细胞内细胞多糖的积累, 而在其他光质, 尤其混光, 尽管生长速率较快, 但物质可能并没有转化成多糖。

对可溶性蛋白的检测表明, 在红光、白光和蓝光下藻体蛋白质含量明显高于其他光质($p < 0.05$), 分别达到 0.51%、0.49% 和 0.48%, 而在黄光下藻体蛋白含量最低, 仅为 0.10%(图 4)。与多糖含量相比, 相对于白光和蓝光, 红光可能有促进蛋白质在藻细胞内的积累作用, 而在混合光质下, 由于红光和蓝光的交互作用, 反而不利于蛋白质的积累, 因而含量较低。

由图 5 可知, 叶绿素和类胡萝卜素的含量均在混光 1 下最高, 分别达到 1.84% 和 1.07%; 在红光下次之, 分别为 1.50% 和 0.938%; 这两种光质明显高于其他光质($p < 0.05$), 蓝光下其色素含量也较其他光质要高, 而在黄光下色素含量最低。这说明红光、蓝光及红蓝混合的光质可能有利于叶绿体的发育, 相应的使

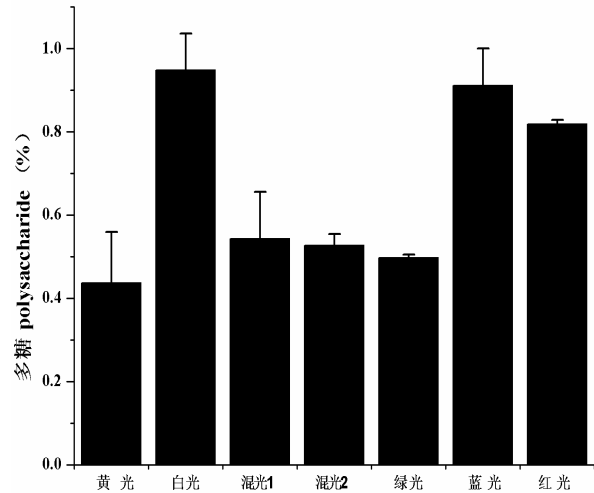


Figure 3. The content of polysaccharide of *B. braunii* 357 under different light qualities
图 3. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的多糖含量

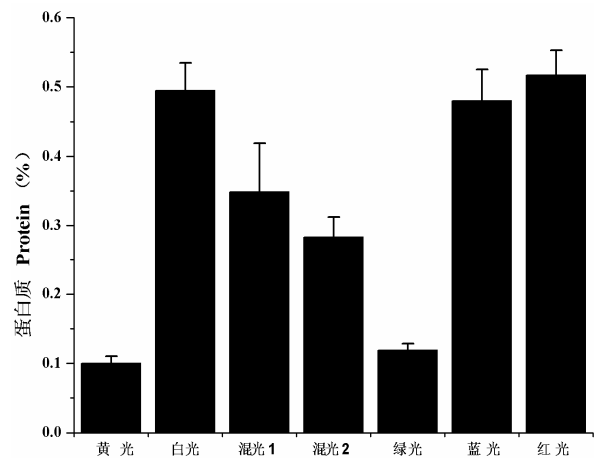


Figure 4. The content of soluble protein of *B. braunii* 357 under different light qualities
图 4. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的可溶性蛋白含量

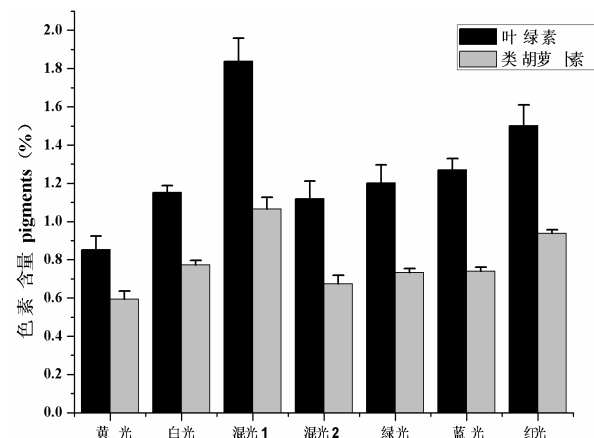


Figure 5. The content of Chlorophyll and carotenoids of *B. braunii* 357 under different light qualities
图 5. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的叶绿素和类胡萝卜素含量

其藻体内的色素含量较高。但比较生物量和多糖含量的结果,单独的红光、蓝光或混光下藻体的光合效率可能都没有白光下高,因而其生物量和多糖的量较白光下要低。

布朗葡萄藻 357 在红、蓝等 7 种光质下培养 48 d 后,分别测定其总脂含量(图 6)。实验结果表明,布朗葡萄藻 357 在混光 1、蓝光和红光下的总脂含量较高,分别达到 25.02%、23.70%和 24.23%,但这三者间没有显著差异,而其他光质下的总脂含量平均只有 18%左右,与前三者间存在极显著差异($p < 0.01$)。这些结果表明,蓝光、红光,或蓝光比例较低的混光 1 能够促进葡萄藻总脂的积累。

布朗葡萄藻 357 在红、蓝等 7 种光质下培养 48 d 后,分别测定其总烃含量(图 7)。实验结果表明,布朗葡萄藻 357 在混光 1、蓝光和红光下的总烃含量较高,分别达到 25.10%、22.50%和 23.62%,而其他光质下的总烃含量平均只有 16%左右。方差分析的结果表明,布朗葡萄藻 357 在混光 1 下的总烃含量高于其他光质,差异显著($p < 0.05$)。这些结果表明,蓝光、红光,或蓝光比例较低的混光 1 能够促进葡萄藻总烃的积累。

4. 结论

光照条件是影响藻类生长的主要环境条件,光照对微藻的生长和有机物质的积累有着重要影响^[23-25]。布朗葡萄藻 357 在白光、混光 1、蓝光和红光下的生长较快,生物量较高,这与绿色植物光合作用最佳光质情况基本一致。其中,布朗葡萄藻 357 在蓝光下细胞密度最高,培养 48 d 后 OD_{680} 可达到 1.31;在蓝光下的干重最高,达到 $2.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,高于其他光质。最近的研究^[26]表明在蓝光下布朗葡萄藻(Race B)的 CO_2 固定效率高于红光,而本研究中布朗葡萄藻 357 的干物质质量积累最多,说明蓝光能够 CO_2 的吸收,增加物质的代谢积累。

不同光质对布朗葡萄藻有机物质的积累有显著的影响,白光和蓝光有利于多糖的积累,其含量分别达到 0.94%和 0.91%。可溶性蛋白含量在红光和白光最高,分别为 0.51%和 0.49%;而叶绿素和类胡萝卜素的含量则在混光 1 下最高,分别达到 1.84%和 1.07%。进一步的检测表明,布朗葡萄藻 357 在混光 1 和红光下,总脂和总烃的含量均较高,其在混光 1 和

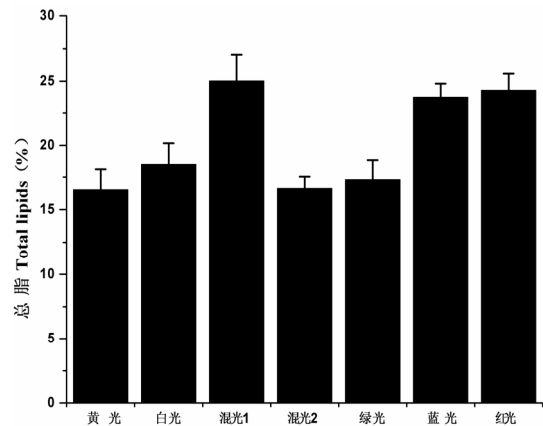


Figure 6. The content of total lipids of *B. braunii* 357 under different light qualities

图 6. 不同光质下 *B. braunii* 357 的总脂含量

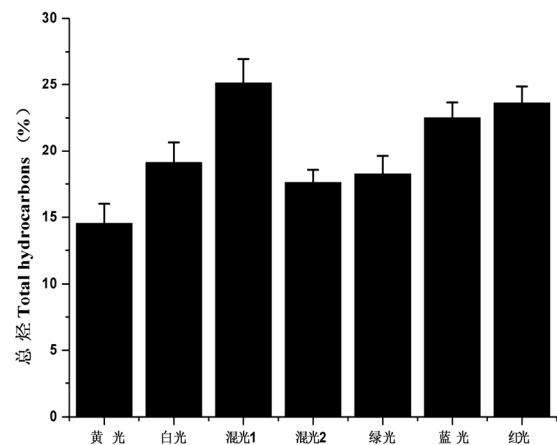


Figure 7. The content of total hydrocarbons of *B. braunii* 357 under different light qualities

图 7. 不同光质下布朗葡萄藻 357 的总烃含量

红光下的总脂含量分别达到 25.02%和 24.23%,总烃含量分别达到 25.10%和 23.62%。说明这两种光质对布朗葡萄藻的脂类代谢有重要的调控作用,且不同比例的红蓝混光对其总脂和总烃的积累有不同的效应。

不同的光质对布朗葡萄藻的生长或有机物质积累有不同的效应,工业化生产时可根据不同的需求选择不同的光质或光质的组合。

5. 致谢

本项目得到了浙江省大学生科技创新项目(2011R412004)的资助,在此表示感谢!

参考文献 (References)

- [1] C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah, D. J. Lee and J. S. Chang.

- Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 71-81.
- [2] A. Banerjee, R. Sharma, Y. Chisti and U. C. Banerjee. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(3): 245-279.
- [3] P. Metzger, C. Largeau. *Botryococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66(5): 486-496.
- [4] C. Dayananda, R. Sarada, R. M. Usha, T. R. Shamalab and G. A. Ravishankara. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioenergy*, 2007, 31(1): 87-93.
- [5] R. A. Ranga, G. A. Ravishankar and R. Sarada. Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 528-533.
- [6] A. Magota, K. Saga, S. Okada, S. Atobe and K. Imou. Effect of thermal pretreatments on hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 2012, 123:195-198.
- [7] L. Song, J. G. Qin, S. Su, J. Xu, S. Clarke and Y. Shan. Micronutrient requirements for growth and hydrocarbon production in the oil producing green alga *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *PLoS One*, 2012, 7(7): e41459.
- [8] Y. Ge, J. Liu and G. Tian. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 130-134.
- [9] 殷大聪, 耿亚红, 梅洪, 欧阳峥嵘, 胡鸿钧, 李夜光. 几种主要环境因子对布朗葡萄藻光合作用的影响[J]. *武汉植物学研究*, 2008, 26(1): 64-69.
- [10] 孙凯峰, 胡章喜, 段舜山. N、P 营养盐胁迫对两株布朗葡萄藻生长的影响[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(3): 517-524.
- [11] 胡章喜, 徐宁, 李爱芬, 段舜山. 布朗葡萄藻在不同培养基中的生长效应[J]. *生态科学*, 2007, 26(4): 332-336.
- [12] 胡章喜, 安民, 段舜山, 徐宁, 孙凯峰, 刘晓娟, 李爱芬, 张成武. 不同氮源对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响[J]. *生态学报*, 2009, 6, 29(6): 3288-3294.
- [13] A. R. Rao, C. Dayananda, R. Sarada, T. R. Shamala and G. A. Ravishankar. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 2007, 98(3): 560-564.
- [14] 沈银武, 朱运芝, 刘永定. 不同光质对中华植生藻的影响[J]. *水生生物学报*, 1999, 23(3): 285-287.
- [15] X. F. Du, N. Zou, D. H. Sun, et al. Effect of Light Intensity on Growth Rate and Accumulation of Organics of *Nannochloropsis oculata* Droop. *Bioprocess*, 2011, 1(2): 18-21.
- [16] N. Korbee, F. L. Figueroa and J. Aguilera. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2005, 80(2): 71-78.
- [17] M. Sorek, O. Levy. Influence of the quantity and quality of light on photosynthetic periodicity in coral endosymbiotic algae. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43264.
- [18] 张志良. *植物生理学实验指导(第二版)*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 160-162.
- [19] R. L. Dryer, G. F. Lata. *Experimental biochemistry*. New York: Oxford University Press, 1989: 346-347.
- [20] 陈建勋, 王晓峰. *植物生理学实验指导(第二版)*[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 81-84.
- [21] 苗洪利, 孙丽娜, 田庆震, 周晓光, 王晶. LED 单色光谱及复合光谱对赤潮优势种中肋骨条藻生长的作用[J]. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(10): 107-110.
- [22] J.-L. Mouget, P. Rose and G. Tremblin. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities-confirmation of chromatic adaptation in diatoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, 75(1-2): 1-11.
- [23] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 常林, 赵萍. 光照强度对微绿球藻生长及有机质积累的影响[J]. *生物过程*, 2011, (1): 18-21.
- [24] R. Liliana, C. Z. Graziella, B. Niccolo, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini and M. R. Tredici. Microalgae for oil strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1): 100-112.
- [25] J. Fabregas, A. Maseda and A. Dominguez. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(1): 31-35.
- [26] M. Baba, F. Kikuta, I. Suzuki, M. M. Watanabe and Y. Shiraiwa. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 266-270.