

## 微藻固定 CO<sub>2</sub> 研究进展

# Advances on CO<sub>2</sub> Fixation by Microalgae

程丽华, 张 林, 陈欢林\*, 高从培

CHENG Li-Hua, ZHANG Lin, CHEN Huan-Lin\* and GAO Cong-Jie

浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310027

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

**摘 要** 空气中 CO<sub>2</sub> 浓度升高所导致的温室效应已成为重大的环境问题, 受到人们普遍关注。概述了高效固定 CO<sub>2</sub> 微藻藻种的筛选和培养方法, 分析了微藻固定 CO<sub>2</sub> 的无机碳利用形式和浓缩机制, 讨论了高效光生物反应器设计和运行目标, 简要介绍了微藻(酶)-膜生物反应器集成新技术。并认为今后的研究方向主要是在进一步探索微藻固定 CO<sub>2</sub> 有关机理的基础上, 构建高效固定 CO<sub>2</sub> 的转基因微藻, 开发高效膜生物反应集成系统。

**关键词** CO<sub>2</sub> 固定, 微藻, 光生物反应器, 碳酸酐酶(CA)

**中图分类号** R392.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0177-05

**Abstract** The greenhouse effect, which is believed to occur primarily as a result of the accumulation of carbon dioxide in the atmosphere, has become one of the major environmental concerns and received worldwide attention. In this paper, algae species screening and cultivation for efficient CO<sub>2</sub> fixation are reviewed. The related dissolved inorganic carbon (DIC) utilization form and CO<sub>2</sub> concentration mechanism (CCM) in the process of CO<sub>2</sub> fixation by microalgae are analyzed. Four objectives of the highly effective photobioreactor design and operation are discussed, and the advances on CO<sub>2</sub> mitigation technology with integration of microalgae (enzyme) and membrane bioreactor are also briefly introduced. In response to elevated CO<sub>2</sub> concentration, much attention needs to be paid to the construction of transgenic microalgae with higher performance in CO<sub>2</sub> fixation based on the further ascertainment of the related mechanism, and the development of effective CO<sub>2</sub> biofixation system integrated with other kinds of advanced technology, such as membrane immobilization and separation.

**Key words** CO<sub>2</sub> fixation, microalgae, photobioreactor, carbonic anhydrase (CA)

近几年大气中 CO<sub>2</sub> 浓度以每年 0.5% 的速度递增, 目前已达到  $372 \times 10^{-6}$ 。据预测, 若 CO<sub>2</sub> 排放不加控制, 在未来 100 年内, 大气温度将上升 1.5 ~ 3℃, 由此会使海平面上升 60cm 左右<sup>[1]</sup>。因此, 控制和降低大气中 CO<sub>2</sub> 含量, 已成为世界各国刻不容缓的大事。近 20 年来, 一些发达国家采用各种物理、化学和生物方法研究 CO<sub>2</sub> 收集、浓缩、以及固定和转化, 其中深海注射、陆地生态系统和生物(化学)方法是 3 种较优的 CO<sub>2</sub> 贮存、捕获和转化途径。

微藻由于具有光合速率高、繁殖快、环境适应性强、处理

效率高以及易与其它工程技术集成等优点, 广泛应用于烟道气中 CO<sub>2</sub> 脱除研究<sup>[2-5]</sup>。微藻固定 CO<sub>2</sub> 技术的另一潜在应用领域是密闭空间, 如潜艇和载人航天器中 CO<sub>2</sub> 的去除, 美国、日本和前苏联从上世纪 90 年代开始研究微藻在环境控制和生命保护系统中 CO<sub>2</sub> 去除和 O<sub>2</sub> 转化过程中的作用<sup>[6-8]</sup>。

微藻固定 CO<sub>2</sub> 技术的研究报道主要集中在以下三个方面: 高效固定 CO<sub>2</sub> 的藻种筛选和培养, 包括从不同环境条件

Received: October 8, 2004; Accepted: December 15, 2004.

\* Corresponding author. Tel: 86-571-87952121; E-mail: chenhl@che.zju.edu.cn

下筛选高效藻种、微藻的高密度光自培养,以及高效固定  $\text{CO}_2$  微藻的基因工程研究;微藻固定  $\text{CO}_2$  机理探索,包括无机碳的利用形式、 $\text{CO}_2$  浓缩机理(CCM),以及高浓度  $\text{CO}_2$  对微藻生长的影响;在培养装置及工艺过程方面,高密度光自培养培养高效光生物反应器,新型膜分离技术和微藻固定  $\text{CO}_2$  技术相结合的微藻(酶)-膜  $\text{CO}_2$  固定集成技术也是重要的研究热点。本文主要就这三个方面展开讨论,旨在促进我国在该方面的研究与开发。

## 1 藻种的筛选和培养

### 1.1 藻种的筛选

藻种的筛选与其应用的环境密切相关。用于密闭空间中微量  $\text{CO}_2$  ( $<0.1\%$ ) 的去除所选用的微藻通常要求对  $\text{CO}_2$  转化率高、比生长速率快、耐 pH 范围宽;应用于烟道气中  $\text{CO}_2$  (10%~20%) 脱除的微藻,除了同时满足上述要求外,还要求具有耐高  $\text{CO}_2$  浓度、耐高温,以及耐  $\text{NO}_x$  和  $\text{SO}_x$  等气体组分。近 10 年来国内外针对藻种筛选研究结果表明,无论是密闭空间中微量  $\text{CO}_2$  的固定还是烟道废气中大量  $\text{CO}_2$  的脱除减排,蓝藻和绿藻具有极大的优势,尤以绿藻中的小球藻为佳。例如日本采用 *Chlorella ellipsoidea*<sup>[6,7]</sup>、*Chlorella sorokiniana* ATCC22521<sup>[8]</sup>、*Chlorella* sp. UK001<sup>[9]</sup> 和 *Chlorococcum littorale*<sup>[9]</sup>;美国通常采用普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)<sup>[10]</sup>;中国台湾从 200 多种微藻中筛选确定的耐高  $\text{CO}_2$  浓度绿藻为 *Chlorella* sp. NTU-H15<sup>[11]</sup>;我国东北大学在烟道气  $\text{CO}_2$  脱除研究过程中筛选出耐高  $\text{CO}_2$  浓度的小球藻 ZY-1<sup>[12]</sup>。

### 1.2 微藻的高密度光自培养

根据微藻的营养模式不同,其培养方式有光自养、混养和异养之分。由于能进行混养或异养的物种较少,易发生细菌污染、低浓度可溶性有机底物可能抑制微藻细胞生长,以及光诱导产物(如色素)在异养培养过程中的生产能力较低等,使得微藻固定  $\text{CO}_2$  技术大多采用光自培养方式。

微藻的光自养生长受到很多环境因素的影响,包括营养条件、光照、温度、pH 和通气条件<sup>[13,14]</sup>等。如何优化上述因素以满足微藻生长的需要,是微藻高密度光自培养的前提条件。

微藻高密度光自培养是降低微藻生产成本的一条有效途径。目前实现微藻高密度光自培养主要采用以下三种方法:优化微藻培养基和培养条件<sup>[8]</sup>;采用不同稀释比及分批补料培养避免底物抑制<sup>[15]</sup>,或采用连续培养提高微藻生产率;开发具有高光传递效率的光生物反应器。大多数研究者认为微藻在培养过程中分泌某种自我抑制的代谢废物,只有 Mandalam 等人否定这一说法,认为可能是培养液中各营养元素失衡抑制了微藻生长<sup>[16]</sup>。迄今为止,小球藻高密度培养的最高细胞密度为  $4 \times 10^9$  个/mL,一般藻类的最高产率(干重)为  $30 \sim 40 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ <sup>[17]</sup>。

### 1.3 高效固定 $\text{CO}_2$ 微藻的基因工程研究

构建高效固定  $\text{CO}_2$  的转基因微藻是进一步提高微藻固

定  $\text{CO}_2$  能力极具潜力的途径。20 世纪 80 年代,真核藻类的基因工程研究兴起,其中莱茵衣藻是真核藻类遗传转化研究的重要模式。在 90 年代,小球藻作为另一个单细胞绿藻的转化系统,才得到深入研究<sup>[18]</sup>。到了 90 年代中期,随着基因技术的发展,人们开始从分子水平解释 CCM 以及发现有关的基因<sup>[19]</sup>,并致力于提高藻类的 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Rubisco)活性,从而进一步提高藻类固定  $\text{CO}_2$  的能力。

目前,微藻固定  $\text{CO}_2$  的基因工程研究主要集中在基因的结构、序列分析以及基因克隆与表达方面。例如 Wakasugi 等测定了单细胞绿藻 *Chlorella vulgaris* C-27 叶绿体基因组的全部核苷酸序列,通过分析和比较有关基因组认为和红藻、褐藻相比,C. *vulgaris* 更加接近陆生植物<sup>[20]</sup>。Beuf 等从一种能够耐受  $\text{CO}_2$  浓度高达 60% 的单细胞海洋绿藻 *Chlorococcum littorale* 中提取了 cDNA,分离出编码 Rubisco 活化酶(rca)相应的 DNA 区域,并指出由于  $\text{CO}_2$  浓度升高,而不是温度等环境压力诱导了 rca<sup>[21]</sup>。Sasaki 等将 *Chlorococcum littorale* 在极高  $\text{CO}_2$  浓度(20%)下诱导的两种 cDNA 克隆分别命名为 HCR1 和 HCR2(High- $\text{CO}_2$  response),进一步分析发现 HCR mRNAs 的诱导不仅需要极高的  $\text{CO}_2$  浓度条件,而且微藻培养液是缺铁的<sup>[22]</sup>。

## 2 微藻固定 $\text{CO}_2$ 机理的探索

了解藻类在光合作用过程中获取外源无机碳的形式及其机理,无机碳在胞内的运输机制,以及无机碳平衡体系对光合作用的影响等对于微藻固定  $\text{CO}_2$  技术的研究与开发应用具有十分重要的理论意义。

### 2.1 无机碳利用形式

微藻的无机碳利用形式多种多样:有些细胞可以利用  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$ ,并且含有胞外碳酸酐酶(CA),如 *Chlamydomonas reinhardtii*、*Scenedesmus obliquus*、*Dunaliella terteelecta*、*Chlorella saccharophila*、*Chlorella vulgaris* C-3、*Chlorella spirulina*、*Chlorella pyrenoidosa* 和 *Chlorococcum littorale*;有的可以利用  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$ ,但不含胞外 CA,如 *Chlorella ellipsoidea* 和 *Chlorella kesslerii*;或者只能利用其中一种无机碳,如 *Chlorella miniata* 和 *Chlorella vulgaris* 11h 只能利用  $\text{CO}_2$ <sup>[9,23,24]</sup>。一般认为只含  $\text{CO}_2$  转运子的细胞,通常没有胞外 CA;而那些只含有  $\text{HCO}_3^-$  转运子的微藻,可能形成的胞外 CA 抑制了无机碳的吸收<sup>[25]</sup>。微藻利用无机碳的形式和 CA 所处部位之间的关系密切。不同微藻不仅 CA 含量不同,而且 CA 在微藻中所处的部位也有很强的藻种特异性。例如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)就至少有 3 种胞内酶:类囊体内腔上的叶绿体 CA 以及两种线粒体上的 CA<sup>[9]</sup>。对不同物种 CA 的定位一直是研究 CA 在藻类间接吸收  $\text{HCO}_3^-$  过程中作用的重要手段。

### 2.2 无机碳浓缩机制(CCM)

不少微藻在适应水体无机碳浓度变化的过程中,会在细

胞内形成一种主动转移无机碳的机制——CO<sub>2</sub> 的浓缩机制 (CCM)。该机制主要是通过无机碳的转运,改变细胞光合作用对无机碳的亲合力,在 Rubisco 羧化酶的活性位点提高 CO<sub>2</sub> 浓度,有利于 Rubisco 起羧化酶作用,抑制其氧化酶活性。这种机制容易受到外界环境,如光、温度、CO<sub>2</sub> 浓度和营养状况的影响。

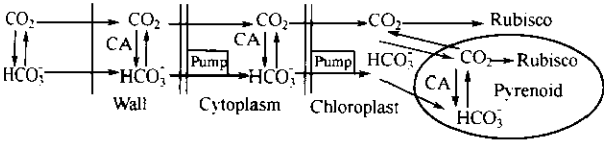


图1 单细胞绿藻的无机碳转运模式

Fig.1 Models for inorganic carbon transport in unicellular green algae

在光合作用过程中,一般认为游离的 CO<sub>2</sub> 可以穿过叶绿体被膜,而 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 是不能的。为了解释这种无机碳浓缩机制是如何使环境中的无机碳进入细胞内,许多学者基于藻细胞结构提出各自的无机碳浓缩模型。图1是其中一个比较完善的单细胞绿藻无机碳浓缩模型,该模型认为 CO<sub>2</sub> 能通过扩散进入细胞内,HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 则通过主动运输进入细胞内,淀粉核内 CO<sub>2</sub> 还能够进行固定<sup>[19]</sup>。当环境 pH 较高,即 CO<sub>2</sub> 浓度不足时,部分 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 在胞外 CA 的作用下解离成 CO<sub>2</sub> 进而扩散进去,部分 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 则依赖离子泵主动运输进入,而胞内 CA 通过调节 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 CO<sub>2</sub> 之间的平衡,维持基质适宜 pH。此外,Thoms 等提出了一种以叶绿体的精细结构和生理学为基础的 CCM 模型,并利用这种模型研究了叶绿体的各个组成部分对 CCM 的特定作用<sup>[25]</sup>。

2.3 CO<sub>2</sub> 浓度影响

高浓度 CO<sub>2</sub> (1% 以上,如烟道气 10% ~ 20%) 明显抑制微藻细胞的 CA 活性和 CCM 的形成。CO<sub>2</sub> 浓度上升几个百分点,首先导致 CCM 效率降低,CO<sub>2</sub> 浓度进一步升高,胞外 CA 受到极大抑制,胞内 CA 几乎丧失。CA 能够催化 CO<sub>2</sub> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 之间的可逆转换,当 CO<sub>2</sub> 浓度升高,CA 由于底物抑制而活性下降,而且在 CO<sub>2</sub> 转化成 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的过程中同时伴随 H<sup>+</sup> 的形成,当 CO<sub>2</sub> 浓度超过某一值时,基质 pH 下降,从而阻碍 CO<sub>2</sub> 固定。实验中我们发现,通入压缩空气,随着光照时间的延长,藻液的 pH 不断上升,从光照前的 8.5 上升至 10.5,表明此时的 CO<sub>2</sub> 供应不能满足微藻生长的需要;而当进气 CO<sub>2</sub> 浓度提高到 1%,藻液的 pH 下降到 7.5 以下,计算得该浓度下单位体积微藻固定 CO<sub>2</sub> 的量最大;当 CO<sub>2</sub> 浓度进一步增加至 3.0%,pH 下降到 7.0 以下,此时藻液中几乎不存在 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,CO<sub>2</sub> 去除率和固定量均大大下降<sup>[26]</sup>。

近来还发现有些微藻之所以能够耐受极高的 CO<sub>2</sub> 浓度是因为能够采取一种有利于 PSI 的过渡状态<sup>[27]</sup>。几乎所有从微藻获得的数据都表明,低浓度 CO<sub>2</sub> 条件下微藻的生长通常需要更多 PSI 光照。由于 PSI 活性增强有利于环形电子流动,而 PSII 系统有利于线形电子流动,当 PSI 环形电子流动增强,微藻产生一种用作 H<sup>+</sup> 运输能源的 ATP。这种光反应

系统活性之间的调整可能有利于离子泵的运转,维持内部的 pH,从而适应高 CO<sub>2</sub> 浓度。当高 CO<sub>2</sub> 条件下生长的细胞转移到低 CO<sub>2</sub> 浓度下也能观察到该过渡状态,表明环形电子传递过程中产生的 ATP 是低 CO<sub>2</sub> 浓度条件下微藻细胞积累无机碳所必需的<sup>[19]</sup>。然而,那种从低 CO<sub>2</sub> 浓度条件下转移到 20% CO<sub>2</sub> 的微藻的 PSII 并没有明显变化<sup>[27]</sup>。

3 微藻固定 CO<sub>2</sub> 的反应器及其集成技术

3.1 高效光生物反应器制备

高效光生物反应器是实现微藻高密度培养的重要手段,高效光生物反应器的研制一直是微藻培养和微藻固定 CO<sub>2</sub> 技术的研究热点。

光生物反应器优化设计的目标主要涉及四个方面:一、增大反应器的比表面积。光生物反应器的形式各种各样,有开放式的,也有密闭式(主要分管式、板式和锥式三类),其中开放式的比表面积较大。二、增强气液传质效率。一般通过设计附属器件结构来改善微藻培养过程中气液传质效果,如气液交换器、冷凝器、超滤装置、混和装置以及营养物的供应装置<sup>[28]</sup>。在实验中我们采用在光生物反应器旁串接中空纤维膜组件的方法改善供气效果,发现不仅气泡更加细密均一,而且气泡在藻液中的停留时间也从原来的 2s 增加到 20s,使得微藻脱除 CO<sub>2</sub> 量提高了 5 倍<sup>[29]</sup>。三、提供高效光源。大量研究表明微藻吸收 CO<sub>2</sub> 产 O<sub>2</sub> 速率,主要取决于光照条件。改善光照条件需要解决两个问题,一个是高效光源提供,另一个是光线在反应器内的有效分布。除了可以利用太阳光和普通的荧光灯作为光源外,还开发了利用发光二极管<sup>[28]</sup>、光导纤维<sup>[30]</sup>以及闪光灯<sup>[31]</sup>作为光源的各种光生物反应器。光源的位置可分为外置式和内置式两种,内置式可以显著改善光线的分布,提高光源利用率,但制作成本较高。另外,各种光照操作条件,如光质、光强、光暗比以及光照时间等,对微藻生长也具有很大影响<sup>[32]</sup>。四、提高光传递效率。研究发现单纯提高光强并不能相应地提高微藻的产 O<sub>2</sub> 速率。以 *Chlorella kessleri* 为藻种,利用发光二极管作为光源的光生物反应器,当藻体密度达到 5 × 10<sup>8</sup> cells/mL 时,O<sub>2</sub> 净产生速率为 10 mmol/(L·h);当藻体增加到一定密度时,其表观产氧速率(OPR)开始下降,而如果光生物反应器中藻体之间没有彼此遮蔽现象,O<sub>2</sub> 的生产速率将至少提高 5 倍<sup>[33]</sup>。因此不能通过无限制提高光合作用质子流来克服这种藻体之间彼此遮蔽的现象。光强对微藻的生长情况影响有三种情况:辐射补偿、辐射饱和及辐射抑制。当藻体密度一定时,辐射能量越大,微藻按顺序出现上述情况;当辐射能量一定时,藻体密度越小,微藻首先出现光抑制现象。针对各种光现象,还提出了各种光理论模型,如光生物反应器内部光分布模型<sup>[34]</sup>、光照条件对光合作用活性影响的动力学模型<sup>[35]</sup>和光辐射热效应模型<sup>[36]</sup>等,其中光生物反应器中藻液的光衰减规律是研究最多的。

除了上述四个因素外,操作过程的经济性也是光生物反应器实际应用时需要考虑的问题。通常封闭式光生物反应

器的投资较高,比较适用于一些高附加值的产品,如微藻代谢产物、医药和基因工程微藻等的培养,以及特殊密闭系统的气体的处理;对于烟道气等的大规模处理,从目前实际应用的可能性来看,更多地还是建造开放式的大型光生物反应系统。

### 3.2 微藻(酶)-膜 CO<sub>2</sub> 固定集成技术

除了微藻固定方法外,CO<sub>2</sub> 去除方法还包括固胺树脂法<sup>[37]</sup>、电化学法、金属氧化物法、分子筛法和膜分离法。相比较而言,对于密闭空气中微量 CO<sub>2</sub> 的去除,膜基气体吸收法在传质效率、能耗、操作性能等方面具有明显的优势。针对空气中 CO<sub>2</sub> 的去除,我们以多孔的疏水或亲水膜作为气、液分隔介质进行膜基吸收的新型分离技术研究<sup>[38]</sup>,也对酶固定化中空纤维膜<sup>[39]</sup>、吸水性凝胶膜<sup>[40]</sup>以及膜式微藻光生物反应器<sup>[29]</sup>进行了多方位研究。

近 10 年来,国外开发新型微藻(酶)-膜 CO<sub>2</sub> 固定集成技术有了较大的进展。例如 Miyatake 等考虑到失重条件下,离心分离并不适合微藻的培养收集,设计了一种结合两种功能膜的生物再生系统将 CO<sub>2</sub> 转化成 O<sub>2</sub>。由于一般大气中 CO<sub>2</sub> 的含量为 0.04%,他们引入了两种不同的组件:一种是气/液选择性分离组件用于大气中 CO<sub>2</sub> 的分离,另一种是非选择性气/液分离组件,它能够在 CO<sub>2</sub> 光生物反应器后的密闭气室中提供富氧气体。结果认为在失重条件下,采用分离 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 气体的选择性膜是十分必要和有效的<sup>[41]</sup>。而 Trachtenberg 等人一直致力于密闭空间舱中微量 CO<sub>2</sub> 的去除研究,提出了 CO<sub>2</sub> 的 CA 酶-膜捕获新方法<sup>[42]</sup>。Chakrabarti 等则首次采用将菠菜中提取的 Rubisco 固定到膜上的方法来研究空气中 CO<sub>2</sub> 的生物固定作用,发现利用二甲基庚二胺盐(dimethyl pimelimidate)固定到蛋白质 A 琼脂上的固定方法明显优于利用 1,3-二环乙基碳二亚胺(DCC)耦合到尼龙膜基上。此外,他们研究了固定化酶的再用性、耦合效率以及温度和 pH 等的影响,结果表明固定化膜的热稳定性和贮藏稳定性都比水溶液态的酶明显提高,而且固定化酶的受热失活速率显著下降<sup>[43]</sup>。

微藻(酶)-膜 CO<sub>2</sub> 固定集成技术,特别是固载活性基团膜分离技术以其体积小、重量轻、能耗低、去除效率高和维护操作方便等优点,特别适合 CO<sub>2</sub> 浓度较低条件下的某些密闭空间中微量 CO<sub>2</sub> 的去除。当然,该技术中固载基团的活性、膜材料选择、膜生物反应器的设计制备以及操作稳定性仍有待深入研究。

## 4 展望

微藻固定 CO<sub>2</sub> 研究成功不仅对探索微藻在大气生态系统中的调控作用具有重要理论意义,而且在工业废气回收及公共场所空气中 CO<sub>2</sub> 浓度控制等方面具有应用前景,特别对于空间站和潜艇等密闭空间空气中 CO<sub>2</sub> 去除与转化,在提高人们生活质量及改善工作环境方面取得社会效益。

尽管微藻固定 CO<sub>2</sub> 技术,由于培养面积需求大、气候温

和以及水分供应充足,目前尚不能进一步推广应用于工业废气的处理<sup>[44]</sup>,而且对于密闭空间舱等领域,还必须考虑微重力和辐射的影响。不过结合微藻本身价值,如可以转化为生物柴油等高价液体燃料从而替代化石燃料,或生产有用物质如类脂和蛋白质,或作为提取高附加值药物原料等,该技术还是很有希望成为经济可行的环保型 CO<sub>2</sub> 去除技术。

对于工业废气,尤其是烟道气,由于存在处理量大、出气温度高、排气 CO<sub>2</sub> 浓度高等特点,针对目前我国大多采用高烟囱排放的现实,我们认为采用微藻固定 CO<sub>2</sub> 技术处理废气拟在以下三个方面进一步开展:筛选耐高温、耐高 CO<sub>2</sub> 浓度及抗污染的藻种,研究不同种类微藻并强化其固定与转化 CO<sub>2</sub> 的能力;利用基因工程技术构建高效固定 CO<sub>2</sub> 的微藻;特别是结合其他领域新技术,开发和放大高效光生物反应器,进一步提高 CO<sub>2</sub> 处理量。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Ehlers E, Krafft T. Understanding the Earth System. Berlin: Springer-Verlag, 2001
- [2] Kurano N, Ikemoto H, Miyashita HH *et al*. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers Mgmt*, 1995, **36**(6-9):689-692
- [3] Zeiler KG, Heacox DA, Toon S *et al*. The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Convers Mgmt*, 1995, **36**(6-9):707-712
- [4] Brown LM. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers Mgmt*, 1996, **37**(6-8):1363-1367
- [5] Keffer JE, Kleinheinz GT. Use of *Chlorella vulgaris* for CO<sub>2</sub> mitigation in a photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, **29**:275-280
- [6] Miya A, Adachi T, Umeda I. Preliminary study on microalgae culturing reactor for carbon dioxide elimination and oxygen recovery system. *SAE Transaction*, 932127
- [7] Adachi T, Miya A. Microalgae culturing reactor for carbon dioxide elimination and oxygen recovery—CO<sub>2</sub> fixation activity under various irradiation cycle. *SAE Transaction*, 941412
- [8] Bolsunover A, Zhavoronks V. Prospects for using microalgae in life-support system. *SAE Transaction*, 951496
- [9] Satoh A, Kurano N, Miyachi S. Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO<sub>2</sub>. *Photosynth Res*, 2001, **68**:215-224
- [10] Mandal RK, Palsson BO. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* Cultures. *Biotech Bioeng*, 1998, **59**(5):605-611
- [11] Chang EH, Yang SS. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Bot Bull Acad Sin*, 2003, **44**:43-52
- [12] Yue LH(岳丽宏), Chen BZ(陈宝智), Wang L(王黎) *et al*. An experimental study for fixation of CO<sub>2</sub> in stack gases using microalgae cultivation. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 2002, **13**(2):156-158

- [13] Hall DO, Fernandez FGA, Guerreo EC *et al.* Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotech Bioeng*, 2003, **82**(1):62–73
- [14] Adachi T, Miya A, Taniguchi S. Experimental study for construction of microalgae culturing system to eliminate CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> regeneration in the closed air: Elimination of CO<sub>2</sub> and regeneration of O<sub>2</sub> using microalgae under low CO<sub>2</sub> concentration in aeration air. *SAE Transaction*, 961559
- [15] Javanmardian M, Palsson BO. Continuous photoautotrophic cultures of the eukaryotic alga *Chlorella vulgaris* can exhibit stable oscillatory dynamics. *Biotech Bioeng*, 1991, **39**:487–497
- [16] Mandalam RK, Palsson BO. *Chlorella vulgaris* (*Chlorellaceae*) does not secrete autoinhibition at high cell densities. *American Journal of Botany*, 1995, **82**(8):955–963
- [17] Palsson BO. DOE final report—biological determinants of photobioreactor design, DOE #: DE-FC22-93PC93212, 1995
- [18] Chen Y(陈颖), Li WB(李文彬), Sun YR(孙勇如). Status and prospects of researches and applications of *Chlorella* spp. biotechnology. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 1998, **18**(6): 12–16
- [19] Miyachi S, Iwasaki I, Shiraiwa Y. Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO<sub>2</sub> conditions. *Photosynth Res*, 2003, **77**:139–153
- [20] Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M *et al.* Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:5967–5972
- [21] Beuf L, Kurano N, Miyachi S. Rubisco activase transcript (rca) abundance increases when the marine unicellular green alga *Chlorococcum littorale* is grown under high-CO<sub>2</sub> stress. *Plant Molecular Biology*, 1999, **41**:627–635
- [22] Sasaki T, Kurano N, Miyachi S. Cloning and characterization of high-CO<sub>2</sub>-specific cDNAs from a marine microalga, *Chlorococcum littorale*, and effect of CO<sub>2</sub> concentration and iron deficiency on the gene expression. *Plant & Cell Physiol*, 1998, **39**(2):131–138
- [23] Colman B, Huertas IE, Bhatti S *et al.* The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. *Funct Plant Biol*, 2002, **29**:261–270
- [24] Miyachi S, Tsuzuki M, Avramova ST *et al.* Utilization modes of inorganic carbon for photosynthesis in various species of *Chlorella*. *Plant & Cell Physiol*, 1983, **24**(3):441–451
- [25] Thoms S, Pahlow M, Wolf-Gladrow DA. Model of the carbon concentrating mechanism in chloroplasts of eukaryotic algae. *J Theor Biol*, 2001, **208**:295–313
- [26] Cheng LH, Chen HL, Zhang L *et al.* Study on medium composition of microalgae optimization for CO<sub>2</sub> removal from air by a membrane photobioreactor. *SAE Transaction*, 2004-01-2350
- [27] Pesheva I, Kodama M, Dionisio-Sese ML *et al.* Changes in photosynthetic characteristics induced by transferring air-grown cells of *Chlorococcum littorale* to high-CO<sub>2</sub> conditions. *Plant & Cell Physiology*, 1994, **35**(3):379–387
- [28] Lee CG, Palsson BO. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotech Bioeng*, 1994, **44**:1161–1167
- [29] Cheng LH(程丽华), Chen HL(陈欢林), Zhang L(张林) *et al.* Study on CO<sub>2</sub> removal from air by membrane-photobioreactor. 2004 Doctoral Forum of China in Peking University(北京大学“2004 年全国博士生论坛”论文集), 2004, pp. 224–230
- [30] Javanmardian N, Palsson BO. High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. *Biotech Bioeng*, 1991, **38**:1182–1189
- [31] Kim NJ, Lee CG. A theoretical consideration on oxygen production rate in microalgal cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2001, **6**: 352–358
- [32] Lee CG, Palsson BO. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**:249–256
- [33] Lee CG. Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 1999, **4**:78–81
- [34] Suh IS, Lee SB. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotech Bioeng*, 2003, **82**(2):180–189
- [35] Yun YS, Park JM. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity of the green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotech Bioeng*, 2003, **83**(3):303–314
- [36] Morita M, Watanabe Y, Saiki H. Evaluation of photobioreactor heat balance for predicting changes in culture medium temperature due to light irradiation. *Biotech Bioeng*, 2001, **74**(6):466–475
- [37] Nakamura T, Senior CL. Recovery and sequestration of CO<sub>2</sub> from stationary combustion systems by photosynthesis of microalgae, DOE #, DE-FC26-00NT40934, 2000
- [38] Ye XQ(叶向群), Sun L(孙亮), Zhang L(张林) *et al.* CO<sub>2</sub> removal from air by hollow-fiber membrane-based absorption system. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化学工程学报), 2003, **17**(3):237–242
- [39] Xu L, Zhang L, Chen HL. Study on CO<sub>2</sub> removal in air by hydrogel membranes. *Desalination*, 2002, **148**:309–311
- [40] Cheng LH, Gao CY, Qiu NJ *et al.* Study on the poly (Acrylic acid-co-acrylamide) hydrogel for the immobilization of *Spirulina platensis*. *ACS: Polymeric Materials Science & Engineering*, 2003, **89**: 612–613
- [41] Miyatake K, Uyeda M, Harano K *et al.* CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> recycling through micro algae culture for life support system in a reduced gravity environment, such as in space. *SAE Transaction*, 1999-01-1960
- [42] Trachtenberg MC, Ge JJ, Cowan RM *et al.* CO<sub>2</sub> capture by means of an enzyme-based reactor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, **984**:453–469
- [43] Chakrabarti S, Bhattacharya S, Bhattacharya SK. Immobilization of D-Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase: A step toward carbon dioxide fixation bioprocess. *Biotech Bioeng*, 2003, **81**(6): 705–711
- [44] Benemann JR. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems. *Energy Convers Mgmt*, 1997, **38**:s475–s479