

# 微藻培养条件优化研究

张 宇,王志成,张 玥,马 宁,周红霞

(黑龙江省能源环境研究院,哈尔滨 150027)

**摘 要:**微藻生物柴油是生物能源领域中很有前景的一个重要方向。本文利用微藻(*Chlorella Protothecoides*)为研究对象,以 BG 培养基为底物进行液态培养,培养后用离心干燥后得干微藻。用浊度法和干重法对微藻生长情况进行测定,对微藻培养的最优培养基、接种量和培养温度等进行研究。研究表明微藻培养最适接种量 1:5、初始 pH 值 5.7、培养温度 30 ℃ 和 BG + 2 g/LC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 培养基。

**关键词:**生物柴油;微藻;液体培养

中图分类号:Q93-31 文献标志码:A 文章编号:1009-3230(2014)07-0015-05

## Optimization Study on Microalgae Culture Conditions

ZHANG Yu, WANG Zhi-cheng, ZHANG Yue, Ma Ning, ZHOU Hong-xia

(Energy and Environmental Research Institute of Heilongjiang Province, Harbin 150027, China)

**Abstract:** Microalgae biodiesel is an important promising direction in bio-energy field. In this paper, microalgae is used as the research object, and BG medium is used as the substrate to be cultured in liquid, then the dried microalgae is obtained by centrifugation. The microalgae growth is measured with turbidity and dry weight method. The optimal medium for microalgae culture, inoculation and incubation temperature is studied. It is shown in the study that the optimum inoculum is 1:5, initial pH is 5.7, temperature is 30 ℃ and BG + 2g/LC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> medium.

**Key words:** Biodiesel; Microalgae; Liquid culture

## 0 引 言

随着人们生活水平的提高,对能源的消耗日益增加。据环保组织世界自然基金会(WWF)与可再生能源咨询公司 Ecofys 的预测,在 2050 年,全球的能源消耗量将达到现今的两倍。在化石能源消耗殆尽的情况下,人们纷纷把目光投向了生物能源。前段时间 GCEP 的报告称生物能源在总体新能源中占大概 20% 的比重,仅次于太阳能。生物能源中的微藻柴油也因此再次得到了人们的重视。

生物能源是解决能源问题的关键。它是清洁能源的代表,不但有极好的可循环性,并且环境友好,绿色清洁,是 21 世纪初各国能源部门都十分关注的领域。生物能源的开发、利用将有效的为社会发展提供动力,并且带动其他相关产业,如运输、发电、以及相关的制造业。生物能源的发展在即将来临的能源革命中将会起到至关重要的作用。而微藻生物柴油就是生物能源领域中很有前景的一个重要方向<sup>[1-2]</sup>。

## 1 实验材料

### 1.1 菌 种

微藻(*Chlorella Protothecoides*), 从中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库购得。

收稿日期:2014-04-10 修订日期:2014-06-10

作者简介:张 宇(1983-),男,黑龙江省肇源县人,学士,助理研究员;研究方向为环境与节能技术。

## 1.2 试剂与仪器设备

实验室中所用的培养皿为 250 ~ 500 mL 三角烧瓶,其中瓶塞经过特殊处理可以用来进行被动气体交换。

培养基为 BG(Blue - Green Medium) 培养基,见表 1。

表 1 BG 培养基

| Component                                            | Amount    | Stock Solution                      |
|------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| (1) $\text{NaNO}_3$                                  | 100 mL/L  | 15.0 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| (2) $\text{K}_2\text{HPO}_4$                         | 10 mL/L   | 2 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$    |
| (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$        | 10 mL/L   | 3.75 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$ |
| (4) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$        | 10 mL/L   | 1.8 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$  |
| (5) 柠檬酸                                              | 10 mL/L   | 0.3 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$  |
| (6) 柠檬酸铁铵                                            | 10 mL/L   | 0.3 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$  |
| (7) $\text{EDTANa}_2$                                | 10 mL/L   | 0.05 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$ |
| (8) $\text{Na}_2\text{CO}_3$                         | 10 mL/L   | 1.0 g/500 mL $\text{dH}_2\text{O}$  |
| (9) 微量元素                                             | 1 mL/L(总) |                                     |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                              |           | 2.86 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$            |           | 1.86 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            |           | 0.22 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  |           | 0.39 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$            |           | 0.08 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |           | 0.05 g/L $\text{dH}_2\text{O}$      |

仪器和设备见表 2。

表 2 仪器和设备列表

| 仪器名称及型号    | 试验中的用途   |
|------------|----------|
| 光照培养箱      | 光照培养微藻   |
| 低温冰箱       | 存放储备液/样品 |
| 冷冻干燥机      | 微藻冷冻干燥   |
| 离心机        | 各种离心工作   |
| 紫外/可见分光光度计 | 微藻生物量测量  |
| 超净工作台      | 接种等细微工作  |
| 自动蒸汽灭菌锅    | 灭菌,消毒    |
| 烘干箱        | 干燥样品,器皿  |
| 自动控温摇床     | 微藻暗培养    |
| PH 计       | 调节培养液 PH |

## 2 小球藻的实验方法

### 2.1 小球藻的富集培养

小球藻的富集工作是为了培养后续油脂累积实验所需要的藻源。按照实验需求分为光照培养

箱培养和异养无光照培养两种形式。在光照培养箱中的光暗周期为 15 h: 9 h,每天早晚需将烧瓶摇匀。暗培养箱则不需要任何的光照。为了防止各类细菌污染,培养用工具器皿都要进过高温灭菌。定期用显微镜观察藻种情况,确定生长状况以及是否存在污染。藻种的重新接种是为了保持藻种的新鲜程度,为油脂累积试验提供固定的年轻藻源。接种时通过测量吸光度和血球计数板确定接种密度,一般使用吸光度在 1 ~ 2 范围内的对数后期藻源接种。

### 2.2 油脂积累试验

在油脂积累实验中,不同的培养条件有不同的操作参数。实验中所用的培养基仍为 BG 培养基,培养基的配置标准严格遵循武汉水生所淡水藻库所提供的配方。在变化碳源和氮源的试验中,培养基中所加入的配方比例经过严格的计算后改动。由于考虑到土壤提取液中的碳氮含量,在设计氮源浓度,种类,碳氮比,限氮等试验中不添加土壤提取液,以避免带入不必要的干扰因素。

同时,通过加入 1N HCl 或 1N NaOH 溶液的方式来调节 pH 值,使得试验中的培养液 pH 浓度在 5 ~ 10 之间。温度范围则设定在 10 ~ 45 °C 之间。光照强度的设定范围从 0lux 到 5 000 lux。油脂积累实验中所用到的氮源有硫酸铵,硫酸钠和酵母这三种,而碳源则有葡萄糖,乙酸钠,混合碳源和模拟废碳源这几类。

### 2.3 小球藻生物量及油脂测定方法

微藻的生物量测定与含油量的测定是试验的关键。试验中对各个细节的掌握和熟练的操作可以确保数据的精确。因此在试验进行之前,本课题组所有参加试验的同学均经过熟练的操作,经过肯定后才可以参与处理核心试验的测量。

#### 2.3.1 小球藻生物量的采收

试验中采用了离心法采收小球藻,将生长到研究需要阶段的藻液转移到离心管中,放入离心机,在 4 000 rpm 的转速下离心 5 min,放弃上清液,将下层浓缩藻泥放入冰箱冷冻 30 min 后转入

冷冻干燥机中干燥 24 h。取出后保存在 4 ℃ 的冰箱中备用。

### 2.3.2 小球藻生物量的测定方法

生物量的测定主要通过使用分光光度计的浊度法和显微镜下血球计数板的方法来确定生物量,并且配合称重和吸光度值寻找最佳的生长量拟合曲线。

### 2.3.3 细胞干重法

取 4 mL 藻液置于已称重的 5 mL 离心管中,在 5 000 ~ 7 000 rpm 转速下离心 5 min,去上清液。并放于烘干箱中在 65 ℃ 下烘干至恒重。同时测量三个平行样,取平均值。

### 2.3.4 浊度法

使用紫外可见分光光度仪测量微藻溶液在波长为 540 nm 下的吸光度(OD540)。用去离子水作为参比样测量在 540 nm 时的吸光度。通过每天测得的吸光度绘制小球藻的生长曲线。并对小

球藻的生长情况做出分析。

### 2.3.5 生长曲线的确定

生长曲线是将微藻溶液吸光度和干重相结合所得到的描述单一批次微藻生长状况的线。通过生长曲线我们可从吸光度的大小直接联系到藻液中含有藻量的干重,便于试验的进展。

细胞干重的测量方法是生物量计算的最直接方法,但是由于过程中需要涉及到离心,洗涤和干燥几个步骤,不然消耗很长的时间动起手来也比较繁琐。因为细胞浓度与干重之间存在着较好的正相关关系,所以我们可以建立一套标准曲线或者回归方程,通过对吸光度的测量间接得到样品中生物量的大小。这种计算方法也正是大多数的单细胞小球藻研究中所惯用的手段<sup>[3-5]</sup>。

在 BG 培养基、pH 值自然状态、光照强度 2 000 lux、接种量 1:5、培养温度 25 ℃ 的条件下培养,得到如图 1 所示的生长曲线。

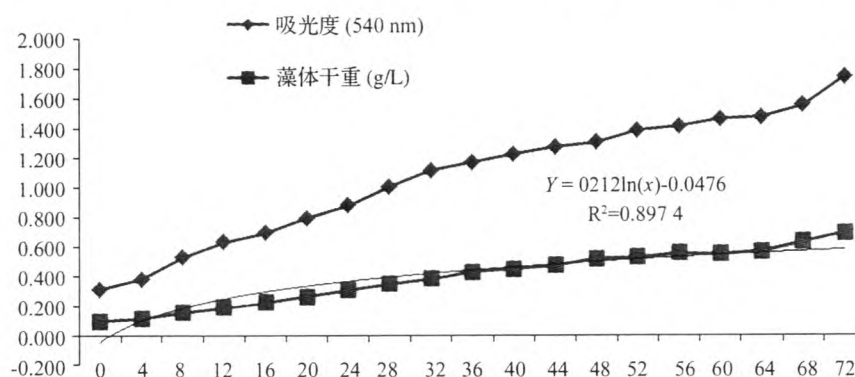


图 1 小球藻生长曲线

## 2.4 小球藻油脂的提取

研究中所使用的优质提取技术是浸提法。溶剂浸提的方法是提取油脂的一种传统方法,现实生活中比较常见。因为脂类不溶于水,却易溶于有机溶剂,测定脂类多时候采用沸点较低的有机溶剂萃取的方式。根据相似相容的规律,非极性的油脂要用非极性的溶剂,极性的糖脂要用极性的醇类来提取。我们的研究中所采用的方法是正己烷和异丙醇向结合的提取方式,每 4g 干重的微藻需要 300 mL 的提取液,其中正己烷和异丙醇的

体积比例为 3:2。为了做到没有气体挥发,提取用锥形瓶的瓶口需要用铝箔纸密封。并且在 800 rpm 的转速下反应 8 h。细胞残留物在通过 Whatman GF/C 滤纸时被去除。滤液被转入分液漏斗并加入 40 mL 水作为诱导两相稳定的引导。当混合溶剂分离出两个不同的层面时,上层深绿色的正己烷层包含有被提取的油脂;下层浅绿色水醇混合层包含有非油脂类藻细胞杂质。正己烷层的液体将被移入到一个事先称量过的容器中,并在干燥箱内以 60 ℃ 的温度蒸发。蒸发使得脂肪类

重量量化烘干。最终的油脂通过重新称重获得。提取后的油脂可以溶解在 20 mL 的正己烷溶液中在 4 ℃ 的条件下封存半个月备用。

### 3 结果与分析

环境因素是影响藻类生长和代谢的主要因素之一。在不同的环境条件影响下,一种藻的生长状态和内部能量变化都产生微妙的变化<sup>[6-7]</sup>。在掌握了环境因素对藻类培养的影响后,即可以做到在实验时排除不必要的影响因子,使得实验的关键因素可以更加准确,稳定。实验中各变量是在其他相关量确定的基础上进行调整。以此来寻找到一个最佳的试验条件。同时,为了提高数据可靠性与准确性,实验中的各项数据均为与平行样的平均值。

#### 3.1 培养温度

单细胞藻类在光合作用的过程中,需要一定的温度范围。温度的变化例如升温或者降温的时候会对光合作用有一定的促进或者抑制作用。有研究指出光合作用和呼吸作用的强度都会被温度所影响,而这两大支柱却都是和微藻的生长代谢有着紧密的关系。并且微藻属于生态热型微生物,它们必须从环境中得到热源,温度的大幅度变化会导致生长速率,新陈代谢效率和细胞内的生化反应速度<sup>[8]</sup>。因此培养时的温度是影响单细胞微藻生长的重要因素之一。微藻可以适应的温度往往在 15 ~ 40 ℃ 之间。而且不同种类的微藻所适应的范围也有所不同。单细胞的绿藻小球藻最适合的温度上限在 36 ℃ 左右而最合适的温度应在 25 ~ 32 ℃ 之间。

所以这组实验的目的是在确定的无光培养状态下,在其他因素稳定的条件里,寻找到最节能而且效率最高的的培养温度。实验中的温度变化分为 20、25、30、32 ℃ 几个标准。光照为 0lux; 初始 pH 为 6.8; 摇速为 160 rpm; 通气量为 50 mL/d; 培养基为 BG 培养基; 葡萄糖碳源浓度为 1 g/L, 培养 72 h。

实验结果见表 3。

表 3 不同培养温度

| 培养温度/℃ | 吸光度(540 nm) |
|--------|-------------|
| 20     | 0.95        |
| 25     | 1.445       |
| 27.5   | 1.52        |
| 30     | 1.53        |
| 32     | 1.447       |

通过上表 3 所示,可以看出当培养温度在 27.5 和 30 ℃ 时,吸光度(540 nm)相同且最大,也就是藻体浓度最大,所以微藻最适生长温度为 27.5 ℃。

#### 3.2 初始 pH

培养基中的初始 pH 值会影响微藻生长及新陈代谢等很多生化反应的一个重要因素,pH 会干涉光合作用里二氧化碳的使用性,同时在呼吸作用中将会影响微藻利用有机碳源效率。并且因为 pH 可以影响细胞壁的渗透性能,从而会使得细胞对培养液中的营养离子的吸收和利用受到一定的影响。同时新陈代谢的中间产物的重复利用和藻内毒性也会有一定影响。与温度和光照相同,最适合藻类生长的 pH 在不同藻种间各有不同。有研究指出<sup>[9]</sup>,最适合微藻生长的 pH 在 5 到 8 之间,pH7 是最合适的。还有研究指出<sup>[10]</sup>,因为生长过程中微藻会因为二氧化碳的吸收使 pH 升高,所以最佳的初始 pH 应该为 6 左右。所以我们的研究将在 pH5 到 10 这个范围中考察 *C. protothecoides* 3 的生长情况和油脂累积效果。

所以本实验的目的是寻找到一个最适合 *C. protothecoides* 3 生长和油脂累积的 pH 值。实验中的 pH 变化分为 5.5、6.5、7.5、8.5 几个标准。光照为 0lux; 温度为 25 ℃; 摇速为 160 rpm; 通气量为 50 mL/d; 培养基为 BG 培养基; 葡萄糖碳源浓度为 1 g/L, 接种量 1:5, 培养 72 h。实验结果见表 4。

表 4 微藻不同初始 pH 值条件下的生长情况

| 初始 pH 值 | 吸光度(540 nm) |
|---------|-------------|
| 5.5     | 1.246       |
| 6.5     | 1.152       |
| 7.5     | 1.129       |
| 8.5     | 1.039       |

通过上表 4 所示,可以看出当初始 pH 值在 5.5 时,吸光度(540 nm)最大,也就是藻体浓度最大,所以微藻最适生长的初始 pH 值为 5.5。

3.3 接种量

初始接种影响藻种的繁殖速度,在 BG 培养基、初始 pH 自然状态、光照强度 0lux、培养温度 25 ℃ 的条件下培养时间 72 h。

实验结果见表 5。

表 5 微藻在不同接种量的情况下的生长情况

| 接种量   | 吸光度(540 nm) |
|-------|-------------|
| 1:5   | 1.445       |
| 1:5   | 1.419       |
| 1:7.5 | 1.382       |
| 1:10  | 1.361       |
| 1:10  | 1.373       |
| 1:20  | 1.35        |
| 1:40  | 1.249       |
| 1:80  | 1.128       |

通过上表所示,可以看出当接种量在 1:5 时,吸光度(540 nm)最大,也就是藻体浓度最大,所以微藻最适生长的接种量为 1:5。

3.4 有机碳源

有机碳源是一切生物生长的必须能源,所以有机碳源的浓度对藻种生长速率有重要的影响,在 BG 培养基、pH 值自然状态、光照强度 0lux、接种量 1:5、培养温度 25 ℃ 的条件下培养时间 72 h。

实验结果见表 6。

表 6 微藻在不同培养基条件下的生长情况

| 培养基成分                                                   | 吸光度(540 nm) |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| BG + 1 g/LC <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | 1.311       |
| BG + 2 g/LC <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | 1.637       |
| BG + 3 g/LC <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | 1.637       |

通过表 6 所示,可以看出当培养基为 BG + 2

g/LC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 时,吸光度(540 nm)最大,也就是藻体浓度最大,所以微藻最适生长的培养基为 BG + 2 g/LC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>。

4 总 结

综上所述,本实验研究表明合理的碳氮比对微藻的生长有很大的影响。在其他条件不变的情况下,可以发现随着有机碳的增加微藻的生物量也在增加,但当到达一定生物量后,即使有机碳的量增加,生物量也不再有变化了。同时也看出在没有有机碳存在的条件下培养,微藻生物量明显比有机碳存在的条件下培养的生物量小。实验研究表明微藻最适生长条件为接种量 1:5、初始 pH 值 5.5、培养温度 27.5 ℃ 和 BG + 2 g/LC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 培养基。

参考文献

[1] 秦桂香. 微藻的研究与开发动态[J]. 青岛科技, 2002,(1):37-38.

[2] 李美兰,李德文,祖元刚. 植物体内一氧化氮的来源及其在非生物胁迫中的作用[J]. 森林工程,2013, 29(3):10-12.

[3] Lee Y K, Low C S. BiotechnologyBioeng[M]. Cambridge Univ. Press,1992:1119-1122.

[4] Chen F, Johns M R. ProcessBiochem[M]. Cambridge Univ. Press,1996:601-604.

[5] Eidhin D N. BiotechnologyBioeng[M]. Cambridge Univ. Press,1988:397-406.

[6] Radakovits R, Jinkerson R E, Darzins A, et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production[M]. EUKARYOTIC CELL, 2010: 486-501.

[7] Gouvela L, Oliveira A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. J IndMicrobiolBiotechnol, 2009, 36:269-274.

[8] Li W K, IMorris. Temperature adaptation in PhaeodactylumtricornutumBohlin; photosyntheticratecompensation and capacity[J]. Exp Mar Biol Ecol, 1982, 58 (2/3):135-150.

[9] 徐天宁. 利用生物技术生产廿碳五烯酸和廿二碳六烯酸[J]. 食品与发酵工业,1995,1:56-64.

[10] Yongmanitchai W. Omega-3 fatty acids: Alternative sources of production[J]. Process Biochem, 1989, 8: 117-125.

# 微藻培养条件优化研究

作者: [张宇](#), [王志成](#), [张玥](#), [马宁](#), [周红霞](#), [ZHANG Yu](#), [WANG Zhi-cheng](#), [ZHANG Yue](#), [Ma Ning](#),  
[ZHOU Hong-xia](#)  
作者单位: [黑龙江省能源环境研究院, 哈尔滨, 150027](#)  
刊名: [应用能源技术](#)  
英文刊名: [Applied Energy Technology](#)  
年, 卷(期): 2014(7)

引用本文格式: [张宇](#). [王志成](#). [张玥](#). [马宁](#). [周红霞](#). [ZHANG Yu](#). [WANG Zhi-cheng](#). [ZHANG Yue](#). [Ma Ning](#). [ZHOU Hong-xia](#) [微藻培养条件优化研究](#)[期刊论文]-[应用能源技术](#) 2014(7)