

# 探討小球藻最適化醱酵培養條件

陳志義

## 摘 要

本研究使用小球藻構造簡單，生長快速，油脂含量高，行光合作用，吸收 CO<sub>2</sub> 生成 O<sub>2</sub> 與油質，是相當有潛力的生質能源生產者，因此研究目的在小球藻菌醱酵培養條件探討，開發有可行性的生質能源與 CO<sub>2</sub> 減量，並同時生產高附加價值之生物化學品。本實驗主要探討溫度、氮源、營養劑、維他命、光照波長之顏色、透光度，對小球藻成長之影響為研究，並由實驗設計法中得到小球藻最佳培養條件。最佳培養條件為：尿素 1ml、維他命 1ml、營養劑 1ml、海鹽 30g、溫度 23°C、日光燈 40W 照射下，1 liter 收集的小球藻為 0.923g。在實驗室中順利使用 5 liter 發酵槽放大發酵培養出高密度小球藻。

**關鍵詞：**小球藻、最佳培養條件、生質能源、營養劑。



# Optimal culture conditions of biomass production by microalgae *Chlorella* sp.

Chih-I Chen

## Abstract

In this study, microalgae *Chlorella* sp., which has simple structure, grows fast, contains high contents on fat, runs photosynthesis, and produces oxygen and fat by absorbing carbon dioxide, is a considerably potential biomass energy producers. Therefore, the purpose of this research is explore the fermentation culture conditions of microalgae *Chlorella* sp., developing the feasible biomass energy and carbon dioxide reduction, and producing high value-added biochemical products. This experiment mainly discusses effects of temperature, source of nitrogen, nutrient, vitamin, the color of the light wavelength, and light transmittance on growth of microalgae *Chlorella* sp., and finding the optimal culture condition of microalgae *Chlorella* sp. through the various designs of experiments. The optimal culture conditions are as follows: adding 1 ml of Urea, vitamin, and nutrient, and 30 gram of sea salt under the condition of 23°C and 40 watt irradiation of fluorescent lamps, and 0.923 g of microalgae *Chlorella* sp. is collected in one liter. This experiment successfully develops high density of microalgae *Chlorella* sp. by enlarging the fermentation in 5-liter fermentor.

**Keywords:** microalgae *Chlorella* sp., biomass energy, the optimal culture conditions, fermentation, 5-liter fermentor.



## 1. 前言

近 10 年來，對能源的需求量快速擴增；而石化能源之天然蘊藏量有限、全球暖化效應、各國預期石化燃料價格逐漸高漲以及各國能源自主的政策下，尋求替代能源日益迫切，生質能的開發應用，成為關注的焦點 [1]。

目前，各國所採用的生質能源原料，主要仍是集中於第一代的糧食作物（如玉米、大麥、裸麥、甘蔗、木薯等）發酵產生酒精與非糧食作物（如麻瘋樹子、棕櫚樹）製作的生質柴油，與第二代非糧食原料（如農作物的莖-稻桿、玉米桿等農作廢棄物以及雜草等）或都市廢棄物（如廢棄食用油等）製造酒精或柴油。第一代原料由於與人或畜牧動物食用的作物爭地、造成國際糧食作物價格上揚 [2]；因此，人們紛紛將焦點轉向第二代非糧食原料/廢棄物，希望能將廢棄的植物纖維素，轉化為能源，而第二代原料仍是有栽植面積/原料不足、纖維素前處理成本過高的問題。因此，除了持續開發可降低第一、二代生質能源生產成本的技術外，歐、美、日等國家均積極開發第三代生質能原料-藻類。藻類是低等的植物，

通常呈單細胞、絲狀體或片狀體，構造簡單，整個生物體都能進行光合作用。具有光合效率高、生長週期短的特點 [3, 4]。藻類按大小通常分為大藻（海帶、紫菜、裙帶菜等）和微藻（單細胞或絲狀體，直徑小於 1 毫米）。其中，微藻是目前第三代生質能原料主要來源。小球藻構造簡單，生長週期短，油脂含量高，行光合作用等特點 [5]。

許多研究藻之醱酵 [5,6]，添加碳源（如 CO<sub>2</sub>、葡萄糖）促使藻生物量增加，本研究嘗試不使用碳源，只利用尿素當氮源，探討小球藻之醱酵可行性；若可，可有效應用於解決畜牧業廢水問題。另外，本實驗採用一次控制一因子的方式，探討影響小球藻生長的因素包括溫度、氮源濃度、營養劑、維他命、鹽度、光照顏色...等，藉由實驗設計法中，找尋最佳高密度小球藻之培養條件，並測試小球藻於 5 升發酵槽之生物量與藻油含量，進而提昇小球藻之應用性。

## 2. 實驗材料與方法

### 2.1 實驗藥品

本實驗使用小球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 又稱為擬球藻，為 *Monodopsidaceae* 科、*Nannochloropsis* 屬，其細胞分裂時產生兩個子細胞，不產



生動孢子，僅含葉綠素。此藻係台南成功大學吳文騰教授實驗室提供。實驗使用藥品如  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{EDTA}$  與其他藥品皆屬試藥級，係中興大學劉永銓教授實驗室提供。

## 2.2 培養基配方與培養步驟

將血清瓶進行第一次滅菌。滅菌完後，加入 900mL 蒸餾水，1mL NS，1mL 尿素(100g/L)，30g 海鹽，進行第二次滅菌。血清瓶蓋要包上鋁箔紙，待溶液冷卻，加入 1mL 維他命液、100mL 小球藻種菌 (約 0.8 g/l)，泡製完成後，測量溶液的 pH 值、OD 值、重量。測量完後，進行拍照，再置入 23°C 的培養箱並接上打氣裝置。

NS 營養劑成份每 liter 含 1.3g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.36g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，33.6g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ，45g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ，20g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，1ml Trace metal solution; Trace metal solution 配方每 liter 含 2.1g  $\text{ZnCl}_2$ ，2.0g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.9g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，2.0g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。

## 2.3 萃取流程

依黃毓涵之實驗方法[5]，小球藻醱酵培養完成，將它收集並離心，上清液倒掉取固體沈澱物。接著，將固體產物浸泡於 cellulase 酵素(1% w/w 量)中，用以破壞小球藻細胞壁，讓藻油易萃取。浸泡約 24h 後，將其離心，上清液倒掉，並放入

-40°C 冷凍。將已冷凍小球藻放入冷凍乾燥機中，抽取水份直至呈粉末狀。將其粉末秤重之，放入 30ml 己烷，約 24h。將其直接超音波萃取 (pulse:20:s/10s、30min)，再將它離心，取上清液，將固體沈澱物丟棄。放入 50°C 烘箱中，約 24h，去除殘餘己烷，步驟如圖 1。秤其重量，並計算藻油量、產率。

## 2.4 微生物濃度之分析方法

為了瞭解在培養過程中，藻生物質量 (Biomass) 的變化狀況，以小球藻之乾重做為衡量其生物質量濃度的基準[5]。首先利用分光光譜儀 (Metertek, SP-830) 對於藻的特徵波長進行量測，再利用此特徵波長 (682 nm) 去測量樣品吸光值 (Optical density, OD)，再將其置入烘箱 85 °C x 6h 後，使用電子天平秤重，並以量測到的吸光值對應藻生物質量 (乾重) 做一校正曲線，並製作成線性迴歸公式，做為藻樣品吸光值及生物質量之間的換算。

## 3. 結果與討論

本實驗在光照強度、通氣量、氮源濃度、營養劑(NS)、維他命等影響因素下，本實驗採用一次控制一因子的方式，執行探討各項因素對小球藻之生物質量 (biomass) 增生之影響。由生物質量濃度可以觀察到藻樣品的吸光值與生物質量之間呈現線性關係，藉此可以提供一個準確



且快速監測藻生物質量濃度的方法。藻吸光值與乾重之間的換算關係式， $Biomass(g/l) = 0.51 \times OD_{682} + 0.126$ ，其中  $Biomass$  代表小球藻的生物質量 (g/L)， $OD_{682}$  是小球藻樣品在特徵波長 682nm 下的吸光值。 $\Delta OD$  值 =  $OD_n - OD_0$ ， $OD_n$  為第  $n$  天測試  $OD$  值， $OD_0$  為剛開始培養時  $OD$  值；由  $\Delta OD$  值變化，可知培養過程，小球藻之生物量增加。

### 3.1 溫度之影響

藻體之生長過程，與生化反應有關。此生化反應速率受溫度影響，因此探討小球藻生物量對溫度之影響。溫度設定為 30°C、27°C、23°C、20°C，於 7 天內測試  $\Delta OD$  值變化。不同溫度下，小球藻培養時間與  $\Delta OD$  值之關係，結果如圖 2。由實驗結果，發現小球藻在 20°C 與 30°C 之  $\Delta OD$  值變化均較 23°C、27°C 差，顯示小球藻培養需在 23~27°C 間。另外，第 0~4 天之  $\Delta OD$  值變化，27°C 之曲線爬昇最快；但第 6 天開始，23°C 之  $\Delta OD$  值即超過 27°C 之  $\Delta OD$  值變化。而且持續培養下，27°C 之  $\Delta OD$  值也隨之下降。此現象可能是小球藻快速生長造成氮源不足，所以無法持續成長 [5,6]；另外，測試葉綠素含量，23°C 培養之葉綠素含量高於 27°C 培養 (data not shown)。由實驗結果知，培養小球藻之最佳適合生長溫度為 23°C。

### 3.2 維他命之影響

微量營養物質(如胺基酸、礦物質、維生素等生長因子) 是微生物生長不可缺少物質。生長因子對發酵會有重要調控之作用。本實驗固定光照強度、通氣量、氮源濃度、溫度、營養劑等條件，探討維他命量之添加 (每 100ml 含 Cyanocobalamin 10mg、Thiamine 10mg、Biotin 0.2 mg) 對小球藻之生物量影響。

維他命量設定為 0.8ml，1ml，1.2ml，於不同維他命量下，培養小球藻 7 天之  $\Delta OD$  值變化，結果如圖 3。由實驗結果知，小球藻成長於使用 1ml 維他命量之  $\Delta OD$  值變化均較 0.8ml 或 1.2ml 佳。不同劑量之維他命，前 2 天之  $\Delta OD$  值變化不大，但第 3 天起，使用 1ml 維他命之小球藻穩定成長，但使用 0.8ml 維他命之小球藻即緩慢成長；另外使用 1.2ml 維他命之小球藻比前兩者更緩慢成長。由此可知，使用維他命有促進小球藻增生之明顯關係，但維他命量過多會抑制小球藻快速成長，故培養小球藻之最佳生長條件為添加 1ml 維他命液。

### 3.3 營養劑 (NS) 之影響

本實驗固定在光照強度、通氣量、氮源濃度、溫度、維他命等因素下，探討礦物質之 NS 對小球藻之生物量影響。

NS 使用量設定為 0.8ml，1ml，



1.2ml，培養小球藻 7 天之 $\Delta$ OD 值變化，結果如圖 4。由實驗結果知，使用 1ml NS 於小球藻培養，由 $\Delta$ OD 值變化可知，從開始到第 5 天均顯示穩定成長，第 6 天後成長緩慢，可能 NS 消耗過多，造成生長受影響漸緩慢；而使用 1.2ml NS 於小球藻培養，從開始到第 4 天時小球藻生長速度緩慢，表示過多礦物質抑制生長速率；到了第 5 天，生長速度開始快速上升，表示初期濃度對生長速度之影響。另外，使用 0.8ml NS 於小球藻培養情形，初期類似使用 1.0ml NS；但第 4 天起，小球藻開始緩慢成長，到了第 6 天開始緩慢持平，無法持續成長。可能 NS 量消耗過多，造成生長受影響漸緩慢。由實驗結果顯示，適量使用礦物質與維他命皆有益於小球藻生長，但過量或低量皆會抑制成長，故培養小球藻之最佳生長條件為添加 1ml NS。

### 3.4 尿素之影響

氮源有益於構成藻體中蛋白質、葉綠素、藻油與細胞壁等重要元素，尤其尿素對藻體是最容易利用之氮源。本實驗固定在光照強度、通氣量、營養劑、溫度、維他命等因素下，探討尿素量對小球藻之生成影響。

設定使用 0.8ml、1ml、1.2ml 之尿素液(100g/L)，於不同尿素下，培養小球藻 7 天之 $\Delta$ OD 值變化，結果如圖 5。由

實驗結果知，使用 1ml 尿素液之小球藻成長穩定成長， $\Delta$ OD 值約 0.7；而另兩者之 $\Delta$ OD 值緩慢成長，使用 1.2ml 尿素液之 $\Delta$ OD 值約 0.46；使用 0.8ml 尿素液之 $\Delta$ OD 值約 0.5。上述實驗結果，顯示使用 1ml 尿素，小球藻生物量隨培養時間增長而增加，且 pH 值穩定控制在 8.4；但氮源濃度會影響藻菌生長速率，尿素量(1.2 ml)過多反而會影響到小球藻成長。故培養小球藻之最佳生長條件為添加 1ml 尿素量。

### 3.5 光照顏色之影響

光合作用之生化反應速率與光照強度呈正比關係；反之，若光照不足會降低光合作用中之酵素反應。故本實驗固定在光照強度、通氣量、營養劑、溫度、維他命，尿素等因素下，探討光照顏色對小球藻之細胞增生之影響。光照顏色分別設定為紅色、綠色、藍色，於不同光照顏色下，培養小球藻 7 天之 $\Delta$ OD 值變化，結果如圖 6。由實驗結果，知道紅色對小球藻的成長較好，第 7 天之 $\Delta$ OD 值約 0.2；藍色其次，而綠色較差。但三者之 $\Delta$ OD 值均較白光差，顯示小球藻生長狀態處於光限制區域，它對光照顏色有很大的關係，即使用白光培養小球藻之最佳生長條件。接著，依上述條件，在 23°C、pH=8.4 下，培養液每升含尿素 1ml、營養劑 1ml、維他命 1ml、海鹽 30g，1L 發酵瓶培養



1 週後，小球藻生物量為 0.923 g/L。

接著使用 5 liter 氣泡發酵槽(一升科技股份有限公司，FC5000)，槽體規格：高度 33 cm x 直徑 16cm，體積 6.6 升。依小球藻最佳生長條件，進行 3 週培養後，得到小球藻產量為 1.046 g/L。再依 2.3 萃取流程，進行藻油萃取，得到 0.012g 藻油(約 1.2%)，表小球藻尚未完全轉變為藻油。

比較文獻 [5,6]，使用白光照強度 1200  $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2$ 、 $\text{CO}_2$  通氣量 2.86 %，獲得藻油脂產率為 0.175 g/L-day(約 52%)，明顯白光照強度與  $\text{CO}_2$  通氣量有利藻油脂生成，因此需再往此方向探討。

## 4. 結論

由實驗中探討很多因素，找到更適合小球藻菌成長的條件與發酵槽操作，且實驗過程了解許多醱酵原理。依 1L 之通氣式醱酵瓶實驗過程，由實驗設計法中，找到了最佳小球藻生長條件為尿素 1ml、營養劑 1ml、維他命 1ml、海鹽 30g、溫度 23°C、pH 值約 8.4±0.1。1L 發酵瓶培養 1 週後，小球藻菌產量 0.923 g/L；行 5L 醱酵槽放大培養，3 週培養後，小球藻菌產量 1.046 g/L；葉綠素含量高，但含油脂量不高(約 1.2%)，故如何將小球藻菌轉化為含高油脂量，需再進一步探討。

## 5. 致謝

此研究經費由 99 年度修平校內研究計畫(99- CE- 1064; 生物柴油應用-小球藻高密度培養條件之探討) 所提供，四技部吳松君同學參與整個實驗過程，在此一併致謝。

## 參考文獻

- [1]. 蘇遠志、黃世佑，”微生物化學工程學”。華香園出版社 (1997)。
- [2]. 林良平，”小球藻之混營生長及微細藻在生態生產上所扮演的角色”。中華生質能源學會會誌(1991) 10 (3-4): 89-98。
- [3]. 林良平，”小球藻 (Chlorella) 之大量培養及在健康食品工業上的應用”。中華生質能源學會會誌(1994) 13 (3-4): 155-67。
- [4]. 蘇遠志，”健康食品綠藻之安全問題—葉綠素的衍生物所引的光過敏症”。食品工業 (1977) 10(5): 12-21。
- [5]. 黃毓涵，”小球藻最適化連續式培養之研究”。國立成功大學化學工程學系碩士論文(2009)。
- [6]. Chiu S. Y., C. Y. Kao, C. H. Chen, et al. (2008) "Reduction of  $\text{CO}_2$  by a high-density culture of *Chlorella* sp in a semicontinuous photobioreactor." *Bioresource Technology* 99(9): 3389-3396.



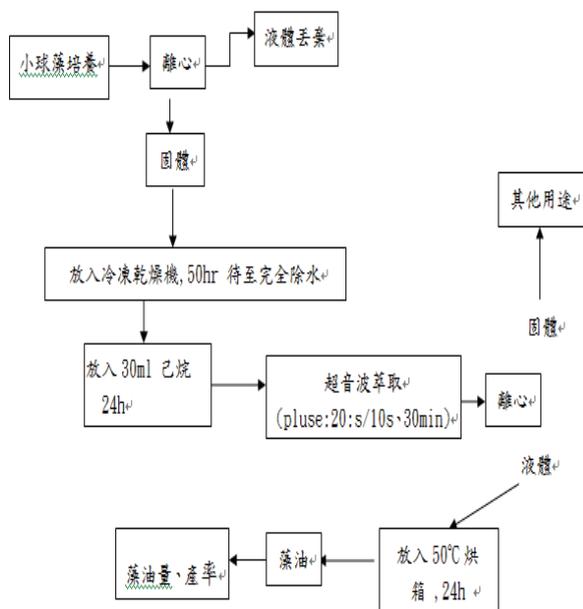


圖 1. 藻油萃取流程

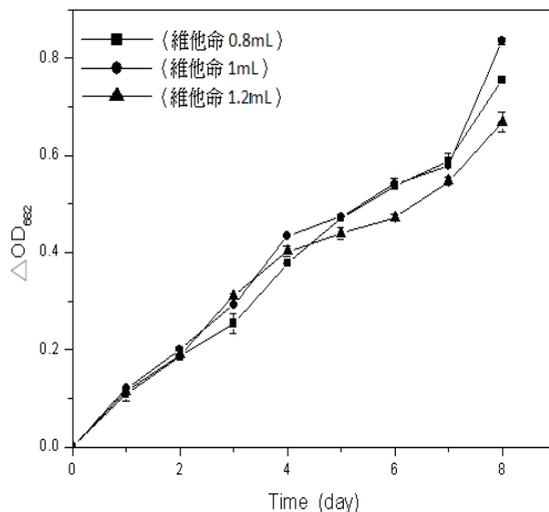


圖 3. 維他命之影響

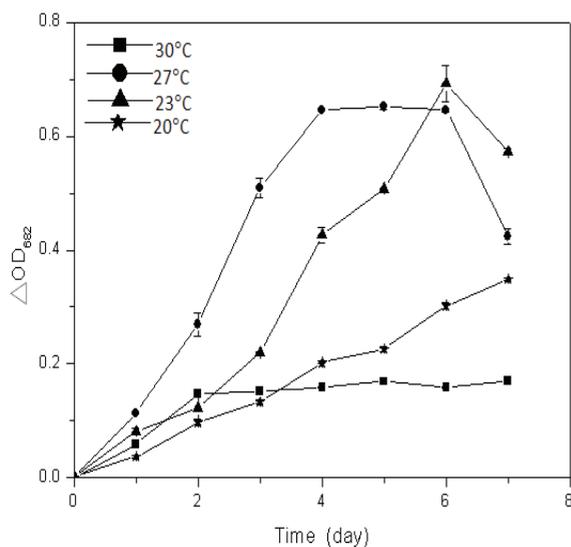


圖 2. 溫度之影響

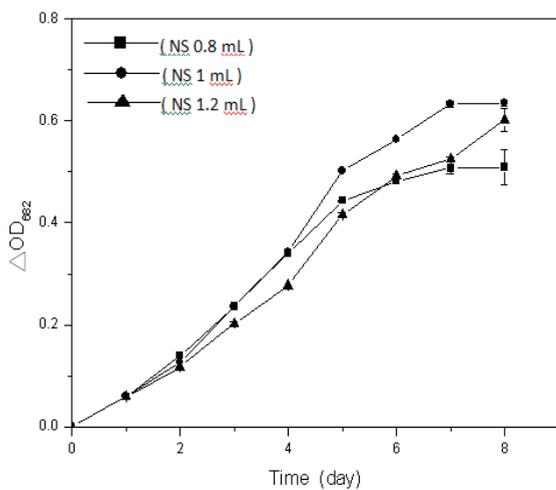


圖 4. 營養劑 (NS) 之影響



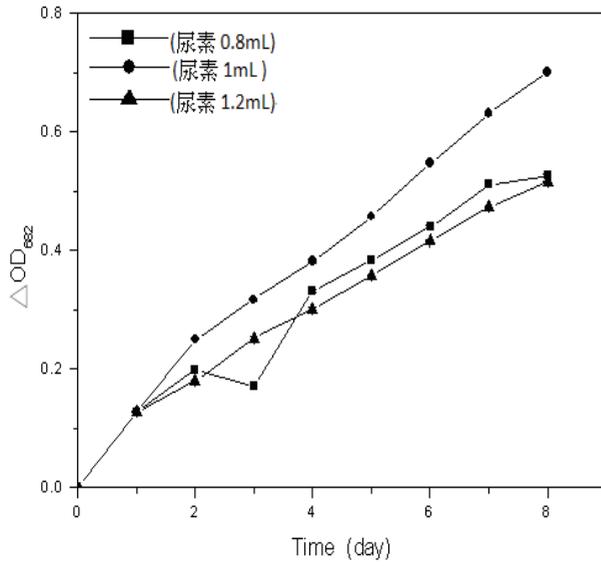


圖 5. 尿素之影響

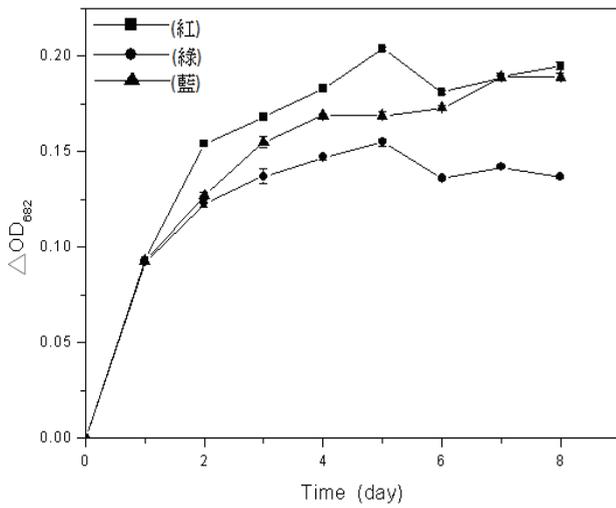


圖 6. 光照波長顏色之影響

