微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
APR 20, 2012, 39(4): 486−494
© 2012 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

小球藻高密度培养及油脂提取条件的优化

李金穗　汪苹*　董黎明

(北京工商大学 食品学院　北京　100048)

摘　要：【目的】高密度培养小球藻及优化油脂提取条件。【方法】通过进行单因素实验研究不同培养基组成及环境因子对其细胞生长影响，并采用超声波提取法进行正交实验对藻粉油脂提取条件进行研究。【结果】对椭圆小球藻 Y4 进行异养培养，最适培养条件为：葡萄糖 50 g/L，硝酸钾 2 g/L，适宜的培养温度、摇床转速和接种量分别为 29 °C、180 r/min 和 20%。在此基础上，进行了 1 L 发酵罐培养实验，获得了干重 18.25 g/L 的生物量。通过对油脂提取条件进行优化，Y4 的油脂提取率由优化前的 25.0%提高到 60.2%，提高了 35.2%。【结论】优化了小球藻的培养条件及油脂提取条件，促进了小球藻的开发和利用。

关键词：椭圆小球藻，高密度培养，油脂提取

Chlorella high density training and lipid extraction condition optimizing

LI Jin-Sui　WANG Ping *　DONG Li-Ming

(*College of Food Science*, *Beijing Technology and Business University*, *Beijing* 100048, *China*)

Abstract: [Objective] *Chlorella* high density training and lipid extraction condition optimizing. **[Methods]** Single factor experiments were used to research different mediums and environmental factors on *Chlorella* cell growth effects, and the ultrasonic extraction method was employed by orthogonal experiment for algae powder oil extraction conditions. **[Results]** The optimal condition of *Chlorella ellipsoidea* Y4 under heterotrophic culture to get high biomass were: BG11 medium with 50 g/L of glucose as the carbon source and 2 g/L KNO_3 as the nitrogen source. The optimum culture temperature, shaking rate and the inoculums size were

*通讯作者：Tel: 86-10-68984481; ✉: wangp@btbu.th.edu.cn
收稿日期：2011-10-02；接受日期：2011-12-12

29 °C, 180 r/min and 20%. By inoculating the preculture to a fermentation tank of 1 L capacity, we got dry cell weight 18.25 g/L. Based on the oil extraction condition optimization, Y4 lipid extraction yield increased from 25% to 60.2%, with lipid extraction yield raised by 35.2%. **[Conclusion]** Optimization of *chlorella* culture conditions and lipid extraction conditions were studied, and the result promoted the exploitation and utilization of *chlorella* resources.

Keywords: *Chlorella ellipsoidea*, High density training , Lipid extraction

小球藻(*Chlorella*)为绿藻门、小球藻属的单细胞绿藻。小球藻富含蛋白质、多种色素、B 族维生素、必需氨基酸、微量元素和一些生物活性代谢产物[1], 而且同时具有抗癌、抗辐射、抗感染、抗氧化、防治高血脂症、防治便秘以及骨髓抑制等一系列生理保健功能, 是目前保健食品开发应用最理想和研究最多的微藻之一[2]。美国、前苏联自 20 世纪 50 年代就开发小球藻作为单细胞蛋白用于饲料添加剂, 日本在 20 世纪 70 年代率先开发小球藻作为人类的健康食品, 80 年代又先后开发出小球藻健康和美容系列产品, 包括小球藻食品、小球藻饮品、小球藻绿酒、小球藻化妆品等[3−4]。在工业上, 小球藻用于制取叶绿素、脯氨酸、油脂[3−7], 在医药领域, 小球藻被用于提取有效活性成分制成各种医药制剂[3−4]。我国曾在 20 世纪 60 年代初开展了小球藻的培养与开发研究[6]。

传统上小球藻的生产采用光自养培养方式, 离不开光照, 产量很低, 限制了小球藻的开发利用。在异养生长条件下无须光照, 同时使细胞浓度达到较高水平, 大大降低分离成本, 为工业化大规模高密度培养微藻奠定了基础[8]。小球藻的异养培养受到碳源、氮源、培养温度、pH、摇床转速和接种量等因素的影响。因此, 研究这些因素对小球藻异养培养的影响也成为人们研究的重点。小球藻的生长周期短, 资源丰富, 且多不饱和脂肪酸组成简单, 产油脂高的小球藻具有更高的利用价值。本实验通过对葡萄糖、KNO_3、接种量、温度、摇床转速设置不同梯度单因素实验, 得到异养小球藻的最佳培养条件, 并对油脂的提取条件进行优化, 确定其最佳提取条件。

1 材料与方法

1.1 藻种

小球藻 *Chlorella ellipsoidea* No.962 (实验统一编号为 Y4), 购自中国科学院武汉水生生物研究所。

1.2 仪器与设备

HH2SH24 型电热恒温水浴锅, 北京长安科学仪器厂; TGL-16G 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 组合式恒温振荡培养箱, 太仓市实验设备厂; 高压灭菌锅, 日本 HIRAYAMA; 电子分析天平 AY22, 日本岛津; 低温超速离心机 Sigma 3K15, 德国 Sigma 公司; Multifors 发酵罐(1 L), 德国 Infors 公司。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 培养基: (1) BG11 液体培养基(1 L)。其配制方法为:

Stock1: 取柠檬酸 0.30 g, 柠檬酸铁铵 0.30 g, Na_2-EDTA 0.05 g, 定容至 100 mL;

Stock2 (g/L): 取 KH_2PO_4 1.50, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 3.75;

Stock3 (g/L): 取 $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 1.8;

Stock4 (g/L): H_3BO_3 2.860, $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ 1.810, $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.222, $NaMoO_4{\cdot}5H_2O$ 0.390, $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.079, $Co(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$ 0.049。

配制 1 L BG11 液体培养基需 Stock1 2 mL、stock2 20 mL、Stock3 2 mL、Stock4 1 mL, 初始

培养基 KNO_3 1.5 g/L, 葡萄糖 40 g/L。

1.3.2 初始培养条件: 实验在装液量为 100 mL 的 250 mL 的三角烧瓶中进行。接种量为 10%, 培养温度为 25 °C, 起始 pH 为 7.0, 摇床转速为 120 r/min, 发酵培养周期为 7 d。

1.4 方法与实验设计

1.4.1 生物量测定: 细胞干重测定: 用移液枪取均匀小球藻液 4 mL, 放入 5 mL 离心管中进行离心, 8 000 r/min 下离心 10min, 除去上清液, 用蒸馏水洗涤藻细胞, 重复离心、洗涤 3 次后, 55 °C 烘干至恒重。

1.4.2 单因素条件下藻株 Y4 生长特性研究: 藻株 Y4 采用异养培养方式, 采用 BG11 初始培养基, 对碳源(葡萄糖)、氮源(硝酸钾)、接种量、温度、摇床转速 5 个单因素设置不同梯度, 测定藻株每天的细胞干重, 每个实验重复 3 次, 取平均值。其中碳源的浓度梯度设置为 30、40、50、60、70 g/L; 氮源的浓度梯度设置为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 g/L; 接种量浓度梯度设置为 5%、10%、15%、20%、25%; 温度梯度设置为 20 °C、23 °C、26 °C、29 °C、32 °C; 摇床转速梯度设置为 90、120、150、180、210 r/min。

1.4.3 油脂提取条件设计: 实验采用超声波提取法: 称取 0.1 g 藻粉置于离心管中, 加入体积比为 1:1 的正己烷:异丙醇溶液, 摇匀后放入超声仪中超声萃取, 萃取后于 10 000 r/min 离心 10 min, 移取上层清液于离心管中, 105 °C 烘箱加热蒸发 2 h, 油脂提取率按下式计算。

$$油脂\%=\frac{提取物质量(g)}{样品质量(g)}\times 100\%$$

实验选取提取剂体积、超声功率、超声时间、提取次数 4 因素设计正交实验, 对油脂提取条件进行优化。

2 结果与讨论

2.1 不同营养物质浓度对小球藻生长影响的研究

2.1.1 碳源(葡萄糖浓度)的影响: 选用葡萄糖作为碳源, 研究不同碳源浓度对藻种生长量的影响。在硝酸钾 1.5 g/L、温度 25 °C、摇床转速 120 r/min、接种量 10%、pH 为 7 的条件下, Y4 藻株生长量如图 1 所示。

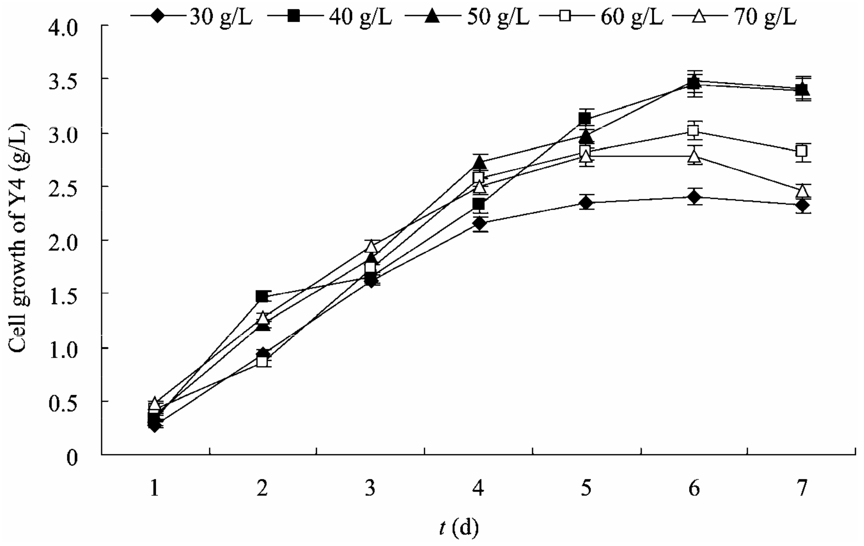

图 1 碳源对小球藻生长量的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on cell growth of Y4

从图 1 的生长曲线中可以看出，小球藻的生长趋势大致为对数形，即在初期生长比较缓慢，中间经历一段比较快的增长后又趋于平缓。其原因可能是，接种初期，小球藻需要一段适应时期，然后才开始大量繁殖增长，呈现出一个比较迅速的上升趋势，由于藻类的迅速增多和营养物质的减少，曲线的后期又逐渐平缓，并有下降趋势。

此外，在葡萄糖浓度为 50 g/L 时小球藻的生长量较高。分析其原因认为，当葡萄糖浓度过低时，营养物质不足以满足小球藻的需求，生长受到了抑制；而当浓度过大时，高浓度的培养基对小球藻的吸收和渗透产生了抑制作用，使其生长受到阻碍，甚至会出现死亡。因此，葡萄糖浓度为 40−60 g/L 时为小球藻的最佳生长条件，故本研究中接下来的实验选取葡萄糖浓度为 50 g/L 进行。Sasaki 等在小球藻与细菌混合培养的污水处理体系中研究了葡萄糖浓度对小球藻生长规律的影响，发现当葡萄糖浓度较低时，藻细胞浓度也低，相对高的葡萄糖起始质量浓度(如 50 g/L)可用于培养高细胞浓度的小球藻[9]。

2.1.2　氮源(硝酸钾浓度)的影响： 选用硝酸钾作为氮源，研究不同氮源浓度对小球藻生长量的影响，在葡萄糖 50 g/L、温度 25 °C、摇床转速 120 r/min、接种量 10%、pH 7 的条件下，Y4 藻株生长情况如图 2 所示。

对小球藻来说，硝酸盐氮是最常用的氮源[10]，从图 2 可以看出，当硝酸钾浓度低于 2 g/L 时，小球藻生长量随着硝酸钾浓度的升高而升高；当硝酸钾浓度超过 2 g/L 时，生长量随着浓度的升高而降低，说明硝酸钾浓度在 2 g/L 左右较适宜小球藻的生长；当硝酸钾浓度过低时，营养物质不足以满足小球藻的需求，使生长受到了抑制；而当浓度过大时，高浓度的氮源对小球藻的生长产生了抑制作用，使其生长受到阻碍，甚至会出现死亡。故本实验接下来选取硝酸钾浓度为 2 g/L 进行培养。

通过 2.1.1 和 2.1.2 的结果可知，当葡萄糖浓度与硝酸钾浓度之比为 25:1 时，小球藻 Y4 生长量为最大。

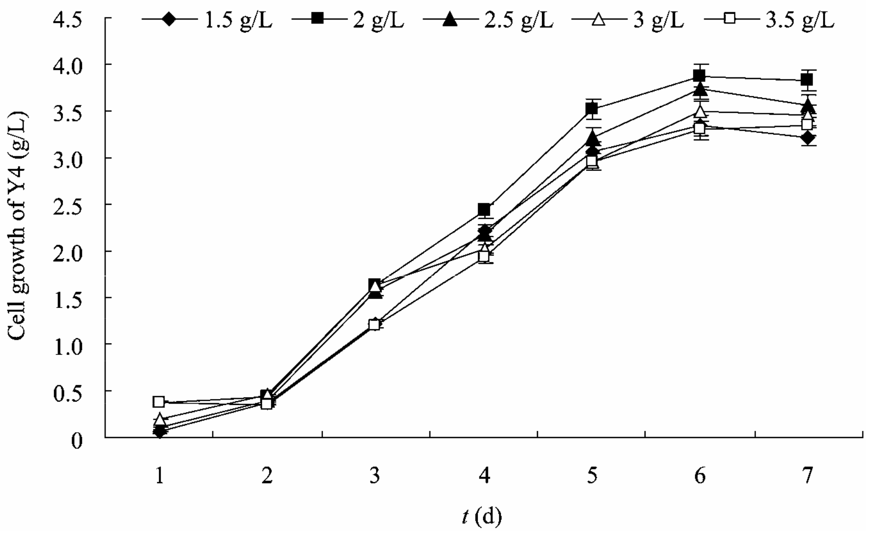

图 2　氮源对 Y4 细胞生长的影响

Fig. 2　Effect of nitrogen source on cell growth of Y4

2.2 不同环境因子变化对小球藻生长影响的研究

2.2.1 接种量对小球藻生长影响的研究: 通过设置不同接种量梯度，选择适宜小球藻生长的接种量范围。选用初始培养基葡萄糖 50 g/L、硝酸钾 2.0 g/L、温度 25 °C、摇床转速 120 r/min、pH 7 的条件下, Y4 藻株生长情况如图 3 所示。

从图 3 可以看出，在接种量为 20%时小球藻的生长量较高。可能是因为当接种量过低的时候，小球藻初始细胞数过低，致使小球藻的生长量偏低，培养液营养物质无法得到充分利用；较大的接种量可以缩小球藻的生长停滞期，延长对数生长期，提高生物量[11]；而当接种量过大时，培养基中的营养物质不足以满足小球藻的需求，生长受到了抑制，同样无法达到最佳。因此，接种量为 15%−25%时为小球藻的最佳生长条件，故本研究中接下来的实验选取接种量为 20%进行。

2.2.2 温度的影响: 通过设置不同温度梯度，选择适宜小球藻生长的温度范围。在葡萄糖 50 g/L、硝酸钾 2.0 g/L、摇床转速 120 r/min、接种量 20%、pH 7 的条件下, Y4 藻株生长情况如图 4 所示。

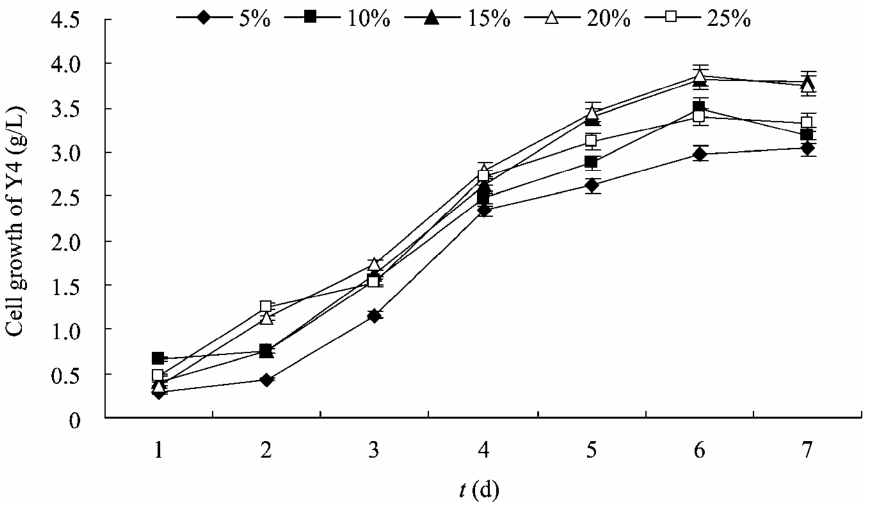

图 3 接种量对 Y4 细胞生长的影响

Fig. 3 Effect of inoculation amount on cell growth of Y4

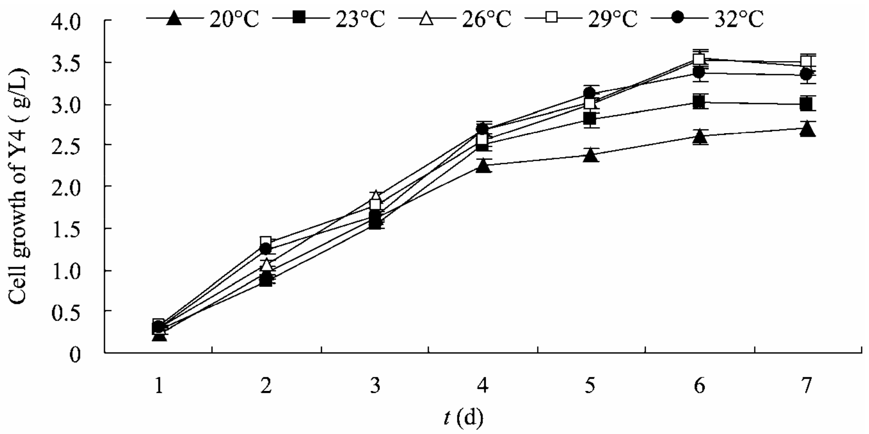

图 4 温度对 Y4 细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of temperature on cell growth of Y4

从图 4 的生长曲线中可以看出，小球藻在温度 29 °C 时的生长量较高。这可能是因为当温度较低时，微藻生长和代谢缓慢，所以生物量较低；随着温度升高，藻体细胞生长代谢旺盛，细胞生长相关的酶被激活，从而促进小球藻的生长[12]；而当温度过高时，小球藻不耐受高温，其对营养的吸收和运动受到阻碍，生长迟滞，甚至会出现死亡。因此，温度为 26 °C−32 °C 时为小球藻的最佳生长条件，故本研究中接下来的实验选取温度为 29 °C 进行。根据文献，小球藻适宜生长在 25 °C−34 °C，一般最适温度为 28 °C[13−14]与本实验结论基本一致。

2.2.3 摇床转速的影响：通过设置不同摇床转速，选择适宜小球藻生长的范围。在葡萄糖 50 g/L、硝酸钾 2.0 g/L、温度 29 °C、接种量 20%、pH 7 的条件下，Y4 藻株生长情况如图 5 所示。

从图 5 可以看出，小球藻在摇床转速为 180 r/min 时比其他转速下的生长量高。分析其原因认为摇床转速主要影响的是培养基中氧含量的多少，当转速过低时，培养基中的氧含量低，无法满足小球藻对氧的需求，对营养物质的需求量也小，导致运动和繁殖能力降低或变慢，同时实验中观察到藻细胞在转速较低时会集结成团，因此过低的转速不利于细胞和营养物质的分散；随着摇床转速增加，培养液中溶氧系数升高，溶氧量增大，小球藻可更好的进行生长；而当转速过高时，则使剪切力增大，导致细胞损伤，在显微镜下观察细胞时可发现，当摇床转速超过 210 r/min 时，有大量细胞碎片出现。因此，摇床转速为 150−210 r/min 时为小球藻的最佳生长条件，故本研究中接下来的实验摇床转速为 180 r/min 进行。

2.2.4 小球藻培养条件优化结果：为了验证优化后培养条件是否适宜小球藻生长，采用上述实验优化后的异养培养条件进行验证培养，结果见图 6。从图 6 可知，小球藻 Y4 生长量在未优化为 2.33 g/L，经过优化后生长量达到 4.03 g/L，生长量提高 173%。说明经过优化后的培养条件适宜小球藻 Y4 的生长。

2.3 发酵罐培养实验

为了获得更高的生长量，采用上述实验优化后的异养培养条件进行发酵罐实验。将处于对数生长末期的种子培养物转接至发酵罐中进行高密度异养培养，发酵过程中，按照以下方式补料：自接种开始，第 24 h 补料 60 mL，第 48 h 补料 100 mL，第 72 h 补料 50 mL，以后每隔 24 h 补料 50 mL，至不再增长，补料培养基为优化后的培养基。发酵罐中的细胞生长量变化如图 7 所示。

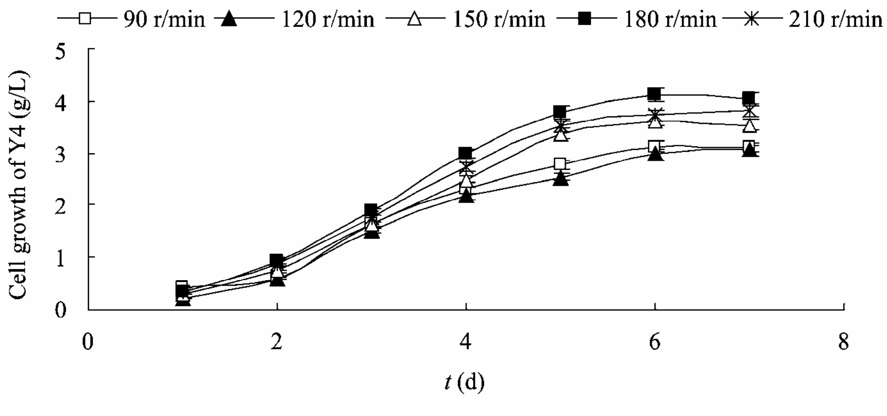

图 5 摇床转速对 Y4 细胞生长的影响

Fig. 5 Effect of shaking rate on cell growth of Y4

由图 7 可以看出，小球藻的比生长速率在 3−5 d 之间达到最大，第 6 天之后生长速率降低，生长量趋于平稳，第 9 天生长量基本维持不变，发酵结束后收集藻体，烘干称重，产量为 18.25 g/L。

2.4 油脂提取正交实验

为了提高藻粉油脂的提取率，采用超声波提取法进行了优化实验。超声波法是利用超声波的空化作用和机械作用，使溶剂分子渗透到组织细胞中去，使可溶性成分更好更快地释放出来[15]。超声波法提取油脂主要受固液比、超声功率、超声提取时间和提取次数 4 个因子的影响[16]，由此作 4 因素 3 水平进行正交实验，确定实验最佳提取工艺条件。实验安排如表 1。

向研磨好的 Y4 藻粉中加入正己烷和异丙醇体积比为 1:1 的溶液经过超声萃取和离心分离，取上清液置于离心管中，放入 105 °C 烘箱烘干 2 h，取出称重得油脂百分含量见表 2。

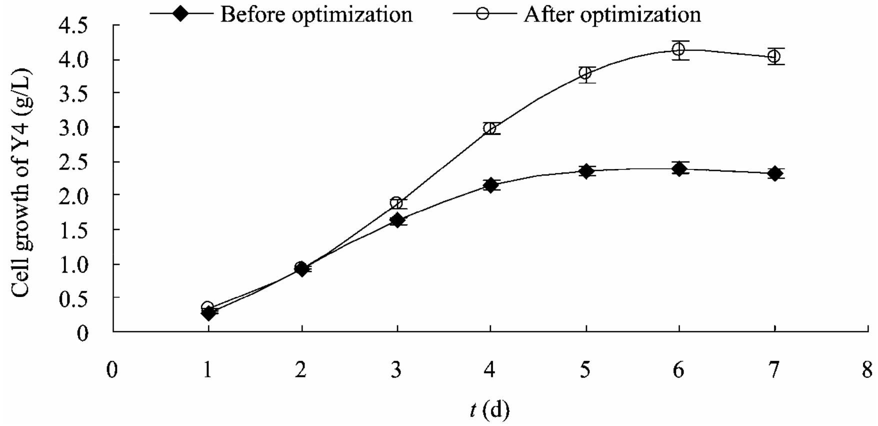

图 6 Y4 培养条件优化的验证试验

Fig. 6 Validation test of Y4 culture conditions for the optimization

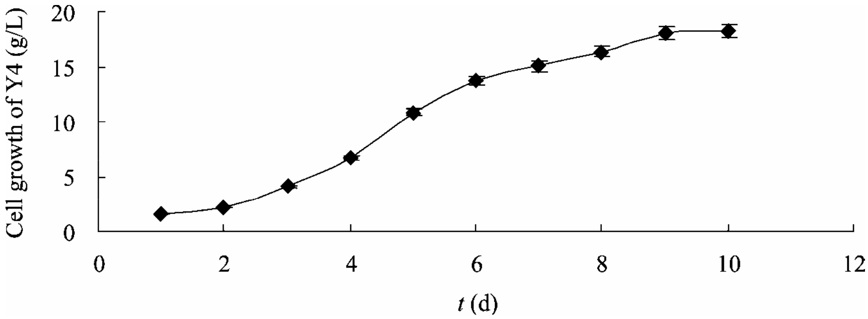

图 7 发酵罐异养培养小球藻 Y4 的生长曲线

Fig. 7 The heterotrophic growth for *Chlorella* Y4 in fermentation tank

表 1 影响超声波提取油脂的因素及水平

Table 1 Influence of factors and levels on extraction rate of oil by ultrasonic treatment

序号 Number	超声功率 Ultrasonic power (W)	超声时间 Ultrasonic time (min)	固液比 Solid-to-liquid ratio	提取次数 Extraction times
1	100	5	1:10	1
2	60	15	1:20	2
3	20	25	1:30	3

表 2 各因素对藻粉油脂提取率的影响
Table 2 Influence of factors on extraction rate of chlorella powder oil

因素 Factors	超声功率 Ultrasonic power (W)	超声时间 Ultrasonic time (min)	固液比 Solid-to-liquid ratio (g/mL)	提取次数 Extraction times	藻粉油脂得率 Extraction rate of *Chlorella* powder oil (%)
1	1(100)	1(5)	1(1:10)	1(1)	35.0
2	1	2(15)	2(1:20)	2(2)	53.8
3	1	3(25)	3(1:30)	3(3)	60.2
4	2(60)	1	2	3	47.2
5	2	2	3	1	38.4
6	2	3	1	2	39.6
7	3(20)	1	3	2	32.3
8	3	2	1	3	31.2
9	3	3	2	1	28.2
均值 1 (Ⅰj) Mean value 1 (Ⅰj)	49.667	38.167	35.267	33.867	
均值 2 (Ⅱj) Mean value 2 (Ⅱj)	41.733	41.133	43.067	41.900	
均值 3 (Ⅲ j) Mean value 3 (Ⅲ j)	30.567	42.667	43.633	46.200	
极差(*R*j) Range (*R*j)	19.100	4.500	8.366	12.333	

根据表中油脂得率可以看出，超声波处理因素对藻粉油脂提取率有明显的影响。根据极差分析，A＞D＞C＞B，即超声功率＞提取次数＞固液比＞超声时间。由上表可见:表观最优条件为实验 3(A1B3C3D3)，即提取条件为：超声功率为 100 W，超声时间为 25 min，固液比为 1:30，提取次数为 3。表观最优条件与计算最优条件相同，故不做验证实验。

根据实验结果，超声功率为 100 W 的时候均值最大，为 49.7%，功率降低均值随之降低，这是由于超声强度越大，空化现象越剧烈，扩散越快，油脂渗透速度越大[17]。超声时间越长藻粉油脂提取率越高，原因是处理时间越长，油脂浸出越充分。固液比及提取次数越多，提取率越高，主要是由于溶剂量越大，体系渗透压越大，油脂越易渗透出来；多次提取率要比一次的高，是因为每次重新提取就又建立了一个高渗透压条件，使得油脂可以被充分浸提出来。在最优条件下提取藻粉油脂得率为 60.2%。

3 结论

(1) 通过对小球藻 Y4 培养条件进行优化，设计单因素实验，得到最适合小球藻 Y4 的培养条件为：葡萄糖 50 g/L，硝酸钾 2 g/L，适宜的培养温度、pH、摇床转速和接种量分别为 29 °C、7.0、180 r/min 和 20%。在此基础上，进行了 2 L 发酵罐培养实验，获得了干重 18.25 g/L 的生物量。

(2) 将培养后的小球藻收取藻粉，对藻粉油脂提取条件进行优化，得到最优提取条件：超声功率为 100 W，超声时间为 25 min，固液比为 1:30，提取次数为 3，在此条件下藻粉提取率达到 60.2%。

研究结果表明，藻株 Y4 是一株性能优良的异养小球藻，适合进行产业化培养利用，且具有较高的油脂含量，本研究并通过优化培养条件及油脂提取条件，促进了小球藻的开发和利用，为最终实现该藻的工业化提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] 葛毅强，陈颖，孙爱东，等．微藻功能食品的研究开发现状和前景[J]．中国畜产与食品，1999, 6(2): 80−81.

[2] 胡月薇，史贤明．新食品资源小球藻的生理活性与保健功能[J]．中国食品学报, 2002, 2(2): 69−72.

[3] Borowitzke MA, Borowitzka LA. Micro-algal Biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

[4] 王业勤，李勤生．小球藻应用研究动态[J]．微生物学通报, 1985, 12(6): 275−277.

[5] Beckerd EW, 孙惠苏译．藻类大量培养—生产与利用[J]．应用微生物, 1982, 4(19): 19−26.

[6] 华汝成．单细胞藻类的培养与利用[M]．北京：农业出版社, 1980.

[7] 吴庆余，盛国英．自养与异养小球藻脂溶性化合物对比研究[J]．植物学报, 1993, 35(11): 849−858.

[8] Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth[J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(11): 421−426.

[9] Sasaki K, Watanabe K, Tanaka T, et al. Short Communication: 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995, 11(3): 361−362.

[10] 王顺昌，王陶，赵世光，等．不同氮源对蛋白核小球藻生长、色素和中性脂肪积累的影响[J]．激光生物学报, 2008, 17(2): 197−201.

[11] 刘世名，陈峰，梁世中．小球藻异养培养的研究：C 源、N 源、接种量及初始 pH 的优化[J]．华南理工大学学报：自然科学版, 1999, 27(4): 111−115.

[12] 张薇，吴虹，宗敏华．蛋白核小球藻发酵产油脂的研究[J]．微生物学通报, 2008, 35(6): 855−860.

[13] 马永强，韩春然，孙冰玉．淡水小球藻异养培养生产叶黄素的研究[J]．食品科技，2007，32(5): 132−134.

[14] 吴正云，曲春波，史贤明．小球藻异养生长及叶黄素合成量影响因子的优化研究[J]．上海交通大学学报：农业科学版, 2007, 25(1): 6−11.

[15] 李小鹏，董文斌．植物油脂提取工艺研究新进展[J]．现代商贸工业, 2007, 19(8): 201−202.

[16] 牟朝丽，陈锦屏，李强，等．小白杏杏仁油脂的超声波提取与脂肪酸组成分析[J]．山东农业大学学报：自然科学版, 2006, 37(3): 334−338.

[17] 韩军岐，张有林，戴桂花，等．超声波处理提取葵花籽油研究[J]．粮食与油脂, 2004, (9): 24−25.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字，年份必须用全称。对科技期刊来说，凡处在计量单位和计数单位前面的数字，包括9以下的各位数字，除个别特例外，均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字，例如：一本教材、两种商品等。