

# 一种小球藻的培养方法

申请号：[201010541615.7](#)

申请日：2010-11-12

申请(专利权)人 [河南师范大学](#)

地址 [453007 河南省新乡市建设路东段46号](#)

发明(设计)人 [马剑敏](#) [苏秀燕](#) [靳同霞](#) [靳萍](#) [施军琼](#) [马帅](#)

主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)

分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#) [C02F3/32\(2006.01\)I](#) [C12R1/89\(2006.01\)N](#)

公开(公告)号 [101967450A](#)

公开(公告)日 [2011-02-09](#)

专利代理机构 [新乡市平原专利有限责任公司](#) [41107](#)

代理人 [毋致善](#)



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101967450 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 201010541615. 7

(22) 申请日 2010. 11. 12

(71) 申请人 河南师范大学

地址 453007 河南省新乡市建设路东段 46  
号

(72) 发明人 马剑敏 苏秀燕 靳同霞 靳萍  
施军琼 马帅

(74) 专利代理机构 新乡市平原专利有限责任公  
司 41107

代理人 毋致善

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

C02F 3/32 (2006. 01)

C12R 1/89 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种小球藻的培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种小球藻的培养方法, 本发明涉及一种小球藻的培养, 本发明的目的是提供一种藻种易得、培养用水来源广泛的用于生产生物能的小球藻的培养方法。本发明的技术方案是, 一种小球藻的培养方法, 用外加的无机碳源、氮源、磷源对污水中营养盐浓度进行调整, 使无机碳、总氮、总磷的浓度分别为 6~18mg/L、15~25mg/L、1.5~2.5mg/L, 将小球藻放入上述培养液, 在温度 20℃~30℃, 光照强度 3000Lux~8000Lux 下培养 8~12 天, 所述污水为生活污水和富营养化的江、河、湖水、以及水产养殖水, 即用污水培养成富含油脂和烃的高密度小球藻。本发明用于生产生物能的小球藻的污水培养方法。

1. 一种小球藻的培养方法,其特征在于:用外加的无机碳源、氮源、磷源对污水中营养盐浓度进行调整,使无机碳、总氮、总磷的浓度分别为  $6\sim 18\text{mg/L}$ 、 $15\sim 25\text{mg/L}$ 、 $1.5\sim 2.5\text{mg/L}$ ,将小球藻放入上述培养液,在温度  $20^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ ,光照强度  $3000\text{Lux}\sim 8000\text{Lux}$  下培养  $8\sim 12$  天,所述污水为生活污水和富营养化的江、河、湖水、以及水产养殖水,即用污水培养成富含油脂和烃的高密度小球藻。

## 一种小球藻的培养方法

### [0001] 技术领域：

本发明涉及一种小球藻的培养，是用于生产生物物质能的小球藻的污水培养方法。

### [0002] 背景技术：

工业化导致能源消耗加大，现在大量使用的化石能源如石油的储量是有限的，并且产生了全球气候变暖和生态系统变化的问题。另一方面，湖泊、河流的富营养化日益严重，水华频繁爆发，已成为一大环境问题。小球藻富含油脂，可以用来生产生物柴油；还含有一些烃类物质，提取后可加工成汽油、柴油使用。小球藻在生长过程中大量吸收水中的氮、磷等营养元素以及重金属，可以净化水体。若用污水大量培养小球藻并使其具有高油脂含量和烃含量，不仅可减缓水质恶化，而且可为生产生物物质能提供大量优质原料。公开号为 CN101565675 的发明专利公开了一种小球藻及其培养方法和它在生物柴油生产中的应用的发明专利。该专利采用了自培养的小球藻(命名为小球藻 YJ1)，培养基为城市污水二级出水。这种培养方法的优点是利用城市污水中的氮磷等营养元素，节约费用，但其缺点是：藻种是自培养的，不易得到；培养基限制为城市污水二级出水，使用范围受到限制，不能满足大面积应用。

### [0003] 发明内容：

本发明的目的是提供一种藻种易得、培养用水来源广泛的用于生产生物物质能的小球藻的培养方法。本发明的技术方案是，一种小球藻的培养方法，其特征在于：用外加的无机碳源、氮源、磷源对污水中营养盐浓度进行调整，使无机碳、总氮、总磷的浓度分别为 6~18mg/L、15~25mg/L、1.5~2.5mg/L，将小球藻放入上述培养液，在温度 20℃~30℃，光照强度 3000Lux~8000Lux 下培养 8~12 天，所述污水为生活污水和富营养化的江、河、湖水、以及水产养殖水，即用污水培养成富含油脂和烃的高密度小球藻。本发明与现有技术比较具有藻种易得、培养用水来源广泛的显著优点。

### [0004] 本发明内容涉及的技术流程及方法步骤描述如下：

#### (一) 测定所取污水的理化指标

测定的主要指标有总氮、总磷、pH 等。其中总氮和总磷用过硫酸盐氧化法同时测定，pH 值用 pH 计测定。

[0005] 本发明所取污水符合大多数富营养化水体的指标：总氮浓度小于 15mg/L，总磷浓度小于 1.5mg/L，pH 为 6~8。

#### [0006] (二) 确定污水中小球藻良好生长的温度、光照条件

将小球藻(*Chlorella vulgaris*) 接种至光生物反应装置，污水原液作为培养基；光生物反应装置包括通气瓶、光生物反应器和开放培养池；具体培养条件设置如下：温度控制在 10~35℃，以 25℃ 为最佳；光照控制在 1000Lux~10000Lux，以 4500Lux 为最佳；定时取样，测定小球藻生长情况。

#### [0007] (三) 确定污水中小球藻成为优势种并具有高产能效应时的碳、氮、磷浓度

(1) 添加外源无机营养盐调节污水的营养盐浓度，优化污水原液

碳源为 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，氮源为 KNO<sub>3</sub>，磷源为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。向污水原液中添加不同种类和质量的营养

盐,分别配制出含不同无机碳浓度、氮浓度和磷浓度的优化的污水培养液。

[0008] (2) 小球藻的培养

将小球藻(*Chlorella vulgaris*)接种至光生物反应装置,以优化后的污水培养液作为培养基;总培养时间视藻细胞生长情况而定,一般介于 96~400 小时,优选 192~288 小时。

[0009] (3) 收集小球藻藻细胞

培养结束后采用离心、絮凝沉淀或过滤技术收集小球藻藻细胞。以离心为例,转速为 3000~6000 r/min,离心 8~15 min,离心后弃上清,保留藻细胞沉淀。

[0010] (4) 冷冻干燥藻细胞

干燥方式为冷冻干燥或喷雾干燥。以冷冻干燥为例,把收集到的湿藻细胞冷冻为冰块,然后放入冷冻干燥机干燥。藻细胞以固体形态存放。

[0011] (5) 制备藻粉

采用酶溶、超声波破碎或研磨破碎藻细胞细胞壁。采取研磨的方法破碎时,可以加入石英砂加强研磨的效果,在显微镜下观察,大部分细胞被破碎。

[0012] (6) 从藻粉中提取油脂和烃类物质

提取油脂的方法为溶剂萃取法或索氏抽提法。溶剂萃取法以氯仿和甲醇作为提取试剂。提取烃类物质方法为溶剂萃取法,提取试剂为正己烷。

[0013] (7) 测定并比较小球藻的比生长速率、油脂含量及烃类含量,确定污水培养的最佳营养盐浓度。

[0014] 在培养初期和末期,测 680nm 处的小球藻藻液吸光值,求出比生长速率。单位质量藻粉抽提的油脂重量和烃类重量即油脂含量和烃含量。比较不同条件下小球藻生长、油脂含量及烃含量的大小,确定出污水中小球藻可成为生物质能优质原料的培养条件。

[0015] 本发明与现有技术比较具有藻种易得,培养用水范围广泛的显著优点。藻种可从中国科学院水生生物研究所藻种库随意购买,培养用水可使用生活污水和富营养化的江、河、湖泊水、以及水产养殖池塘水。本发明确定出小球藻在污水中可大量生长并具有高油脂含量或烃含量的培养条件。本发明中小球藻在污水原液中油脂含量最高为 22%,烃含量最高为 1.4%;添加适量的营养盐优化污水后,小球藻比生长速率明显提高,油脂含量最高可提高 1 倍以上,烃类含量最高可提高 8 倍以上。

[0016] 具体实施方式:

以下实施例中使用的培养基为污水原液或优化后的污水培养液。污水原液取自生活污水和富营养化的江、河、湖泊水、以及水产养殖池塘水

以下实施例中使用的小球藻(*Chlorella vulgaris*),购自中国科学院水生生物研究所藻种库。

[0017] 以下实施例所涉及的小球藻细胞的生长情况和比生长速率的测定方法采用浊度法,定时(每隔 48 h)取样,用分光光度计测定藻液在 680nm 处的吸光值( $OD_{680}$ )。公式: $\mu = (\ln N_T - \ln N_0) / T$ 。其中  $\mu$  为比生长速率, $N_0$  为接种时藻液在 680 nm 处的吸光值, $N_T$  为培养 T 天后藻液在 680 nm 处的吸光值。以此表示一定时期内小球藻的总体生长情况。

[0018] 以下实施例中所涉及的油脂测定方法参照文献(Bligh E G, et al. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959;Chen F, et al. Journal of Applied Physiology, 1991)中 Bligh 等和 Chen 等的方法。称取一定质量的藻粉放入研钵中研磨

(可加入适量石英砂),直到在显微镜下观察大部分细胞被破碎为止;然后将其转入离心管中,向藻泥中加入适量的氯仿、甲醇和蒸馏水的混合溶剂提取总脂,剧烈晃动振荡 1h,再依次加入氯仿和蒸馏水、并剧烈晃动,使最终体积比为氯仿:甲醇:蒸馏水=1:1:0.9;之后离心获取上清液。重复以上步骤 2 次,合并所有提取液,混匀静置。上层为水相,含盐类和水溶性物质,下层为氯仿层,氯仿层在旋转蒸发仪上于 60℃ 条件下旋转蒸发至恒重,余下即为油脂,称其重量。油脂含量的计算方式为:

总脂百分含量=(总脂重/干藻重)×100%。

[0019] 以下实施例涉及的烃类测定方法参照文献(Sawayama S, et al. Applied Microbiology and Biotechnology,1992)中 Sawayama 等的方法。称取一定质量的藻粉放入研钵中研磨(可加入适量石英砂),直到在显微镜下观察大部分细胞被破碎为止;然后转入离心管中并加入一定体积的正己烷使两者充分混匀(30min),再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,然后将其置于旋转蒸发仪上在 30℃ 下蒸发掉正己烷,余下即为提取出的烃,称其质量。烃含量计算方式为:

总烃百分含量=(总烃重/干藻重)×100%

#### 实施例 1

在鱼塘废水作为培养基培养小球藻的过程中,考察了温度、光照对小球藻细胞生长的影响。生长条件优化过程如下:选择 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 的温度和 1500Lux、3000Lux、4500Lux、6000Lux、8000Lux、10000Lux 的光照条件,进行两种条件的组合培养。在培养的不同时间,测定小球藻的生长情况。优化结果显示:污水中的小球藻在温度 20℃~30℃,光照强度 3000Lux~8000Lux 下生长良好,比生长速率均达 0.1641 以上。其中温度为 25℃,光强为 4500Lux 的条件下,生长最好,其比生长速率可达 0.1908。

#### [0020] 实施例 2

向初步处理过的生活污水中添加不同质量的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,分别配制出无机碳浓度为 0~24mg/L 的培养液,小球藻接种量为 10%。在光暗比为 12h:12h、温度为 25℃、光照强度为 4500 Lux 的条件下培养 10 天,在培养的不同时间,测定该小球藻的生长情况。待培养结束后 4000 r/min 离心 10min,收获小球藻藻细胞。冷冻干燥并制备藻粉后测定油脂含量和烃类含量。

[0021] 结果显示:污水中外加无机碳浓度为 6~18mg/L 时,小球藻生长良好并具有高产能效应,比生长速率最高可达 0.2306,油脂含量最高可达 36.27%,烃类含量最高可达 6.67%;

#### 实施例 3

向富营养化的湖水中添加不同质量的  $\text{KNO}_3$ ,分别配制出氮浓度为 10~35mg/L 的培养液,小球藻接种量为 10%。在光暗比为 12h:12h,温度为 25℃,光照强度 4500 Lux 的条件下培养 10 天,在培养的不同时间,测定该小球藻的生长情况。待培养结束后 4000 r/min 离心 10min,收获小球藻藻细胞。冷冻干燥并制备藻粉后测定油脂含量和烃类含量。

[0022] 结果显示:污水中总氮浓度为 15~25mg/L 时,小球藻生长良好并具有高产能效应,比生长速率最高可达 0.2715,油脂含量最高可达 40.17%,烃类含量最高可达 11.13%;

#### 实施例 4

向富营养化的河水中添加不同质量的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,分别配制出磷浓度为 1~3.5mg/L 的培养液,小球藻接种量为 10%。在光暗比为 12h:12h,温度为 25℃,光照强度 4500 Lux 的条件下

培养 10 天,在培养的不同时间,测定该小球藻的生长情况。待培养结束后 4000 r/min 离心 10min,收获小球藻藻细胞。冷冻干燥并制备藻粉后测定油脂含量和烃类含量。

[0023] 结果显示:污水中总磷浓度为 1.5~2.5mg/L 时,小球藻生长良好并具有高产能效应,比生长速率最高可达 0.2759,油脂含量最高可达 38.4%,烃类含量最高可达 6.53%;

#### 实施例 5

向鱼塘废水中添加不同质量的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 配制出无机碳浓度为 6~18mg/L,总氮浓度为 15~25mg/L 时,总磷浓度为 1.5~2.5mg/L 的培养液。小球藻接种量为 10%。在光暗比为 12h:12h,温度为 25℃,光照强度 4500 Lux 的条件下培养 10 天,在培养的不同时间,测定小球藻的生长情况。待培养结束后 4000 r/min 离心 10min,收获小球藻藻细胞。冷冻干燥并制备藻粉后测定油脂含量和烃类含量。

[0024] 优化结果显示:污水中外源无机碳浓度为 6 mg/L,总氮浓度为 15mg/L,总磷浓度为 2mg/L 时,小球藻生长良好并具有最高产能效应,比生长速率可达 0.2876,油脂含量可达 44.35%,烃类含量可达 12.73%。

[0025] 利用获得的小球藻油脂,可通过酯交换反应制成生物柴油,所含的烃类物质提取后可加工成汽油、柴油使用。

#### [0026] 参考文献

[1] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917

[2] Chen F, John M R. Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*[J]. Journal of Applied Physiology, 1991, 3:203-209

[3] Sawayama S, Minowa T, Dotc Y. Growth of the hydrocarbon rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 38(2):135-138。