

以碳水化合物為碳源，用深部通氣法

培養綠藻之研究

邱 健 人*

Studies on the Production of Chlorella by Submerged Culture

Chien-jen Chiou

緒 言

綠藻於 1890 年即為 Beijerinck 所發現。並於 1949 年 Myero 及 1951 年 Cook 開始無菌培養；其後發現綠藻不需在無菌狀態即可繁殖，而奠定了人工培養綠藻的基礎。

綠藻與其他微生物一樣，含有極高的蛋白質，且生長速度極為快速，人類很早就想把它開發成食糧，唯以目前的培養方法生長，雖可利用廉價的陽光及二氧化碳作為原料，但其生長速度僅達 $8.6 \text{ g/m}^2/\text{day}$ ，而其成本高達每磅 1.12 美元，無法與牛乳、大豆等蛋白源相競。

最近由於學者不斷的研究，綠藻的用途日漸廣濶，菌體蛋白除可作食料外，所含之葉綠素可做為着色劑，又可做為脫臭劑及醫藥用品。而其所含之綠藻生長因子 (chlorella growth factor) 不但可做為乳酸飲料工業的生長促進劑，且可做為胃潰瘍及十二指腸等之治療劑。因此人們對於綠藻需求愈來愈大，已促綠藻生產工業化的時機。

但要使綠藻生產工業化，首先必需提高生產速度，且必需降低生產成本，因此著者為檢其可能性，而做本實驗，茲將結果報告如下：

實驗方法

一、菌株的來源

所使用的綠藻菌株為自全省各地採集，包括高山地區及海岸地帶之河川湖泊之水中所分離之菌株。

二、純菌分離方法

本實驗所採取之分離方法，乃將分離樣品——水，先經紗布粗濾，取濾液 1ml 接入如表一所示含有氮素之無機培養基培養，再經通常純化菌類之方法，分離數次，即可獲純良之綠藻菌株。

表一 分離用培養組成

Table 1 The Composition of Isolation Media

硝酸鉀	KNO_3	6.25 g
硫酸鎂	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.23 g
磷酸氫鉀	KH_2PO_4	0.62 g
氯化鈣	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	136mg
硼酸	H_3BO_3	114mg
硫酸鋅	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50mg
氯酸鐵	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	49mg
硫酸錳	$MnSO_4 \cdot H_2O$	12mg
鉬酸鈉	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	10mg
硫酸銅	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	16mg
氯化鈷	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4mg
四醋酸乙稀雙胺二鈉	Disodium ethylene diamine tetra acetate (EDTA)	500mg
氯黴素	chlorophenicol	100mg
蒸餾水	distilled water	1 l

三、培養方法

實驗培養以經純化之優良綠藻，做為實驗用種菌。培養時，先將綠藻移植至米麴斜面培養基，於 $30^\circ C$ 培養活化一天，然後接一白金耳至含有表二所示基礎培養組成 50ml 之 500ml 三角瓶，振盪培養 48 小時。

表二 實驗用基礎培養基

Table 2 The Composition of Basal Media

葡萄糖	Glucose	4%
磷酸氫鉀	KH_2PO_4	0.1%
硫酸鉀	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
糖蜜	Molasses	0.5%
尿素	Urea	0.5%

四、分析方法

1. 乾菌量之測定：使用 10ml 刻度離心管，取培養液 10ml 於 3000r.p.m. 離心 10 分鐘後，於 $105 \sim 110^\circ C$ 乾燥至恒量，測其重量表示之。

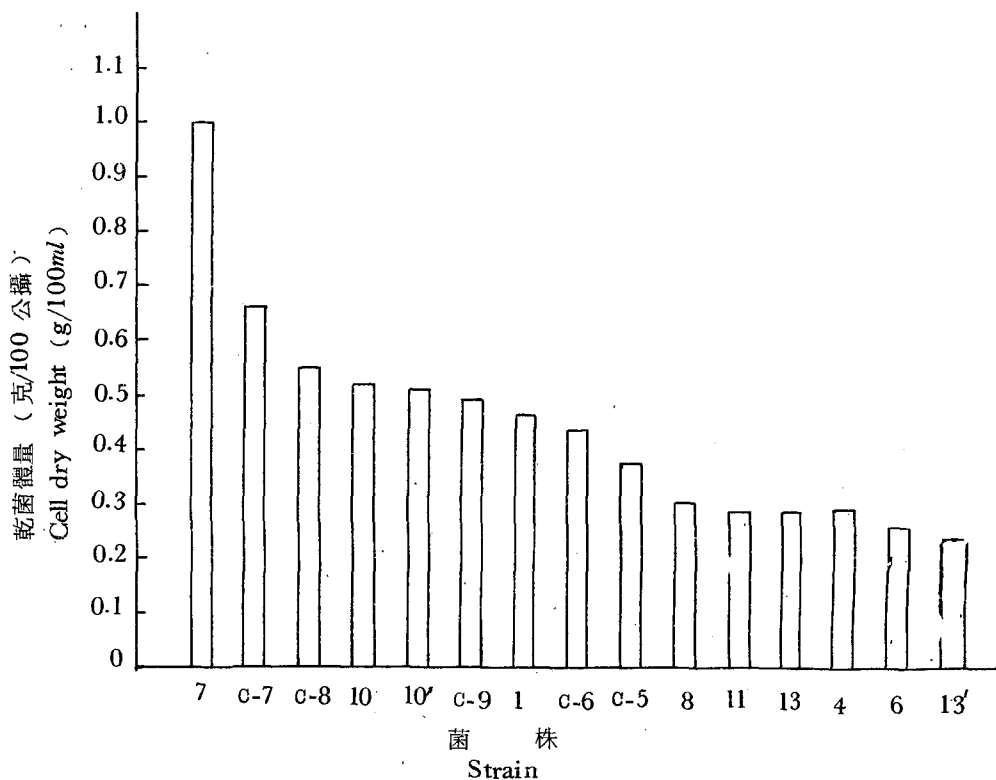
2. 細胞數：以 Thomas 氏血球計測定，以每 ml 含量表示。

實驗結果

一、葡萄糖利用綠藻之分離

綠藻一般均需在有陽光照射下，始能由二氧化碳及水合成菌體蛋白而生長。著者為想分離出一種不需陽光照射，而能以糖類為唯一碳源之他營性綠藻，將來以適應於培養在密閉之醱酵槽內，曾依上述分離之方法，從全省各地所收集之水樣品，加以分離。結果如圖一所示，共分離十五株能利用葡萄糖之綠藻菌株

。其中以 No. 7 菌株生育最佳，菌體產量高達 1%，對糖收率亦達 50% 以上。而 C-7, C-8, No. 10, No. 10', C-9, No. 1 等株之菌體產量在 0.5~1% 左右，其他均低於 0.5% 以下。No. 7 綠藻經初步鑑定結果屬單細胞綠藻類之 *Chlorella* 屬，其詳細菌學性質，尚在實驗中。



圖一、各種不同野生綠藻在振盪培養生長量之比較

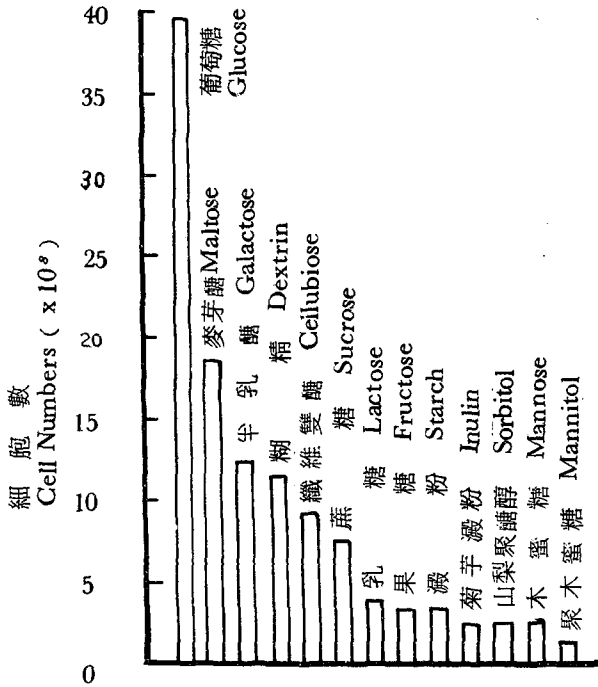
Fig. 1. Comparison of various wild strain of *Chlorella* on growth rate by shaking culture

二、糖類種類對於綠藻生長之影響

在他營性之微生物，糖類為合成菌體蛋白，其他細胞成份及獲得能量之來源。糖類被利用之好壞直接影響菌體之生產速度及收量，且影響成本頗巨。在選離出之 No. 7 綠藻，以各種碳水化合物培養的結果，示如圖二。以利用葡萄糖之菌體收量最佳，其次以麥芽糖次之。糊精、纖維雙糖，蔗糖亦能利用。至於乳糖、果糖、糖醇及多醣類的利用，則不甚理想。

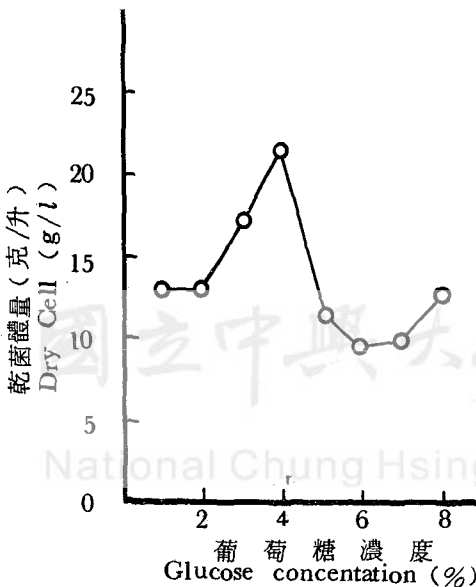
至於葡萄糖濃度，如圖三所示，以 4% 對於綠藻之生長最佳，菌體收量高達 2% 以上。但葡萄糖濃度如高於 5%，則收量反而降低，故如以同式培養，碳源濃度以 4% 較適宜。如以澱粉糖化液培養，如圖四所示，以 6% 最佳，唯此等濃度，以葡萄糖換算，亦約等於 4%。但在澱粉糖化液中培養綠藻時，由於糖化液中含有水解不完全之糊精、麥芽糖及有機氮存在，菌體收量略較以葡萄糖為佳，如以經糖化及沈澱處理之糖蜜培養時，以低濃度生長較佳，對糖收率，亦較葡萄糖及澱粉糖化液為高，而其最適生長糖度 Bx 5° 最優，高於 Bx 5° 則因糖蜜所含雜質過多，以致影響生長速度。結果如圖五所示。

在本省而言，雖然富產各種碳水化合物，唯以糖蜜之產量最多，價格最便宜，故為一種理想之碳源。再者糖蜜中含有氨基酸，維生素及各種無機鹽，極適於綠藻生長，故糖蜜為一種理想之培養材料，唯使用濃度不能過高，因此如以追加法或與澱粉糖化液混合使用，效果比單用某一種糖類為佳。



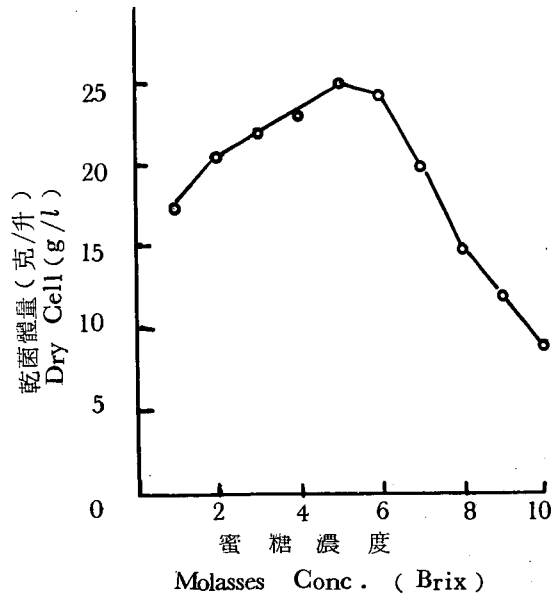
圖二、碳源種類對於綠藻生長之影響

Fig. 2 Effect of carbon Sources on Chlorella growth(4%)



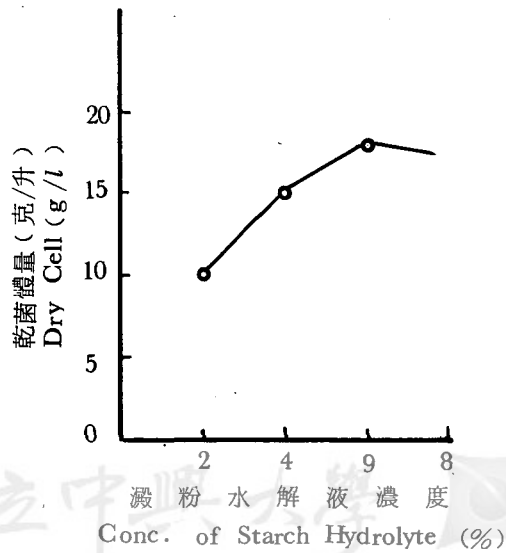
圖三、葡萄糖濃度對於綠藻生長之影響

Fig. 3 Effect of glucose concentration on Chlorella growth



圖四、糖蜜濃度對於綠藻生長之影響

Fig. 4 Effect of Molasses Concentration on Chlorella Growth



圖五、澱粉糖化液濃度對於綠藻生長之影響

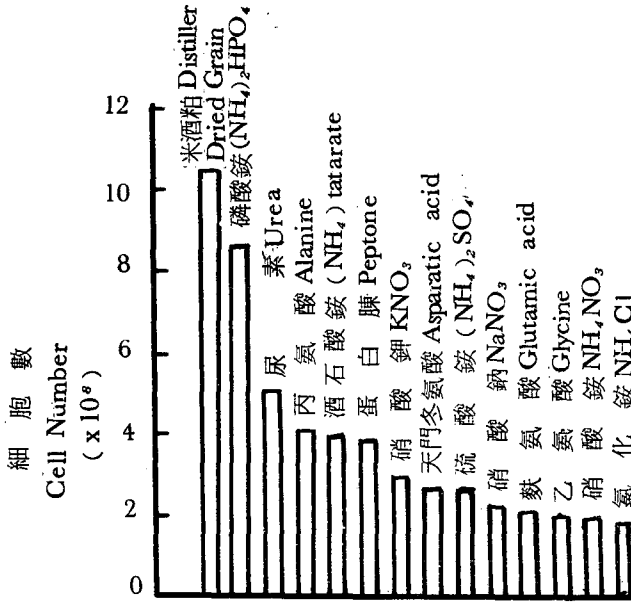
Fig. 5 Effect of Starch Hydrolyte Concentration on Chlorella Growth

三、氮源種類及濃度對於綠藻之影響

在藻類之菌類中，一般均能利用無機氮源，合成菌體蛋白或其他含氮化合物，但其合成速度極為緩慢。如圖六所示，No. 7 綠藻以培養基添加酒粕做為單一氮源效果最好，無機氮源則以磷酸氫

鉍較佳，其他有機氮，如尿素，各種氨基酸等，效果則不甚良好。

如以數種氮源混合使用，如圖七所示，以各 0.25% 混合之酒粕，磷酸鉍鉍最佳，而以酒粕、尿素或磷酸鉍鉍、尿素次之，蛋白脲 (peptone)、尿素再次之，而以磷酸鉍鉍與蛋白脲較差。



圖六、氮源種類對於綠藻生長之影響

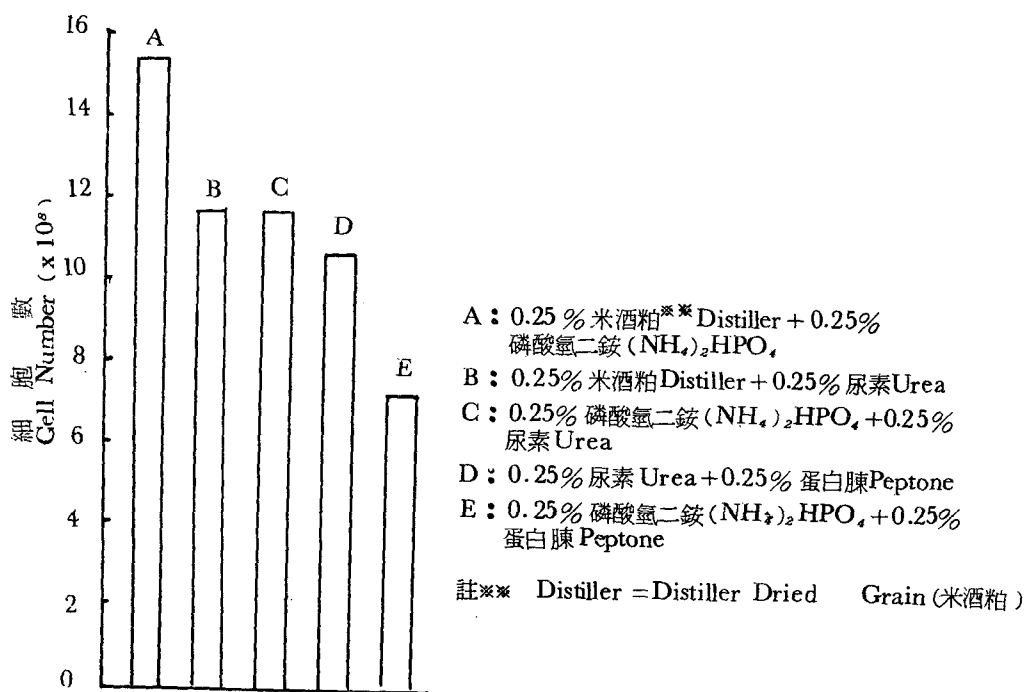
Fig. 6 Effect of nitrogen source on Chlorella Growth

*註：為台中酒廠供給之米酒粕，其組成如下：

水份	13.1%
粗蛋白	20.0%
粗脂肪	4.8%
粗纖維	9.5%
粗灰分	6.5%

四、培養條件對於綠藻生長之影響

a. 溫度之影響：綠藻常隨所存在地域的不同，而其最適生長溫度亦不同。本實驗所使用 No. 7 菌，乃由本省之水中所分離，故如表三所示，其最適生長溫度為 30 °C，較一般綠藻所能生長之溫度為高。



圖七、混合氮源對於綠藻生長之影響

Fig. 7 Effect of Mixed Nitrogen Source on Chlorella Growth

表三、溫度對於綠藻生長之影響

Table 3. Effect of Temperature on Chlorella Growth

培養溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	生育量 Growth (g/l)
15	18.1
20	18.9
25	20.7
30	24.8
35	10.2

b. pH之影響：培養液之pH，不但影響綠藻生長且影響雜菌之污染，經實驗的結果，No. 7綠藻菌株，在pH 5~8均能生長，但以保持在pH 6.0~7.0培養，綠藻之生長及收量最佳，結果如表四所示。唯以pH 6.0~7.0培養綠藻，如空氣過濾不完全，極易污染細菌，特別是乳酸菌的污染，以致影響收量。

表四、pH對於綠藻生長之影響

Table 4. Effect of pH on Chlorella Growth

酸度 pH	生育量 Growth (g/l)
4	0.15
5	10.81
6	21.23
7	22.07
8	15.61

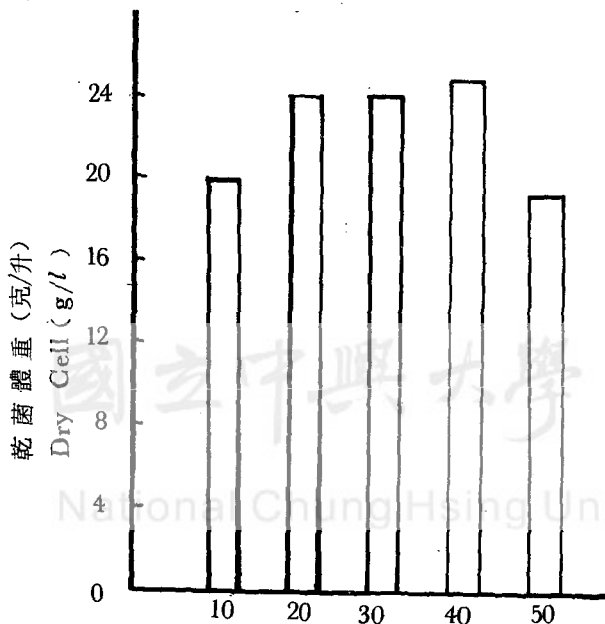
c. 通氣量之影響：綠藻合成菌體蛋白時，與其他微生物一樣，需經好氣代謝 (aerobic metabolism)。但每一種菌所需之氧量不同。No. 7 之綠藻經實驗的結果如表五所載，以振幅 7 cm，回轉數 120 r.p.m. 振盪培養時，以 500 ml 之三角瓶盛 100 ml 培養液之結果最佳，其所要求通氣量與酵母相似，而較好氣菌少，此可能是生長速度不若細菌快速之緣故。

表五、通氣量對於綠藻生長之影響

Table 5. Effect of Aeration on Chlorella Growth

通氣量 Aeration (ml/500ml)	生育量 Growth (g/l)
25	18.32
50	18.42
75	20.13
100	22.75

d. 接種量之影響：綠藻在深部培養時，其生長速度較細菌及酵母菌為差，故如增加接量，則可縮短其培養時間，但如圖八所接種量之多少與收量無關，雖以接種對培養液之 20~40% 之收量，略見稍佳，但無顯著的結果。



圖八、接種量對於綠藻生長之影響

Fig. 8. Effect of inoculum size on Chlorella growth (%)

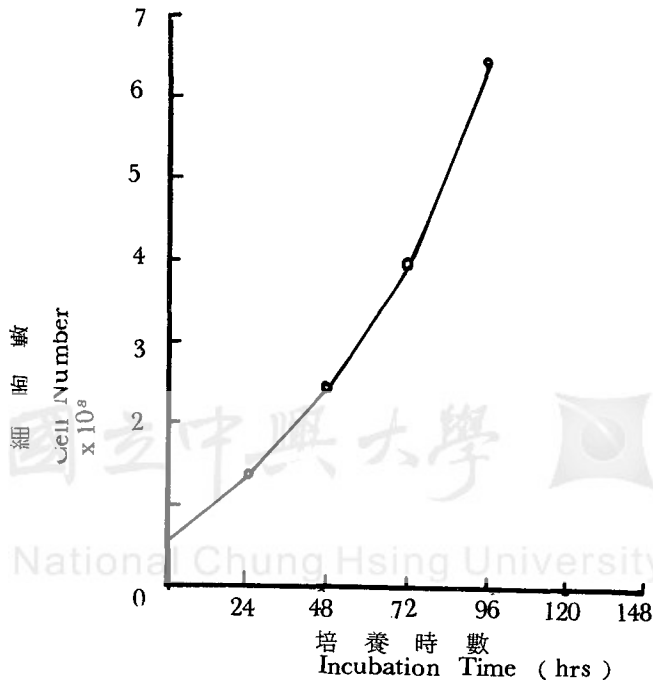
五、雜菌污染之防止：在上述實驗，常於培養過程污染雜菌，特別是易與綠藻共生之細菌。為防止此類雜菌之污染，試於培養基中，添加 100ug/ml 之抗生素培養，結果如表六所示，除青黴素無防止雜菌效果外，其他各種抗生素均具有防止雜菌污染功能。但如表六所示，對綠藻本身並無不良之影響，因此如於培養基中添加抗生素，則可補空氣過濾不完之缺點。

表六、抗生素對於防止雜菌污染的功效

Table 6. Effect of Antibiotics on Prevention of Chlorella Cultural Condition

抗 生 素 Antibiotics	雜菌污染情形 Contamination	綠藻生育量 Chlorella Growth (g/l)
青 黴 素 Penicillin	+	21.3
鏈 黴 素 Streptomycin	-	24.5
氯四環黴素 Chlorotetracyclin	-	23.1
氯 黴 素 Chlorophenical	-	23.8
新 黴 素 Neomycin	-	22.3
金 黴 素 Auromycin	-	21.7

六、流加培養法對綠藻收量之影響：如以 5% 葡萄糖培養綠藻，僅能獲得 2% 左右之菌體蛋白，但如增加培養初期的糖份，則因糖濃度過高，影響綠藻之生長及收量，因此為提高收量，試以流加法培養，結果如圖九所示，如以每日追 4% 之糖份，則培養至第四天，菌體濃度為第二天之三倍，菌體濃度為 5.4，對糖收率 52.3%。



圖九、綠藻在合成培養基生長之情形

Fig. 9 Growth curves of Chlorella in synthetic media

結 論

綠藻以天日培養時，雖能利用陽光及低廉之二氧化碳及無機鹽合成蛋白，唯其效率非常低，以致影響成本，如以葡萄糖為碳源，雖然其原料成本較貴，但不受陽光氣候等條件影響。且其生產速度較天日培養快五十倍，故較前者有利。

以深部培養時，雖能利用農產廢物如糖蜜、酒粕等培養。唯培養時，由於生長速度較細菌慢，需長時間培養始可達到最高菌體濃度，因雜菌污染的防止較困難，動力消耗較多，以致無法與大豆蛋白競爭。但近來由於綠藻之用途日廣，如先抽取葉綠素及有效成份作為醫藥用品，殘餘之蛋白，再做為食飼料，則其價格可與大豆蛋白競爭，故以深部培養，培養綠藻生產食飼蛋白，並非不可能的事。

本研究承蒙本系系主任朱植人先生，台中酒廠研究課長林慶福之指導，及朱國維、黃益昌兩位同學之幫助，得以順利完成，僅以此致謝。

摘 要

著者從本省各地收集水源樣品，分離能以糖類為碳源之綠藻數株，其中以 No. 7 株生長最佳。No. 7 株之綠藻，對於碳水化合物之利用，以葡萄糖最好，麥芽糖次之。葡萄糖濃度，則以 4% 之生長最佳，收率亦最高。如以澱粉糖化液或糖蜜取代葡萄糖，則綠藻之生長更佳，唯糖蜜濃度過高時，由於所含雜質過多，以致影響綠藻之生長。

在以糖類為培養基，如添加酒粕或磷酸氫氨做為氮源則生長較佳。但如混合二種氮源使用，效果更佳，而以酒粕與磷酸氫氨混合，生長最好。

至於培養條件，本菌株以 30°C，pH6.0~7.0，通氣量 1:2 (v/v) 培養，生長最適合。

為防止雜菌的污染，於培養基中添加 100 ug/ml 之氯黴素，即可防止，但對綠藻之生長則無影響。

以 4% 葡萄糖培養綠藻時，生長及收率雖然最好，唯菌體濃度過低，不利於工業生產，故為提高生產，於培養過程中，不時追加糖份，則經四日培養後，可得 5.4% 菌體，其收率亦達 50% 以上。

參考文獻

- (1) 宋秉南，徐榕聲，詹元佑 (1950)：綠藻試驗。糖試所試驗報告 47-48 期 90 頁。
- (2) 宋秉南，詹元佑，徐榕聲 (1961)：分離耐高溫易生長比重或細胞較大的綠藻的方法。糖試所研究彙報 23 期 87-90 頁。
- (3) 宋秉南，徐榕聲，區慶安 (1962)：綠藻試驗。糖試所試驗報告 50-51 期 143-144 頁。
- (4) Fisher, A.W. (1955): Solar Energy Res. The Univ. Wisconsin in Press Madison, Wis. p 185-198.
- (5) Jongensen, J and Convit, J. (1953): Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. Carnegie Insitution of Wisconsin Publication 600 Washinton D. C.

Studies on the Production of Chlorella by Submerged Culture

Chien-jen Chiou*

Summary

There have been a number of reports concerning the production of Chlorella. Chlorella is a microorganism, which has the ability of dissimilating and assimilation of organic compound as Lopez described. The growth rate and cell mass of Chlorella are different on the types of energy obtained. Namely, its specific growth rate base on cell number and cell mass is small in inorganic cultures.

In the course of investigations on Chlorella production with glucose medium, the author isolated many glucose assimilating Chlorella from the natural sources. Among them, the strain No. 7, which showed a heavy growth on a glucose medium.

Using a glucose assimilating Chlorella, No. 7, the cell growth in a glucose medium were investigation. The result showed that, this strain assimilated glucose, maltose and dextrin much better than other carbohydrates. A vigorous growth of this strain was obtained with 4% of glucose, or 6% of starch hydrolte, or Brix° 5 of molasses in medium.

The effects of nitrogen source on cell growth was examined. Addition of A rice wine distiller or $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ greatly promoted growth. But using a mixing nitrogen compound of rice wine distiller and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as nitrogen source, the cell growth was further increased.

This strain grew well with the PH in the range between 6.0 to 7.0 and with the temperture, 25°C to 30°C.

When No. 7 was cultured on a medium with the initial concentration at 2% of glucose, and then glucose was added day by day during the culture to make the final concentration of glucose about 10% in the culture broth 4 days, the cell yield was 5.4g per liter.

國立中興大學

National Chung Hsing University

* Instructor, Dept. of Food Chemical Engineering, National Chung-Hsing University.