



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103087919 A

(43) 申请公布日 2013.05.08

(21) 申请号 201310015701.8

(22) 申请日 2013.01.16

(71) 申请人 西北师范大学

地址 730070 甘肃省兰州市安宁区安宁东路  
967 号

(72) 发明人 孔维宝 刘娜 张继 牛世全  
杨红 曾家豫

(74) 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心  
62100

代理人 张英荷

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12R 1/89(2006.01)

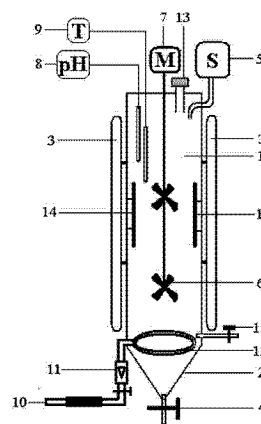
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法及装置

(57) 摘要

本发明提供了一种连续培养与原位自絮凝沉降法采收微藻的方法及装置,属于微生物培养技术领域。本发明通过鼓泡搅拌柱式光生物反应器培养微藻细胞,采用原位自絮凝沉降法分离藻细胞,并从柱下端锥体底部放出浓缩藻浆;再通过絮凝上清液中直接补料继续培养藻细胞,可同时实现有机废水的再利用、CO<sub>2</sub>的生物固定、微藻的连续培养与分离,降低了大规模培养微藻的成本,提高了培养和采收的效率;培养液的循环利用使其处理量大大降低;微藻培养和采收工艺简单、操作方便;设备结构简单,成本低,适用范围广,具有产业化推广应用的潜力。



1. 一种连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,包括以下工艺步骤:

(1) 配制废水培养基:在经静止沉降、40 ~ 100 目过滤预处理的有机废水中,添加相应的物质,配制成以下浓度组分的培养基:

氮源:0.25 ~ 1.5 g/L,磷源:0.05 ~ 0.25 g/L,NaHCO<sub>3</sub>:0.05 ~ 1.0 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.075 ~ 0.15 g/L,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O:25 ~ 100 mg/L,NaCl:25 ~ 500 mg/L,FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O:5 ~ 50 mg/L;

调整上述废水培养基的 pH 值为 6.5 ~ 8.0,并采用微滤除菌或高压蒸汽灭菌后待用;

(2) 接种与培养微藻:在柱式反应器中,将培养至对数生长期的藻种细胞接入上述废水培养基进行培养:接入湿重藻种细胞浓度为 100 ~ 500 mg/L,在自然光源照射下或控制光照强度为 2000 ~ 10000 lux、光暗比为(8h ~ 16h):(16h ~ 8h)的光源照射下,控制搅拌转速为 150 ~ 300 r/min;通入空气或空气与 CO<sub>2</sub> 的混合气体,通气量控制在为 200 ~ 1200 ml/min;调节培养液的 pH 在 7.0 ~ 9.0,在培养温度 20 ~ 35°C 下培养 6 ~ 12 天;

(3) 采收微藻:培养结束后,用碱液调节培养液的 pH 值在 11 ~ 13,并以 150 ~ 300 r/min 的转速搅拌处理 5 ~ 15min;停止搅拌后自然静置沉降,使藻种细胞自然沉降于柱式反应器的底部,待沉降完全后从底部阀门分离沉降的藻浆;

(4) 微藻的连续培养与采收:沉降上清液用酸液调整 pH 值至 6.5 ~ 8.0,在其中补加相应的物质,使培养基的浓度组分同步步骤(1),并按步骤(2)、(3)的工艺进行连续接种、培养和采收。

2. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(1)所述有机废水为啤酒工业废水、城市生活污水、畜禽养殖废水或食品加工废水。

3. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(1)所述氮源为 KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub> 或尿素。

4. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(1)所述磷源为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 或 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。

5. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(2)所述藻种为小球藻属的微藻品种。

6. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(2)中所述空气与 CO<sub>2</sub> 的混合气体中,CO<sub>2</sub> 的体积分数为 1% ~ 10%。

7. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(3)中,调整 pH 所用的碱液为 NaOH 或 KOH,碱液浓度为 1 mol/L 至饱和;而且不同批次处理中交替使用不同种类的碱液。

8. 如权利要求 1 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法,其特征在于:步骤(4)中,调整 pH 所用的酸液为硫酸、盐酸、硝酸、柠檬酸或醋酸,酸液浓度为 1 mol/L 至饱和;而且不同批次处理中交替使用不同种类的酸液。

9. 一种连续培养与原位自絮凝采收微藻的装置,包括柱式反应器(1),其特征在于:所述柱式反应器的底部为倒锥体(2),并在倒锥体的底端设有排藻阀(4);柱式反应器的下部设置有通气装置和采样阀(15);柱式反应器内中间部位设置有搅拌桨(6);柱式反应器的内壁设有加热器(14),外周设置有光源(3);柱式反应器的上部设有营养盐储罐(5)、pH 电极(8)、温度传感器(9)和接种口(13)。

10. 如权利要求 9 所述连续培养与原位自絮凝采收微藻的装置,其特征在于:所述通气装置包括设置在柱式反应器内的气体分布器(12)及安装在柱式反应器外的通气管路(10),所述通气管路(10)内设置有滤膜或滤芯;并在通气管路(10)上还设置有气体转子流量计(11)。

## 连续培养与原位自絮凝采收微藻的方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物培养技术领域,涉及一种培养与采收微藻的方法,尤其涉及一种连续培养与原位自絮凝采收小球藻的方法;本发明同时还涉及一种连续培养与原位自絮凝采收小球藻的装置。

### 背景技术

[0002] 藻类具有分布广、生物量大、光合效率高、环境适应能力强、生长周期短、蛋白质和油脂含量高以及环境友好等突出特点。小球藻属于单细胞绿藻,含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质、食物纤维、核酸及叶绿素等,是维持和促进人体健康所不可缺少的营养素。小球藻具有增强人体免疫、防止病毒增殖、抑制癌细胞增殖、降低血清胆固醇含量、排毒等功能。小球藻为世界上公认的健康食品,是全世界微藻产业中产量最大的品种。

[0003] 目前,微藻的培养方法主要有罐式、室外开放池、循环池、跑道池、室内密闭培养器和管式反应器等。微藻的大规模采收方法有离心法、絮凝沉淀法、过滤法和筛分法等。但是,这几种方法均存在一些问题:在低密度培养时,离心法的动力成本较高;常规的絮凝法不仅要用到絮凝剂,而且采收后的培养液不能循环使用,生产成本较高,而且若使用化学絮凝剂,大量废水会造成环境污染;过滤法采收微藻时,容易造成滤布堵塞;筛分法只适用于个体较大的微藻。

[0004] 大规模采收小球藻的难点主要在于:(1)培养液中藻细胞的密度一般较低,若要获得一定规模的藻体,必须要大量培养,因此,培养液的处理量非常大。(2)小球藻细胞的个体比较小,一般只有 $3\sim 8\mu\text{m}$ ,因而一般的固液分离方法不太适用。(3)小球藻浓度达到一定值时,黏度很大造成分离困难。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术中存在的问题,提供一种低成本、高效率、培养液可循环利用的连续培养与原位自絮凝采收小球藻细胞的方法。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种连续培养与原位自絮凝采收小球藻的装置。

[0007] (一)连续培养与原位自絮凝采收小球藻的方法

本发明连续培养与原位自絮凝采收小球藻的方法,包括以下工艺步骤:

1、配制废水培养基:在经静止沉降、 $40\sim 100$ 目过滤预处理的有机废水中,添加相应的物质,配制成以下浓度组分的培养基:

氮源: $0.25\sim 1.5\text{ g/L}$ , 磷源: $0.05\sim 0.25\text{ g/L}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ : $0.05\sim 1.0\text{ g/L}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : $0.075\sim 0.15\text{ g/L}$ ,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : $25\sim 100\text{ mg/L}$ ,  $\text{NaCl}$ : $25\sim 500\text{ mg/L}$ ,  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : $5\sim 50\text{ mg/L}$ 。

[0008] 所述氮源为 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ 或尿素。

[0009] 所述磷源为 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 。

[0010] 所述有机废水为啤酒工业废水、城市生活污水、畜禽养殖废水或食品加工废水。

[0011] 调整上述废水培养基的pH值为 $6.5\sim 8.0$ ,并采用微滤除菌或高压蒸汽灭菌后待

用。

[0012] 2、接种与培养微藻：在柱式反应器中，将培养至对数生长期的藻种细胞接入上述废水培养基进行培养；接入湿重藻种细胞浓度为 100~500 mg/L，在自然光源照射下或控制光照强度为 2000~10000 lux、光暗比为(8h~16h)：(16h~8h)的光源照射下，控制搅拌转速为 150~300 r/min；通入空气或空气与 CO<sub>2</sub> 的混合气体，通气量控制在为 200~1200 ml/min；调节培养液的 pH 在 7.0~9.0，在培养温度 20~35℃ 下培养 6~12 天。

[0013] 所述藻种为小球藻属的微藻品种。

[0014] 所述空气与 CO<sub>2</sub> 的混合气体中，CO<sub>2</sub> 的体积分数为 1%~10%。

[0015] 3、采收微藻：培养结束后，用碱液调节培养液的 pH 值在 11~13，并以 150~300 r/min 的转速搅拌处理 5~15min；停止搅拌后自然静置沉降，使藻种细胞自然沉降于柱式反应器的底部，待沉降完全后从底部阀门分离沉降的藻浆。

[0016] 调整 pH 所用的碱液为 NaOH 或 KOH，碱液浓度为 1 mol/L 至饱和；而且不同批次处理中交替使用不同种类的碱液。

[0017] 4、微藻的连续培养与采收：沉降上清液用酸液调整 pH 值至 6.5~8.0，在其中补加相应的物质，使培养基的浓度组分同步步骤(1)，并按步骤(2)、(3)的工艺进行连续接种、培养和采收。

[0018] 调整 pH 所用的酸液为硫酸、盐酸、硝酸、柠檬酸或醋酸，酸液浓度为 1 mol/L 至饱和；而且不同批次处理中交替使用不同种类的酸液。

[0019] (二) 连续培养与原位自絮凝采收微藻的装置

一种连续培养与原位自絮凝采收微藻的装置，包括柱式反应器，该柱式反应器的底部为倒锥体，并在倒锥体的底端设有排藻阀；柱式反应器的下部设置有通气装置和采样阀；柱式反应器内中间部位设置有搅拌桨，该搅拌桨有安装在搅拌机外部的电机传动；柱式反应器的内壁设有加热器，外周设置有光源；柱式反应器的上部设有营养盐储罐、pH 电极、温度传感器(pH 电极、温度传感器不与搅拌桨相撞)和接种口(同时作为调酸碱口和尾气出口)。

[0020] 所述通气装置包括设置在柱式反应器内的气体分布器(为环形管，并在环形管设置有向上的通气口)及安装在柱式反应器外的通气管路，该通气管路内设置有滤膜或滤芯；并在通气管路上设置有气体转子流量计。

[0021] 操作要点：先将微藻培养基注入柱式反应器中，按上述工艺要求通过接种口接入已培养好的藻种细胞；控制搅拌速度、pH 值、温度、光照强度、光周期和通气量培养微藻；连续培养一定时间后，搅拌状态下在培养液中加入碱液调整其 pH 值，使藻细胞发生自絮凝沉降，停止搅拌，自然静止沉降使藻细胞沉降完全，从柱底部的排藻阀门放出藻浆；再通过反应器顶部的接种口调整沉降后的培养上清液的 pH 值，并通过营养盐补料口补加浓缩营养盐母液(已灭菌)调整 pH 值后，继续接入已培养好的藻种细胞，在相同条件下进行培养；如此反复，实现了微藻的连续培养与原位自絮凝采收，解决了大规模培养微藻时的技术难题，降低了微藻的培养成本、提高了培养效率，同时实现了微藻培养液的重复利用。

[0022] 本发明相对现有技术具有以下优点：

1、通过鼓泡搅拌柱式光生物反应器培养微藻细胞，采用原位自絮凝沉降法分离藻细胞，并从柱下端锥体底部放出浓缩藻浆；再通过絮凝上清液中直接补料，可继续培养藻细

胞,实现了微藻的连续培养与原位自絮凝采收,降低了大规模培养微藻的成本,提高了微藻培养和采收的效率;

2、以有机废水为主要基质配制微藻培养基,实现了废水再利用,降低了培养基成本;

3、培养液的循环利用,大大降低了培养液的处理量,从而降低了处理废水造成的环境污染;

4、微藻的连续培养与原位自絮凝采收工艺简单、操作方便,分离效率高;

5、微藻的连续培养与原位自絮凝采收设备结构简单,成本低,适用范围广,具有产业化推广应用的潜力。

## 附图说明

[0023] 图 1 为本发明连续培养与原位自絮凝采收微藻装置的结构示意图。

## 具体实施方式

[0024] 下面通过具体实施例对本发明微藻连续培养与原位自絮凝采收的装置和工艺进一步说明。

[0025] 实施例一

### 1、微藻连续培养与原位自絮凝采收装置

微藻连续培养与原位自絮凝采收装置(参照图 1),包括一个底部为倒锥体 2 (锥体高 10~40 cm)的柱式反应器 1(反应器的材质无色透明的有机玻璃;柱体为圆柱状,柱内直径为 10~40 cm,柱身高度为 50~200 cm);并在倒锥体的底端设有排藻阀 4。柱式反应器 1 的下部设置有通气装置,给柱体内通入含一定比例 CO<sub>2</sub> 的无菌空气,以实现供气和 CO<sub>2</sub> 的生物固定。该通气装置包括设置在柱式反应器 1 内的气体分布器 12 及安装在柱式反应器外的通气管路 10,通气管路内设置有滤膜或滤芯,并在通气管路上还设置有气体转子流量计 11。柱式反应器内的中轴上安装有搅拌桨 6,并由柱体外的电机 7 提供动力。柱式反应器的内壁设有加热器 14,对柱体内的物料进行控温加热,以保证工艺所需要的温度。柱式反应器的外周设置有光源 3 (LED 人工光源),以提供反应所需光照条件。柱式反应器的上部设有营养盐储罐 5、pH 电极 8、温度传感器 9 (pH 电极 8、温度传感器 9 的安放位置与叶片旋转位置错开)和接种口(13 同时也是调酸碱口和尾气出口)。柱式反应器 1 的下部设有采样阀 15。

[0026] 2、微藻连续培养与原位自絮凝采收工艺

(1) 普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)种子的制备:以土壤浸出液培养基(SEM)作为普通小球藻的种子培养基,SEM 组成如表 1 所示。

[0027] 表 1 :SEM 培养基组成

营养成分	浓度 (mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	250
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	75
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175
NaCl	25
土壤浸出液	40 ml
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5
Fe-EDTA	1 ml
A <sub>5</sub> 溶液	1 ml
蒸馏水	定容至 1L
pH 值	6.8~7.2
A <sub>5</sub> 溶液成分	浓度 (mg/100ml)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	286
MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	181
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22.2
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	7.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.9

其中,土壤提取液的配制方法:取未施过肥的肥力较好的土壤 0.5 kg 置于烧杯或三角瓶中,加入蒸馏水 1000ml,瓶口用透气塞封口,在水浴中沸水加热 2h,冷却后在无菌条件下过滤,取上清液,将灭菌蒸馏水加入上清液至总体积 1000ml。

[0028] EDTA-Fe 的配置方法:将 EDTA 和 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 分别溶于蒸馏水和 0.1mol/L HCl,混匀即可。

[0029] 培养基灭菌条件:121℃、0.1MPa、20min。

[0030] 在 SEM 上接种经 SEM 固体培养基(SEM 中加 2% 琼脂固化)分离纯化后的普通小球藻种子,培养条件:25±2℃,光照强度 4000 lux,光周期:12h:12h,摇瓶转速 150rpm,培养时间 6~12 天,取对数生长期的藻细胞接种。

[0031] (2)废水培养基的配置:取某啤酒厂生产废水,静置沉降预处理,取上清液用 40 目滤网过滤后,添加相应的物质,配制成以下浓度组分的微藻培养基:NaNO<sub>3</sub> 1.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 100 mg/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 50 mg/L。调整培养基的 pH 为 6.5;121℃、0.1 MPa、灭菌 20 min 后冷却待用。

[0032] (3)接种与培养:将上述培养基注入已消毒灭菌的柱式反应器中,接入湿重藻细胞浓度为 500 mg/L,人工控制光照强度为 10000 lux,光暗比为 16h:8h,搅拌转速为 150 r/min,通入无菌空气(含 1% CO<sub>2</sub>,通气量为 1200 ml/min),培养温度 35℃,培养液 pH 值控制在 7.0~7.5,培养时间为 12 天。

[0033] (4)微藻采收:在以 150 r/min 的搅拌转速下,从柱式反应器顶部的接种口缓慢滴

加 1mol/L NaOH,使培养液的 pH 值为 11,继续搅拌 5 min 后停止自然静止沉降,使絮凝藻细胞沉降至柱式反应器的底部,待沉降完全后从底部的排藻阀放出浓缩藻浆,保留上清液。通过测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得得藻细胞的絮凝率为 93%。

[0034] (5)微藻的连续培养和采收:从反应器顶部的接种口 13 向沉降后的上清液中缓慢滴加 1 mol/L HCl 溶液使培养液的 pH 值为 6.5,通过营养盐储罐 5 向反应器中补加相应的营养盐母液(已灭菌),使沉降上清液的浓度组分同步骤(2)中微藻培养基的浓度组分,并调整 pH 值为 6.5,继续按 500 mg/L (湿重)接种量接入已培养好的普通小球藻种子,再于步骤(3)相同条件下连续培养 12 天。在以 150r/min 的搅拌转速下,从反应器顶部的接种口缓慢滴加 1 mol/L KOH 使培养液的 pH 值为 11,继续搅拌 5min 后停止,自然静止沉降使絮凝藻细胞沉降完全,最后从柱底部的排藻阀门放出浓缩藻浆,保留上清液。沉降上清液用 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调整 pH 值至 7.2。通过测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得出藻细胞的絮凝率为 90%。在循环使用培养液第三次时,由于受小球藻胞外代谢产物和盐积累的影响,小球藻长势减弱,但藻细胞絮凝沉降率仍达 95%。

#### [0035] 实施例二

1、微藻连续培养与原位自絮凝采收装置:与实施例 1 同。

[0036] 2、微藻连续培养与原位自絮凝采收工艺:

(1) 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 种子的制备:同实施例 1;

(2) 废水培养基的配置:取某处城市生活废水,静置沉降预处理,取上清液用 60 目滤网过滤后按以下浓度加入营养盐(g/L):KNO<sub>3</sub> 1.0 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 50 mg/L, NaCl 200 mg/L, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 20 mg/L。调整培养基的 pH 为 7.2;121℃、0.1 MPa、灭菌 20 min 后冷却待用。

[0037] (3)接种与培养:将上述培养基注入已消毒灭菌的柱式反应器中,接入湿重藻细胞浓度为 400 mg/L,人工控制光照强度为 6000 lux,人工控制光暗比为 12h:12h,搅拌转速为 200 r/min,通入无菌空气(含 4% CO<sub>2</sub>,通气量为 800 ml/min),培养温度 30℃,培养液 pH 值控制在 7.5~8.0,培养时间为 10 天。

[0038] (4)微藻采收:在以 200 r/min 的搅拌转速下,从柱式反应器顶部的接种口缓慢滴加 5mol/L NaOH,使培养液的 pH 值为 12,继续搅拌 10min 后停止,自然静止沉降使絮凝藻细胞沉降完全,最后从柱底部的排藻阀门放出浓缩藻浆,保留上清液。通过测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得得藻细胞的絮凝率为 85%。

[0039] (5)微藻的连续培养和采收:从反应器顶部的调酸碱口向沉降后的培养上清液中缓慢滴加 5 mol/L HCl 使培养液的 pH 值为 7.0,通过营养盐储罐向反应器中补加相应的营养盐母液(已灭菌),使沉降上清液的浓度组分同步骤(1)中微藻培养基的浓度组分,并调整 pH 值为 7.2,继续按 400 mg/L (湿重)接种量接入已培养好的蛋白核小球藻种子,再于步骤(3)相同条件下连续培养 10 天。在以 200 r/min 的搅拌转速下,从反应器顶部的调酸碱口缓慢滴加 5 mol/L KOH 使培养液的 pH 值为 12.0,继续搅拌 10min 后停止,自然静止沉降使藻细胞沉降完全,从柱底部的排藻阀门放出藻浆,沉降上清液用 5 mol/L HNO<sub>3</sub> 调整 pH 值至 7.0。测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得出藻细胞的絮凝率为 89%。在第三次重复循环培养时,调整培养液 pH 值的碱为 5mol/L 的 NaOH,酸为 5mol/L 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,藻细胞长势良好,絮凝沉降率为 91%。

**[0040] 实施例三**

1、微藻连续培养与原位自絮凝采收装置：与实施例 1 同。

**[0041] 2、微藻连续培养与原位自絮凝采收工艺：**

(1) 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 种子的制备：同实施例 1；

(2) 废水培养基的配置：取某养殖场废水，静置沉降预处理，取上清液用 60 目滤网过滤，加自来水按 1:1 体积稀释后，再按以下浓度加入营养盐(g/L)：尿素 0.25 g/L,  $K_2HPO_4$  0.05 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.075 g/L,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  50 mg/L, NaCl 100 mg/L,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  5 mg/L。调整培养基的 pH 为 7.5；采用微滤除菌。

**[0042] (3) 接种与培养：**将上述培养基注入已消毒灭菌的柱式反应器中，接入湿重藻细胞浓度为 250 mg/L，人工控制光照强度为 2000 lux，人工控制光暗比为 8h:16h，搅拌转速为 250 r/min，通入无菌空气(含 6%  $CO_2$ ，通气量为 500 ml/min)，培养温度 25℃，培养液 pH 值控制在 7.5~8.0，培养时间为 8 天。

**[0043] (4) 微藻采收：**在以 250 r/min 的搅拌转速下，从柱式反应器顶部的接种口缓慢滴加 10 mol/L NaOH，使培养液的 pH 值为 12.5，继续搅拌 15 min 后停止，自然静止沉降使絮凝藻细胞沉降完全，最后从柱底部的排藻阀门放出浓缩藻浆，保留上清液。通过测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得得藻细胞的絮凝率为 88%。

**[0044] (5) 微藻的连续培养和采收：**从反应器顶部的调酸碱口向沉降后的培养上清液中缓慢滴加 10 mol/L 醋酸使培养液的 pH 值为 7.0，通过营养盐储罐向反应器中补加相应的营养盐母液(已灭菌)，使沉降上清液的浓度组分同步骤(1)中微藻培养基的浓度组分，并调整 pH 值为 7.5，继续按 250 mg/L (湿重)接种量接入已培养好的蛋白核小球藻种子，再于步骤(3)相同条件下连续培养 8 天。在以 250 r/min 的搅拌转速下，从反应器顶部的调酸碱口缓慢滴加 10 mol/L KOH 使培养液的 pH 值为 12.5，继续搅拌 15min 后停止，自然静止沉降使藻细胞沉降完全，从柱底部的排藻阀门放出藻浆，沉降上清液用 10 mol/L  $HNO_3$  调整 pH 值至 7.5。测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得出藻细胞的絮凝率为 92%。在第三次重复循环培养时，调整培养液 pH 值的碱为 10mol/L 的 NaOH，酸为 10mol/L 的  $H_3PO_4$ ，藻细胞长势良好，絮凝沉降率为 85%。在进行第四次循环培养时，培养液受污染，小球藻细胞的长势受到抑制。

**[0045] 实施例四**

1、微藻连续培养与原位自絮凝采收装置：与实施例 1 同。

**[0046] 2、微藻连续培养与原位自絮凝采收工艺：**

(1) 普通小球藻(*Chlorella vulgaris*) 种子培养液的制备：同实施例 1；

(2) 废水培养基的配置：取某淀粉加工厂生产废水，静置沉降预处理，再用 100 目滤网过滤后按以下浓度加入营养盐(g/L)：尿素 0.5 g/L,  $Na_2HPO_4$  0.15 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.125 g/L,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  25 mg/L, NaCl 25 mg/L,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  10 mg/L。调整培养基的 pH 为 8.0；微滤除菌后待用。

**[0047] (3) 接种与培养：**将上述培养基注入已消毒灭菌的柱式反应器中，接入湿重藻细胞为 100 mg/L，自然光源，自然光周期，搅拌转速为 300 r/min，通入无菌空气(含 10%  $CO_2$ ，通气量为 200 ml/min)，培养温度  $20 \pm 2^\circ C$ ，培养液 pH 值控制在 8.0~9.0，培养时间 6 天。

**[0048] (4) 微藻采收：**在以 300 r/min 的搅拌转速下，从柱式反应器顶部的接种口缓慢滴

加饱和 KOH,使培养液的 pH 值为 13,继续搅拌 10min 后停止,自然静止沉降使絮凝藻细胞沉降完全,最后从柱底部的排藻阀门放出浓缩藻浆,保留上清液。通过测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得藻细胞的絮凝率为 78%。

[0049] (5) 微藻的连续培养和采收:从反应器顶部的调酸碱口向沉降后的培养上清液中缓慢滴加饱和 HCl 溶液使培养液的 pH 值为 8.0,通过营养盐储罐向反应器中补加相应的营养盐母液(已灭菌),使沉降上清液的浓度组分同步骤(1)中微藻培养基的浓度组分,并调整 pH 值为 8.0,继续按 100 mg/L(湿重)接种量接入已培养好的普通小球藻种子,再于步骤(3)相同条件下连续培养 6 天。在以 300 r/min 的搅拌转速下,从反应器顶部的调酸碱口缓慢滴加饱和 NaOH 使培养液的 pH 值为 13,继续搅拌 10min 后停止,自然静止沉降使藻细胞沉降完全,从柱底部的排藻阀门放出藻浆,沉降上清液用饱和  $H_3PO_4$  调整 pH 值至 8.0。测定沉降前后培养液在 660nm 处的吸光值得出藻细胞的絮凝率为 80%。在第三次重复循环培养时,调整培养液 pH 值的碱为饱和 KOH 溶液,酸为饱和柠檬酸溶液,藻细胞长势良好,絮凝沉降率为 82%。

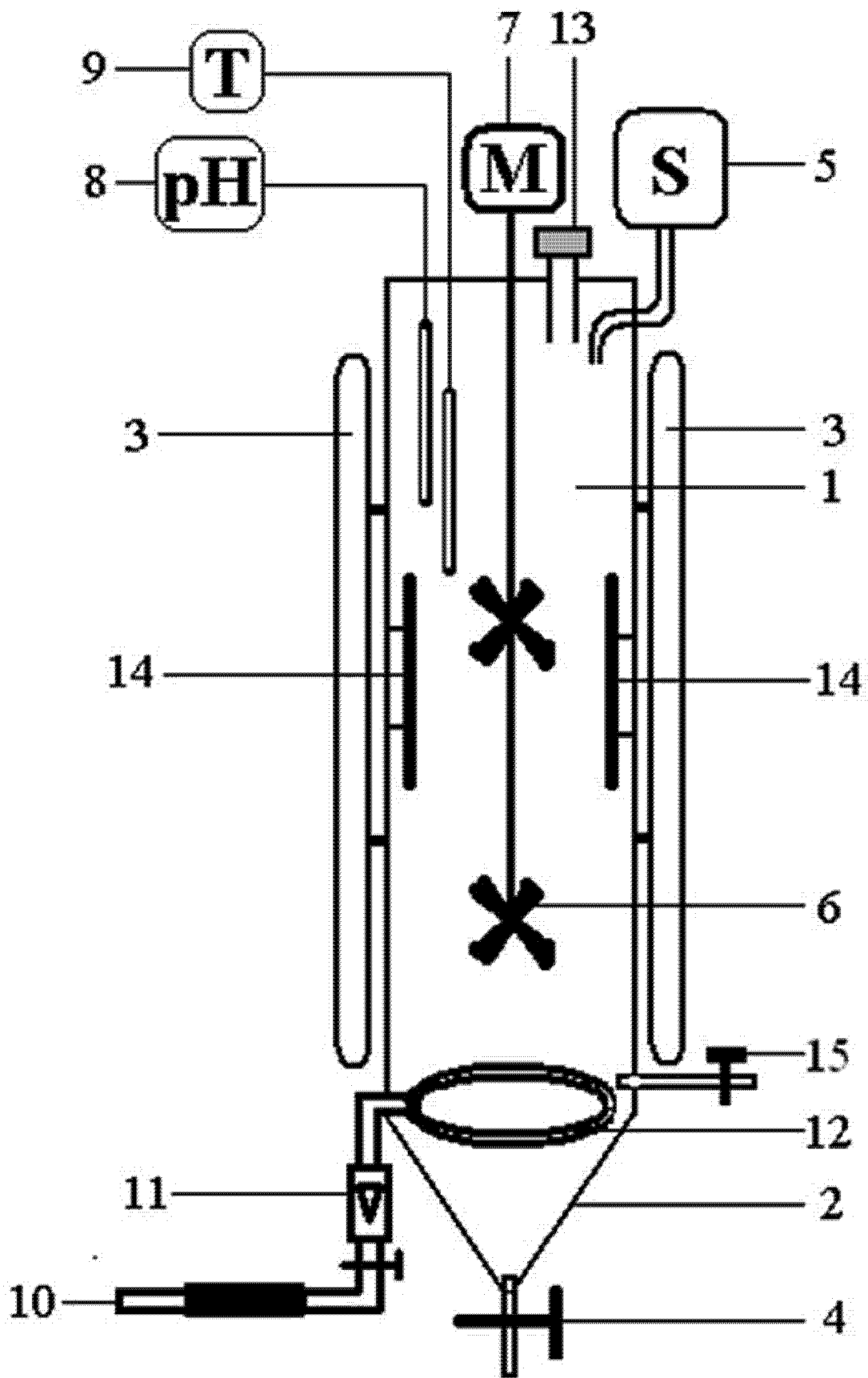


图 1