

# 一种培养小球藻的方法

申请号：[201010220941.8](#)

申请日：2010-07-07

**申请(专利权)人** [中国石油化工股份有限公司](#) [中国石油化工股份有限公司抚顺石油化工研究院](#)

**地址** [100728 北京市朝阳区朝阳门北大街22号](#)

**发明(设计)人** [王领民](#) [金平](#) [师文静](#) [李晓姝](#) [王崇辉](#) [佟明友](#) [黎元生](#)

**主分类号** [C12N1/12\(2006.01\)I](#)

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

**公开(公告)号** [102311921A](#)

**公开(公告)日** [2012-01-11](#)

**专利代理机构** [抚顺宏达专利代理有限责任公司](#) [21102](#)

**代理人** [李微](#)



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102311921 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

(21) 申请号 201010220941. 8

(22) 申请日 2010. 07. 07

(71) 申请人 中国石油化工股份有限公司

地址 100728 北京市朝阳区朝阳门北大街  
22 号

申请人 中国石油化工股份有限公司抚顺石  
油化工研究院

(72) 发明人 王领民 金平 师文静 李晓姝  
王崇辉 佟明友 黎元生

(74) 专利代理机构 抚顺宏达专利代理有限责任  
公司 21102

代理人 李微

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

C12R 1/89 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

### (54) 发明名称

一种培养小球藻的方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种培养小球藻的方法。本发明提出了一种以微生物菌渣处理液为主要异养碳源来实现混合培养的方法,利用自养出发藻种,经过异养条件驯化培养,自养与异养两个过程耦合,进行混合培养,培养后藻液经絮凝分离后,萃取获得油脂,剩余的藻细胞与未利用的细菌菌渣再经过本发明所提供的预处理过程,可以继续用于微藻培养。本发明方法利用廉价碳源作为有机碳源,实现了自养与异养过程的耦合,本发明技术路线为大规模培养微藻生长油脂技术提供了新思路。

1. 一种培养小球藻的方法,所述方法包括:往生物反应器中加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0 的培养基,按工作体积的 5% ~ 15% 接入小球藻藻种进行培养,培养条件为:搅拌速度为 80 ~ 100rpm(转/分钟),通入空气和二氧化碳的混和气,通气量为 0.1 ~ 1.0vvm,光照强度为 1000 ~ 6000lx,培养温度为 25℃ ~ 32℃,培养过程中控制 pH 值小于 10。

2. 按照权利要求 1 所述的方法,其特征在于,往所述的培养基中加入 3v% ~ 15v% 的菌渣或藻渣预处理液作为有机碳源。

3. 按照权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的菌渣选自克雷伯氏肺炎杆菌菌渣或酵母菌菌渣。

4. 按照权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的菌渣选自克雷伯氏肺炎杆菌菌渣。

5. 按照权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的菌渣处理液通过如下方法处理制得:微生物发酵结束后,在 60℃ ~ 80℃ 蒸煮 30min ~ 60min,在常温下过滤获得菌渣滤饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的碱液进行水解,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15℃ ~ 30℃,处理时间为 5d ~ 10d。

6. 按照权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的藻渣处理液通过如下方法制得:藻细胞破碎除油后得到藻饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的碱液进行水解,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15℃ ~ 30℃,处理时间为 5d ~ 10d。

7. 按照权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于,所述的碱选自 NaOH 和 / 或 NaHCO<sub>3</sub>。

8. 按照权利要求 2 所述的培养方法,其特征在于,所述的培养基中还含有 0.01 ~ 0.05mmol/L 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>。

9. 按照权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的培养基里面还含有 0.5 ~ 1.0mL/L 的微量元素溶液。

10. 按照权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述的微量元素溶液组成为:H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5.5 ~ 6.5g、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.0 ~ 5.0g、MnCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.5 ~ 1.0g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.20 ~ 0.40g、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.50 ~ 1.00g、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.10 ~ 0.20g、去离子水 1L。

11. 按照权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的培养方式为批式发酵、批式流加发酵或连续发酵。

## 一种培养小球藻的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于微藻生物技术领域,具体的说涉及一种利用廉价碳源进行混养发酵培养微藻的方法。

### 背景技术

[0002] 微藻富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸等营养成分(如螺旋藻),可用于食品、医药和能源方面;可以大量积累脂肪酸,有些微藻脂肪酸含量可占干重的 30%~60%。利用培养微藻来积累油脂资源,已经成为目前利用太阳能开发可再生资源最热门的研究领域。不仅具有强大的市场潜力,而且具有非凡的社会价值。

[0003] 但大部分野生微藻生长速度不快,固定二氧化碳能力也有限,要实现规模化生产,就消耗大量的人力物力,而收获甚微。当前,微藻研究正值热门时期,微藻的生长速度和油脂积累量成为研究的重点。

[0004] 微藻根据其营养方式分为自养与异养两种。第一种自养过程就是微藻利用 CO<sub>2</sub> 气体进行光合作用来固定碳源的同时获得能源,进行生长,并积累油脂。由于 CO<sub>2</sub> 在培养液中溶解度有限,吸收利用效率低下,CO<sub>2</sub> 的有效利用吸收,是实现理想培养效果的关键。目前开放的光生物培养微藻技术中,有不少 CO<sub>2</sub> 补给方式和装置。CN 200610018771.9 采用一种与养殖池相连的 CO<sub>2</sub> 补给装置,可以有效提高 CO<sub>2</sub> 利用率,但工艺繁琐,增加了设备投资。CN 200410020978.0 和 CN 03128138.9 中均采用在光生物反应器系统中加入一种装置方法,来实现 CO<sub>2</sub> 的补给,同时也能实现一定的氧解析效果。这些都难免增加设备投资,工艺过程繁琐。目前文献报道中还有另外一种 CO<sub>2</sub> 补给方式,CN200410009360.4 和 CN 200510126465.2 中使用烟道气补碳。

[0005] 第二种是异养培养方式,就是在培养过程人为提供碳源,比如葡萄糖等,显而易见,葡萄糖作为异养碳源,属于速效碳源,可以提高微藻生长的速度,但其油脂积累效率并没有得到相应的提高,同时该类碳源必然增加培养成本,将会受到原料的极大限制。

[0006] CN03109312.4 公开了一种用淀粉酶解培养异养藻快速热解制备生物柴油的方法。该专利以低质粮食淀粉为原料,利用酶解淀粉制葡萄糖水溶液配制培养液,再通过异养转化技术获得异养小球藻;然后用高脂肪含量的异养藻细胞快速热解,获得高产量和高质量的生物柴油。该方法选择低质粮食淀粉水解后提供葡萄糖用作有机碳源,成本仍较高了。

[0007] 在微藻培养条件和培养方式的基础上,人们的目光转向利用微藻生产生物柴油的培养策略。单步培养策略:完全培养基培养,虽然油脂的含量会比较低(加大提取成本),但生长速率快,能快速地增加生物量;不完全培养基培养,虽然生产速率比较慢,但高的油脂含量能抵消生物量的不足。两步培养策略:先利用完全培养基异养培养,使其生物量快速增加,再利用不完全培养基自养培养如氮限制或改变培养条件如光强、温度,使藻类大量积累油脂。

[0008] CN 200810112998.9 公开了一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法。该方法包括小球藻的自养培养、细胞浓缩、异养发酵、藻类细胞收集和干燥、从干燥的细

胞中提取油脂和酯化反应制备生物柴油等步骤。该方法在异养阶段加入的有机碳源选自葡萄糖、果糖、玉米淀粉水解液、木薯淀粉水解液等,成本较高。

[0009] 由于在异养培养过程均加入了价格较高的葡萄糖作为有机碳源,因而现有两步培养方法存在异养碳源的经济性较差与培养效率不理想等问题。

## 发明内容

[0010] 本发明要解决的技术问题是提供一种适用于小球藻高密度高品质培养的培养方法。该培养方法可利用廉价碳源为异养碳源,对小球藻实现异养与光自养耦合培养,可使小球藻达到高密度培养的效果,同时藻体含油量与单一培养相比有较大幅度提高,藻体品质与异养培养相比有较大幅度提高,藻体含油量在培养结束时达到光自养培养时的水平。

[0011] 本发明培养小球藻的方法包括如下内容:往生物反应器中加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0 的培养基,按工作体积的 5% ~ 15% 接入小球藻藻种进行培养,培养条件为:搅拌速度为 80 ~ 100rpm,通入空气和二氧化碳的混和气(其中 CO<sub>2</sub> 含量为 5v% ~ 15v%),通气量为 0.1 ~ 1.0vvm,光照强度为 1000 ~ 6000lx,培养温度为 25℃ ~ 32℃,培养过程中控制 pH 值小于 10。

[0012] 本发明方法中,所用的小球藻包括市场上普通小球藻,也可包括经过驯化后可以进行异养快速生长的异养小球藻。

[0013] 本发明方法中所用小球藻培养基,是在常规培养基基础上主要加入廉价碳源作为异养培养过程的生长碳源得到的。该廉价碳源是一种经过预处理之后的菌渣(包括细菌菌渣或酵母菌菌渣)或藻渣(微藻细胞破碎除油后得到藻渣),优选为克雷伯氏肺炎杆菌菌渣或酵母菌菌渣。通常需要往培养基中加入 3v% ~ 15v% 的菌渣或藻渣预处理液作为有机碳源。

[0014] 本发明方法中,由于菌渣或藻渣基本上为固体物质,为了能更好的被小球藻吸收利用。优选在加入培养基前对菌渣或藻渣进行预处理,以获得菌渣或藻渣处理液用作营养液。所述菌渣的预处理方法为:微生物发酵结束后,在 60℃ ~ 80℃ 蒸煮 30min ~ 60min,在常温下过滤获得菌渣滤饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的稀碱进行水解,所用的稀碱选自 NaOH 和 / 或 NaHCO<sub>3</sub>,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15℃ ~ 30℃,处理时间为 5d ~ 10d。所述藻渣的预处理方法为:藻细胞破碎除油后得到藻饼,对藻饼以上述稀碱水解条件进行水解处理,获得预处理液。

[0015] 本发明方法中,菌渣或藻渣预处理液在用于小球藻培养时是一种固液混合物,对培养体系具有一定的遮光性,遮光区对光自养的暗反应及异养生长均有利。

[0016] 本发明方法中,使用的异养营养源为上述菌渣或藻渣预处理液。其在作为小球藻异养营养源的同时,还可以在小球藻培养基中加入 0.01 ~ 0.05mmol/L 浓度的 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 0.5 ~ 1.0mL/L 的微量元素混合液。上述每升微量元素混合液成份如下:H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5.5 ~ 6.5g、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.0 ~ 5.0g、MnCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.5 ~ 1.0g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.20 ~ 0.40g、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.50 ~ 1.00g、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.10 ~ 0.20g。

[0017] 本发明方法中,提供了小球藻生长的自养与异养两种生长过程条件,根据廉价异养碳源的加入方式可以将此培养过程分为:批式培养、批式流加培养和连续培养三种方式,三种培养方式均可实现光自养与异养两个过程的耦合培养。

[0018] 本发明方法中,三种培养方式均是本领域内常规的发酵培养方式。批式培养方式就是一次投料一次收获,将所需培养基与小球藻种子在无菌条件下一次性转入反应器中,设定基本的培养条件,实施温度转速光照以及通气和 pH 控制等条件,在小球藻细胞浓度不再增加或者增加变化很小的情况下即可收获。

[0019] 当采用批式流加发酵方式时,在培养过程中,可以对异养碳源(菌渣或藻渣预处理液)进行流加补充,初始培养条件同批式培养条件。流加起始时间根据取样分析藻细胞浓度数值而定,当分析得藻细胞浓度达到  $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$  时,开始流加异养碳源,此流加的异养碳源浓度配制在  $10 \sim 30\%$  (初始菌渣或藻渣预处理液体积与稀释用蒸馏水体积比),配制好后消毒灭菌处理,流加速度控制在  $0.1 \sim 1.0\text{mL/min}$  水平,当细胞浓度达到  $1.0 \times 10^{10} \sim 2.0 \times 10^{10}$  时,停止流加,直至培养结束。

[0020] 若采用连续发酵进行培养:初始培养条件与操作同批式培养,连续过程控制参数为反应器中藻细胞浓度,当藻细胞浓度为  $1.0 \times 10^{10} \sim 2.0 \times 10^{10}$  时,向反应器中流加新鲜培养基,培养基成份同培养初始条件,采用上加下出方式,流加进去新鲜培养基混合均匀后,反应器下端放出相应培养液,流加和放出量一致,维持反应器中总的培养液体积不变,放出的培养液进行藻细胞的收集处理过程,以获得藻细胞。根据培养过程藻细胞增殖情况,保证反应器藻细胞浓度处于  $1.0 \times 10^{10} \sim 2.0 \times 10^{10}$  水平,根据此参数来设定流加与放料速度,连续操作的流加与放料速度应在  $0.5 \sim 1.0\text{mL/min}$ 。此连续培养方式下,可以实现长期运转,无需更换种子,连续加料连续收获藻细胞产品。直到设备需要维修或者种子性能下降为止,终止培养过程。

[0021] 本发明方法中,所述的小球藻可以为普通自养小球藻,也可以通过对普通自养小球藻进行异养条件驯化获得可以同时进行异养生长的小球藻。例如,可以以自养小球藻出发,经多批次诱导,获取一种可以在自养与异养条件下均可生长的小球藻藻种。该藻种生长过程可以利用菌渣或藻渣预处理液作为生长的部分碳源,实现较高的藻细胞收获和油脂积累效率,为大规模高效培养微藻提供基础。

[0022] 通过对自养小球藻进行异养条件驯化以获得异养小球藻的方法为本领域的普通常识。例如,所述通过驯化获得混养小球藻的方法包括:

[0023] 出发藻种为一种自养小球藻,对自养藻种进行异养条件驯化培养,所用培养基为添加葡萄糖与菌渣或藻渣预处理液的基本培养基,异养驯化培养条件为,避光情况下  $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 、 $100 \sim 150\text{rpm}$ 、空气浴摇床培养  $7 \sim 10\text{d}$ ;

[0024] 经过多批次异养驯化之后,对异养驯化藻种进行分离纯化,将培养在异养条件下的指数期藻液稀释涂布于基本培养基所做的固体平板上,弱光条件培养  $10\text{d} \sim 20\text{d}$ ,得到若干单藻落,将此单藻落挑取后,划到固体斜面基本培养基中培养,待生长后,即可获得纯种藻种,该藻种既可用于异养发酵培养微藻,也可用于混合发酵培养微藻过程中。

[0025] 根据本发明提供的培养方法,所述的常规培养基为本领域中异养发酵培养普通小球藻通常采用的培养基,所述常规培养基的基本组成一般为:

[0026]

NaNO <sub>3</sub> 或 KNO <sub>3</sub>	0.10 ~ 0.50g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3H <sub>2</sub> O	0.05 ~ 0.10g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.05 ~ 0.10g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.01 ~ 0.05g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 ~ 0.5g
NaCl	0.01 ~ 0.05g
Soil extract*(土壤提取液)	10 ~ 40mL
FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.001 ~ 0.005g
Fe-EDTA	0.5 ~ 2mL
水	1L

[0027]

[0028] 与现有技术相比较,本发明培养小球藻的方法具有如下特点:

[0029] (1) 本发明方法实现了光自养与异养过程的耦合,较现在普遍采用的先自养-后异养方法或者先异养-后自养的培养方法节省了时间,同时在混合培养过程中实现了高品质高密度培养微藻的目的;

[0030] (2) 本发明的培养基中添加菌渣或藻渣预处理液用作廉价异养有机碳源,该碳源比单纯添加葡萄糖或者淀粉水解液等异养碳源更据生长优势,本发明方法油脂积累量可以达到40%以上的水平;同时本发明方法将常规生物发酵生产中的菌渣或藻渣实现循环再利用,解决了菌渣或藻渣的污染问题,还能变废为宝;

[0031] (3) 本发明的培养基中除了加入菌渣或藻渣预处理液用作有机碳源以外,还可同时加入适量Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液,细菌菌渣或藻渣预处理液与Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>的同时加入,使得本发明方法培养效率更高。因此本发明的技术路线,为大规模培养微藻生长油脂技术提供了新思路。

## 具体实施方式

[0032] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案作进一步的描述。本发明实施例中,所述的添加物质的浓度均是以培养基总体积为基准,即添加物质的含量占培养液配制完成后总的培养液体积百分比或摩尔数或质量等。

[0033] 实施例1

[0034] 出发藻种为自然界分离获得的一种自养微藻,经实验室分离纯化鉴定为普通小球藻,实验室编号为FY1#,所用培养基为基本培养基,成分如表1:

[0035] 表1

[0036]

NaNO <sub>3</sub>	0.25g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3H <sub>2</sub> O	0.075g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.075g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.025g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.175g
NaCl	0.025
Soil extract(土壤提取液)	40mL
FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.005g
Fe-EDTA	1mL
蒸馏水	1000mL

[0037] 将小球藻藻种从斜面中转移至摇瓶中在 30℃、100rpm、3000lx 光照和空气浴条件下进行培养,获得自养培养条件下的实验数据。培养 10d,分析测试摇瓶中藻细胞的浓度,以细胞计数仪来测量其中的活细胞数,以索氏提取法分析干重情况下藻细胞中所含油脂成份的总百分数。

#### [0038] 实施例 2

[0039] 出发藻种为 FY1# 自养小球藻,培养条件为基本培养基中添加异养碳源,分别添加 0.02mmol/L 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 与浓度为 3% (v/v) 的细菌菌渣预处理液;这里添加物质的浓度表述,均是以培养基总体积为基准,即添加物质的含量占培养液配制完成后总的培养液体积百分比或摩尔数或质量等,其他实施例亦是如此。

[0040] 其中细菌菌渣来源为厌氧生长的克雷伯氏肺炎杆菌,此菌以甘油为唯一底物,在厌氧培养条件下生长,可以发酵生产 1,3- 丙二醇,发酵结束后,经 80℃ 蒸煮 40min 后,在常温下过滤获得菌渣滤饼,对菌渣滤饼经过烘干后,在 0.1mol/L 的 NaOH 溶液下进行水解,水解过程的固液比为 1 : 20,处理时间为 7d,处理温度为 25℃。处理后的营养液直接作为小球藻异养培养的营养源来使用。此菌渣处理也用于异养微藻的培养。

[0041] 异养驯化培养条件为,避光情况下 30℃、120rpm、空气浴摇床培养 10d,经过 8 批次异养驯化之后,对异养驯化藻种进行分离纯化:将培养在异养条件下的指数期藻液稀释涂布于基本培养基所做的固体平板上,弱光条件培养 10d ~ 20d,得到若干单藻落,将此单藻落挑取后,划到固体斜面基本培养基中培养,待生长后,即可获得纯种藻种。

[0042] 驯化后挑选出单一纯种藻种,此驯化藻种实验室编号为 FY1X-9#,进行异养培养实验,条件和上述异养驯化过程条件一致,培养 5d 后,分析测试摇瓶中藻细胞的浓度,以细胞计数仪来测量其中的活细胞数,以索氏提取法分析干重情况下藻细胞中所含油脂成份的百分数。

#### [0043] 实施例 3



[0044] 在实施例 2 基础上获得的驯化藻种 FY1X-9#, 对其进行外加葡萄糖碳源情况的考察实验, 葡萄糖的添加量为 30g/L, 其他培养条件与异养驯化条件一致, 培养 5d, 分析测试摇瓶中藻细胞的浓度, 以细胞计数仪来测量其中的活细胞数, 以索氏提取法分析干重情况下藻细胞中所含油脂成份的百分数。

[0045] 实施例 4

[0046] 对实施例 2 中所获得驯化藻种 FY1X-9# 进行混合培养: 基本培养基中添加 10% (v/v) 上述菌渣预处理液, 混合均匀后 121℃ 消毒 30min, 通入 0.5L/min 的空气与 CO<sub>2</sub> 混合气 (CO<sub>2</sub> 体积百分比为 7%), 在 30℃, 100rpm, 3000lx 光照条件下培养 5d。此过程所配制的培养基由于含有 10% (v/v) 的菌渣预处理液, 很好地给藻细胞提供了异养碳源和部分避光环境, 因此其所实现的生长过程属于自养与异养同步进行的混合培养过程。培养 5d 后, 对培养液进行分析, 分析测试摇瓶中藻细胞的浓度, 以细胞计数仪来测量其中的活细胞数, 以索氏提取法分析干重情况下藻细胞中所含油脂成份的百分数。

[0047] 实施例 5

[0048] 在培养基中添加 0.02mmol/L 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 其他条件同实施例 4。

[0049] 实施例 6

[0050] 在培养基中添加 0.8mL/L 的微量元素溶液, 其他添加同实施例 5。上述每升微量元素混合液成份如下: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.0g、ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.5g、MnCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.75g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.35g、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.75g、Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.15g。

[0051] 实施例 7

[0052] 在培养基中添加 5v% 的菌渣预处理液, 其他条件同实施例 6。

[0053] 实施例 8

[0054] 对培养过程采用批式流加操作, 初始培养条件同实施例 6, 当小球藻细胞浓度达到  $1.0 \times 10^6$  开始对反应器实施菌渣预处理液流加操作, 流加速度为 0.2mL/min。其中所流加的预处理液中还需补充 0.02mmol/L 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 0.8mL/L 的微量元素溶液 (反应器中初始装液体积为基准), 以补充藻细胞生长对他们的消耗。

[0055] 上述实施例实验结果见表 2:

[0056] 其中, 干重 (x) 与细胞计数测得的细胞浓度 (y) 之间的换算标准曲线关系如下

[0057]  $y = 0.6856x \times 10^8 - 2.68 \times 10^6$

[0058] 表 2

[0059]

实施例	藻干重 (g/L)	油脂含量 (wt%)	藻细胞浓度 ( $\times 10^9$ 个/mL)	备注
1	0.64	17.9	0.0412	FY1#
2	4.66	34.2	0.3168	FY1X-9#
3	2.91	22.4	0.1968	FY1X-9#
4	11.20	38.5	0.7652	FY1X-9#
5	19.20	40.1	1.3137	FY1X-9#
6	22.36	41.7	1.5303	FY1X-9#
7	21.33	40.8	1.4597	FY1X-9#
8	20.57	40.0	1.4076	FY1X-9#

[0060] 从上述数据可以看出,实施例1使用的原始出发藻种普通小球藻,实施例2~8均使用的为异养驯化所得藻种。其中实施例2异养碳源为细菌菌渣,实施例3异养碳源为葡萄糖,它们都为单一的异养培养过程;实施例4则是利用异养驯化藻种进行自养与异养的混合培养过程,并以菌渣为异养碳源;实施例5在用菌渣做异养碳源进行混合培养的同时,还添加了亚硫酸钠;实施例6则在实施例5的基础上又添加了微量元素;实施例7改变了实施例6中使用异养碳源的浓度;实施例8则是在实施例6的基础上进行了批式流加培养过程。实验结果表明,实施本发明方案,以异养驯养藻种FY1X-9#为培养对象,外加克雷伯氏肺炎杆菌菌渣为部分碳源,进行小球藻的光自养与异养混合培养过程,在本发明实验条件范围内,可以获得较高的藻细胞生物量,藻细胞浓度在 $10^9$ 个/mL水平,藻细胞干重含油脂总量在40%水平。