

盐藻细胞泡载分离法采收的初步研究

郑毅¹, 崔景芹², 马润宇¹, 丛威², 蔡昭铃²

(1. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029; 2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:通过对盐藻细胞的浓缩倍数和采收率的测定, 考察了藻液 pH 值、气体流速(v_g)、藻细胞初始浓度(C_0)对盐藻细胞的泡载分离采收性能的影响, 优化了盐藻细胞泡载分离采收条件。结果表明: 在 v_g 为 60 ml/min, C_0 为 2.58×10^5 个/ml, pH 值为 7.5 的条件下, 盐藻细胞泡载分离的采收率达 90%~94%, 浓缩倍数达 30~34。泡载分离是分离浓缩盐藻细胞的一种简便、高效的方法。

关键词: 盐藻细胞; 泡载分离; 浓缩倍数; 采收率

中图分类号: TQ028 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)01-0043-05

1 前言

盐藻(*Dunaliella salina*)是一种在食品、医药保健、化工和养殖业中具有独特经济价值的微藻^[1]。已在我国及美、澳、日、以色列等国实现大面积培养, 形成了较大规模的微藻产业^[2]。目前生产上采用开放式跑道池培养, 盐藻细胞的培养浓度比较低, 通常为 $(4\sim5) \times 10^5$ 个/ml, 且细胞的形体微小, 一般为 $14 \mu\text{m} \times 22 \mu\text{m}$ 左右。藻体密度与水相近, 因而细胞的采收较为困难^[1,3-5]。传统的固液分离手段都具有一定的局限, 如絮凝沉淀法会污染产品、过滤法分离效率低等^[6]。目前工业上主要采用高速离心法, 但能耗高并破坏微藻细胞。泡载分离是一种较新的生物分离方法, 它通过鼓泡使细胞或溶质聚集在气-液界面, 借助浮力上升至溶液主体上方形成富集层, 以达到分离、浓缩溶质和净化液相主体的目的^[7], 特别适于低浓度产物的富集。

迄今为止, 泡载分离技术已成功用于多种微生物的分离, 在生物发酵液分离、废水处理以及微藻的分离中都有应用^[8-11]。然而将其应用于盐藻细胞的采收却较少报道^[12-14]。而且目前所采用的泡载分离微藻大都是在预先加入某种絮凝剂的条件下进行的, 增加了后序处理负担。本工作考察了在无絮凝剂的情况下泡载采收盐藻的可行性, 初步研究了气体流速(v_g)、藻细胞初始浓度(C_0)及藻液 pH 值对盐藻的批式泡载采收的影响。

2 材料和方法

2.1 材料与仪器

藻种: 内蒙古兰太生物工程公司提供, 经纯化后使用。

仪器: FA2004 上皿电子天平(上海精密科学仪器有限公司); XSZ-D₂ 倒置式显微镜(重庆光学仪器厂); pH-HJ90 型数字式 pH 计(北京创业仪器厂); HZQ-QG 温控培养箱(哈尔滨东联电子技术公司); LZB 型玻璃转子流量计(沈阳玻璃仪器厂); 玻璃泡载分离塔(自制); 2.5 L 气升式光生物反应器(自制)。

2.2 培养方法

培养基: 选用 ASP₂ 为培养基^[4](不加维生素溶液)。

收稿日期: 2002-09-24, 修回日期: 2002-11-21

作者简介: 郑毅(1976-), 男, 福建省平潭县人, 硕士研究生, 环境工程专业; 丛威, 通讯联系人。

藻种纯化：在 ASP₂ 培养基中加入 1.5%~2% 的琼脂粉，配制成固体培养基并制成平板，将经夏季强日光照射培养的藻液涂布到平板上，于温控培养箱中 30°C 下静置培养，每天人工摇动 1~2 次。以荧光灯为光源上、下照光培养，上光源平均光强 3.6~4.0 mW/cm²，下光源平均光强 5.7~6.0 mW/cm²。平板培养一周后将大而红的藻株转接进 10 ml(含 5ml 培养液)锥形瓶，培养 5~7 d 后再次划线或涂布分离，经 3 次反复纯化得到的大而红的藻株经 10 和 50 ml(含 20~30 ml 培养液)扩种培养，最后接入 250 ml 锥形瓶培养 5~8 d 作藻种。

2.5 L 气升式光生物反应器培养：将 200 ml 藻种液接入装有 1800 ml 液体培养基的 2.5 L 光照培养玻璃罐，在温度 30°C、光强 1.6 mW/cm²、NaCl 浓度 12%、CO₂-空气混合气体(CO₂ 6%， φ) 通气量 20 ml/min、接种浓度 8×10^4 个/ml 的条件下培养 7 d 左右，藻细胞浓度达到 $(5\sim6) \times 10^5$ 个/ml，作为泡载采收实验藻液。

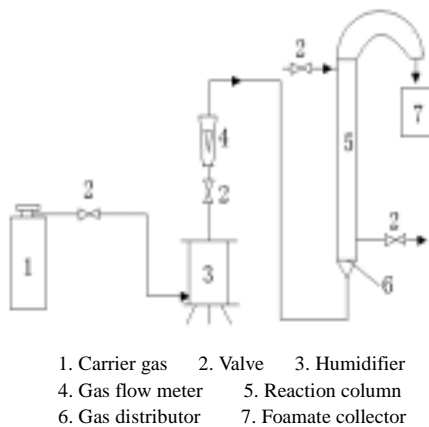


图 1 泡载分离装置示意图

Fig.1 Schematic of foam separation set-up

2.3 泡载分离装置与实验方法

实验装置见图 1，主要由高压氮气瓶、饱和和增湿缓冲罐、流量计和泡载分离塔等组成。分离塔主体由玻璃制成，内径 20 mm，高 25 cm，塔底焊接直径 19 mm 的 G3 耐酸过滤沙片(孔径 16~30 μ m)。

实验方法：将原藻液配成预定的 3 种不同的初始浓度 $(1\sim 2, 2\sim 3, 3\sim 4) \times 10^5$ 个/ml，再用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将藻液的 pH 值调到实验所需值。实验开始时先将待处理的藻液 200 ml 一次性倒入分离塔中，然后开启氮气瓶阀门，氮气经过饱和和增湿缓冲罐由塔底进入塔内。富集藻液由塔顶排入贮槽，每隔 20 s 自塔底取出 0.5 ml 藻液，测定其藻细胞浓度。实验结束后稀藻液自塔底排出。分别测定残液和泡沫液的体积和浓度。每次

实验以 30 min 为限。实验以 v_g 、 C_0 及藻液 pH 值为 3 个考察因素，采用 $L_9(3^3)$ 正交实验设计方法^[15]。

2.4 测定方法

以计数板直接计数法在倒置式显微镜下测定藻细胞浓度。每个样品分别计数(25 个中格即 0.1 mm³ 中的藻细胞总个数)4 次，取算术平均值。本次实验以下列 2 个无因次的参数来表征泡载分离采收性能：

$$E = C_f / C_0, \quad R = C_f V_f / (C_0 V_0) \times 100\%,$$

式中 E 为浓缩倍数， R 为藻细胞采收率， C_0 为藻细胞初始浓度， C_f 为泡沫相藻细胞浓度， V_0 为原藻液体积， V_f 为泡沫液体积。

3 结果与讨论

3.1 正交实验结果

根据正交实验数据处理方法得到表 1。由表可以看出， E 在 v_g 中的极差最大(80.17)，在 pH 中的极差其次(16.13)，在 C_0 中的极差最小(12.88)，说明 v_g 对 E 的影响最大，pH 的影响其次， C_0 的

影响最小. 同样可以很容易地看出 R 在 v_g 中的极差最大(158.1), 在 pH 中的极差其次(28.4), 在 C_0 中的极差最小(23.6), 表明 v_g 对 R 的影响最大, pH 的影响其次, C_0 的影响最小.

由正交实验结果可见, 在 $v_g=60$ ml/min, $C_0=2.58 \times 10^5$ 个/ml, pH=7.5 的条件下, E 和 R 都较高. 在此条件下进行了 3 次实验验证, 结果如表 2. 实验结果有较好的重复性.

表 1 $L_9(3^3)$ 正交实验安排与结果
Table 1 Arrangement and results of $L_9(3^3)$ orthogonal experiment

No.	v_g (ml/min)	C_0 ($\times 10^5$ cells/ml)	pH	V_f (ml)	E_i	R_i (%)
1	60 (1)	1.78 (1)	7.5 (2)	4.1	35.21	93.9
2	60 (1)	2.58 (2)	9.0 (3)	6.5	29.05	94.4
3	60 (1)	3.40 (3)	6.0 (1)	5.2	35.17	87.9
4	100 (2)	1.38 (1)	9.0 (3)	9.0	7.33	34.7
5	100 (2)	2.35 (2)	6.0 (1)	24.0	3.17	39.6
6	100 (2)	3.53 (3)	7.5 (2)	10.2	8.76	43.8
7	140 (3)	1.33 (1)	6.0 (1)	4.3	18.58	61.9
8	140 (3)	2.58 (2)	7.5 (2)	10.4	16.02	80.1
9	140 (3)	3.63 (3)	9.0 (3)	17.8	7.48	63.6
	ΣE	ΣR	ΣE	ΣR	ΣE	ΣR
$K_1^{1)}$	99.43	276.2	61.12	190.5	56.92	189.4
K_2	19.26	118.1	48.24	214.1	59.99	217.8
K_3	42.08	205.6	51.41	195.3	43.86	192.7
$e^{2)}$	80.17	158.1	12.88	23.6	16.13	28.4
					SUM E_i	SUM R_i
					160.77	599.9

Note: 1) The sum of experimental results (E or R) at level i ; 2) $e=K_{i, \max}-K_{i, \min}$.

表 2 最优条件验证实验结果
Table 2 Results of experiments for proving optimum conditions

No.	V_f (ml)	E_i	R_i (%)
1	4.2	30.02	89.26
2	5.0	29.08	93.81
3	3.8	34.56	94.03

3.2 气速 (v_g) 对采收性能的影响

比较了 60, 100, 140 ml/min 3 种气速条件下的采收性能. 由表 1 可见, E 和 R 随 v_g 的变化趋势基本一致. 在 v_g 较小时, E 和 R 较高, 这是因为 v_g 较小时, 泡沫到达塔顶的时间较长, 延长了排水时间, 使进入泡沫间隙的主体溶液减少, 泡沫中夹带的液体量也减少, 所以实验所得的 E 较高; 另外由于本实验的分离塔高径比较大, 所以在 v_g 较小时产生的扩散碰壁下沉返混的气泡数目较少, 保证了较高的泡载分离效率, 从而导致 R 也高. 在 v_g 增大至 100 ml/min 时, E 和 R 明显降低. 这可能是由于泡沫中夹带的液体量增加, 使吸附于泡沫中的藻细胞被“稀释”, 从而导致 E 较低; 同时由于 v_g 增大使分离塔中气泡返混数目增加, 从而降低了气泡的泡载分离效率, 所以 R 不但没有升高反而降低. 当 v_g 继续升高至 140 ml/min 时, E 和 R 突然升高但仍然都低于 v_g 为 60 ml/min 时的值. 原因可能是当 v_g 升高到一定程度时, 虽然气泡的返混数目继续增加, 但此时 v_g 已增大到足以补偿气泡返混但还不能完全补偿泡载效率损失, 另外此时进入泡沫间隙液体中的藻细胞与主体藻液中的藻细胞浓度接近, 所以最终导致 E 和 R 都升高. 此外, 在显微镜下还观察到在 $v_g=140$ ml/min 时, 藻细胞溶液中已经有一部分藻细胞在高速气泡的剪切冲击下破损. 所以, 在盐藻细胞的泡载分离中 v_g 不能过大, 需要结合分离塔的结构(主要是高径比)选择适当的 v_g , 既要保证有较高的 E 和 R , 也要兼顾到藻细胞所能承受的气泡剪切力.

3.3 藻细胞初始浓度 (C_0) 对采收性能的影响

由表 1 可见, R 随 C_0 的变化趋势是先增大, 然后降低, 而 E 先下降后提高. 这可能是因为随

C_0 的增大, 溶液中的藻细胞数目增多, 细胞表面分泌的各种高聚物如蛋白质、多糖等活性物质也增加, 细胞间交联架桥作用增强, 相互形成大的絮团. 但是此时絮团间隙内的持液量也随之上升, 夹带此絮团的泡沫持液量也增加^[16], 所以 E 减小而 R 增大; 当细胞浓度到达一定程度后细胞絮凝平衡稳定时的细胞数目增多, 此时只需较少的泡沫就可以使细胞絮团上浮, 即细胞絮团间隙内的持液量有所减少, 但泡沫相的细胞浓度有所减少, 所以此时 E 增大而 R 减小.

3.4 pH 值对采收性能的影响

如表 1 所示, 在所研究的 pH 值范围内, 碱性条件得到的 E 和 R 最小, 随着料液 pH 值减小至接近中性时, 所得到的 E 和 R 最高; 当 pH 继续减小至酸性时, E 和 R 又开始逐渐降低. pH 对泡载分离效果的影响比较复杂, 这可能与酸碱性的改变会影响藻细胞的表面性质, 使藻细胞的吸附能力和疏水性发生变化有关^[16,17]. 在实际生产操作过程中 pH 一般保持在 7.5~8.2 (即一般培养液的 pH 值)^[13], 不但有利于盐藻的存活, 也有利于提高盐藻的泡载分离效率.

4 结论

实验结果表明, 在盐藻细胞的泡载分离与采收过程中, 气速(v_g)、藻液初始浓度(C_0)、藻液 pH 值对泡载分离采收性能具有重要影响:

(1) 在适当的较低气速下, 泡载分离过程中的细胞浓缩倍数 E 和采收率 R 较高; 在气速较高的情况下, 虽然也能获得较高的细胞浓缩倍数和采收率, 但部分藻细胞已经在气泡的剪切力下破损.

(2) 藻细胞初始浓度对细胞浓缩倍数 E 和采收率 R 的影响是相反的, 实际操作中需要适当选择, 以便得到较为理想的 E 和 R .

(3) pH 对盐藻的存活和泡载分离效果都有重要影响. pH 为 7.5 左右可获得较高的细胞浓缩倍数和采收率.

(4) 本实验条件下盐藻泡载采收的优化条件为: $v_g=60$ ml/min, $C_0=2.58 \times 10^5$ 个/ml, pH=7.5. 在此条件下, 盐藻细胞采收率 R 可达 90%~94%, 浓缩倍数 E 达 30~34. 此结果明显优于有絮凝剂的情况($R=80\% \sim 94\%$, $E=6 \sim 21$ ^[13,18]).

(5) 采用泡载分离法采收盐藻, 选择适当的采收条件, 可在不加絮凝剂条件下获得较好的采收效果, 大大减小了产品污染.

参考文献:

- [1] 段学辉, 张嗣良. 盐藻及其生物量采收 [J]. 海湖盐与化工, 1997, 27(2): 22-31.
- [2] 周世水, 姚汝华. 利用盐藻(*Dunaliella*)培养生产 β 胡萝卜素 [J]. 生物学杂志, 1997, 14(6): 15-18.
- [3] 吴南君. 培养耐盐的杜氏藻的生物技术 [J]. 生物技术通报, 1992, 8(5): 1-3.
- [4] 古玉环, 陈军. 盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 的生物学特性与培养研究 [J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 1995, 31(4): 52-55.
- [5] 刘建国, 吴超元. 盐藻和 β 胡萝卜素研究述评 [J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(3): 323-329.
- [6] Mohn F H. Harvesting of Microalgal Biomass [A]. Borowitzka L J. Micro-algal Biotechnology [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 395-414.
- [7] 於兵, 邓修. 泡沫分离技术的研究 [J]. 华东化工学院学报, 1984, 13: 17-22.
- [8] 常志东, 刘会洲, 陈家镛. 泡沫分离法的应用与发展 [J]. 化工进展, 1999, (5): 18-21.
- [9] 高廷耀, 顾国维. 水污染控制工程, 下册, 第二版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 45.
- [10] 邓修. 泡沫吸附分离技术进展 [J]. 石油化工, 1984, 13(9): 627-635.
- [11] 陆九芳, 李总成, 包铁竹. 分离过程化学 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1993. 46-50.

- [12] Alan J R. Microflotation: New Low Gas-flow Rate Foam Separation Techniques for Bacteria and Algae [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1966, 8: 135–151.
- [13] 周全. 制盐母液养殖盐藻及泡载采收技术的研究 [J]. *海湖盐与化工*, 1995, 24(6): 11–16.
- [14] Kanel, Jeffrey Scott, Guelcher, et al.. Flotation Separation Methods and Systems for Dewatering Suspensions of Microalgae and Extracting Components Therefrom [P]. US Patent: 5951875, 1998–07–02.
- [15] 汪荣鑫. 数理统计 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1966. 148–154.
- [16] 修志龙, 张代佳, 贾凌云, 等. 泡沫分离法分离人参皂苷 [J]. *过程工程学报*, 2001, 1(3): 289–292.
- [17] 曾文炉, 李浩然, 李宝华, 等. 螺旋藻泡载分离法采收的实验室研究 [J]. *过程工程学报*, 2002, 2(1): 40–44.
- [18] 张爱群, 刘长岩. 利用气浮法采收盐藻的研究 [J]. *海湖盐与化工*, 1997, 26(3): 7–9.

Preliminary Study on Harvesting *Dunaliella salina* Cells by Foam Flotation Technique

ZHENG Yi¹, CUI Jing-qin², MA Run-yu¹, CONG Wei², CAI Zhao-ling²

(1. School of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Proc. Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: By determining the enrichment factor and total yield of *Dunaliella salina* cells, the effects of different operational conditions, such as gas flow rate (v_g), initial cell concentration (C_0) and pH on the feasibility of foam flotation of *Dunaliella salina* cells were investigated. By the way, the treatment conditions were optimized. The experimental results showed that when v_g was 60 ml/min, C_0 was 2.58×10^5 cells/ml and pH was 7.5, foam flotation had a high concentrating efficiency for total yield (90%~94%) and the enrichment factor reached 30~34. The foam flotation may be a simple and highly effective method for concentrating *Dunaliella salina* cells.

Key words: *Dunaliella salina* cell; foam flotation; enrichment factor; total yield