

一种小球藻的培养方法

申请号：[201010220906.6](#)

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 [102311920A](#)

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 102311920 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201010220906.6

(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 5 页

(54) 发明名称

一种小球藻的培养方法

(57) 摘要

本发明公开一种小球藻的培养方法,该方法包括如下内容:生物反应器内藻种液体积占培养基总体积的百分比为 5-15%,通入 CO₂含量为 5v%-15v% 的气体,通气量为 0.1-1.0vvm,培养温度自 25℃-40℃起在 0.5-10 天内降温至 0℃-15℃,于 0℃-15℃下继续恒温培养 5-15 天。本发明方法能够使微藻在低温下正常生长,提高微藻油脂积累量和 CO₂的利用效率。

1. 一种小球藻的培养方法,其特征在于包括如下内容:生物反应器内藻种液体积占培养基总体积的百分比为5-15%,通入CO₂含量为5v%-15v%的气体,通气量为0.1-1.0vvm,培养期间pH为7-10,培养温度自25℃-40℃起在0.5-10天内降温至0℃-15℃,于0℃-15℃下继续恒温培养5-15天。

2. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于:所述的培养温度自25℃-40℃起每0.5-5天匀速降温1-10℃,每降1-10℃恒温培养0.5-5天,直至降温至0-15℃。

3. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于:所述的培养温度自25℃-40℃起在0.5-10天内匀速降温至0℃-15℃。

4. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于:所述的生物反应器内搅拌速度为80-100rpm,光照强度为1000-6000lx。

5. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于:所述的培养基基本组成为每升水中含有0.10~0.50g的NaNO₃或KNO₃,0.05~0.10g的K₂HPO₄·3H₂O,0.05~0.10g的MgSO₄·7H₂O,0.01~0.05g的CaCl₂·2H₂O,0.05~0.5g的KH₂PO₄,0.01~0.05g的NaCl,10~40mL的土壤提取液,0.001~0.005g的FeCl₃·6H₂O,0.5~2mL的Fe-EDTA。

6. 如权利要求1或4所述的培养方法,其特征在于:所述的培养基内含有浓度为0.01~0.05mmol/L的Na₂SO₃。

7. 如权利要求1或4所述的培养方法,其特征在于:所述的培养基内含有浓度为0.5~1.0mL/L的微量元素混合液,每升微量元素混合液成份为H₃BO₃5.5~6.5g、ZnSO₄·7H₂O 4.0~5.0g、MnCl₂·H₂O 0.5~1.0g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.20~0.40g、CuSO₄·5H₂O 0.50~1.00g、Co(NO₃)₂·6H₂O 0.10~0.20g。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:含CO₂的气体是厌氧发酵或微氧发酵过程排放的尾气。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:含CO₂的气体是好氧微生物发酵过程的尾气脱氧处理后的气体,氧含量为低于8v%。

一种小球藻的培养方法

技术领域

[0001] 本发明属于微藻生物技术领域,涉及一种小球藻的培养方法。

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,需要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] 微藻的生产要消耗 CO₂, CO₂ 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 CO₂ 补给方式和装置。李夜光等“微藻养殖池补充二氧化碳装置”(申请号 200610018771.9)采用一种与养殖池相连的 CO₂ 补给装置,可以有效提高 CO₂ 利用率,但工艺繁琐,增加了设备投资。刘建国等“微藻规模培养的管道光生物反应器”(申请号 200410020978.0)及缪坚人等“一种微藻工业生产用光合生物反应器系统”(申请号 03128138.9)均采用在光生物反应器系统中加入一种装置方法,来实现 CO₂ 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的一种 CO₂ 补给方式,丛威等在“通过 PH 值反馈控制补碳培养微藻的方法”(申请号 200410009360.4)和“用于大规模微藻的补碳装置及其使用方法合用途”(申请号 200510126465.2)中使用烟道气补碳。

[0005] 现有技术中,通过 CO₂ 补给装置来实现较高的 CO₂ 溶解浓度,提高 CO₂ 的利用效率。此外,培养温度也是影响 CO₂ 溶解浓度的一个重要因素。目前一般的微藻在 25℃~35℃ 条件下培养,其 CO₂ 溶解度相差不大,当培养温度下降到 5℃~15℃ 以后,CO₂ 在培养液中的溶解度提高了 3~4 倍,这为微藻的培养提供了优先条件。但是,温度降低会严重影响微藻的生长速度,甚至使大部分微藻无法生长,因此,现有技术中关于在低温下培养微藻鲜有报道。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供一种微藻高效培养方法。本发明方法能够使微藻在低温下正常生长,提高微藻油脂积累量和 CO₂ 的利用效率。

[0007] 本发明微藻培养方法包括如下内容:生物反应器内藻种液体积占培养基总体积的百分比为 5~15%,通入 CO₂ 含量为 5v%~15v%的气体,通气量为 0.1~1.0vvm(每分钟通入单位体积容积内的单位体积量),培养期间 pH 为 7~10,培养温度自 25℃~40℃ 起在 0.5~10 天内降温至 0℃~15℃,于 0℃~15℃ 下继续恒温培养 5~15 天。

[0008] 本发明方法培养温度可以自 25℃~40℃ 起每 0.5~5 天匀速降温 1~10℃,每降

1-10℃恒温培养 0.5-5 天,直至降温至 0-15℃,也可以自 25℃ -40℃起在 0.5-10 天内匀速降温至 0℃ -15℃。

[0009] 本发明方法所述的生物反应器内搅拌速度为 80-100rpm,光照强度为 1000-6000lx。

[0010] 本发明方法藻种为一种小球藻,包括市场上普通小球藻,也可包括经过驯化后可以异养快速生长的异养小球藻。

[0011] 本发明方法所用培养基的基本组成如下:

[0012]

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

[0013] 本发明方法还可以在小白藻培养基中加入 0.01 ~ 0.05mmol/L 浓度的 Na₂SO₃ 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: H₃BO₃ 5.5 ~ 6.5g、ZnSO₄ • 7H₂O 4.0 ~ 5.0g、MnCl₂ • H₂O 0.5 ~ 1.0g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4H₂O 0.20 ~ 0.40g、CuSO₄ • 5H₂O 0.50 ~ 1.00g、Co(NO₃)₂ • 6H₂O 0.10 ~ 0.20g。

[0014] 本发明方法中,通入的含 CO₂ 的气体可以来自任意微生物发酵过程得到的含二氧化碳气体,最好是厌氧发酵或微氧发酵过程排放的尾气,对于好氧微生物发酵过程的尾气可以先进行脱氧处理,然后利用,如吸附脱氧处理等,氧含量优选为低于 8% (v),最优选为低于 5% (v)。典型的厌氧过程如克雷博士肺炎杆菌厌氧发酵生产 1,3- 丙二醇,初始通入的 99% N₂,菌体在厌氧状态下发酵,产生大量的 CO₂ 气体,一般尾气中含 CO₂ 的体积浓度为 10% 左右。典型的好氧过程如酵母菌发酵制乙醇的过程,该尾气通过吸附脱除部分氧气后可以使用。

[0015] 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:

[0016] 1、本发明方法通过适宜的温度控制和选用的合适的培养基及培养条件的协同作用使培养后的小球藻能在 0-15℃ 下正常生长,解决了现有技术中微藻生长缓慢,甚至无法生长的问题。

[0017] 2、本发明方法由于培养出的小球藻能够在 0-15℃ 下正常生长,此时培养液中所含 CO₂ 的浓度大大增加,提高了 CO₂ 的利用率,特别是在培养基中含有一定浓度的 Na₂SO₃ 和微量元素时,使小球藻中油脂的积累量明显提高,适合作为生物柴油的原料。

[0018] 3、本发明方法在保证 CO₂ 利用率的同时拓宽了小球藻适宜的生长温度,避免了小球藻养殖过程中对温度的控制和养殖小球藻对地域、时间的要求,例如在一年四季或者在我国北方温度较低的区域均可进行大面积养殖。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体实施例对本发明方法的技术方案作进一步的描述。本发明方法实施例中,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。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:

[0020] 表 1

[0021]

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

[0022] 实施例 1

[0023] 生物反应器内小球藻藻种液体积占培养基总体积的百分比为 10%,搅拌速度为 90rpm,光照强度为 3000lx,通入含 CO₂ 的气体是厌氧发酵或微氧发酵过程排放的尾气,CO₂ 含量为 10v% 的气体,通气量为 0.5vvm,培养期间 pH 为 7-10,培养温度自 30℃ 起每天匀速降温 5℃,每降 5℃ 恒温培养 1 天,直到温度降至 0℃,于 0℃ 下继续恒温培养 10 天。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 FY1T。将此小球藻纯种藻种从斜面中转移至摇瓶中在 5-15℃、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。

[0024] 实施例 2

[0025] 生物反应器内小球藻藻种液体积占培养基总体积的百分比为 15%,搅拌速度为 100rpm,光照强度为 2000lx,通入含 CO₂ 的气体是好氧微生物发酵过程的尾气脱氧处理后的气体,氧含量为低于 8v%, CO₂ 含量为 5v% 的气体,通气量为 1.0vvm,培养期间 pH 为 7-10,培养温度自 25℃起 6 日内匀速降温至 0℃,于 0℃下继续恒温培养 10 天。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 FY1T。将此小球藻纯种藻种从斜面中转移至摇瓶中在 5-15℃、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。

[0026] 实施例 3

[0027] 生物反应器内小球藻藻种液体积占培养基总体积的百分比为 5%,在培养基中添加 0.02mmol/L 的 Na₂SO₃ 和 0.8mL/L 的微量元素溶液,上述每升微量元素混合液成份如下: H₃BO₃ 6.0g、ZnSO₄·7H₂O 4.5g、MnCl₂·H₂O 0.75g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.35g、CuSO₄·5H₂O 0.75g、Co(NO₃)₂·6H₂O 0.15g,搅拌速度为 80rpm,光照强度为 3000lx,通入含 CO₂ 的气体是厌氧发酵或微氧发酵过程排放的尾气,CO₂ 含量为 15v% 的气体,通气量为 0.1vvm,培养期间 pH 为 7-10,培养温度自 35℃起 5 日内匀速降温至 10℃,于 10℃下继续恒温培养 10 天。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 FY1T。将此小球藻纯种藻种从斜面中转移至摇瓶中在 5-15℃、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。

[0028] 比较例 1

[0029] 出发藻种为自养小球藻 FY1,将此小球藻纯种藻种从斜面中转移至摇瓶中在 25-30℃、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。

[0030] 比较例 2

[0031] 出发藻种为自养小球藻 FY1,将此小球藻纯种藻种从斜面中转移至摇瓶中在 5-15℃、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。

[0032] 上述实施例实验结果如下表:

[0033] 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:

[0034]
$$y = 0.6856x \times 10^8 - 2.68 \times 10^6$$

[0035]

	藻干重	油脂含量	藻细胞浓度 ($\times 10^8$)
	(g/L)	(%)	个/mL)
实施例 1	1.18	37.8	0.7822
实施例 2	1.06	38.5	0.6999
实施例 3	1.14	40.1	0.7547
比较例 1	1.05	17.9	0.6931
比较例 2	0.16	10.2	0.0829

[0036]

[0037] 从上述实验结果可知,实施例 1-3 为适宜的温度控制和选用的合适的培养基及培养条件的协同作用培养后的小球藻藻种,4-5 为从自然界分离获得的一种自养小球藻藻种。两者相比,本发明方法获得的的小球藻藻种不仅可以在较低温度范围内正常生长,而且其固碳效果理想,所积累油脂含量为出发藻种的油脂积累量的二倍多。