

异养小球藻的半连续发酵方法

申请号：[201310031846.7](#)

申请日：2013-01-29

申请(专利权)人 [河南天冠企业集团有限公司](#) [清华大学](#)
地址 [473000 河南省郑州市南阳市生态工业园区天冠大道1号](#)
发明(设计)人 [毕生雷](#) [杜风光](#) [孙沛勇](#) [丁凌飞](#) [李勇](#) [周鹏](#) [银会娟](#) [吴庆余](#)
[卢悦](#)
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 [103060199A](#)
公开(公告)日 [2013-04-24](#)
专利代理机构 [郑州联科专利事务所\(普通合伙\)](#) [41104](#)
代理人 [王金](#) [田小伍](#)



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103060199 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201310031846. 7

C12R 1/89 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 29

(71) 申请人 河南天冠企业集团有限公司

地址 473000 河南省郑州市南阳市生态工业
园区天冠大道 1 号

申请人 清华大学

(72) 发明人 毕生雷 杜风光 孙沛勇 丁凌飞

李勇 周鹏 银会娟 吴庆余

卢悦

(74) 专利代理机构 郑州联科专利事务所 (普通
合伙) 41104

代理人 王金 田小伍

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

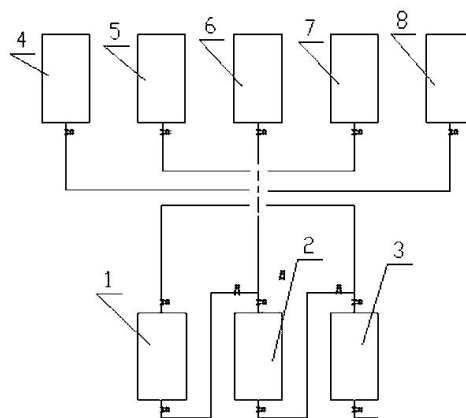
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

异养小球藻的半连续发酵方法

(57) 摘要

本发明公开了一种异养小球藻的半连续发酵方法,按以下步骤进行:a. 向一级发酵罐压入培养基并接种异养小球藻;重复培养—补充培养基的操作直到补加到一级发酵罐容积的 80%;b. 发酵液干重再次达到 50g/L 后,向二级发酵罐压入 50 ~ 70% 的发酵液;c. 向一级发酵罐和二级发酵罐压入灭过菌的培养基,任一发酵罐发酵液干重达 50g/L 后,再向该发酵罐补充培养基,直至发酵液体积达该发酵罐容积的 80%;d. 将二级发酵罐内的发酵液压入三级发酵罐,重复培养—补充培养基的操作,发酵完成后压到后续处理;本方法满足了比较大的培养基/种子比例要求。减少了细胞生长的不适应性,使细胞生长更快,减少了停滞期,适于进行半连续发酵生产。



1. 异养小球藻的半连续发酵方法,方法的特征是按以下步骤进行:

a. 一级发酵罐(1)空消、降温后,培养基罐(8)向一级发酵罐(1)压入灭过菌的培养基,然后接种异养小球藻;接种后一级发酵罐内发酵液体积为一级发酵罐(1)容积的30~50%;经过培养,发酵液干重达到50g/L后,培养基罐(8)继续向一级发酵罐(1)补充灭过菌的培养基,补充培养基的比例占发酵罐内发酵液体积的10~30%;经过培养,发酵液干重再次达到50g/L后,继续向一级发酵罐(1)按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直到补加到一级发酵罐(1)容积的80%;

b. 经过培养,发酵液干重再次达到50g/L后,一级发酵罐(1)向空消并降温后的二级发酵罐(2)压入发酵液,压入发酵液的比例占一级发酵罐(1)发酵液体积的50~70%;

c. 压料后,培养基罐(8)向一级发酵罐(1)和二级发酵罐(2)分批压入灭过菌的培养基,每次补充培养基的比例占各发酵罐内发酵液体积的10~30%;经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐(8)向该发酵罐按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的80%;

d. 经过培养,二级发酵罐(2)内的发酵液干重达到50g/L后,将二级发酵罐(2)内的发酵液压入三级发酵罐(3),压入发酵液占二级发酵罐(2)发酵液体积的50~70%,之后,一级发酵罐(1)向二级发酵罐(2)压入占一级发酵罐体积50~70%的发酵液;

然后培养基罐向一级发酵罐(1)、二级发酵罐(2)、三级发酵罐(3)分批压入灭过菌的培养基,培养基罐每次向任一发酵罐补充培养基的比例分别占该发酵罐内发酵液体积的10~30%,经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到50g/L后,再向该发酵罐按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的80%;

三级发酵罐(3)中的发酵液体积达到该发酵罐容积的80%,且三级发酵罐(3)内发酵液干重再次达到50g/L后,直接压到后续处理;

除任一发酵罐刚接种时、任一级发酵罐刚接收上一级发酵罐压过来的发酵液时两种情形外,上述发酵过程中向任一发酵罐内补充培养基时要保证每次补充培养基后发酵液中的干物质含量高于30g/L;

上述发酵过程中,任一级发酵罐向下一级发酵罐压入发酵液后,如果下一级发酵罐内发酵液体积不足该发酵罐容积的30%,应当立即补加培养基,使该级发酵罐内发酵液体积一次性补加到发酵罐容积的30%;上述一次性补充培养基时,补充培养基的体积不受发酵罐内发酵液体积的10~30%的限制;

在各级发酵罐培养过程中,必要时分别通过碳源罐(5)、氮源罐(6)、碱液罐(4)、泡敌罐(7)通过连接管路向各级发酵罐注入碳源、氮源、碱液、泡敌,补加的方法是:通过取样分析,当碳源低于20g/L时就补加碳源达到40g/L,同时按照碳源:氮源=10:1的比例补加氮源;当任一发酵罐内有泡沫时则对该发酵罐补加泡敌,一次补加泡敌的量为该发酵罐发酵液体积的5%;当PH低于7时则向发酵液里补加碱液;各级发酵罐的发酵温度为36度。

异养小球藻的半连续发酵方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种异养小球藻的半连续发酵方法,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 异养小球藻生产技术是通过控制小球藻的新陈代谢、破除生产环境限制,从而达到提高生产效率、获得更多的油脂的方法。

[0003] 目前异养小球藻主要是单罐生产,扩培的方法是一级发酵结束全部压送到下一级发酵罐做种子,直到最后一级发酵结束后进行处理。目前尚没有连续或者半连续的发酵方法。

[0004] 异养小球藻生长缓慢,如果接种量过小,甚至需要生长一个月。这么长的生长时间导致发酵过程中进入任何一个杂菌都有可能导致发酵失败,从而影响正常生产、导致巨大的经济损失。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种生长周期短的异养小球藻的半连续发酵方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明的异养小球藻的半连续发酵方法按以下步骤进行:

a. 一级发酵罐(1)空消、降温后,培养基罐(8)向一级发酵罐(1)压入灭过菌的培养基,然后接种异养小球藻;接种后一级发酵罐内发酵液体积为一级发酵罐(1)容积的30~50%;经过培养,发酵液干重达到50g/L后,培养基罐(8)继续向一级发酵罐(1)补充灭过菌的培养基,补充培养基的比例占发酵罐内发酵液体积的10~30%;经过培养,发酵液干重再次达到50g/L后,继续向一级发酵罐(1)按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直到补加到一级发酵罐(1)容积的80%;

b. 经过培养,发酵液干重再次达到50g/L后,一级发酵罐(1)向空消并降温后的二级发酵罐(2)压入发酵液,压入发酵液的比例占一级发酵罐(1)发酵液体积的50~70%;

c. 压料后,培养基罐(8)向一级发酵罐(1)和二级发酵罐(2)分批压入灭过菌的培养基,每次补充培养基的比例占各发酵罐内发酵液体积的10~30%;经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐(8)向该发酵罐按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的80%;

d. 经过培养,二级发酵罐(2)内的发酵液干重达到50g/L后,将二级发酵罐(2)内的发酵液压入三级发酵罐(3),压入发酵液占二级发酵罐(2)发酵液体积的50~70%,之后,一级发酵罐(1)向二级发酵罐(2)压入占一级发酵罐体积50~70%的发酵液;然后培养基罐向一级发酵罐(1)、二级发酵罐(2)、三级发酵罐(3)分批压入灭过菌的培养基,培养基罐每次向任一发酵罐补充培养基的比例分别占该发酵罐内发酵液体积的10~30%,经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到50g/L后,再向该发酵罐按其内发酵液体积的10~30%补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的80%;三级发酵罐(3)中的发酵液体积达到该发酵罐容积的80%,且三级发酵罐(3)内发酵液干重再次达到50g/L后,直接压到后续处理;除任一发酵罐刚接种时、任一级发酵罐刚接收上一级发酵罐压过来的发酵液时两种情

形外,上述发酵过程中向任一发酵罐内补充培养基时要保证每次补充培养基后发酵液中的干物质含量高于 30g/L;上述发酵过程中,任一级发酵罐向下一级发酵罐压入发酵液后,如果下一级发酵罐内发酵液体积不足该发酵罐容积的 30%,应当立即补加培养基,使该级发酵罐内发酵液体积一次性补加到发酵罐容积的 30%;上述一次性补充培养基时,补充培养基的体积不受发酵罐内发酵液体积的 10 ~ 30% 的限制;在各级发酵罐培养过程中,必要时分别通过碳源罐(5)、氮源罐(6)、碱液罐(4)、泡敌罐(7)通过连接管路向各级发酵罐注入碳源、氮源、碱液、泡敌,补加的方法是:通过取样分析,当碳源低于 20g/L 时就补加碳源达到 40g/L,同时按照碳源:氮源=10:1 的比例补加氮源;当任一发酵罐内有泡沫时则对该发酵罐补加泡敌,一次补加泡敌的量为该发酵罐发酵液体积的 5%;当 PH 低于 7 时则向发酵液里补加碱液;各级发酵罐的发酵温度为 36 度。

[0007] 本发明的有益之处在于:少量的培养基补加到发酵液(发酵液中已含有较多的异养小球藻)中去,相比以往将发酵液全部压出后再重新加入培养基培养的方式,满足了比较大的培养基/种子比例要求。由于每次仅有少量培养基补加到发酵液中去,因此减少了细胞生长的不适应性,使细胞生长更快,减少了停滞期,解决了因为接种量小、生物质生长缓慢造成的发酵异常问题,适于进行半连续发酵生产。由于本发明的异养小球藻的半连续发酵方法能够加快细胞生长速度,缩短生长周期,因此相应也降低了生产周期中进入杂菌导致发酵失败的风险。

附图说明

[0008] 图 1 是本发明的结构示意图。

具体实施方式

[0009] 为了加深对本发明的理解,特结合实施例和附图对本发明作进一步的详述,下述实施例仅限于对本发明的解释。

[0010] 如图 1 所示,本发明的异养小球藻的半连续发酵方法所用到的发酵系统包括通过管路连接在一起的培养基罐 8、氮源罐 6、碳源罐 5、泡敌罐 7、碱液罐 4、一级发酵罐 1、二级发酵罐 2 和三级发酵罐 3。

[0011] 生产开始前,培养基罐 8、氮源罐 6、碳源罐 5、泡敌罐 7 配料实消后降温保压备用。碱液罐 4 配好后降温备用。

[0012] 实施例一

本实施例的异养小球藻的半连续发酵方法按以下步骤进行:

a. 一级发酵罐(500L)经过空消、降温后,通过培养基罐补加 150L 培养基,接入 100L 种子(接种后一级发酵罐内发酵液体积为一级发酵罐容积的 50% 即 250L);经过培养,待发酵液干重达到 50g/L (克/升)后,再通过培养基罐补加 30L (补充培养基的比例占一级发酵罐内发酵液体积的 12%,补加以后干重为 44.64g/L) 培养基,经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 60L (补充培养基的比例占发酵罐内发酵液体积的 21.4%,补加以后干重为 41.18g/L) 培养基,经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 60L (补充培养基的比例占发酵罐内发酵液体积的 17.6%,补加以后干重为 42.5g/L) 培养基,此时发酵液体积达到 400L (即一级发酵罐容积的 80%)。

[0013] b. 经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,开始由一级发酵罐向空消并降温后的二级发酵罐(500L)压入 280L(压入发酵液的比例占一级发酵罐发酵液体积的 70%)发酵液。

[0014] 按照本方法完成一级发酵(即 500L 发酵)完成需要 6 天,正常情况下 500L 发酵需要 15 天。

[0015] c. 此时一级发酵罐还剩余 120L 发酵液,通过培养基罐补加 30L(使初始发酵液体积达到发酵罐容积的 30%)培养基,经过培养,发酵液干重达到 50g/L 后,再通过培养基罐向一级发酵罐补加 30L(补充培养基的比例占一级发酵罐内发酵液体积的 20%,补加以后干重为 41.67g/L)培养基,经过培养,发酵液干重达到 50g/L 后,再通过培养基罐补加 40L 培养基(原有 165L,补加 22.22% 补加以后干重为 40.9g/L);每次补充培养基的比例占各发酵罐内发酵液体积的 10 ~ 30%,以此方法重复补加培养基和进行培养的操作,直到发酵液体积达到 400L 且发酵液干重达到 50g/L 后,再次向二级发酵罐压入 280L 发酵液。

[0016] 所述 b 步骤结束后,二级发酵罐有 280L 发酵液,通过培养基罐补加 30L 培养基(原有 280L,补加 10.7%,补加以后干重为 45.17g/L);经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 60L 培养基(原有 310L,补加 19.4% 补加以后干重为 41.89g/L);每次补充培养基的比例占各发酵罐内发酵液体积的 10 ~ 30%,以此方法重复补加培养基和进行培养的操作,直到二级发酵罐内发酵液体积达到 400L。

[0017] d. 经过培养,二级发酵罐内的发酵液干重达到 50g/L 后,向三级发酵罐(500L)压入 280L 发酵液,压入发酵液的比例占二级发酵罐发酵液体积的 70%;再由一级发酵罐向二级发酵罐压入占一级发酵罐体积 50 ~ 70% 的发酵液。

[0018] 然后培养基罐向一级发酵罐、二级发酵罐、三级发酵罐分批压入灭过菌的培养基,培养基罐每次向任一发酵罐补充培养基的比例分别占该发酵罐内发酵液体积的 10 ~ 30%,经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,再向该发酵罐按其内发酵液体积的 10 ~ 30% 补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%;

按照本方法完成二级发酵(即 500L 发酵)完成需要 6 天,正常情况下 500L 发酵需要 15 天。

[0019] 三级发酵罐中的发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%,且三级发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,直接将发酵液压到后续处理。

[0020] 其中,发酵过程中向任一发酵罐内补充培养基时要保证每次补充培养基后发酵液中的干物质含量高于 30g/L;这里对补料的限制具有两种例外情形,一种是任一发酵罐刚接种时,第二种是任一级发酵罐刚接收上一级发酵罐压过来的发酵液时。除此两种例外情形外,发酵过程中补料时均应遵守上述补料限制。

[0021] 上述发酵过程中,任一级发酵罐向下一级发酵罐压入发酵液后,如果下一级发酵罐内发酵液体积不足该发酵罐容积的 30%,应当立即补加培养基,使该级发酵罐内发酵液体积一次性补加到发酵罐容积的 30%。

[0022] 在各级发酵罐培养过程中,必要时,分别通过碳源罐(5)、氮源罐(6)、碱液罐(4)、泡敌罐(7)通过连接管路向各级发酵罐注入碳源、氮源、碱液、泡敌,以维持发酵液的营养成份及异养小球藻的正常生长;补加的方法是:通过取样分析,当碳源低于 20g/L 时就补加碳源达到 40g/L,同时按照碳源:氮源=10:1 的比例补加氮源;当任一发酵罐内有泡沫时则对该发酵罐补加的泡敌,一次补加泡敌的量为该发酵罐发酵液体积的 5%;

当PH低于7时则向发酵液里补加碱液;各级发酵罐的发酵温度为36度,当温度偏离36度时则需要调节温度。

[0023] 当然,本实施例中发酵罐的级数也可以超出附图所示的三级的限制,可以根据需要增加发酵罐的级数,并按上述发酵方法进行发酵。

[0024] 按照现有技术中的发酵方法,单个500L罐装培养基300L,使用卡氏罐接种10L,需要生长15天才能达到要求并将发酵液压到后续处理。使用本实施例的方法,生长周期最多只需要10天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,如果使用本实施例的技术方案可以节约34%的能源消耗。

[0025] 按照现在技术中的发酵方法,同时开展两个500L罐装培养基300L,使用卡氏罐接种10L,需要同时生长15天才能达到要求并将发酵液压到后续处理。使用本实施例的方法,生长周期最多只需要15天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,如果使用本实施例的技术方案可以至少节约50%的能源消耗。

[0026] 实例二

本实施例的异养小球藻的半连续发酵方法按以下步骤进行:

a. 一级发酵罐(500L)经过空消、降温后,通过培养基罐补加100L培养基,接入100L种子(接种后一级发酵罐内发酵液体积为一级发酵罐容积的40%即200L);经过培养,待发酵液干重达到50g/L(克/升)后,再通过培养基罐补加60L(原有200L,补加30%,补加以后干重为38.46g/L)培养基,经过培养,待发酵液干重达到50g/L,再通过培养基罐补加60L(原有260L,补加23%,补加以后干重为40.62g/L)培养基,经过培养,待发酵液干重达到50g/L,再通过培养基罐补加80L(原有320L,补加25%,补加以后干重为40g/L)培养基,此时发酵液体积达到400L(即一级发酵罐容积的80%)。

[0027] 按照本方法完成一级发酵(即500L发酵)完成需要5天,正常情况下500L发酵需要15天。

[0028] b. 经过培养,待发酵液干重达到50g/L,开始由一级发酵罐向空消并降温后的二级发酵罐(500L)压入200L(压入发酵液的比例占一级发酵罐发酵液体积的50%)发酵液;

c. 此时一级发酵罐还剩余200L发酵液,通过培养基罐补加60L(原有200L,补加30%,补加以后干重为38.46g/L)培养基,经过培养,发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐向一级发酵罐补加60L(原有260L,补加23%补加以后干重为40.63g/L)培养基,经过培养,发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐补加80L培养基(原有320L,补加25%补加以后干重为40g/L);此时发酵液体积达到400L。经过培养,待发酵液干重达到50g/L后,再次向二级发酵罐压送200L发酵液。

[0029] 所述b步骤结束后,二级发酵罐有200L发酵液,通过培养基罐补加60L(原有200L,补加30%,补加以后干重为38.46g/L)培养基,经过培养,发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐向一级发酵罐补加60L(原有260L,补加23%补加以后干重为40.63g/L)培养基,经过培养,发酵液干重达到50g/L后,再通过培养基罐补加80L培养基(原有320L,补加25%补加以后干重为40g/L);此时发酵液体积达到400L。

[0030] d. 经过培养,二级发酵罐内的发酵液干重达到50g/L后,向三级发酵罐(500L)压入200L发酵液,压入发酵液的比例占二级发酵罐发酵液体积的50%;再由一级发酵罐向二级发酵罐压入占一级发酵罐体积50~70%的发酵液。

[0031] 然后培养基罐向一级发酵罐、二级发酵罐、三级发酵罐分批压入灭过菌的培养基,培养基罐每次向任一发酵罐补充培养基的比例分别占该发酵罐内发酵液体积的 10 ~ 30%,经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,再向该发酵罐按其内发酵液体积的 10 ~ 30% 补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%。

[0032] 按照本方法完成一级发酵(即 500L 发酵)完成需要 5 天,正常情况下 500L 发酵需要 15 天。

[0033] 三级发酵罐中的发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%,且三级发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,直接将发酵液压到后续处理。

[0034] 其中,发酵过程中向任一发酵罐内补充培养基时要保证每次补充培养基后发酵液中的干物质含量高于 30g/L;这里对补料的限制仅限任一发酵罐的发酵过程,至于刚接种时、N 级罐向 N+1 级罐首次转移发酵液时则不在此限制范围内。

[0035] 上述发酵过程中,任一级发酵罐向下一级发酵罐压入发酵液后,如果下一级发酵罐内发酵液体积不足该发酵罐容积的 30%,应当立即补加培养基,使该级发酵罐内发酵液体积一次性补加到发酵罐容积的 30%;

当然,本实施例中发酵罐的级数也可以超出附图所示的三级的限制,可以根据需要增加发酵罐的级数,并按上述发酵方法进行发酵。

[0036] 在各级发酵罐培养过程中,必要时,分别通过碳源罐(5)、氮源罐(6)、碱液罐(4)、泡敌罐(7)通过连接管路向各级发酵罐注入碳源、氮源、碱液、泡敌,以维持发酵液的营养成份及异养小球藻的正常生长;补加的方法是:通过取样分析,当碳源低于 20g/L 时就补加碳源达到 40g/L,同时按照碳源:氮源=10:1 的比例补加氮源;当任一发酵罐内有泡沫时则对该发酵罐补加的泡敌,一次补加泡敌的量为该发酵罐发酵液体积的 5%;

当 PH 低于 7 时则向发酵液里补加碱液;各级发酵罐的发酵温度为 36 度,当温度偏离 36 度时则需要调节温度。

[0037] 按照现有技术中的发酵方法,500L 罐装培养基 300L,使用卡氏罐接种 10L,需要生长 15 天才能达到要求并将发酵液压到后续处理。使用本实施例的方法,生长周期最多只需要 7 天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,如果使用本实施例的技术方案可以节约 50% 的能源消耗。

[0038] 按照现有技术中的发酵方法,500L 罐装培养基 300L,使用卡氏罐接种 10L,需要生长 15 天才能达到要求并将发酵液压到后续处理。使用本实施例的方法,生长周期最多只需要 12 天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,如果使用本实施例的技术方案可以节约 60% 的能源消耗。

[0039] 实例三、

本实施例的异养小球藻的半连续发酵方法按以下步骤进行:

a. 一级发酵罐(50L)经过空消、降温后,通过培养基罐补加 5L 培养基,接入 10L 种子(接种后一级发酵罐内发酵液体积为一级发酵罐容积的 30%);经过培养,待发酵液干重达到 50g/L (克/升)后,再通过培养基罐补加 4L (原有 15L,补加 27%,补加以后干重为 39.47g/L) 培养基,经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 5L (原有 19L,补加 26%,补加以后干重为 39.58g/L) 培养基,经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 7L (原有 24L,补加 29%,补加以后干重为 38.71g/L) 培养基,经过培养,待发酵液

干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 9L(原有 31L,补加 29%,补加以后干重为 38.75g/L),此时发酵液体积达到 40L(即一级发酵罐容积的 80%)。

[0040] b. 经过培养,待发酵液干重达到 50g/L,开始由一级发酵罐向空消并降温后的二级发酵罐(500L)压入 28L(压入发酵液的比例占一级发酵罐发酵液体积的 70%)发酵液;

按照本方法完成一级发酵(即 50L 发酵)完成需要 5 天,正常情况下 50L 发酵需要 7 天。

[0041] c. 此时一级发酵罐还剩余 12L 发酵液,再通过培养基罐补加 3L 培养基(原有 12L,补加 25%,补加以后干重为 40g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 4L 培养基(原有 15L,补加 26.67%,补加以后干重为 39.47g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 5L 培养基(原有 19L,补加 26%,补加以后干重为 39.58g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 7L 培养基(原有 24L,补加 29%,补加以后干重为 38.71g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 9L 培养基(原有 31L,补加 29%,补加以后干重为 38.75g/L),经过培养,发酵液体积达到 40L 且发酵液干重达到 50g/L 后再次向二级发酵罐压 28L 发酵液;

所述 b 步骤结束后,二级发酵罐有 28L 发酵液,通过培养基罐补加 122L 培养基使得初始发酵液体积为发酵罐容积的 30%,经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 45L 培养基(原有 150L,补加 30%,补加以后干重为 38.46g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 50L 培养基,(原有 195L,补加 26%,补加以后干重为 39.8g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 50L 培养基,(原有 245L,补加 20%补加以后干重为 41.52g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 50L 培养基,(原有 295L,补加 16.95%,补加以后干重为 42.75g/L),经过培养,发酵液干重达到 50g/L,再通过培养基罐补加 55L 培养基,(原有 345L,补加 15.94%补加以后干重为 43.13g/L),发酵液体积达到 400L,继续培养到发酵液干重达到 50g/L,开始向三级发酵罐(5000L)压 280L 发酵液;压入发酵液的比例占二级发酵罐发酵液体积的 70%;再由一级发酵罐向二级发酵罐压入占一级发酵罐体积 50~70% 的发酵液。

[0042] 然后按照上述方法,通过培养基罐向一级发酵罐、二级发酵罐、三级发酵罐分批压入灭过菌的培养基,培养基罐每次向任一发酵罐补充培养基的比例分别占该发酵罐内发酵液体积的 10~30%,经过培养,任一发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,再向该发酵罐按其内发酵液体积的 10~30% 补充灭过菌的培养基,直至发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%;

按照本方法完成二级发酵(即 500L 发酵)完成需要 12 天,正常情况下 500L 发酵需要 15 天。

[0043] 三级发酵罐中的发酵液体积达到该发酵罐容积的 80%,且三级发酵罐内发酵液干重达到 50g/L 后,直接将发酵液压到后续处理。

[0044] 其中,发酵过程中向任一发酵罐内补充培养基时要保证每次补充培养基后发酵液中的干物质含量高于 30g/L;这里对补料的限制仅限任一发酵罐的发酵过程,至于刚接种时、N 级罐向 N+1 级罐首次转移发酵液时则不在此限制范围内。

[0045] 上述发酵过程中,任一级发酵罐向下一级发酵罐压入发酵液后,如果下一级发酵罐内发酵液体积不足该发酵罐容积的 30%,应当立即补加培养基,使该级发酵罐内发酵液体积一次性补加到发酵罐容积的 30%。

[0046] 在各级发酵罐培养过程中,必要时,分别通过碳源罐(5)、氮源罐(6)、碱液罐(4)、泡敌罐(7)通过连接管路向各级发酵罐注入碳源、氮源、碱液、泡敌,以维持发酵液的营养成份及异养小球藻的正常生长;补加的方法是:通过取样分析,当碳源低于 20g/L 时就补加碳源达到 40g/L,同时按照碳源:氮源=10:1 的比例补加氮源;当任一发酵罐内有泡沫时则对该发酵罐补加的泡敌,一次补加泡敌的量为该发酵罐发酵液体积的 5%。

[0047] 当 PH 低于 7 时则向发酵液里补加碱液;各级发酵罐的发酵温度为 36 度,当温度偏离 36 度时则需要调节温度。

[0048] 当然,本实施例中发酵罐的级数也可以超出附图所示的三级的限制,可以根据需要增加发酵罐的级数,并按上述发酵方法进行发酵。

[0049] 按照现有技术中的发酵方法,单个 500L 罐装培养基 300L,使用卡氏罐接种 10L,需要生长 15 天才能达到要求并将发酵液压到后续处理。使用本实施例的方法,生长周期最多只需要 12 天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,使用本实施例的技术方案虽然需要一个 50L 种子培养过程,但是仍然可以节约 17% 的能源消耗。

[0050] 按照现有技术中的发酵方法,单个 50L 罐装培养基 20L,使用卡氏罐接种 10L,需要生长 7 天才能达到要求、单个 500L 罐装培养基 300L,使用卡氏罐接种 10L,需要生长 15 天才能达到要求并将发酵液压到后续处理,总共需要 22 天。使用本实施例的方法,50L 和 500L 总生长周期最多只需要 12 天。另外,因为发酵过程中间,要不停的通风、搅拌,需要消耗大量的风、电,使用本实施例的技术方案虽然需要一个 50L 种子培养过程,但是仍然可以节约 17% 的能源消耗。

[0051] 本发明的半连续发酵方法的特点之一在于各培养装置培养达到培养目标后不是将其内的全部发酵液压出,而是压出 50 ~ 70% (体积比);压出后补料时,每次补充的培养基占该培养装置内现有发酵液的 10 ~ 30% (体积比),培养至细胞干重 >50 克 / 升后继续补充 10 ~ 30% (体积比) 的培养基,直到培养液占该培养装置容积的 80%。这样每次仅有少量培养基补加到发酵液中去,减少了细胞生长的不适应性,减少了停滞期;同时比较大的培养基 / 种子比例使细胞生长更快,进一步提高了培养(生产)效率。

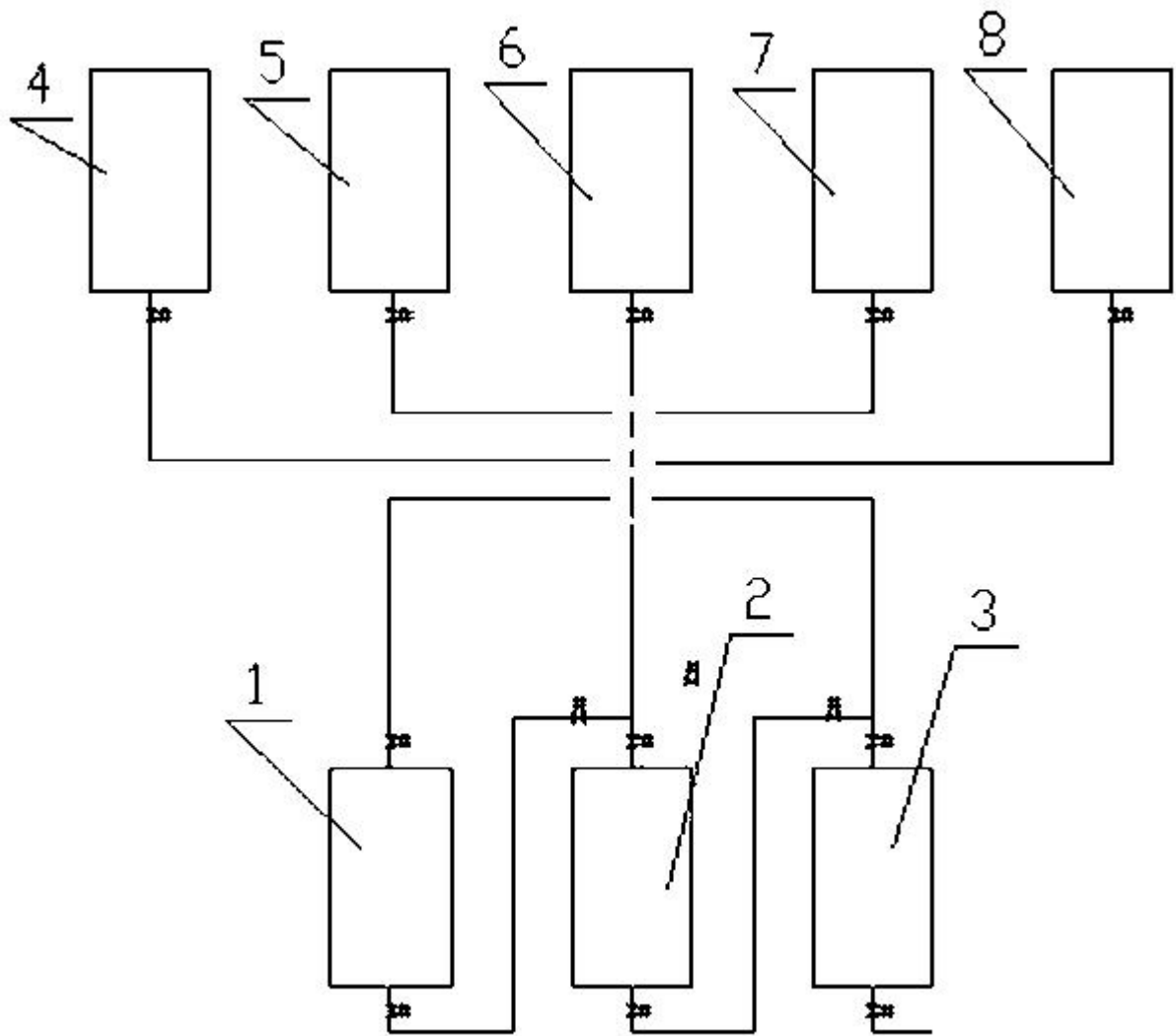


图 1