

高密度高品质培养小球藻的方法

申请号：[200610025618.9](#)

申请日：2006-04-12

申请(专利权)人 [华东理工大学](#) [上海泽元海洋生物技术有限公司](#)

地址 [200237上海市梅陇路130号](#)

发明(设计)人 [李元广](#) [李兴武](#) [沈国敏](#) [钱峰慧](#) [安洋](#) [魏鸿刚](#) [王伟](#)

主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)

分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#) [A23K1/16\(2006.01\)I](#) [A23L1/337\(2006.01\)I](#)

公开(公告)号 [1837351](#)

公开(公告)日 [2006-09-27](#)

专利代理机构 [上海专利商标事务所有限公司](#)

代理人 [范征](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610025618.9

[51] Int. Cl.

C12N 1/12 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23L 1/337 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 9 月 27 日

[11] 公开号 CN 1837351A

[22] 申请日 2006.4.12

[21] 申请号 200610025618.9

[71] 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市梅陇路 130 号

共同申请人 上海泽元海洋生物技术有限公司

[72] 发明人 李元广 李兴武 沈国敏 钱峰慧
安 洋 魏鸿刚 王 伟

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 6 页

[54] 发明名称

高密度高品质培养小球藻的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种高密度高品质培养小球藻的方法，该培养方法包括生物反应器高密度异养培养、高密度藻液的稀释和光自养培养三个阶段。用本发明方法可使小球藻在较短的培养周期里细胞密度达到高密度培养的水平，还可使小球藻的品质与异养培养相比有较大幅度提高，达到了光自养培养时的水平，从而实现了小球藻高密度高品质的培养。

1. 一种培养小球藻的方法, 其特征在于, 该培养方法包括以下步骤:

a) 在生物反应器中进行异养培养: 在生物反应器中加入 pH 为 6.0~7.0 的培养基, 按工作体积的 5~10% 接入小球藻藻种进行补料分批培养, 培养温度为 28~32℃, 控制 pH 小于 8.5, 控制溶氧在 15% 以上, 至小球藻细胞密度最高时结束培养;

b) 藻液稀释: 用培养基将步骤 a) 获得的藻液稀释至细胞密度为 5-25 克/升, 所述培养基不含有机碳源, 其 pH 为 6.0~7.0;

c) 光自养培养: 将步骤 b) 获得的稀释液转入光自养培养, 培养温度为 17~42℃, 光照强度为 5~60klx, 光自养培养周期为 30~40 小时。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述小球藻选自普通小球藻和蛋白核小球藻。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 b) 中的培养基为不含有机碳源的步骤 a) 的培养基, 且其中氮源浓度为 2~10 克/升。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 在溶氧供应良好且全封闭的机械搅拌式生物反应器中进行, 步骤 c) 在选自封闭式光生物反应器、开放式大池的光自养培养装置中进行。

5. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 步骤 a) 在葡萄糖完全消耗后结束。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 a) 中, 当培养基的 pH 高于 8.5 时用酸进行调节。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 在步骤 a) 中, 在接种后 27~33 小时进行补料, 之后每隔 5~8 小时进行补料, 补料是加入碳源葡萄糖及氮源溶液, 葡萄糖的补加浓度为使培养液中葡萄糖浓度达到 15-25 克/升, 氮源浓度达到 3-4 克/升。

8. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 当小球藻为普通小球藻时, 步骤 a) 中的所述异养培养的培养基基本上由以下成分组成: KNO_3 7~11 克/升、葡萄糖 25~35 克/升、 KH_2PO_4 0.6~0.8 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.7~2.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6~0.8 克/升、 CaCl_2 0.1~0.2 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.03 克/升; 微量元素 0.5~2ml, 其中微量元素的组成为 H_3BO_3 11~12 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5~9.5 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4~1.5 克/升, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8~0.9 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5~1.6 克

/升, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.45~0.55 克/升; 水。

9. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 当小球藻为蛋白核小球藻时, 步骤 a) 中的所述异养培养的基本上由以下成分组成: 葡萄糖 27-30 克/升, 尿素 4.5-5 克/升, KH_2PO_4 1-1.5 克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1-1.5 克/升, CaCl_2 0.07-0.1 克/升, 柠檬酸三钠 0.1-0.3 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.5-1 mL, A5 溶液 3-3.5mL; 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24-26 克/升和 EDTA 32-35 克/升; A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.8-2.9 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.7-1.9 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2-0.25 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05-0.1 克/升, Na_2MoO_4 0.02-0.25 克/升; 水。

10. 用权利要求 1 所述的方法获得的小球藻培养物在制备保健食品或饲料添加剂中的用途。

高密度高品质培养小球藻的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及一种适合用于小球藻高密度高品质培养的方法。

背景技术

人们对小球藻的研究历史较长，其中普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）和蛋白核小球藻（*Chlorella pyrenoidosa*）是研究的较多的藻种，也是目前商业化生产普遍采用的藻种。

目前，小球藻常用的培养方式有两种：开放式户外大池光自养培养和发酵罐异养培养。开放式户外大池培养是目前商业化大规模生产常用的方法，虽然其成本低，但由于细胞密度低、易污染、占地面积大等缺点，使其发展受到很大限制。异养培养目前基本上处于实验室研发阶段，其虽可较大幅度地提高藻细胞密度，但获得的藻体与光自养培养相比其蛋白质和色素的含量明显下降，即品质降低，不具有光自养培养的小球藻的应用价值。Atev.A(1981)异养培养普通小球藻 A2（*Chlorella vulgaris* A2）时发现胞内叶绿素、蛋白质、类胡萝卜素、尼克酸的含量均比光自养生长时要低，胞内氨基酸除赖氨酸和酪氨酸含量高于光自养生长，其它氨基酸含量均低于光自养培养（Atev A., Manova A. Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* A2. Dokl. Bolg. Akad. Nauk,(English)1981,34(5): 687~690）。张大兵等（1996）发现从自养模式转化为异养模式时蛋白核小球藻（*Chlorella prototuecoides*）细胞内叶绿素消失，总蛋白含量减少，仅为光自养培养的 1/5（张大兵，吴庆余. 小球藻细胞的异养转化. 植物生理学通报, 1996, 32(2): 140~144）。James. C. Ogbonna 等（1997）异养培养蛋白核小球藻 C-212(*Chlorella pyrenoidosa* C-212)也证实了类似的实验结果(Ogbonna J.C., Masui. H., Tanaka.H. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation—an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. J. Appl. Phycol.1997 ,9, 359~366)。潘欣等（2002）异养培养椭圆小球藻，也发现蛋白含量减少（潘欣，李建宏，戴传超，等. 小球藻异养培养的研究. 食品科学, 2002, 23(4): 28~33）。由上可见，对于小球藻属中常用的三个种（即普通小球藻、蛋白核小球藻、椭圆小球藻）在异养培养时均存在品质下降问题。因此，在实现高密度培养时如何保持其高品质，是小球藻培养技术中一个亟待解决的重要问题。

James. C. Ogonna 等(1997)采用 Endo 培养基异养—光自养串联培养蛋白核小球藻 C-212 (*Chlorella pyrenoidosa* C-212)可使藻体蛋白质和叶绿素含量得到较大幅度的提高(Ogonna J.C., Masui. H., Tanaka.H. Sequential heterotrophic: autotrophic cultivation—an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. J. Appl. Phycol.1997 ,9, 359~366.)。但从工业化大规模生产角度来看, Ogonna 等建立的培养系统和培养工艺存在以下三方面难以解决的问题: 1) U 型管式光生物反应器规模较大时存在易碎、不便于清洗、氧气解析缓慢等问题,难以放大; 2) 异养—光自养串联培养过程中异养培养系统(可在位蒸汽灭菌)与光自养培养系统直接相连接,容易染菌,在大规模培养时无法实现无菌操作; 3) 连续培养工艺极易污染杂菌,在工业化生产中基本上不使用,采用更多的是分批补料培养工艺。文献中未见小球属中其它种的高密度高品质培养的报道。

本发明者首先采用 Ogonna 等使用的培养基和培养方法对普通小球藻进行探索性实验,结果表明培养结束时普通小球藻藻细胞密度仅为 4.68g/L,藻体蛋白质和叶绿素分别仅为 23.3%和 1.2%,不能实现普通小球藻高密度高品质培养。这说明采用 Ogonna 等使用的培养基和培养方法并不能通用于其它种的小球藻的高密度高品质培养。因此有必要对小球藻高密度高品质培养的方法展开深入研究。

发明内容

实现小球藻高密度高品质培养可从三个方面着手:一是选择合适的培养基,二是选择合适的培养系统,三是建立合适的培养工艺。本发明主要以普通小球藻为研究对象,建立了一种小球藻高密度高品质培养的方法,并将该方法应用于蛋白核小球藻高密度高品质培养。申请人的另一项发明专利申请已给出了适合于普通小球藻高密度高品质培养的培养基组合物(李元广,李兴武,沈国敏,等.一种适合于普通小球藻高密度高品质培养的培养基组合物.中国发明专利,申请号:200610024004.9,该文纳入本文作为参考),本发明中培养普通小球藻采用的培养基即为该培养基组合物,本发明中培养蛋白核小球藻采用的培养基为 Ogonna 等使用的 Endo 培养基。

本发明的目的是提供一种适用于小球藻高密度高品质培养的培养方法。该培养方法可使小球藻达到高密度培养的前提下,藻体品质与异养培养相比有较大幅度提高,培养结束时达到光自养培养时的水平。

为实现上述目的,本发明提供了一种用于高密度高品质培养小球藻的培养方法,所述培养方法包括生物反应器高密度异养培养、高密度藻液的稀释和光自养培养三个阶段。

具体而言,本发明提供了一种培养小球藻的方法,其特征在于,该培养方法包括以下步骤:

a) 在生物反应器中进行异养培养:在生物反应器中加入 pH 为 6.0~7.0 的培养基,按工作体积的 5~10%接入小球藻藻种进行补料分批培养,培养温度为 28~32℃,控制 pH 小于 8.5,控制溶氧在 15%以上,至小球藻细胞密度最高时结束培养;

b) 藻液稀释:用培养基将步骤 a)获得的藻液稀释至细胞密度为 5-25 克/升,所述培养基不含有机碳源,其 pH 为 6.0~7.0;

c) 光自养培养:将步骤 b)获得的稀释液转入光自养培养,培养温度为 17~42℃,光照强度为 5~60klx,光自养培养周期为 30~40 小时。

在一个较佳的实施方案中,所述小球藻选自普通小球藻和蛋白核小球藻。

在一个较佳的实施方案中,所述步骤 b)中的培养基为不含有机碳源的步骤 a)的培养基,且其中氮源浓度为 2~10 克/升。

在一个较佳的实施方案中,步骤 a)在溶氧供应良好且全封闭的机械搅拌式生物反应器中进行,步骤 c)在选自封闭式光生物反应器、开放式大池的光自养培养装置中进行。

在一个较佳的实施方案中,步骤 a)在葡萄糖完全消耗后结束。

在一个较佳的实施方案中,在步骤 a)中,当培养基的 pH 高于 8.5 时用酸进行调节。

在一个较佳的实施方案中,在步骤 a)中,在接种后 27~33 小时进行补料,之后每隔 5~8 小时进行补料,补料是加入葡萄糖及氮源溶液(如前所述培养普通小球藻时氮源为 KNO_3 ,培养蛋白核小球藻时为尿素),葡萄糖的补加浓度为使培养液中葡萄糖浓度达到 15-25 克/升,氮源浓度达到 3-4 克/升。

在一个较佳的实施方案中,当小球藻为普通小球藻时,步骤 a)中的所述异养培养的培养基基本上由以下成分组成: KNO_3 7~11 克/升、葡萄糖 25~35 克/升、 KH_2PO_4 0.6~0.8 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.7~2.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6~0.8 克/升、 CaCl_2 0.1~0.2 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.03 克/升;微量元素 0.5~2ml,其中微量元素的组成为 H_3BO_3 11~12 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5~9.5 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4~1.5 克/升, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8~0.9 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5~1.6 克/升, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.45~0.55 克/升;水。

在一个较佳的实施方案中,当小球藻为蛋白核小球藻时,步骤 a)中的所述异养培养的培养基基本上由以下成分组成:葡萄糖 27-30 克/升,尿素 4.5-5 克/升, KH_2PO_4

1-1.5 克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1-1.5 克/升, CaCl_2 0.07-0.1 克/升, 柠檬酸三钠 0.1-0.3 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.5-1 mL, A5 溶液 3-3.5mL, 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24-26 克/升和 EDTA 32-35 克/升, A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.8-2.9 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.7-1.9 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2-0.25 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05-0.1 克/升, Na_2MoO_4 0.02-0.25 克/升; 水。

本发明还有一个方面涉及用上述方法获得的小球藻培养物在制备保健食品或饲料添加剂中的用途。

用本发明公开的方法来培养小球藻,一方面可使小球藻在较短的培养周期里细胞密度达到高密度培养的水平(异养培养结束时细胞密度可达到 45~55 克/升),另一个更重要的方面在于其可使小球藻的品质与异养培养相比有较大幅度提高,达到了光自养培养时的水平,从而实现了小球藻高密度高品质的培养。

附图简述

图 1 显示了在 5L 生物反应器/1L 开放式平板光生物反应器串联系统中异养培养结束后用稀释用培养基稀释与不稀释的普通小球藻培养的结果。

图 2 显示了 5L 生物反应器/1L 平板光生物反应器中不同稀释倍数下异养一稀释一光自养串联培养的结果,其中, H 表示异养培养阶段, A-10 表示光自养培养阶段细胞干重 11.45g/L, A-20 表示光自养培养阶段细胞干重 21.89g/L, A-30 表示光自养培养阶段细胞干重 32.56g/L。

图 3 显示了 50L 生物反应器/30L 平板式光生物反应器串联系统中异养一稀释一光自养串联分批补料培养普通小球藻的结果。

图 4 显示了 50L 生物反应器/30L 平板式光生物反应器串联系统中异养一稀释一光自养串联培养普通小球藻时 30L 平板式光生物反应器置于户外的培养结果。

图 5 显示了 30L 平板式光生物反应器、5L 塑料盆、开放式大池中普通小球藻光自养培养阶段在户外进行的培养结果。

图 6 显示了 50L 生物反应器/30L 平板式光生物反应器串联系统中异养一稀释一光自养串联分批补料培养蛋白核小球藻的结果。

具体实施方案

本发明提供了一种高密度高品质培养小球藻的方法,该培养方法包括生物反应器高密度异养培养、高密度藻液的稀释和光自养培养三个阶段:

a) 在生物反应器中进行异养培养:在生物反应器中加入 pH 为 6.0~7.0 的培养基,

按工作体积的 5~10%接入小球藻藻种进行补料分批培养, 培养温度为 28~32℃, 控制 pH 小于 8.5, 控制溶氧在 15%以上, 至小球藻细胞密度最高时结束培养;

b) 藻液稀释: 用培养基将步骤 a)获得的藻液稀释至细胞密度为 5-25 克/升, 所述培养基不含有机碳源, 其 pH 为 6.0~7.0;

c) 光自养培养: 将步骤 b)获得的稀释液转入光自养培养, 培养温度为 17~42℃, 光照强度为 5~60klx, 光自养培养周期为 30~40 小时。

a) 生物反应器高密度异养培养

阶段/步骤 a)在生物反应器中进行。所述生物反应器可以由本领域技术人员根据常规技能来作合适的选择, 例如可以是溶氧供应良好且全封闭的机械搅拌式生物反应器。

在阅读了下文、尤其是实施例后, 本领域技术人员能够理解, 本发明的实质并不在于培养基本身。换言之, 本领域技术人员也可在本发明中采用小球藻培养领域中所常用的其它培养基。在本发明的优选方案中, 具体使用了两种培养基, 一种为 HA-SK 培养基(该培养基组合物申请人已申请一项中国发明专利, 申请号: 200610024004.9), 用于培养普通小球藻, 另一种为 Ogbonna 等使用的 Endo 培养基, 用于培养蛋白核小球藻。因此, 在较佳的实施方案中, 本发明的方法适用于培养普通小球藻和蛋白核小球藻。

本发明所用的 HA-SK 培养基是基本上由 KNO_3 、葡萄糖以及少量无机盐、微量元素和水组成。在所述技术方案中, 所述微量元素宜选自 H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 中的一种或多种或全部。

本文所用的术语“基本上由……组成”表示本发明的组合物中除了含有主要组分 KNO_3 、葡萄糖以及少量无机盐、微量元素和水外, 还可包含一些对于组合物的基本特性或新的特性(即可维持普通小球藻在较短的培养周期里细胞密度达到高密度培养的水平, 同时叶绿素和蛋白质水平与常规异养培养相比有较大幅度提高)没有实质上影响的组分。本文所用的术语“由……组成”表示本发明的组合物由所指出的具体组分组成, 没有其他组分, 但是可以带有含量在通常范围内的杂质。

在该培养基中, 培养基的各组分可在一定范围内变化而不会对普通小球藻细胞密度和品质有很大的实质影响。因此, 这些组分的用量不应受实施例的严格限制。如本领域技术人员所熟知的, 培养基中还应加入少量无机盐, 例如硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁和磷酸盐等, 以及少量微量元素如 Mn、Zn、B、I、M、Cu、Co 等。在本发明

中, 较佳的微量元素组分宜选自 H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 中的一种或多种。无机盐和微量元素的用量可根据常规知识确定。

作为氮源的 KNO_3 的范围为 7.0~11.0 克/升, 作为碳源和能源的葡萄糖可在 25~35 克/升之间。具体而言, KNO_3 的浓度可为 7-10 克/升, 7-9 克/升或大约 8 克/升。葡萄糖的浓度可为 26-34 克/升、27-33 克/升、28-32 克/升、29-31 克/升或大约 30 克/升。 KH_2PO_4 的浓度可为 0.65-0.75 克/升或大约 0.7 克/升。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的浓度可为 1.75-1.95 克/升、1.8-1.9 克/升、1.83-1.85 克/升或大约 1.84 克/升。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度可为 0.65-0.75 克/升或大约 0.7 克/升。 CaCl_2 的浓度可为 0.13-0.18 克/升, 0.14-0.15 克/升, 或大约 0.142 克/升。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度可为 0.015-0.025 克/升或大约 0.02 克/升。

对于微量元素, 一个较佳的实施方案是在培养基组合物中加入 0.5~2ml 具有以下组成的微量元素母液: H_3BO_3 11~12 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5~9.5 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4~1.5 克/升, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8~0.9 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5~1.6g, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.45~0.55 克/升。该微量元素母液可在配制本发明培养基组合物之前预先配制。微量元素母液的加入量可以为 0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2 毫升。

在一个尤其佳的实施方案中, 本发明的 HA-SK 培养基组合物宜由以下成分组成: KNO_3 7~11 克/升、葡萄糖 25~35 克/升、 KH_2PO_4 0.6~0.8 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.7~2.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6~0.8 克/升、 CaCl_2 0.1~0.2 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.03 克/升; 微量元素 0.5~2ml, 其中微量元素的组成为 H_3BO_3 11~12 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5~9.5 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4~1.5 克/升, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8~0.9 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5~1.6 克/升, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.45~0.55 克/升; 水 1000ml。

本发明所用的 Endo 培养基基本上由以下成分组成: 葡萄糖 27-30 克/升, 尿素 4.5-5 克/升, KH_2PO_4 1-1.5 克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1-1.5 克/升, CaCl_2 0.07-0.1 克/升, 柠檬酸三钠 0.1-0.3 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.5-1 mL, A5 溶液 3-3.5mL, 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24-26 克/升和 EDTA 32-35 克/升, A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.8-2.9 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.7-1.9 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2-0.25 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05-0.1 克/升, Na_2MoO_4 0.02-0.25 克/升; 水。

在一个较佳的实施方案中, 所述 Endo 培养基由以下成分组成: 葡萄糖 28 克/升, 尿素 4.8 克/升, KH_2PO_4 1.2 克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 克/升, CaCl_2 0.08 克/升, 柠檬酸三钠 0.2 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.64mL, A5 溶液 3.2mL, 其中 Fe-EDTA 溶液配方为

FeSO₄·7H₂O 25 克/升和 EDTA 33.5 克/升, A5 溶液配方为 H₃BO₃ 2.86 克/升, MnCl₂·4H₂O 1.81 克/升, ZnSO₄·7H₂O 0.222 克/升, CuSO₄·5H₂O 0.07 克/升, Na₂MoO₄ 0.021 克/升; 水。

在根据上述配方配制培养基后, 可用常规手段如酸或碱将所述培养基的 pH 调为 6.0~7.0, 并在 115-120℃ 下高压灭菌 15~20 分钟。另外, Endo 培养基中的尿素配制成高浓度溶液后单独高压灭菌。

在将上述培养基加入生物反应器中后(装料系数通常为 0.6~0.8, 优选是 0.7), 加水(宜是自来水)至工作体积, 然后灭菌。然后, 当温度降至 25~30℃ 时, 按工作体积的 5~15%(更佳为 5-10%)接入小球藻开始异养培养, 培养条件为: 温度: 25~30℃, 控制溶氧在 15% 以上, pH 小于 8.5。

异养培养阶段采用补料分批培养的方式进行, 可在接种一段时间后(通常是 27-38 小时后)补料, 之后每隔 5~8 小时补料, 补料是加入碳源葡萄糖及氮源(培养普通小球藻的氮源为 KNO₃, 培养蛋白核小球藻的氮源为尿素)溶液, 葡萄糖的补加浓度为 15-25 克/升, 氮源溶液的补加浓度为 3-4 克/升, 培养直至小球藻细胞密度最高时结束培养。补料液的浓度宜较高, 目的是使培养液体积不至于补料而太大。补料母液要分开灭菌。

在补料过程中若出现溶氧迅速下跌的现象, 可调节转速, 使溶氧保持在一定水平上, 因为溶氧不足会抑制藻细胞的生长甚至出现藻体自溶的现象, 从而影响小球藻细胞密度的进一步提高。在培养时, 应当注意 pH 不宜过高, 因为 pH 太高了藻细胞不易生长。当 pH 高于 8.5 时, 宜用酸例如 10% 的硫酸调节 pH。

异养培养至小球藻细胞密度最高时(通常可达 45 克/升-55 克/升或更高)结束培养, 更佳的可在小球藻细胞密度达到最高且培养液内葡萄糖被完全消耗时结束培养。

b) 高密度藻液的稀释

在阶段/步骤 b) 中, 采用 pH 为 6.0~7.0 的不含有机碳源的培养基对异养培养获得的高密度藻液进行稀释。所述培养基可对应于现有技术中常规用于培养小球藻的培养基, 只是其中不含有机碳源, 且其 pH 为 6.0-7.0。在更优选的实施方案中, 所述培养基的氮源浓度为 2~10 克/升, 较佳为 2~8 克/升, 更佳为 3~6 克/升。所述氮源可以与步骤 a) 中所用的氮源相同或不同。

在一个优选的具体方案中, 异养培养获得的高密度藻细胞宜用不含有机碳源、氮源浓度为 2~10 克/升的初始培养基(即培养普通小球藻时采用不含葡萄糖的 HA-SK 培养基, 培养蛋白核小球藻时采用不含葡萄糖的 Endo 培养基)进行适当稀释。

稀释采用的培养基无需高压灭菌,配制好后调节 pH 至 6.0~7.0 即可使用。稀释后的细胞密度宜为 2~25 克/升,更佳为 5~20 克/升。

在一个更佳的方案中,稀释采用的培养基中的氮源浓度为 3~5 克/升,稀释后的细胞密度为 10~16 克/升。

c) 光自养培养

随后,将光自养培养装置用自来水清洗干净后,将步骤 b)的稀释后的细胞液转入其中后进行光自养培养。光自养培养与异养培养在不同的生物反应器中进行。通常,光自养培养可在封闭式光生物反应器、平板式光生物反应器、开放式大池等光自养培养装置中进行。培养温度控制在 17~42℃,光照强度为 5~60klx,光自养培养周期为 30~40 小时。

本发明关键之处在于,异养培养阶段与光自养培养阶段在不同的生物反应器中进行,异养培养在溶氧供应良好且全封闭的机械搅拌式生物反应器中进行,而光自养培养在封闭式光生物反应器、开放式大池等光自养培养装置中进行。且异养培养获得的高密度藻液必须采用不含有机碳源的培养基适当稀释后转入光自养培养,才可实现高密度高品质培养。

在本文中,所述藻体的品质指标为单位藻体蛋白质和叶绿素含量。所述藻体的生物量指标为单位培养液中藻体干重。本领域技术人员能够采用常规技术对所述单位藻体蛋白质、叶绿素含量和进行测定。

蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法(宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998, 76~78.)。叶绿素含量测定采用甲醇提取比色法(Ogbonna J.C., Masui. H., Tanaka.H. Sequential heterotrophic: autotrophic cultivation—an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. J. Appl. Phycol.1997 ,9, 359~366.)。藻体干重测量时取培养过程中某一时刻的培养液 V(ml), 7200r/min 离心 10min, 将离心后的藻体用去离子水洗涤 3 次,转移至称量瓶(W1(g)) 中在 80℃烘箱中烘干至恒重 W2(g)。藻体干重 C_x 可根据下式计算: $C_x(g/L) = (W2 - W1) / V/1000$ 。

用本发明的方法不仅能够使小球藻在较短的培养周期里细胞密度达到高密度培养的水平,另一个更重要的方面在于其可使小球藻的品质与异养培养相比有较大幅度提高,达到了光自养培养时的水平,从而实现了小球藻高密度高品质的培养。因此,本发明获得的小球藻培养物能够用于制备保健食品、饲料添加剂等诸多应用。

以下将通过实施例对本发明的有关内容作进一步的说明。除非另有所述，本发明采用的培养基中各组分含量均用克/升(g/L)表示。本发明所采用的普通小球藻和蛋白核小球藻购自中科院武汉水生生物研究所。

实施例 1

在 5L 生物反应器中加入下述异养采用的培养基，加自来水至 3.4L 后灭菌，然后当温度降至 30℃ 时按工作体积的 6% 接入普通小球藻，开始异养培养。异养培养条件：温度为 30℃，转速从接种时的 200r/min 逐渐调整到培养结束时的 400r/min，空气流量为 1vvm，pH 小于 8.5，控制溶氧在 15% 以上。接种后 30h 时开始添加补料液（20 g/L 葡萄糖和 3.33g/LKNO₃ 的混合溶液），之后每隔 5~8 小时补加 1 次，共补加 4 次。培养至 56.34h 细胞干重(□) 达到 47.91g/L，藻体蛋白质(◇) 和叶绿素(□)含量分别为 33.42%和 15.65mg/gDcw(见图 1)，异养培养阶段结束。

| | |
|---|---|
| KNO ₃ : 9.25 | 葡萄糖: 30 |
| KH ₂ PO ₄ : 0.7 | Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O: 1.84 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0.7 | CaCl ₂ : 0.142 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O : 0.02 | |
| 微量元素: 1ml ; 微量元素配方(g/L): H ₃ BO ₃ 11.42 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O 8.82 |
| MnCl ₂ ·H ₂ O 1.42 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O 0.8707 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O 1.57 | Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O 0.49 |

水: 1000ml

异养培养获得的藻细胞蛋白质和叶绿素含量处于较低水平，其中一部分藻液采用下述稀释采用的培养基将藻细胞稀释至约 20g/L，转入 1L 平板式光生物反应器进行光自养培养。光自养培养条件：温度为 30℃，装液体积 0.9L，空气流量为 0.45L/min，平板反应器采用双面人工光照，每一面的光强为 36klx。继续培养至 83.00h，细胞干重(●) 基本上不变，为 20.05g/L，藻体蛋白质(●) 和叶绿素(▲) 含量分别为 52.80%和 36.45mg/gDcw(见图 1)。

| | |
|---|---|
| KNO ₃ : 4.95 | FeSO ₄ ·7H ₂ O : 0.02 |
| KH ₂ PO ₄ : 0.7 | Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O: 1.84 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0.7 | CaCl ₂ : 0.142 |
| 微量元素: 1ml ; 微量元素配方(g/L): H ₃ BO ₃ 11.42 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O 8.82 |
| MnCl ₂ ·H ₂ O 1.42 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O 0.8707 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O 1.57 | Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O 0.49 |

水: 1000ml

异养培养获得的藻液的另一部分不经过稀释处理, 直接转入 1L 平板式光生物反应器进行光自养培养。光自养培养条件: 温度为 30℃, 装液体积 0.9L, 空气流量为 0.45L/min, 平板反应器采用双面人工光照, 每一面的光强为 36klx。继续培养至 80.34h, 细胞干重大幅度下降, 为 38.45g/L, 藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 41.34%和 29.32mg/gDcw(见图 1), 其明显低于上述经过稀释处理的结果。

上述结果表明, 异养培养获得的高密度藻液必须通过适当的稀释转入光自养培养, 既维持细胞密度处于较高水平, 同时获得的藻体品质也处于较高水平。

实施例 2

在 5L 生物反应器中加入实施例 1 中异养采用的培养基, 采用实施例 1 中使用的异养培养条件和培养工艺培养普通小球藻。培养至 60.08h 细胞干重(ρ) 达到 51.15g/L, 藻体蛋白质(ρ) 和叶绿素(\square)含量分别为 33.65%和 12.80mg/gDcw(见图 2), 异养培养阶段结束。

采用下述稀释采用的培养基, 其中 KNO_3 含量分别为 2.60g/L、4.95g/L 和 7.36g/L, 将异养培养获得的高密度藻液分别稀释成 11.45 g/L(A-10)、21.89g/L(A-20)和 32.56g/L(A-30)后转入 1L 平板式光生物反应器中进行光自养培养。光自养培养条件与实施例 1 中相同。继续培养至 87.08h, 转入光自养初始细胞干重为 11.45 g/L 时, 细胞干重略有增加, 为 12.07g/L, 藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 51.49%和 33.51mg/gDcw; 转入光自养初始细胞干重为 21.89g/L 时, 细胞干重基本不变, 为 19.79g/L, 藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 52.54%和 36.15mg/gDcw; 而转入光自养初始细胞干重为 32.56g/L 时, 细胞干重下降, 为 28.07g/L, 藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 51.16%和 32.42mg/gDcw(见图 2)。

KNO_3 : 2.60、4.95、7.36 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.02

KH_2PO_4 : 0.7 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 1.84

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.7 CaCl_2 : 0.142

微量元素: 1ml ; 微量元素配方(g/L): H_3BO_3 11.42 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.82

$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.42 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8707

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.49

水: 1000ml

上述结果表明, 异养培养获得的高密度藻液经过适当稀释后转入光自养培养藻体品质均可达到较高水平, 但稀释后细胞密度较高时藻细胞较大幅度死亡。

实施例 3

在 50L 生物反应器中加入实施例 1 中异养采用的培养基，加自来水至 34L 后灭菌，然后当温度降至 30℃时按工作体积的 6%接入普通小球藻，开始异养培养。采用实施例 1 中使用的异养培养条件和培养工艺培养普通小球藻，其中补料次数增加至 5 次。培养至 58.20h 细胞干重达到 54.52g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 32.01%和 12.70mg/gDcw (见图 3)，异养培养阶段结束。

50L 生物反应器异养培养获得的高密度藻细胞，采用实施例 1 中稀释用的培养基（其中 KNO_3 含量为 2.60g/L）稀释至 14.88 g/L，然后转入 30L 平板式光生物反应器进行光自养培养。光自养培养条件：温度为 30℃，装液体积 24L，空气流量为 12L/min，平板反应器采用双面人工光照，每一面的光强为 45klx。继续培养至 100h，细胞干重基本不变，为 13.78g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 55.79%和 30.33mg/gDcw (见图 3)，基本上实现了普通小球藻高密度高品质培养的实验室放大。

实施例 4

在 50L 生物反应器中加入实施例 1 中异养采用的培养基，加自来水至 34L 后灭菌，然后当温度降至 30℃时按工作体积的 6%接入普通小球藻，开始异养培养。采用实施例 1 中使用的异养培养条件和培养工艺培养普通小球藻。培养至 58.20h 细胞干重达到 46.40g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 35.02%和 15.46mg/gDcw (见图 4)，异养培养阶段结束。

异养培养获得的高密度藻细胞，采用实施例 1 中稀释用的培养基（其中 KNO_3 含量为 2.60g/L）稀释至 12.66g/L 转入 30L 平板式光生物反应器中，然后将 30L 平板式光生物反应器置于户外进行光自养培养。光自养培养条件：装液体积 24L，空气流量为 12L/min，自然温度，温度在 17.8~42.4℃，自然光照，光强在 0~65klx。在户外继续培养至 113h，细胞干重为 10.11g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 57.40%和 36.92mg/gDcw (见图 4)。

上述结果说明，本发明建立的异养—稀释—光自养串联培养方法不受自然光昼夜交替的光照模式和自然温度变化的影响。

实施例 5

在 1500L 发酵罐中加入实施例 1 中异养采用的培养基，且采用实施例 1 中的培养

条件与培养工艺培养普通小球藻，培养约 60 小时细胞密度达到 50.80 g/L，藻体叶绿素和蛋白含量分别为 10.98mg/gDcw 和 30.37%。

将获得的高密度藻液实施例 1 中稀释用的培养基稀释至 3.70g/L，分别在 30L 平板式光生物反应器、5L 塑料盆（50×40×20cm）、开放式大池中进行户外光自养培养。光自养培养条件：自然温度，温度在 17.8~42.4℃，自然光照，光强在 0~65klx。在户外光自养培养 26.75h，30L 平板式光生物反应器中细胞干重为 4.08g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 51.95%和 20.98mg/gDcw；5L 塑料盆中细胞干重为 4.20g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 55.02%和 21.85mg/gDcw；开放式大池中细胞干重为 3.90g/L，藻体蛋白质和叶绿素含量分别为 52.52%和 22.83mg/gDcw（见图 5）。

上述结果说明，本发明建立的异养—稀释—光自养串联培养方法不受光自养培养阶段采用的培养装置的限制。

实施例 6

在 50L 生物反应器中加入下述异养采用的培养基，加自来水至 34L 后灭菌，然后当温度降至 30℃时按工作体积的 8%接入蛋白核小球藻，开始异养培养。异养培养条件：温度为 30℃，转速从接种时的 150r/min 逐渐调整到培养结束时的 400r/min，空气流量为 1vvm，pH 小于 8.5，控制溶氧在 15%以上。接种后 37h 时开始添加补料液（18 g/L 葡萄糖溶液和 3.2g/L 尿素溶液），之后每隔 6~10 小时补加 1 次，共补加 5 次。培养至 71.48h 细胞干重(ρ) 达到 54.88g/L，藻体蛋白质(ρ) 和叶绿素(□)含量分别为 46.18%和 7.17mg/gDcw（见图 6），异养培养阶段结束。

| | |
|---|---|
| 葡萄糖：28g/L | 尿素：4.8g/L |
| KH ₂ PO ₄ ：1.2g/L | MgSO ₄ ·7H ₂ O：1.2g/L |
| CaCl ₂ 0.08g/L | 柠檬酸三钠：0.2g/L |
| Fe-EDTA 溶液：0.64mL | A5 溶液：3.2mL |

其中 Fe-EDTA 溶液配方为 FeSO₄·7H₂O25g/L 和 EDTA33.5g/L；A5 溶液配方：H₃BO₃ 2.86g/L，MnCl₂·4H₂O 1.81 g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.222g/L，CuSO₄·5H₂O 0.07g/L，Na₂MoO₄ 0.021g/L。

50L 生物反应器异养培养获得的高密度藻细胞，采用下述稀释用的培养基 15.20g/L 后转入 30L 平板光生物反应器进行光自养培养。光自养培养条件：温度为 30℃，装液体积 24L，空气流量为 12L/min，平板反应器采用双面人工光照，每一面的光强为 45klx。经过后续光照培养的藻细胞蛋白质和叶绿素含量分别为 72.31%和

20.97mg/gDcw (见图 6)。

尿素: 4.8g/L

KH_2PO_4 : 1.2g/L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1.2g/L

CaCl_2 : 0.08g/L

柠檬酸三钠: 0.2g/L

Fe-EDTA 溶液: 0.64mL

A5 溶液: 3.2mL

其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25g/L 和 EDTA 33.5g/L; A5 溶液配方: H_3BO_3 2.86g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.07g/L, Na_2MoO_4 0.021g/L。

上述结果说明,本发明建立的异养—稀释—光自养串联培养方法是一种小球藻高密度高品质培养普遍适用的方法,不仅可实现普通小球藻的高密度高品质培养,而且可实现蛋白核小球藻的高密度高品质培养。

尽管上面已经描述了本发明的具体例子,但是有一点对于本领域技术人员来说是明显的,即在不脱离本发明的精神和范围的前提下可对本发明作各种变化和改动。因此,所附权利要求覆盖了所有这些在本发明范围内的变动。

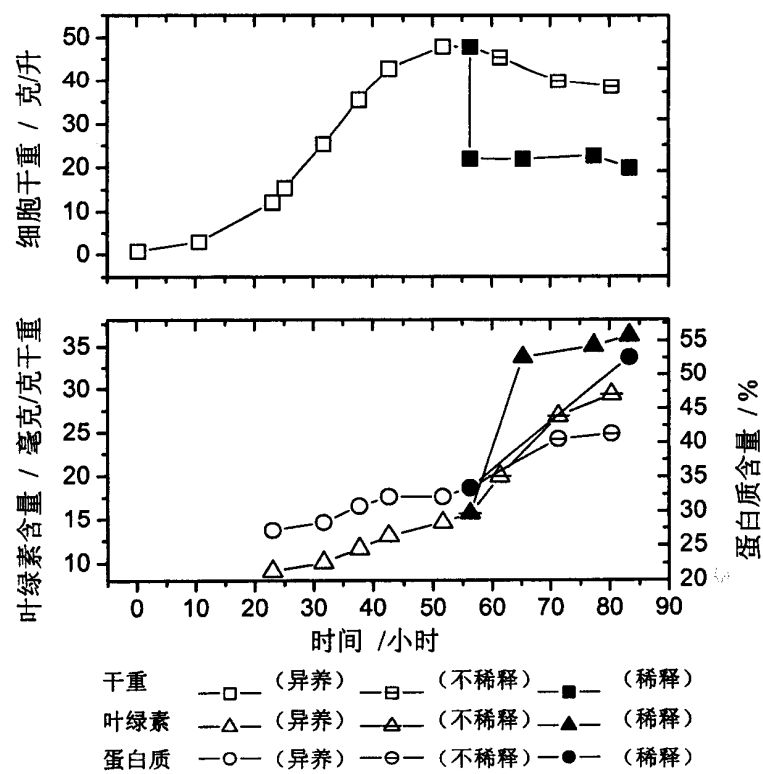


图 1

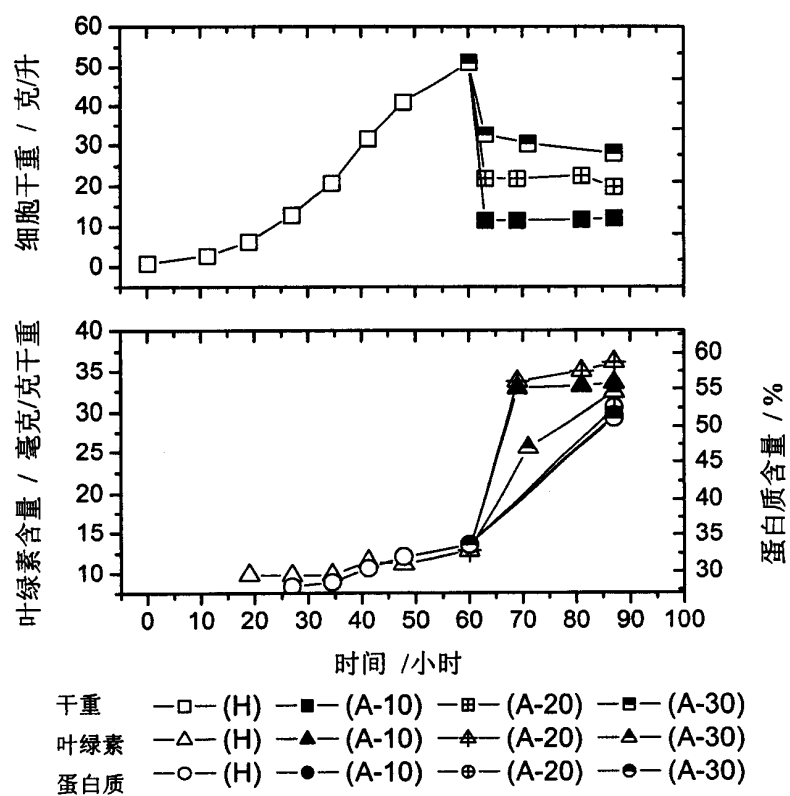


图 2

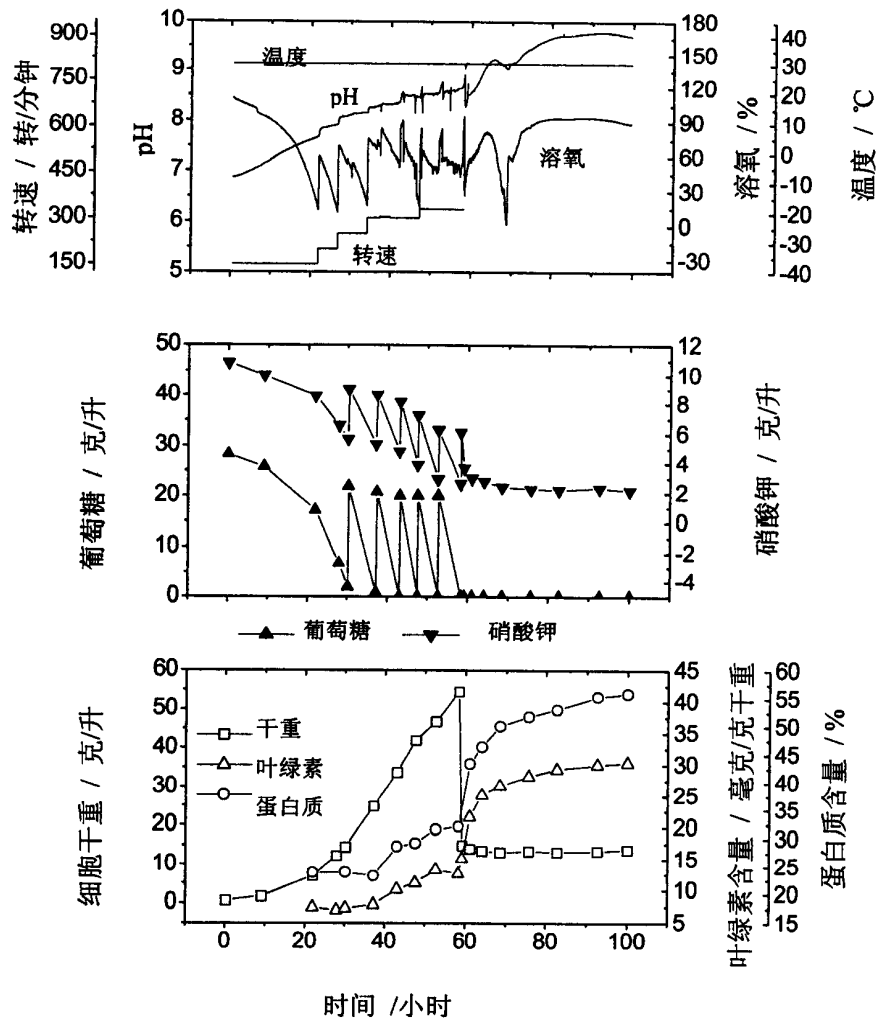


图 3

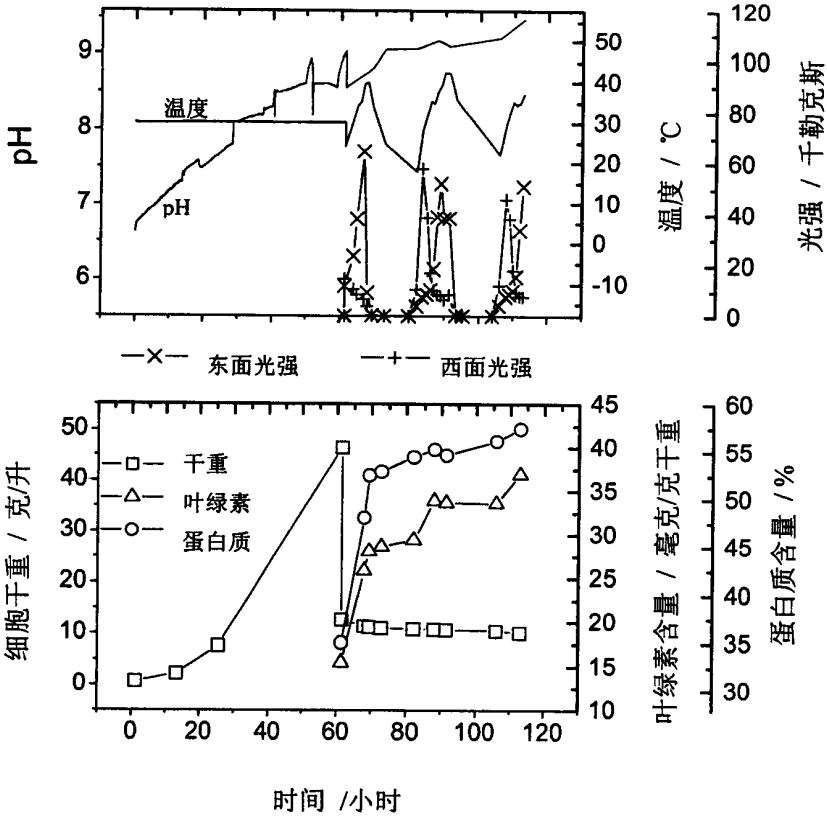


图 4

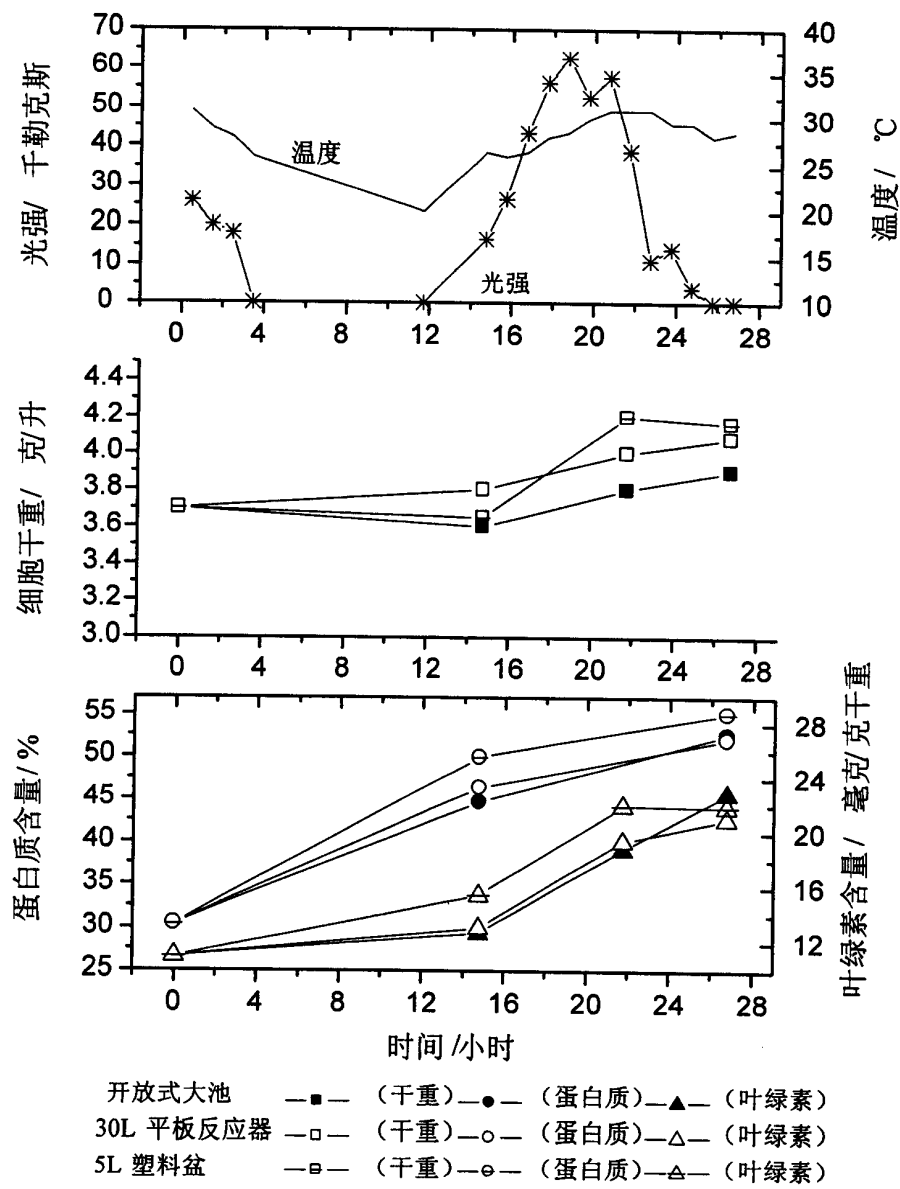


图5

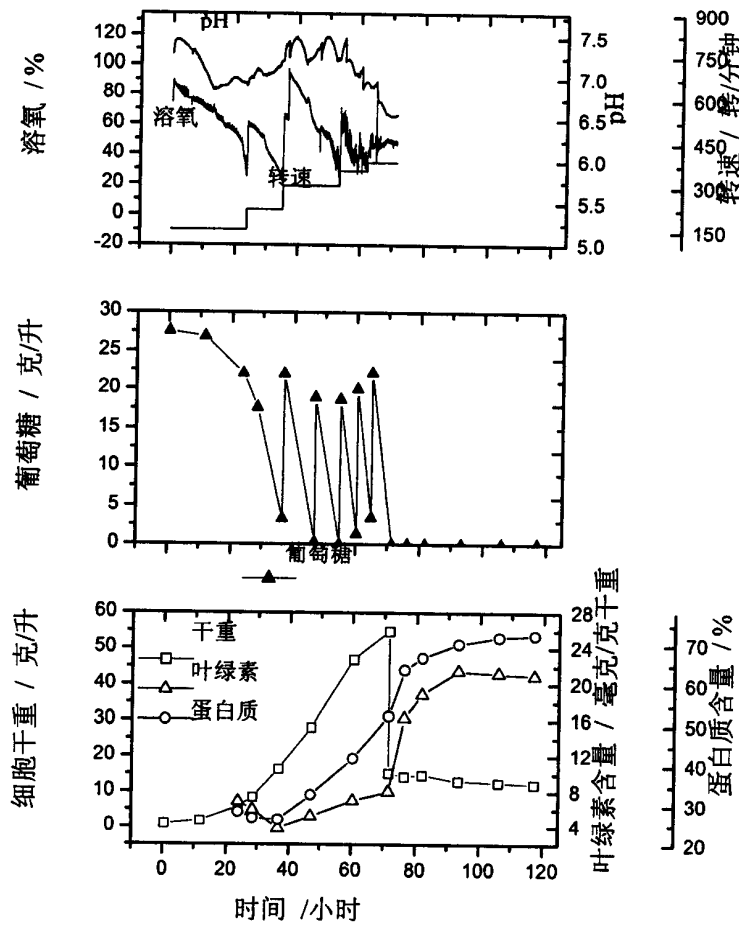


图 6