

一种异养发酵培养小球藻的方法

申请号：[200810246702.2](#)

申请日：2008-12-30

申请(专利权)人 [北京科技大学](#)

地址 [100083北京市海淀区学院路30号](#)

发明(设计)人 [闫海](#) [景建克](#) [许倩倩](#) [刘硕](#) [杨晓静](#) [杨帅](#) [贾璇](#) [王子敬](#)

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 [101481656](#)

公开(公告)日 [2009-07-15](#)

专利代理机构

代理人

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810246702.2

[43] 公开日 2009 年 7 月 15 日

[11] 公开号 CN 101481656A

[22] 申请日 2008.12.30

[21] 申请号 200810246702.2

[71] 申请人 北京科技大学

地址 100083 北京市海淀区学院路 30 号

[72] 发明人 闫海 景建克 许倩倩 刘硕
杨晓静 杨帅 贾璇 王子敬

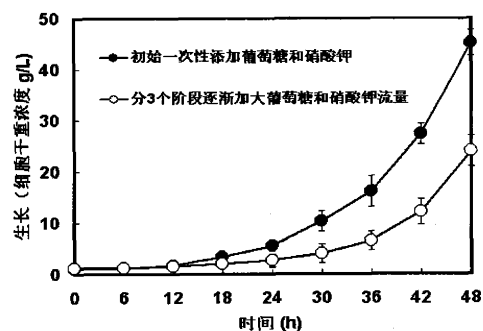
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种异养发酵培养小球藻的方法

[57] 摘要

一种异养发酵培养小球藻的方法，属于生物技术领域。该方法采用筛选得到的小球藻 USTB-01 (菌种保藏号：CGMCC No. 1448，保藏日期：2005 年 8 月 25 日)，在小球藻 USTB-01 异养发酵培养过程中，根据小球藻 USTB-01 的不同生长期，分 3 个阶段逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量，保证了小球藻 USTB-01 的快速生长，培养 2 天时间可以获得 45g/L 以上的小球藻生物量，为工业化高效异养发酵培养小球藻奠定了基础。



1、一种异养发酵培养小球藻的方法，其特征在于，通过筛选得到 1 株具备异养生长能力的小球藻 USTB-01，保藏号为 CGMCC No.1448，保藏日期为 2005 年 8 月 25 日。

2、如权利要求 1 所述的异养发酵培养小球藻的方法，其特征在于，配制小球藻培养基，包括基础培养基和流加液两部分，基础培养基组成为 1 L 去离子水中含 KH_2PO_4 1.0~5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0~4.0 g, NaCl 0.5~2.0 g, NaCO_3 0.1~2.0 g, CaCl_2 1.0~50.0 mg, FeSO_4 1.0~10.0 mg, ZnCl_2 1.0~10.0 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 mg, CuCl_2 0.1~1.0 mg; 流加液的组成为 1L 去离子水中含葡萄糖 600~800 g, KNO_3 50~155 g, 碳和氮的质量比值为 10~30, 根据小球藻的不同生长期，对葡萄糖和硝酸钾流加控制，配制好的培养基在 120~130℃ 高温、0.10~0.18 MPa 高压下灭菌 10-30 分钟，然后待温度降低到 20~35℃ 后接种小球藻种进行异养发酵培养。

3、如权利要求 2 所述的异养发酵培养小球藻的方法，其特征在于，小球藻异养发酵培养采用 10~5000 升发酵罐，培养体积为 5~3000 升，培养温度为 20~35℃，pH 6.0~8.5，曝气量 0.5~2.0 m^3/h ，搅拌转速 200~500 转/分钟。

4、如权利要求 2 所述的异养发酵培养小球藻的方法，其特征在于，小球藻异养发酵培养的葡萄糖和硝酸钾流加控制是根据小球藻的不同生长期，分 3 个阶段逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量，流加到培养物中的葡萄糖浓度控制条件，从 0 到 12 h 为 0.5~1.0 g/L/h; 12 到 24 h 为 1.0~2.0 g/L/h; 从 24 到 48 h 为 2.0-3.0 g/L/h。

一种异养发酵培养小球藻的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，特别是提供了一种高效异养发酵培养小球藻-USTB01 (*Chlorella*-USTB01) (CGMCC No.1448, 保藏日期: 2005 年 8 月 25 日) 的方法。

背景技术

小球藻属有大约 10 种小球藻，都富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、维生素和藻因子等多种重要生命活性物质，具有极高的营养价值和提高免疫力的功能，已被列为二十一世纪人类的健康食品。随着人们生活水平的日益提高，对小球藻的需求会越来越大。

一般认为小球藻属于低等植物，主要吸收无机碳通过光合作用合成有机物。但采用光照自养培养方法，当藻细胞浓度增加到一定数量后，必然阻挡光线进入培养物内，使培养出的藻细胞浓度很低。但进入二十世纪七十年代以来，国外学者发现，有些小球藻可以在无光照条件下生长于有机物，不仅大幅度提高了小球藻的生长速度，而且获得了很大的藻生物量，从而引起了单细胞藻类培养的一次重要革命。当前，美国、日本、以色列等国家和我国台湾地区等已成为小球藻的主要生产地，年产量约为 1500~2000 吨，而国际市场的年需求量约为 8000~10000 吨。因此不断改善培养条件，选育优良藻种，推进对小球藻的进一步开发和利用，是今后小球藻研究领域的一个重要课题。我国从 20 世纪 50 代起开始对小球藻进行培养研究，虽然国内外学者在异养培养小球藻的培养方法和控制条件方面进行了大量的研究，确定了葡萄糖和硝酸钾是目前异养培养小球藻普遍使用的碳源和氮源，但是发现初始高浓度的葡萄糖和硝酸钾却对小球藻的异养生长产生明显的抑制作用，因此如何在异养发酵培养过程中既能够满足小球藻对葡萄糖和硝酸钾的需要，同时又不使葡萄糖和硝酸钾的残留量过高是保证小球藻快速生长的保证。由于至今如何在短时间内高效培养获得高细胞浓度小球藻的技术尚不完善，因此严重制约了大规模异养培养小球藻的产业化生产。目前国内外尚未发现有在如此短时间培养获得如此高藻生物量的报道。

发明内容

本发明将筛选得到 1 株具备异养生长能力的小球藻 USTB-01 进行小球藻的异养发酵培养，在培养过程中，根据小球藻生长的不同期，分 3 个阶段逐渐加大葡萄糖和硝酸钾的流加量，以保证小球藻能够持续快速生长，在短时间内培养出的藻细胞干重

浓度达到 45 g/L 以上，实现高效异养发酵培养小球藻的目的。

1、通过筛选得到 1 株具备异养生长能力的小球藻 USTB-01 (*Chlorella* USTB-01)，保藏号为 CGMCC No.1448，保藏日期为 2005 年 8 月 25 日。

2、配制小球藻培养基：培养基包括基础培养基和流加液两部分，基础培养基组成 (1 L 去离子水中)：KH₂PO₄ 1.0~5.0 g，MgSO₄·7H₂O 1.0~4.0 g，NaCl 0.5~2.0 g，NaHCO₃ 0.1~2.0 g，CaCl₂ 1.0~50.0 mg，FeSO₄ 1.0~10.0 mg，ZnCl₂ 1.0~10.0 mg，MnCl₂·4H₂O 1.0~10.0 mg，CuCl₂ 0.1~1.0 mg；流加液的组成 (1L 去离子水中)：葡萄糖 600~800 g，KNO₃ 50~155 g (碳和氮的质量比值 10~30)。根据小球藻的不同生长期，对葡萄糖和硝酸钾流加控制。配制好的培养基在 120~130℃ 高温、0.10~0.18 MPa 高压下灭菌 10-30 分钟，然后待温度降低到 20~35℃ 后接种小球藻种进行异养发酵培养。

3、小球藻异养发酵培养：采用 10~5000 升发酵罐，培养体积为 5~3000 升，培养温度为 20~35℃，pH 6.0~8.5，曝气量 0.5~2.0 m³/h，搅拌转速 200~500 转/分钟。

4、小球藻异养发酵培养的葡萄糖和硝酸钾流加控制：根据小球藻的不同生长期，分 3 个阶段逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量，具体流加到培养物中的葡萄糖浓度控制条件为 3 个阶段，从 0 到 12 h: 0.5~1.0 g/L/h; 12 到 24 h: 1.0~2.0 g/L/h; 从 24 到 48 h: 2.0-3.0 g/L/h。

本发明的优点：根据小球藻生长的不同生长阶段，逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量，既保证了小球藻生长所需的葡萄糖和硝酸钾量，同时又不会因葡萄糖和硝酸钾浓度过高而抑制小球藻的生长。在培养 2 天时间内，获得了 45 g/L 以上的藻细胞干重，实现了小球藻高效异养发酵培养，为异养培养小球藻作为人类健康食品的工业化生产奠定了坚实的基础，具有重要的应用前景和开发价值。

附图说明

图 1 为本发明在 50 升全自控发酵罐内，采用流加或 1 次性初始全部添加葡萄糖和硝酸钾 2 种不同培养条件下，小球藻 USTB-01 的生长曲线。横坐标为培养时间小时，纵坐标为小球藻培养物中的藻细胞干重浓度 g/L。

图 2 为本发明在 50 升全自控发酵罐内，采用流加或 1 次性初始全部添加葡萄糖和硝酸钾 2 种不同培养条件下，培养物中葡萄糖浓度的变化曲线。横坐标为培养时间

小时，纵坐标为小球藻培养物中的葡萄糖浓度 g/L。

图 3 为本发明在 50 升全自控发酵罐内，采用流加或 1 次性初始全部添加葡萄糖和硝酸钾 2 种不同培养条件下，培养物中硝酸钾浓度的变化曲线。横坐标为培养时间小时，纵坐标为小球藻培养物中的硝酸钾浓度 g/L。

具体实施方式

1、小球藻培养基：配制 20 升培养基，组成(1.0 L 去离子水中)： KH_2PO_4 3.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g，NaCl 1.0 g， NaHCO_3 0.2 g， CaCl_2 10.0 mg， FeSO_4 5.0 mg， ZnCl_2 5.0 mg， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg， CuCl_2 1.0 mg。如果采用一次性添加葡萄糖和硝酸钾方式，则在培养基中加入了 78 g/L 葡萄糖和 11.3 g/L 硝酸钾（碳和氮的质量比为 20:1）；如果采用流加葡萄糖和硝酸钾方式，则在另外的 5 升玻璃瓶中配制 2 升流加液，组成为 (1.0 L 去离子水中)：葡萄糖 800 g， KNO_3 115 g（碳和氮的质量比为 20:1）。将培养基和流加液均在 121℃和 0.11 MPa 高压下灭菌 20 分钟，待培养基温度降低到 30℃后接种小球藻种进行异养发酵培养。

2、小球藻的异养发酵培养条件：采用 50 升全自控发酵罐，配制 20 升液体培养基，培养温度为 30℃；通过流加 10%盐酸控制 pH 为 7.0；曝气量 2.0 m³/h；搅拌转速初始为 200 转/分钟，以后每 6 小时增加 75 转/分钟直到 500 转/分钟为止。

3、小球藻异养发酵培养的葡萄糖和硝酸钾流加控制：根据小球藻生长的不同阶段，逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量，具体流加到培养物中的葡萄糖浓度控制条件为 3 个阶段：从 0 到 12 h: 1.0 g/L/h; 12 到 24 h: 1.5 g/L/h; 从 24 到 48 h: 2.0 g/L/h。

4、小球藻异养发酵培养结果：图 1 说明，与初始一次性添加葡萄糖和硝酸钾相比，根据小球藻不同生长阶段逐渐增加葡萄糖和硝酸钾的流加量可以明显提高小球藻的生长速度，在培养 2 天时间获得了 45.1 g/L 的藻生物量，比初始一次性添加葡萄糖和硝酸钾培养条件下获得的藻生物量 24.0g/L 提高了 87.9%。在根据小球藻不同生长阶段逐渐增加葡萄糖和硝酸钾流加量条件下，培养物中的葡萄糖和硝酸钾浓度经历了一个在开始阶段增加，在 24 或 30 h 后开始降低，在 48 h 基本全部消耗的过程，在整个培养过程中，葡萄糖和硝酸钾浓度始终保持在 20.0g/L (图 2) 和 2.6 g/L (图 3) 以下，因此保证了小球藻快速持续的生长，在进一步扩大规模的小球藻产业化生产方面具有重要的应用前景。

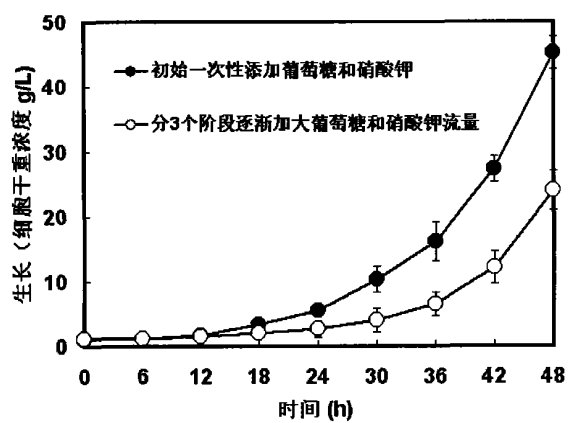


图 1

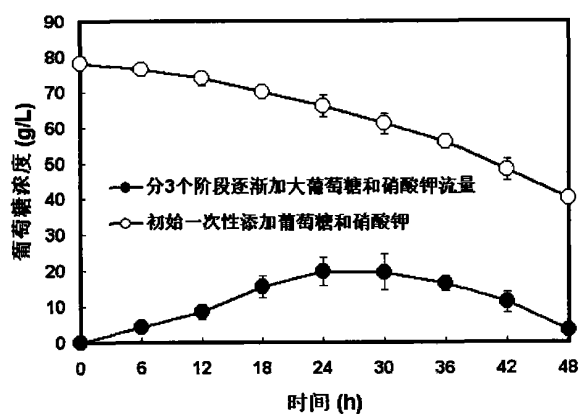


图 2

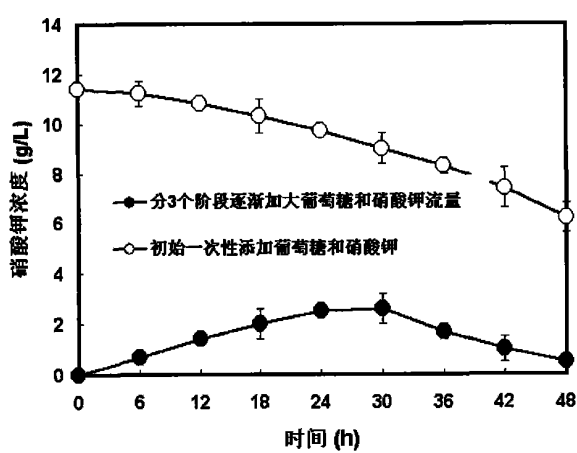


图 3