

半无菌培养异养小球藻的方法

申请号：[02146686.6](#)

申请日：2002-11-05

申请(专利权)人 [清华大学](#)
地址 [100084北京市100084-82信箱](#)
发明(设计)人 [吴庆余](#) [缪晓玲](#) [赫振华](#) [徐瀚](#)
主分类号 [C12N1/12](#)
分类号 [C12N1/12](#)
公开(公告)号 [1418946](#)
公开(公告)日 [2003-05-21](#)
专利代理机构 [北京众合诚成知识产权代理有限公司](#)
代理人 [李光松](#)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02146686.6

[43] 公开日 2003 年 5 月 21 日

[11] 公开号 CN 1418946A

[22] 申请日 2002.11.5 [21] 申请号 02146686.6

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市 100084-82 信箱

[72] 发明人 吴庆余 缪晓玲 赫振华 徐 瀚

[74] 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司

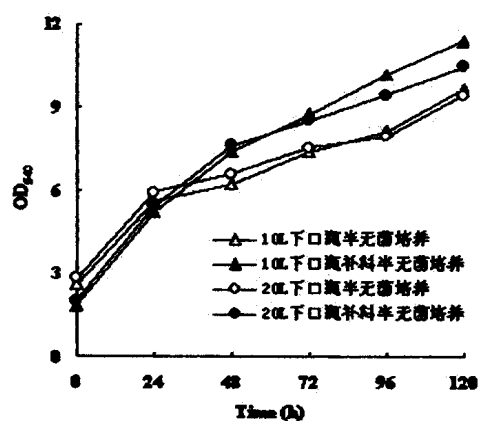
代理人 李光松

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称 半无菌培养异养小球藻的方法

[57] 摘要

本发明公开了属于藻类生物培养技术的一种半无菌培养异养小球藻的方法, 该技术采用两步法, 第一步无菌扩种培养, 第二步开放式大容量培养。该技术解决了在不影响产率的情况下, 简化了培养操作, 大幅降低了培养成本, 获得了高纯度的异养小球藻, 为工业生产和对小球藻的大规模开发利用打下了基础。我们采用的两步法半无菌培养, 操作较为方便, 实验和生产成本低, 获得的藻纯度很高; 而且在相同 OD 值情况下, 生物量与生物反应器中培养得到的生物量相当或更高, 适于在实验室中或工业上大量培养, 为对小球藻的大规模开发利用打下了基础。



ISSN 1008-4274

1. 一种半无菌培养异养小球藻的方法，该技术采用两步法，即第一步无菌扩种培养，第二步开放式大容量培养，其特征在于：所述无菌扩种培养是在 400 ml 通气培养瓶中对异养小球藻细胞进行无菌培养，即对培养基和培养器皿进行高压为 20 p. s. i 灭菌处理后，在培养器皿中对异养小球藻进行无菌培养，控制温度 25~27℃，待藻生长到对数期时，再移到较大通气培养器皿无菌培养，培养时间为 20~24 小时；所述开放式大容量培养是在非无菌条件下将藻种转移到大广口瓶中进行室温大体积培养，温度范围 22~28℃，培养瓶和培养液均不做灭菌处理，用气泵通入空气提供细胞悬浮与搅拌，进行第二步开放式培养过程中严格监视藻细胞的生长情况，并进行补料培养，测定细胞密度，绘制细胞生长曲线。

2. 根据权利要求 1 所述半无菌培养异养小球藻的方法，其特征在于：所述气泵通气流量为 60—100L/h。

3. 根据权利要求 1 所述半无菌培养异养小球藻的方法，其特征在于：所述补料培养为在第二步操作过程中进行，补料时间为藻生长后 24h，补料量为：10L 培养液中加入葡萄糖 50g，甘氨酸 0.5g；或 20L 培养液中加入葡萄糖 90g，甘氨酸 0.9g。补料经高压为 20 p. s. i 灭菌处理。

半无菌培养异养小球藻的方法

技术领域

本发明属于藻类生物培养技术，特别涉及以低成本培养，获得纯度高、生长快，在异养条件下的一种半无菌培养异养小球藻的方法。

背景技术

藻类生物生态分布广，生长速度快，应用价值高。小球藻含丰富的蛋白质、多糖、脂类、叶绿素、维生素、微量元素和一些生物活性代谢产物，广泛应用于保健食品、饲料、食品添加剂、精细化工品和医药制剂原料。长期以来，小球藻不仅是生物科学研究中优良的实验材料，而且是受人瞩目的开发利用对象。小球藻细胞除了可在自养条件下利用光能和二氧化碳进行正常的生长外，还可以在异养条件下利用有机碳源进行生长繁殖，类似于细菌的代谢生长。目前大规模培养主要采用水泥池中开放培养，易染菌、产量低、获得的藻不纯，这种传统的、低产量的池塘光培养系统已不能满足要求。80年代以来各种半密闭和密闭培养系统的研究受到广泛重视，应用各种光生物反应器进行间歇流加、连续流加等方式培养，在一定程度上提高了小球藻的产量和产率，但由于仍然采用光照自养方式，生产效率并没有得到根本的改变。以有机物作为小球藻的唯一碳源进行异养培养，具有无需光照，细胞增殖快，浓度高，生产系统易于实现自动控制，可利用现有的发酵设备等优点，已引起国外高度重视。但是目前为止，国内对小球藻的异养培养报道甚少，如何简化操作、降低异养培养成本、特别在不灭菌的条件下培养获得纯度高生长快的异养藻细胞，是国内外尚未解决的关键技术问题。

迄今为止，已报道的异养转化和培养实验都是严格地在无菌条件下进行的。因为异养生长的藻细胞需要消耗大量的葡萄糖等有机碳源，在含有葡萄糖的培养液中，细菌等微生物易于大量繁殖，因此必须对培养液和实验容器进行高温灭菌处理。这样的灭菌处理一方面操作繁琐，另一方面消耗大量电能。

发明内容

本发明的目的是提供一种半无菌培养异养小球藻的方法，该技术采用两步

法，即第一步无菌扩种培养，第二步开放式大容量培养。其特征在于：所述无菌扩种培养是在 400 ml 通气培养瓶中对异养小球藻细胞进行无菌培养，即对培养基和培养器皿进行高压为 20 p. s. i 灭菌处理后，在培养器皿中进行无菌培养，控制温度 25~27℃，待藻生长到对数期时，再移到较大通气培养器皿无菌培养，培养时间为 20~24 小时；所述开放式大容量培养是在非无菌条件下将藻种转移到大广口瓶中进行室温大体积培养，温度范围 22—28℃，培养瓶和培养液均不做灭菌处理，用气泵通入空气提供细胞悬浮与搅拌，进行第二步开放式培养过程中严格监视藻细胞的生长情况，并进行补料培养，测定细胞密度，绘制细胞生长曲线。

所述气泵通气流量为 60—100L/h。

所述补料培养为在第二步操作过程中进行，补料时间为藻生长后 24h，补料量为：10L 培养液中加入葡萄糖 50g，甘氨酸 0.5g；或 20L 培养液中加入葡萄糖 90g，甘氨酸 0.9g。补料经高压灭菌。

本发明的有益效果是 1. 两步法半无菌培养异养小球藻技术与现有技术比，简化了培养操作，大幅降低了培养成本，特别是在不灭菌的条件下，培养获得纯度高、生长快的异养藻细胞。即让处于对数生长期旺盛生长的细胞快速大量繁殖，让细菌等微生物还来不及繁殖起来的时候，异养藻细胞便形成了单种优势，达到了收获所需要的密度，通过两步法培养，每升藻液所得干重约为 3.8g。2. 在不补料条件下培养得到的藻颜色呈淡黄色，色泽较干，油性少，补料后，不仅藻的生长速度提高，OD 值增大；而且得到的藻色泽较油，每升所得干重也较多。在 OD 值相同时，如 OD 值为 10 时，通常在不补料情况下，每升所得干重约为 3.8g，而补料后每升所得干重可达到 5.4g。

附图说明

图 1 为无菌培养和开放式培养条件下的异养小球藻生长比较曲线；

图 2 为异养小球藻在不同半无菌条件下的细胞生长曲线

具体实施方式

本发明为一种半无菌培养异养小球藻的方法，该技术采用两步法，即第一步

无菌扩种培养，无菌扩种培养是在 400 ml 通气培养瓶中对异养小球藻细胞进行无菌培养，即对培养液和培养器皿进行高压为 20 p. s. i 灭菌后，在培养器皿中对异养小球藻进行无菌培养，控制温度 25—27℃，待藻生长到对数期时，再移到较大通气培养器皿无菌培养，培养期为 24 小时后进行第二步，开放式大容量培养，在非无菌条件下将藻种转移到大广口瓶中进行室温大体积培养，温度范围 22—28℃，培养瓶和培养液均不做灭菌处理，用气泵通入通气流量为 60—100L/h 的空气提供细胞悬浮与搅拌。进行第二步开放式培养过程中严格监视藻细胞的生长情况，并进行补料培养，补料量为：10L 培养液加葡萄糖 50g，甘氨酸 0.5g；20L 培养液加葡萄糖 90g，甘氨酸 0.9g。补料经高压为 20 p. s. i 灭菌。结果表明异养小球藻在半无菌条件下，生长速度明显高于在开放式条件下的生长，测定细胞密度，绘制细胞生长曲线表明两步法培养的最终细胞密度大大高于开放式的细胞密度，离心收集得到的藻纯度很高。在不补料条件下培养得到的藻颜色呈淡黄色，色泽较干，油性少，可能是营养受限所致。补料后，不仅藻的生长速度提高，OD 值增大；而且得到的藻色泽较油，每升所得干重也较多。在 OD 值相同时，如 OD 值为 10 时，通常在不补料情况下，每升所得干重约为 3.8g，而补料后每升所得干重可达到 5.4g。

上述异养培养液基本组成为葡萄糖 10.0g/L，L-甘氨酸 0.1g/L， K_2HPO_4 39.3g/L， KH_2PO_4 70.0g/L， $MgSO_4$ 14.6g/L，微量元素 A_5 1.0ml/L， $FeSO_4$ 0.3g/L， V_{B1} 10.0μg/L。调 pH 为 6.1，在培养的同时用 100w 的灯进行光照。

下面再结合具体实施例对发明作进一步的说明。

实施例 1

对简单的无菌培养和开放式培养条件下异养藻细胞的生长状态进行比较，结果显示（如图 1 所示）。小球藻在不经灭菌的 20L 玻璃缸中开放式培养（培养液也未灭菌），异养细胞的生长很慢，染菌程度高，反映异养细胞密度的 OD 值增长较慢，最终仅达到 3 左右。小球藻不易被离心沉淀，不利于细胞产物的收集。如果补料（即在培养液中继续补充营养盐和葡萄糖），则更容易使细菌大量生长，离心收集得到的藻不纯且生物量较低。经过灭菌处理的实验组异养细胞的生长曲

线显示，反映异养细胞密度的 OD 值增长较快，最终达到了 9 左右，是开放式培养的 3 倍。严格灭菌条件下培养的异养小球藻易于被离心沉淀，因此利于细胞产物的收集。但是对培养液和实验容器进行高温灭菌处理操作繁琐，消耗大量电能，大大地增加生产成本。在无菌条件下也不能进行补料（即在培养液中继续补充营养盐和葡萄糖）操作。

实施例 2

分别对小球藻在 10L、20L 下口瓶（补料）半无菌培养的生长状态进行比较，结果显示（如图 2 所示）。在第一步操作中，所有培养液和培养器皿均高压灭菌。然后，对异养小球藻藻种在 400 ml 通气培养瓶中进行严格的无菌培养，温度 26℃，光照强度不作要求。待藻细胞生长到对数期时，20—24 小时后，在无菌条件下将藻细胞转移到 3L 三角瓶中继续在光照培养箱中培养，作为 20L 大量培养的藻种。在第二步操作中，将 3L 三角瓶中的藻种在非无菌条件下（开放体系中）转移到 10L 或 20L 下口瓶中培养。下口瓶的上下口均给予通气，培养温度随实验室温度变化而变化，光照强度不作要求。

在做补料培养时，补料量为：10L 培养液加葡萄糖 50 g，甘氨酸 0.5 g；20L 培养液加葡萄糖 90 g，甘氨酸 0.9 g。补料是经高压灭菌的。在藻生长 24 h 后补料，96 h 或 120 h 后收集藻细胞。

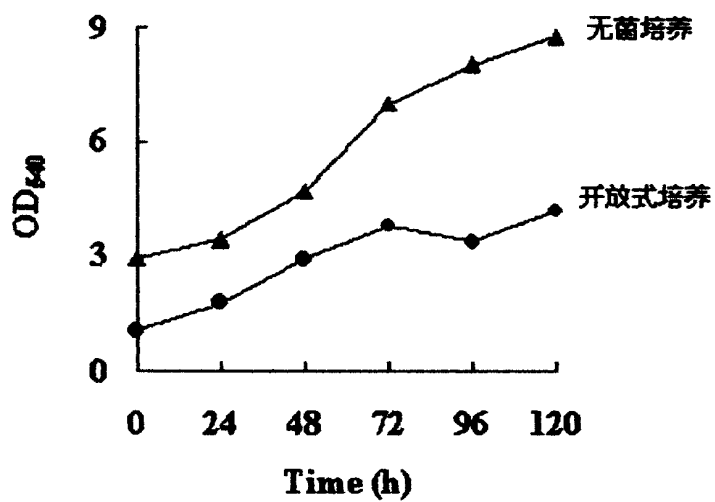


图 1

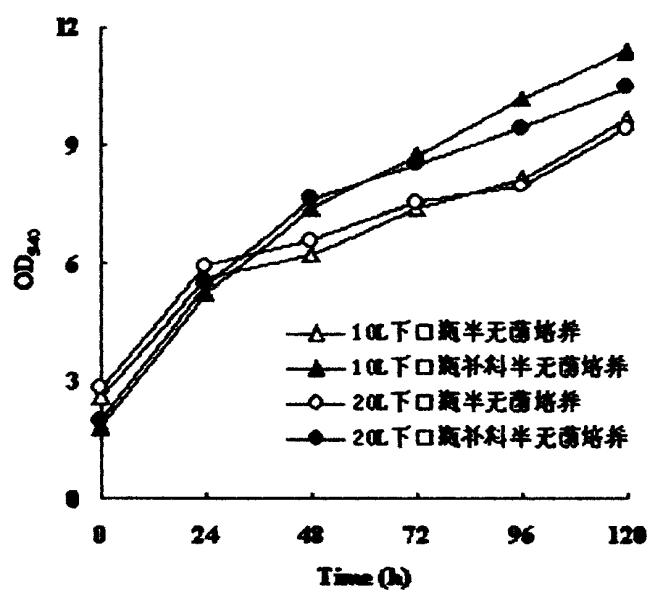


图 2