

一种分阶段补料法培养小球藻的方法

申请号：[201310363188.1](#)

申请日：2013-08-20

申请(专利权)人 [甘肃富民生态农业科技有限公司](#)

地址 743000 甘肃省定西市循环经济产业园区

发明(设计)人 [常贵](#) [田裕钊](#) [田耕](#)

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 103396953A

公开(公告)日 2013-11-20

专利代理机构

代理人



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103396953 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201310363188. 1

(22) 申请日 2013. 08. 20

(71) 申请人 甘肃富民生态农业科技有限公司

地址 743000 甘肃省定西市循环经济产业园区

(72) 发明人 常贵 田裕钊 田耕

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006. 01)

C12R 1/89(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种分阶段补料法培养小球藻的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种分阶段补料法培养小球藻的方法,其主要特征是:小球藻的培养分为两个阶段,即小球藻无光照异养自发酵培养和小球藻后期光照培养,其中,在第二阶段培养过程中,补充营养因子:葡萄糖 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CoCO_3 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用本发明技术方案,既有效提供小球藻细胞所需养分,又避免一次性投料造成的浪费,同时,也可以通过物料的更替和营养因子改变,提高产品的产率。

1. 一种分阶段补料法培养小球藻的方法,其特征在于:小球藻发酵培养用的培养基:以水为溶剂, CH_3COONa $0.15 \sim 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $2.0 \sim 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.1 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 $1.0 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 ZnCl_2 $1.0 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CuCl_2 $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1.0 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;将配制好的培养基溶液导入密闭反应器中,在 $120 \sim 130^\circ\text{C}$ 和 $0.1 \sim 0.2 \text{ MPa}$ 条件下消毒灭菌 $10 \sim 20 \text{ min}$,然后将其加入到养殖罐中,待冷却至 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 时,加 NaOH 溶液或稀盐酸调节 pH 为 $6 \sim 8$,然后添加小球藻菌种,其投加量为小球藻接种密度为 25% 。

2. 一种分阶段补料法培养小球藻的方法,其特征在于:小球藻的无光照异养自发酵培养:将所述已接小球藻菌种的液体培养基在阻断光照条件下发酵培养,其中,菌种发酵培养过程中,养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200 \text{ r/min}$,养殖罐通入空气的量为 $0.5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,同时,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间,温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$,发酵培养时间为 12 h 。

3. 一种分阶段补料法培养小球藻的方法,其特征在于:小球藻生长阶段培养用的培养基补料:以发酵培养用的培养基中的水量为标准,葡萄糖 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CoCO_3 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,加入补料时,提高养殖罐的旋转转速为 500 r/min ,同时有效控制培养基 pH 值在 $6 \sim 8$ 之间,温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 。

4. 一种分阶段补料法培养小球藻的方法,其特征在于:小球藻培养后期光照培养:所述的无光照发酵培养 12 h 后,小球藻进入生长阶段,在该阶段,采用光源照射提供光照,其中,光照强度为 $4.5 \times 10^3 \text{ lx}$,光照频率为 $220 \mu \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200 \text{ r/min}$,养殖罐通入空气的量为 $0.5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间,温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$,光照培养时间为 12 h 。

一种分阶段补料法培养小球藻的方法

技术领域

[0001] 本发明属于藻类生物培养技术领域,尤其涉及一种分阶段补料法培养小球藻的方法。

背景技术

[0002] 小球藻细胞内含有丰富的叶绿素,属于单细胞绿藻,是真核生物,其光合作用非常强,是其他植物的几十倍。小球藻含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质、食物纤维、核酸及叶绿素等,是维持和促进人体健康所不可缺少的营养素,特别是含有令人瞩目的生物活性物质糖蛋白、多糖体以及高达 13% 的核酸等物质,具有增强人体免疫、防止病毒增殖、抑制癌细胞增殖、抑制血糖上升,降低血清胆固醇含量,排除毒素,迅速修复机体的损伤等功能。小球藻中富含 CGF (小球藻生长因子),能迅速恢复机体造成的损伤,并可作为食品风味改良剂,它是世界上公认的健康食品,广泛应用于食品及发酵领域。

[0003] 小球藻在人工培养条件下能大量生长繁殖,产量很高,蛋白质含量为干重的 50% 左右,还富含其他成分。目前,人工培养小球藻的方法主要有三种,即密闭无菌培养、开放半无菌培养和开放藻菌混养,三种培养方法主要考虑产品的用途,高成本的培养方式和培养基只适合生产高附加值的医药用品、精细化工用品产品。随着生活质量的日益提高和人们生活需求的逐渐增长,富含丰富的营养成分,且有优良的医疗保健作用的小球藻将会成为人们最为喜爱的食品之一。

[0004] 小球藻富含丰富的营养成分,其中,油脂的含量比例很高,油脂是人体重要的供能物质,并能在人体内储存起来,成为维持生命活动的备用能源物质,同时,油脂也可生产生物柴油,解决当前能源紧缺的问题。研究表明油脂的合成受氮源的影响很大,目前,小球藻培养中主要采用 NH_4NO_3 和尿素作为氮源,虽然油脂合成有明显提高,但是仍然不能满足需求;同时油脂的积累受到 Fe^{3+} 含量的影响,研究表明,在小球藻菌种细胞指数生长阶段, Fe^{3+} 对油脂的积累有显著的促进作用,而在小球藻培养后期 Fe^{3+} 会增加细胞密度。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于:提供一种分阶段补料法培养小球藻的方法,该技术采用两步补料法,在小球藻细胞指数生长和培养后期两个阶段,分批次投加有利于油脂合成和积累的成分,有效增加小球藻油脂的含量,同时避免不必要的浪费,降低成本投入;本发明技术采用蛋白胨和酵母膏作氮源,不仅适宜细胞生长,而且极大促进油脂的合成。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0007] 1、小球藻发酵培养用的培养基:以水为溶剂, CH_3COONa $0.15 \sim 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $2.0 \sim 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaCl $0.1 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 $1.0 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 ZnCl_2 $1.0 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CuCl_2 $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1.0 \sim 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.5 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将配制好的培养基溶液导入密闭反应器中,在 $120 \sim 130^\circ\text{C}$ 和 $0.1 \sim 0.2 \text{ MPa}$ 条件下消毒灭菌 $10 \sim 20 \text{ min}$,然后将其加入

到养殖罐中,待冷却至 25 ~ 30℃时,加 NaOH 溶液或稀盐酸调节 pH 为 6 ~ 8,然后添加小球藻菌种,其投加量为小球藻接种密度为 25%。

[0008] 2、小球藻的无光照异养自发酵培养:将所述已接小球藻菌种的液体培养基在阻断光照条件下发酵培养,其中,菌种发酵培养过程中,养殖罐旋转转速为 140 ~ 200r/min,养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,同时,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃,发酵培养时间为 12h。

[0009] 3、小球藻生长阶段培养用的培养基补料:以发酵培养用的培养基中的水量为标准,葡萄糖 $5.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.5 \sim 1.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CoCO_3 $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,加入补料时,提高养殖罐的旋转转速为 500r/min,同时有效控制培养基 pH 值在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃。

[0010] 4、小球藻培养后期光照培养:所述的无光照发酵培养 12h 后,小球藻进入生长阶段。在该阶段,采用光源照射提供光照,其中,光照强度为 $4.5 \times 10^3\text{lx}$,光照频率为 $220\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,养殖罐旋转转速为 140 ~ 200r/min,养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃,光照培养时间为 12h。

[0011] 5、将培养出的小球藻细胞经过收获、干燥和压片后,可以作为人类健康食品和医药用品应用,也可提取油脂炼制生物柴油。

[0012] 与现有培养小球藻技术相比,本发明采用分阶段补料法培养小球藻,不仅有效增加小球藻油脂含量,而且减少不必要的浪费,降低生产成本;分阶段补料不仅有效控制碳源与氮源的比例,促进小球藻细胞增殖,而且降低小球藻细胞增长过程中代谢产生的毒素对其细胞的破坏,提高产量。

具体实施方式

[0013] 实施例 1

[0014] 1、小球藻发酵培养用的培养基:取 1m^3 去离子水做溶剂,称取 CH_3COONa 150g、蛋白胨 1.6kg、酵母膏 800g、 KH_2PO_4 100g、 K_2HPO_4 2kg、NaCl 100g、CaCl 1kg、 ZnCl_2 1kg、 CuCl_2 100g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 500g。将配制好的培养基溶液导入密闭反应器中,在 120 ~ 130℃和 0.1 ~ 0.2MPa 条件下消毒灭菌 10 ~ 20min,然后将其加入到养殖罐中,待冷却至 25 ~ 30℃时,加 NaOH 溶液或稀盐酸调节 pH 为 6 ~ 8,然后添加小球藻菌种,其投加量为小球藻接种密度为 25%。

[0015] 2、小球藻的无光照异养自发酵培养:将所述已接小球藻菌种的液体培养基在阻断光照条件下发酵培养,其中,菌种发酵培养过程中,养殖罐旋转转速为 140 ~ 200r/min,养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,同时,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃,发酵培养时间为 12h。

[0016] 3、小球藻生长阶段培养用的培养基补料:以发酵培养用的培养基中的水量为标准,葡萄糖 5kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 500g、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4g、 CoCO_3 1.5g,加入补料时,提高养殖罐的旋转转速为 500r/min,同时有效控制培养基 pH 值在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃。

[0017] 4、小球藻培养后期光照培养:所述的无光照发酵培养 12h 后,小球藻进入生长阶段。在该阶段,采用光源照射提供光照,其中,光照强度为 $4.5 \times 10^3\text{lx}$,光照频率

为 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200\text{r/min}$, 养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, 通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间, 温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 光照培养时间为 12h。

[0018] 5、将培养出的小球藻细胞经过收获、干燥和压片后, 可以作为人类健康食品和医药用品应用, 也可提取油脂炼制生物柴油。

[0019] 实施例 2

[0020] 1、小球藻发酵培养用的培养基: 取 1m^3 去离子水做溶剂, 称取 CH_3COONa 170g、蛋白胨 1.6kg、酵母膏 800g、 KH_2PO_4 100g、 K_2HPO_4 2.0kg、 NaCl 300g、 CaCl_2 1.5kg、 ZnCl_2 3.0kg、 CuCl_2 500g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.0kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 700g。将配制好的培养基溶液导入密闭反应器中, 在 $120 \sim 130^\circ\text{C}$ 和 $0.1 \sim 0.2\text{MPa}$ 条件下消毒灭菌 $10 \sim 20\text{min}$, 然后将其加入到养殖罐中, 待冷却至 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 时, 加 NaOH 溶液或稀盐酸调节 pH 为 $6 \sim 8$, 然后添加小球藻菌种, 其投加量为小球藻接种密度为 25%。

[0021] 2、小球藻的无光照异养自发酵培养: 将所述已接小球藻菌种的液体培养基在阻断光照条件下发酵培养, 其中, 菌种发酵培养过程中, 养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200\text{r/min}$, 养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, 同时, 通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间, 温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 发酵培养时间为 12h。

[0022] 3、小球藻生长阶段培养用的培养基补料: 以发酵培养用的培养基中的水量为标准, 葡萄糖 5.0kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 700g、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4g、 CoCO_3 1.5g, 加入补料时, 提高养殖罐的旋转转速为 500r/min , 同时有效控制培养基 pH 值在 $6 \sim 8$ 之间, 温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 。

[0023] 4、小球藻培养后期光照培养: 所述的无光照发酵培养 12h 后, 小球藻进入生长阶段。在该阶段, 采用光源照射提供光照, 其中, 光照强度为 $4.5 \times 10^3\text{lX}$, 光照频率为 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200\text{r/min}$, 养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, 通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间, 温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 光照培养时间为 12h。

[0024] 5、将培养出的小球藻细胞经过收获、干燥和压片后, 可以作为人类健康食品和医药用品应用, 也可提取油脂炼制生物柴油。

[0025] 实施例 3

[0026] 1、小球藻发酵培养用的培养基: 取 1m^3 去离子水做溶剂, 称取 CH_3COONa 200g、蛋白胨 1.6kg、酵母膏 800g、 KH_2PO_4 1.0kg、 K_2HPO_4 10.0kg、 NaCl 0.1 ~ 5.0kg、 CaCl_2 2.0kg、 ZnCl_2 5.0kg、 CuCl_2 1.0kg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 1.0kg。将配制好的培养基溶液导入密闭反应器中, 在 $120 \sim 130^\circ\text{C}$ 和 $0.1 \sim 0.2\text{MPa}$ 条件下消毒灭菌 $10 \sim 20\text{min}$, 然后将其加入到养殖罐中, 待冷却至 $25 \sim 30^\circ\text{C}$ 时, 加 NaOH 溶液或稀盐酸调节 pH 为 $6 \sim 8$, 然后添加小球藻菌种, 其投加量为小球藻接种密度为 25%。

[0027] 2、小球藻的无光照异养自发酵培养: 将所述已接小球藻菌种的液体培养基在阻断光照条件下发酵培养, 其中, 菌种发酵培养过程中, 养殖罐旋转转速为 $140 \sim 200\text{r/min}$, 养殖罐通入空气的量为 $0.5\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, 同时, 通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 $6 \sim 8$ 之间, 温度控制 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 发酵培养时间为 12h。

[0028] 3、小球藻生长阶段培养用的培养基补料: 以发酵培养用的培养基中的水量为标准, 葡萄糖 5.0 kg、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 1.0kg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4g、 CoCO_3 1.5g, 加入补料时, 提高

养殖罐的旋转转速为 500r/min,同时有效控制培养基 pH 值在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃。

[0029] 4、小球藻培养后期光照培养:所述的无光照发酵培养 12h 后,小球藻进入生长阶段。在该阶段,采用光源照射提供光照,其中,光照强度为 $4.5 \times 10^3 \text{lx}$,光照频率为 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,养殖罐旋转转速为 140 ~ 200r/min,养殖罐通入空气的量为 $0.5 \text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,通过全自动流加入 NH_4NO_3 或 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ 调节 pH 值维持在 6 ~ 8 之间,温度控制 25 ~ 30℃,光照培养时间为 12h。

[0030] 5、将培养出的小球藻细胞经过收获、干燥和压片后,可以作为人类健康食品和医药用品应用,也可提取油脂炼制生物柴油。