

高密度培养异养小球藻的方法

申请号：[200610078003.2](#)

申请日：2006-04-29

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](#) [徐瀚](#)
主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)
分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)
公开(公告)号 1837352
公开(公告)日 2006-09-27
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](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610078003.2

[43] 公开日 2006 年 9 月 27 日

[11] 公开号 CN 1837352A

[22] 申请日 2006.4.29

[21] 申请号 200610078003.2

[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 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

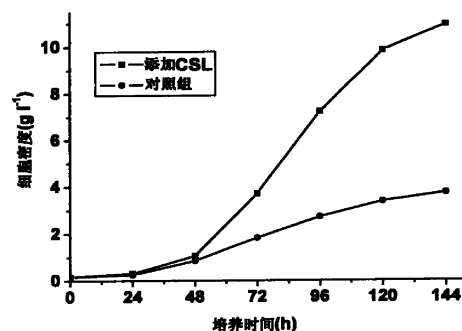
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称

高密度培养异养小球藻的方法

[57] 摘要

本发明公开了属于生物技术领域的一种高密度培养异养小球藻的方法。该方法是在通气培养瓶中加入含葡萄糖的培养基和少许添加剂 CSL，在异养条件下快速培养小球藻，该技术解决了异养小球藻对葡萄糖利用不充分的问题，并使得小球藻对高浓度葡萄糖的耐受能力大大加强，从而简化生产工艺、降低生产成本、有利于异养小球藻的大规模高密度培养。该技术使用一种添加剂 CSL，加入少许即可使异养小球藻利用葡萄糖的效率得到极大的提高，并且有助于缓解高浓度葡萄糖对藻细胞的伤害。在培养液中底物葡萄糖浓度为 100g/l 时，小球藻收获生物量 34.97g/l。



1. 一种高密度培养异养小球藻的方法，其特征在于：在培养基中加入添加剂 CSL，使得小球藻能充分利用葡萄糖，并缓解高浓度葡萄糖对藻细胞的伤害；所述培养异养小球藻有如下两种方式：

方式 a：在 1000ml 通气培养瓶中加入 pH 值为 5.0~7.0 的培养基和加入按体积比计算为培养基的 0.5~3 % 的添加剂 CSL，接种量 5~15 % (v/v)，培养温度 25~30℃，通气量 0.3~1.0 vvm，加入有机硅消泡剂万分之 0.5；至异养小球藻细胞密度最高时结束培养；

方式 b：在 5~11000L 发酵罐中加入上述培养基和添加剂 CSL，装料系数 60 %，接种量 5~10 % (v/v)；培养温度 25~30℃，搅拌转速 200~450 rpm，通气量 1.0~2.0 vvm，罐压 0.04 Mpa，加入有机硅消泡剂万分之 0.5；至达到最大生物量后停止培养。

2. 根据权利要求 1 所述高密度培养异养小球藻的方法，其特征在于：所述异养培养基的组成为葡萄糖 10~100 g/l， KH_2PO_4 0.3~1.0 g/l， $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 g/l， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.5 g/l， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~6 mg/l，甘氨酸 0.05~0.3 g/l， V_{B_1} 5~15 $\mu\text{g/l}$ ， A_5 微量元素液 1 ml/l，余量为水；其中 A_5 微量元素液的组成是 H_3BO_3 2.86 g/l， $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.039 g/l， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 g/l， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g/l， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.074 g/l。

3. 根据权利要求 1 所述高密度培养异养小球藻的方法，其特征在于：所述添加剂 CSL 为“清华大学生物技术实验室自制，是一种成分复杂的混合物，用于发酵生产；其主要成分包含占添加剂 CSL 总重量的 0.5~4% 的蛋白质、1~3% 的葡萄糖、2~5% 的硝酸钾 0.4~2% 的磷酸钾、0~1% 的游离氨基酸、0.01~1% 的植物生长素。

高密度培养异养小球藻的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及在异养条件下快速培养小球藻的一种高密度培养异养小球藻的方法。

背景技术

小球藻为绿藻门小球藻属(*Chlorella*)单细胞绿藻，生态分布广，易于培养，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。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，生长速度比光照条件下快，类似于细菌的代谢生长。目前最廉价、最适宜而被广泛使用的有机碳源是葡萄糖。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。

迄今为止，已报道的异养小球藻的大规模培养绝大部分以葡萄糖为碳源，但是葡萄糖的利用率都较低，培养末期剩糖较多，需要重新收集使用或者被浪费。根据异养小球藻的不同种，其耐受的最高葡萄糖浓度不尽相同。对于原始小球藻 *Chlorella protothecoides*, Shi 等(1999)的研究认为最适合生产叶黄素的葡萄糖浓度为 40 g/l，但是刘世名等(2000)认为最有利于小球藻生长的葡萄糖浓度是 10 g/l，闫海等(2005)的结论则是葡萄糖浓度高于 13.8 g/l 就对小球藻生长产生不良影响。他们一致的解决办法就是采用流加或者补料批次发酵的方式进行培养，以控制葡萄糖浓度，但是这种方式显然加大了大规模生产小球藻时的工艺难度，同时提高了生产成本。

我们提出的高密度培养异养小球藻的方法则独辟蹊径，通过找到一种特殊的添加剂，使得小球藻对葡萄糖的利用率得到极大提高，同时增强了小球藻对高浓度葡萄糖的耐受能力。采用此添加剂，用量少，价格低，省去回收葡萄糖的步骤，

不用流加补料,降低了生产难度和生产成本,有利于工业化生产异养小球藻。

发明内容

本发明的目的在于为解决异养小球藻对葡萄糖的利用率较低的问题,增强小球藻对高浓度葡萄糖的耐受能力,实现在简化工艺条件下异养小球藻的高密度培养。其特征在于,所述培养异养小球藻有如下两种方式:

方式 a: 在 1000ml 通气培养瓶中加入 pH 值为 5.0~7.0 的培养基和加入按体积比计算为培养基的 0.5~3 % 的添加剂 CSL, 使得小球藻能充分利用葡萄糖, 并缓解高浓度葡萄糖对藻细胞的伤害; 接种量 5~15 % (v/v), 培养温度 25~30℃, 通气量 0.3~1.0 vvm, 加入有机硅消泡剂万分之 0.5; 至异养小球藻细胞密度最高时结束培养。

所述异养培养液基本组成为葡萄糖 10~100 g/l, KH_2PO_4 0.3~1.0 g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.5 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~6 mg/l, 甘氨酸 0.05~0.3 g/l, V_{B_1} 5~15 $\mu\text{g/l}$, A_5 微量元素液 1 ml/l, 余量为水; 其中 A_5 微量元素液的组成是 H_3BO_3 2.86 g/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.039 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.074 g/l。

方式 b: 在 5~11000L 发酵罐中加入上述培养基和添加剂 CSL, 装料系数 60 %, 接种量 5~10 % (v/v); 培养温度 25~30℃, 搅拌转速 200~450 rpm, 通气量 1.0~2.0 vvm, 罐压 0.04 Mpa, 加入有机硅消泡剂万分之 0.5; 至达到最大生物量后停止培养。

所述添加剂 CSL 为清华大学生物技术实验室自制, 是一种成分复杂的混合物, 用于发酵生产; 其主要成分包含占添加剂 CSL 总重量的 0.5~4% 的蛋白质、1~3% 的葡萄糖、2~5% 的硝酸钾 0.4~2% 的磷酸钾、0~1% 的游离氨基酸、0.01~1% 的植物生长素。

本发明的有益效果是该技术在培养基中加入少许添加剂 CSL, 解决了异养小球藻对葡萄糖利用不充分的问题, 使异养小球藻利用葡萄糖的效率得到极大的提高, 并使得小球藻对高浓度葡萄糖的耐受能力大大加强, 有助于缓解高浓度葡萄糖对藻细胞的伤害, 从而有利于异养小球藻的大规模高浓度培养。此方法可使葡

葡萄糖的利用率提高到 70.9~99.6 %，适宜异养小球藻生长的葡萄糖浓度范围达到 10~100 g/l，藻细胞生物量达到 34.97 g/l。该技术适合于各种规模的异养小球藻培养，尤其有利于改善大规模发酵培养的工艺，降低生产成本。

附图说明

图 1 是在培养基葡萄糖浓度 10 g/l 条件下，通气培养瓶中添加 CSL 与未添加情况下异养小球藻生长曲线的比较。

图 2 是在培养基葡萄糖浓度 30 g/l 条件下，通气培养瓶中添加 CSL 与未添加情况下异养小球藻生长曲线的比较。

图 3 是在培养基葡萄糖浓度 50 g/l 条件下，通气培养瓶中添加 CSL 与未添加情况下异养小球藻生长曲线的比较。

图 4 是在培养基葡萄糖浓度 100 g/l 条件下，通气培养瓶中添加 CSL 与未添加情况下异养小球藻生长曲线的比较。

具体实施方式

本发明为一种高密度培养异养小球藻的方法，该技术的关键在于添加一种能显著提高异养小球藻对葡萄糖的利用率和对高浓度葡萄糖耐受能力的添加剂。

具体步骤如下：

异养培养液基本组成为葡萄糖 10~100 g/l， KH_2PO_4 0.3~1.0 g/l， $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 g/l， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.5 g/l， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~6 mg/l，甘氨酸 0.05~0.3 g/l， V_{B_1} 5~15 $\mu\text{g/l}$ ， A_5 微量元素液 1 ml/l，余量为水。其中 A_5 微量元素液的组成是 H_3BO_3 2.86 g/l， $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.039 g/l， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 g/l， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g/l， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.074 g/l。调节 pH 为 6.3 ± 0.2 。

通气摇瓶培养条件如下：对培养基和培养器皿进行高压灭菌后，在培养器皿中对异养小球藻进行无菌培养，接种量 5~15 % (v/v)。控制培养温度 28~30 $^{\circ}\text{C}$ ，通气量 0.3~1.0 vvm。一般培养条件下，异养小球藻在 6 天后生长几乎停止，生长动态表现为典型的 S 型生长曲线：即 0—24 h 为迟滞期，24—120 h 为快速生长期，120—144 h 进入稳定期，异养小球藻细胞密度到达最高，144 h 后细胞开始凋亡，结束培养。

对培养液或发酵液收集离心, 转速 8000 rpm, 温度 8 °C, 离心 10 min。去掉上清液, 得到藻泥洗涤再次离心收集后, -20 °C 冷冻过夜, 然后冷冻干燥得到干藻粉。称重, 换算成细胞密度。

所述添加剂 CSL 为清华大学生物技术实验室自制, 是一种成分复杂的混合物, 用于发酵生产; 其主要成分包含占添加剂 CSL 总重量的 0.5~4% 的蛋白质、1~3% 的葡萄糖、2~5% 的硝酸钾 0.4~2% 的磷酸钾、0~1% 的游离氨基酸、0.01~1% 的植物生长素。

下面根据附图结合具体实施例对本新型小球藻培养技术作进一步的说明。

实施例 1

对在培养基葡萄糖浓度 10 g/l 条件下, 添加 CSL 与否对异养藻细胞的生长状态的影响, 结果显示如图 1 所示。

10 g/l 的葡萄糖浓度是被广泛报道的异养小球藻生长的适宜条件。经过 144 h 的培养, 在未加入 CSL 的条件下, 藻细胞密度为 3.74 g/l; 加入 1 ‰ 的 CSL 后, 细胞密度高达 10.95 g/l, 为对照组的 293 %。未加入 CSL 的培养液残糖高达 6.49 g/l, 加入 CSL 的培养液残糖仅有 0.12 g/l, 葡萄糖的利用率从 35.1 % 提高到 98.8 %。表明 CSL 的加入极大的促进异养小球藻的生长, 并使葡萄糖得到充分利用。

实施例 2

对在培养基葡萄糖浓度 30 g/l 条件下, 添加 CSL 与否对异养藻细胞的生长状态的影响, 结果显示如图 2 所示。

经过 144 h 的培养, 在未加入 CSL 的条件下, 藻细胞密度为 0.22 g/l, 对比接种后藻细胞浓度 0.17 g/l, 可以认为 30 g/l 的高浓度葡萄糖基本抑制了藻的生长。加入 1.5 ‰ 的 CSL 后, 细胞密度达到 18.01 g/l, 残糖 0.13 g/l, 葡萄糖的利用率 99.6 %。表明 CSL 的加入减轻了高浓度葡萄糖对小球藻的伤害, 刺激了小球藻的生长。

实施例 3

对在培养基葡萄糖浓度 50 g/l 条件下, 添加 CSL 与否对异养藻细胞的生长

状态的影响,结果显示如图3所示。

经过 192 h 的培养,在未加入 CSL 的条件下,藻的生长被抑制。加入 2 %的 CSL 后,细胞密度达到 22.97 g/l,残糖 8.40 g/l,葡萄糖的利用率 83.2 %。表明随着葡萄糖浓度的提高,收获细胞密度增加,但藻细胞对葡萄糖的利用率下降,生长周期延长,同时糖转化为生物量的效率降低。

实施例 4

对在培养基葡萄糖浓度 100 g/l 条件下,添加 CSL 与否对异养藻细胞的生长状态的影响,结果显示如图4所示。

经过 192 h 的培养,在未加入 CSL 的条件下,藻的生长被抑制。加入 3%的 CSL 后,细胞密度达到 34.97 g/l,残糖 29.09 g/l,葡萄糖的利用率 70.81 %。表明随着葡萄糖浓度的进一步提高,收获细胞密度进一步增加,但藻细胞对葡萄糖的利用率进一步下降。

根据以上实施例可以看出,本发明成功的提高了异养小球藻对葡萄糖的利用率和对高浓度葡萄糖的耐受能力,实现了异养小球藻的高密度培养,简化了培养工艺条件,为大规模发酵培养异养小球藻打下来良好的基础。

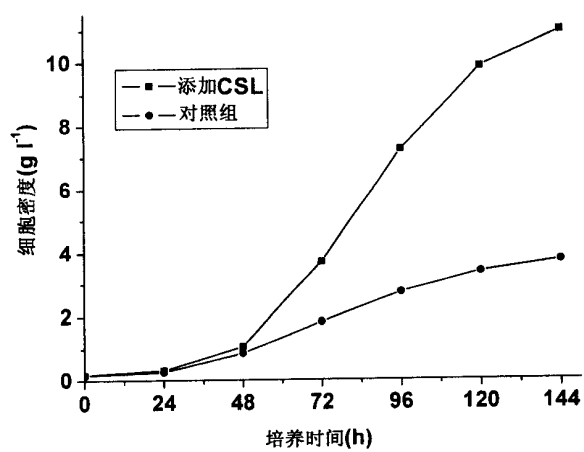


图 1

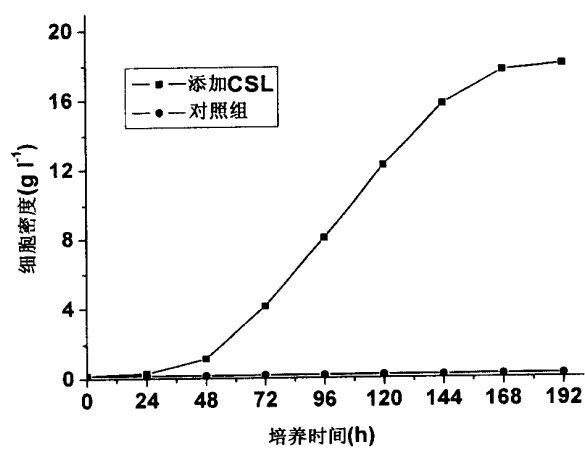


图 2

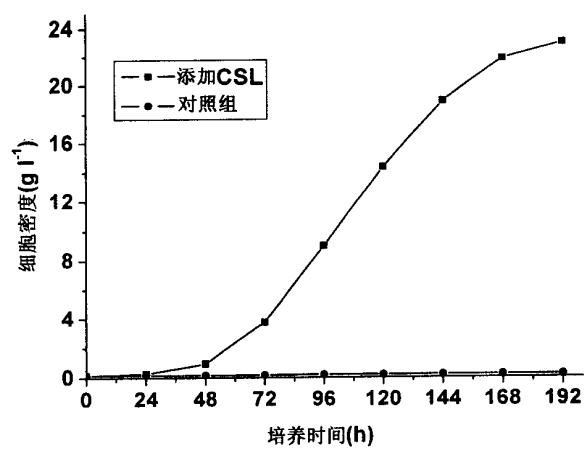


图 3

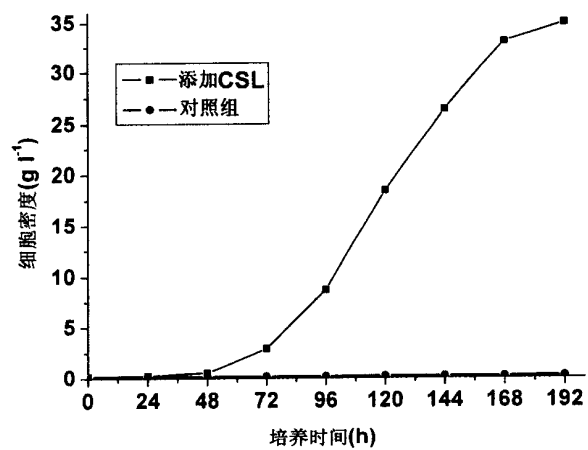


图 4