

一种用于培养小球藻的培养基组合物

申请号：[201010539185.5](#)

申请日：2010-11-05

申请(专利权)人 [中国石油化工股份有限公司](#) [中国石油化工股份有限公司抚顺石油化工研究院](#)

地址 100728 北京市朝阳区朝阳门北大街22号

发明(设计)人 [王领民](#) [金平](#) [师文静](#) [李晓姝](#) [王崇辉](#) [佟明友](#) [黎元生](#)

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 102465098A

公开(公告)日 2012-05-23

专利代理机构 [抚顺宏达专利代理有限责任公司](#) 21102

代理人 [李微](#)



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102465098 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 23

(21) 申请号 201010539185. 5

C12R 1/89(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 05

(71) 申请人 中国石油化工股份有限公司

地址 100728 北京市朝阳区朝阳门北大街
22 号

申请人 中国石油化工股份有限公司抚顺石
油化工研究院

(72) 发明人 王领民 金平 师文静 李晓姝
王崇辉 佟明友 黎元生

(74) 专利代理机构 抚顺宏达专利代理有限责任
公司 21102

代理人 李微

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种用于培养小球藻的培养基组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种适用于普通小球藻培养的培养基组合物以及利用该培养基进行混合培养小球藻的方法。所述培养基是在常规 SE 培养基的基础上,通过添加 0.00126 ~ 0.063 克 / 升的 Na_2SO_3 和有机碳源获得的。本发明的培养基用于光自养 - 异养混合培养普通小球藻,能够显著促进小球藻的生长,可使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,即实现小球藻的高密度培养;而且本发明的培养基组合物使得普通小球藻更容易利用有机碳源、尤其是利用廉价碳源进行生长,并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用,可使普通小球藻的品质即油脂含量与异养培养相比有较大幅度提高,达到光自养培养时的水平。

1. 一种用于培养小球藻的培养基组合物,其特征在于,每升所述培养基组合物包括:
 Na_2SO_3 0.00126 ~ 0.063g、有机碳源 10 ~ 50g、 NaNO_3 或 KNO_3 0.1 ~ 0.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ~ 0.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ~ 0.1g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 ~ 0.05g、 KH_2PO_4 0.05 ~ 0.2g、 NaCl 0.05 ~ 0.1g、Soil extract 20 ~ 40mL、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001 ~ 0.01g、 Fe-EDTA 0.5 ~ 1mL、微量元素溶液 0.5 ~ 1mL 和去离子水余量。
2. 按照权利要求1所述的培养基组合物,其特征在于,每升所述培养基组合物包括 0.02 ~ 0.05g Na_2SO_3 。
3. 按照权利要求1所述的培养基组合物,其特征在于,1升所述微量元素溶液的组成包括: H_3BO_3 5.5 ~ 6.5g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 ~ 5.0g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 ~ 1.0g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.20 ~ 0.40g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.50 ~ 1.00g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.10 ~ 0.20g 和去离子水余量。
4. 按照权利要求1所述的培养基组合物,其特征在于,所述的有机碳源为葡萄糖、淀粉水解液、菌渣处理液和藻渣处理液中的一种或几种。
5. 按照权利要求1所述的培养基组合物,其特征在于,所述的有机碳源为菌渣处理液或藻渣处理液,其在培养基组合物中的含量为 30 ~ 50g/L
6. 按照权利要求4或5所述的培养基组合物,其特征在于,所述的菌渣选自细菌菌渣或酵母菌菌渣。
7. 按照权利要求6所述的培养基组合物,其特征在于,所述的细菌选自厌氧发酵的克雷伯氏肺炎菌,所述的酵母菌选自假丝酵母菌。
8. 按照权利要求1~7任意一项所述的培养基组合物,其特征在于,所述的菌渣处理液通过如下方法制得:
细菌或酵母菌发酵结束后,在 60℃ ~ 80℃ 蒸煮 30min ~ 60min 后,在常温下过滤获得菌渣滤饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的碱溶液进行水解,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15℃ ~ 30℃,处理时间为 5d ~ 10d;
所述的藻渣处理液通过如下方法制备:藻细胞破碎除油后得到藻饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的碱液进行水解,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15℃ ~ 30℃,处理时间为 5d ~ 10d。
9. 按照权利要求8所述的培养基组合物,其特征在于,所述的碱选自 NaOH 和 / 或 NaHCO_3 。
10. 按照权利要求1或2所述的培养基组合物,其特征在于,每升所述培养基组合物中还包括番茄提取液 5 ~ 15mL。
11. 按照权利要求10所述的培养基组合物,其特征在于,所述番茄提取液的配制过程为:称取 100% 原汁番茄汁,用蒸馏水溶解配制成 100 ~ 200g/L 浓度的溶液,将其离心去固体杂质,得到上清液,即为番茄提取液。
12. 一种驯化培养小球藻的方法,其特征在于,驯化过程使用了权利要求1~11任意一项所述的培养基组合物。
13. 一种培养小球藻的方法,该方法采用光自养-异养混合培养普通小球藻,其特征在于,所述方法使用了权利要求1~11任意一项所述的培养基组合物。
14. 按照权利要求13所述的小球藻培养方法,其特征在于,所述方法包括:往生物反应器中加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0 的权利要求1~11任意一项所述的培养基组合物,按工作

体积的 5%～15%接入普通小球藻藻种进行培养,培养条件为:搅拌速度为 80～100rpm,通入空气和二氧化碳的混合气体,通气量为 0.1～1.0vvm,光照强度为 2000～3000lx,培养温度为 25℃～32℃,培养过程中控制 pH 值小于 10。

一种用于培养小球藻的培养基组合物

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体的说涉及一种适合用于普通小球藻高密度高品质培养的培养基组合物和培养小球藻的方法。

背景技术

[0002] 人们对小球藻得研究历史较长,其中普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 是研究的较多的一个藻种,也是目前商业化生产普遍采用的藻种之一。

[0003] 小球藻富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸等营养成分,可用于食品、医药和能源方面;可以大量积累脂肪酸,有些小球藻脂肪酸含量可占干重的 30%~60%。利用培养小球藻来积累油脂资源,已经成为目前利用太阳能开发可再生资源最热门的研究领域。不仅具有强大的市场潜力,而且具有非凡的社会价值。

[0004] 但大部分野生小球藻生长速度不快,固定二氧化碳能力也有限,要实现规模化生产,就消耗大量的人力物力,而收获甚微。

[0005] 小球藻根据其营养方式分为自养与异养两种。第一种光自养过程就是小球藻利用 CO₂ 气体进行光合作用来固定碳源的同时获得能源,进行生长,并积累油脂。由于 CO₂ 在培养液中溶解度有限,吸收利用效率低下,藻细胞生长速率有限,规模化以后一般采取开放池放养,却容易污染并且还具有细胞密度低和占地面积大等不利因素。第二种是异养培养方式,就是在培养过程人为提供碳源,比如葡萄糖等,显而易见,虽然通过提供异养碳源,可以大幅度提高藻细胞密度,但其藻细胞品质明显下降,蛋白和脂肪酸含量均偏低。葡萄糖作为异养碳源,属于速效碳源,可以提高小球藻生长的速度,但其油脂积累效率并没有得到相应的提高,同时该类碳源必然增加培养成本,将会受到原料的极大限制。

[0006] Atev. A (Atev A., Manova A. Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* A2. Dokl. Bolg. Akad. Nauk, (English) 1981, 34(5) :687 ~ 690)、张大兵等 (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) 和潘欣等 (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) 均对异养小球藻培养过程品质下降问题做了阐述。其中研究的主要是小球藻中蛋白质成份的变化。

[0007] 在小球藻培养条件和培养方式的基础上,人们的目光转向利用小球藻生产生物柴油的培养策略。单步培养策略:完全培养基培养,虽然油脂的含量会比较低(加大提取成本),但生长速率快,能快速地增加生物量;不完全培养基培养,虽然生产速率比较慢,但高的油脂含量能抵消生物量的不足。两步培养策略:先利用完全培养基异养培养,使其生物量快速增加,再利用不完全培养基自养培养如氮限制或改变培养条件如光强、温度,使藻细胞大量积累油脂。

[0008] CN 200610025618.9 公开了一种高密度高品质培养小球藻的方法,该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。该方法在异养培养基中加入葡萄糖作为有机碳源,成本较高。

[0009] CN200610024004.9 公开了一种培养普通小球藻的方法,该方法采用异养—光自养串联培养普通小球藻。该方法异养培养采用的培养基组合物基本上由 KNO_3 、葡萄糖以及少量无机盐、微量元素和水组成。即该方法中的异养培养基中同样加入了价格较贵的葡萄糖作为有机碳源。

[0010] 上述异养培养小球藻的文献改善小球藻培养品质均只是指藻细胞中蛋白质和叶绿素的含量。尤其是CN200610024004.9,虽然通过优化小球藻培养组合物成份,但却没有提及此组合物培养小球藻对小球藻油脂含量的改善效果。

[0011] 因此,在目前研究过程中为达到培养小球藻利用廉价碳源高密度生长的同时,还能获得较高含量的脂肪酸累积效果,必须从基本培养基组合物入手。有必要解决小球藻异养高密度高含油品质培养的培养组合物问题。

发明内容

[0012] 本发明要解决的技术问题是提供一种用于培养普通小球藻的培养基组合物,该培养基可使小球藻达到高密度培养的前提下,藻细胞油脂积累与现有的两步培养相比较有较大幅度提高,培养结束时达到光自养培养时的水平。

[0013] 为实现上述目的,本发明提供了一种用于培养普通小球藻的培养基组合物,所述培养基基本上包括 Na_2SO_3 、有机碳源以及少量无机盐、微量元素和水。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,每升所述培养基组合物的组成包括: Na_2SO_3 0.00126 ~ 0.063g,优选 0.02 ~ 0.05g、有机碳源 10 ~ 50g、 NaNO_3 或 KNO_3 0.1 ~ 0.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ~ 0.1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 ~ 0.1g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 ~ 0.05g、 KH_2PO_4 0.05 ~ 0.2g、 NaCl 0.05 ~ 0.1g、Soil extract(土壤提取液) 20 ~ 40mL、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001 ~ 0.01g、 Fe-EDTA 0.5 ~ 1mL、微量元素溶液 0.5 ~ 1mL,去离子水余量。

[0015] 其中 1 升微量元素溶液的组成为: H_3BO_3 5.5 ~ 6.5g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 ~ 5.0g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 ~ 1.0g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.20 ~ 0.40g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.50 ~ 1.00g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.10 ~ 0.20g 和去离子水余量。

[0016] 根据本发明的培养基组合物,其中所述的有机碳源选自葡萄糖、淀粉水解液、菌渣处理液和藻渣处理液中的一种或几种。有机碳源用量为每升培养基溶液中添加 10 ~ 50g 该有机碳源,其中以水解液或处理液形式加入的碳源,亦是按对应预处理方法获得的水解液或处理液重量来添加入培养基组合物中。

[0017] 其中所述的有机碳源优选菌渣处理液或藻渣处理液。所述的菌渣选自细菌菌渣或酵母菌菌渣,细菌优选厌氧发酵的克雷伯氏肺炎菌,酵母菌优选假丝酵母菌。所述的菌渣或藻渣处理液是通过对菌渣或藻渣进行预处理得到的。所述菌渣的预处理方法为:细菌或酵母菌发酵结束后,在 60°C ~ 80°C 蒸煮 30min ~ 60min 后,在常温下过滤获得菌渣滤饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的稀碱进行水解,所用的稀碱选自 NaOH 和 / 或 NaHCO_3 ,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20(质量比),处理温度为 15°C ~ 30°C ,处理时间为 5 ~ 10 天。所述藻渣的预处理方法为:藻细胞破碎除油后得到藻饼,然后加入 0.01 ~ 0.1mol/L 的碱液进行水解,水解过程的固液比为 1 : 10 ~ 1 : 20,处理温度为 15°C ~ 30°C ,处理时间为 5d ~ 10d。

[0018] 所述的培养基中葡萄糖浓度为 10 ~ 15g/L,所述淀粉或菌渣水解液浓度为 30 ~

50g/L。

[0019] 在本发明的另一种实施情况中,每升培养基组合物还包括番茄提取液 5 ~ 15mL,优选 6 ~ 10mL。其中番茄提取液的配制过程为:称取 100% 原汁番茄汁,用蒸馏水溶解配制成为 100 ~ 200g/L 浓度的溶液,将其离心去固体杂质,得到上清液,即为番茄提取液。

[0020] 本发明还同时提供了一种驯化培养混养小球微藻的方法,在驯化过程中使用了上述的培养基组合物。所述的驯化培养方法包括:

[0021] 出发藻种为一种自养小球藻,对自养小球藻进行异养条件驯化培养,所用培养基为上述的培养基。异养驯化培养条件为,避光情况下 25℃ ~ 30℃、100 ~ 150rpm、空气浴摇床培养 7d ~ 10d;经过 5 ~ 10 批次异养驯化之后,对异养驯化藻种进行分离纯化:将培养在异养条件下的指数期藻液稀释涂布于 SE 培养基(为本领域所熟知的基本培养基)所做的固体平板上,弱光条件培养 10d ~ 20d,得到若干单藻落,将此单藻落挑取后,划到 SE 固体斜面培养基中培养,待生长后,即可获得纯种混养藻种。

[0022] 其中驯化过程使用的培养基组合物中,优选有机碳源同时包括葡萄糖、细菌菌渣处理液或藻渣处理液,葡萄糖浓度为 10 ~ 15g/L,菌渣或藻渣处理液浓度为 30 ~ 50g/L。

[0023] 在某些实施例的情况下,本发明还提供了一种培养小球藻的方法,该方法采用光自养-异养混合培养小球微藻,其特征在于,所述方法采用了本发明所述的培养基组合物。

[0024] 所述的培养小球藻的方法包括:往生物反应器中加入 pH 值为 6.0 ~ 7.0 的上述培养基,按工作体积的 5% ~ 15% 接入普通小球藻藻种进行培养,培养条件为:搅拌速度为 80 ~ 100rpm,通入空气和二氧化碳的混合气体,通气量为 0.1 ~ 1.0vvm,光照强度为 2000 ~ 3000lx,培养温度为 25℃ ~ 32℃,培养过程中控制 pH 值小于 10。

[0025] 在配制成培养基组合物后,根据需要调节所述培养基组合物的 pH 值至 6.0 ~ 7.0,并在 121℃ ~ 130℃ 下灭菌 30 ~ 60 分钟。

[0026] 与现有的小球藻培养基相比较,本发明的培养基组合物具有如下特点:

[0027] 1、由于加入了 Na_2SO_3 ,本发明的培养基组合物用于光自养-异养混合培养普通小球藻,能够促进小球藻的生长,可使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,即可以实现小球藻的高密度培养,比无 Na_2SO_3 添加时生物量可提高 80% ~ 140%。

[0028] 2、 Na_2SO_3 与番茄提取液、微量元素母液的配合使用,使得普通小球藻更容易利用有机碳源进行生长,并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用,可使普通小球藻的品质即油脂含量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。

[0029] 3、在本发明的培养基组合物中可以加入廉价的菌渣或藻渣处理液用作有机碳源,该类有机碳源与 Na_2SO_3 和番茄提取液、微量元素母液相配合,既能够实现小球藻的高密度培养,得到的较高的油脂含量,同时还大幅降低了小球藻的培养成本。

具体实施方式

[0030] 首先采用文献中报道的 SE 培养基(该培养基为本领域所熟知,可用于小球藻在光自养条件下生长,通过添加碳源来实现异养培养),对 SE 培养基进行略加修改即上述发明内容中所使用培养基中去除 Na_2SO_3 和有机碳源成份。以该修改后的 SE 培养基来培养出发小球藻,在 SE 培养基中此出发小球藻细胞生长虽然可以实现培养,但培养结束时藻细胞浓

度不高,而且藻细胞内的油脂含量也较低。说明该培养基需要进一步优化,才能实现高密度高品质培养的目的。

[0031] 本发明以此 SE 培养基为基础,通过在其中添加 Na_2SO_3 和有机碳源,改变其中有机碳源作用效果,在碳源氮源以及 Na_2SO_3 作用下,并调整培养基中其他元素含量,包括添加番茄提取液,获得了适用于出发小球藻通过异养优化所获得诱变小球藻混合培养的培养基,使该培养基可实现普通小球藻或诱变小球藻的高密度高品质培养。

[0032] 本发明中所述的藻细胞品质指标为单位藻体油脂含量,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藻体油脂含量和藻体干重进行测定,具体方法均为本领域所熟知。

[0033] 以下将通过实施例对本发明的技术内容作进一步的说明。除非另有所述,本发明方法和实施例中所所述的添加物质的浓度均是以培养基总体积为基准,即添加物质的含量占培养液配制完成后总的培养液体积的百分比或摩尔数或质量等。

[0034] 实施例 1

[0035] 在 250mL 摇瓶中加入 100mL 如下所示的培养基,接种比例为 10% (即种子液体积占培养体积的 10%),其中种子为经过驯化的小球藻,异养培养(装液量 100mL,温度 30 度,摇床转速 100rpm)48 小时,结果测得细胞密度最大为 14.24g/L,油脂含量为 30.8% (细胞内总油脂量占总细胞干重的百分数)。

[0036] 每升培养基组成:

[0037] 葡萄糖 15g Na_2SO_3 0.040g

[0038] KNO_3 0.35g 微量元素母液 0.5mL

[0039] $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.075g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075g

[0040] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025g KH_2PO_4 0.175g

[0041] NaCl 0.025 Soil extract (土壤提取液) 30mL

[0042] $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005g Fe-EDTA 1mL

[0043] 蒸馏水余量

[0044] 其中 1 升微量元素母液配方: H_3BO_3 6.0g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.5g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.35g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15g、蒸馏水余量。

[0045] 比较例 1

[0046] 培养基基本组成同实施例 1,未加入 Na_2SO_3 这种组分,培养条件和过程与实施例 1 相一致。培养结果分析测得的细胞密度只有 6.11g/L,油脂占细胞干重的含量也只有 27.6%。

[0047] 根据上述实验结果可以看出,在同样基础培养基条件下,使用 Na_2SO_3 对小球藻的培养效果影响比较明显,在有 Na_2SO_3 存在下,小球藻更容易利用有机碳源进行生长,并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用。

[0048] 实施例 2

[0049] 在 250mL 摇瓶中加入 100mL 如下所示的培养基,接种比例为 10% (即种子液体积占培养体积的 10%),其中种子为经过异养驯化的小球藻,异养培养(装液量 100mL,温度 30 度,摇床转速 100rpm)48 小时,结果测得细胞密度最大为 19.41g/L,油脂含量为 35.2% (细胞内总油脂量占总细胞干重的百分数)。

[0050] 其中菌渣处理液是通过细菌或酵母菌菌渣进行水解处理获得。其中优选克雷伯氏肺炎杆菌,其以甘油为唯一底物,在厌氧条件下发酵生产 1,3- 丙二醇。发酵结束后,经 80℃ 蒸煮 40min 后,在常温下过滤获得菌渣滤饼,对菌渣滤饼经过烘干后,在 0.1mol/L 的 NaOH 溶液下进行水解,水解过程的固液比为 1 : 20,处理时间为 7d,处理温度为 25℃。经过处理后的菌渣处理液可以作为有机碳源用于配制培养基组合物。

[0051] 每升培养基组成如下:

[0052] 菌渣处理液 30g Na₂SO₃ 0.040g

[0053] NaNO₃ 0.35g 微量元素母液 0.7mL

[0054] K₂HPO₄ · 3H₂O 0.075g MgSO₄ · 7H₂O 0.075g

[0055] CaCl₂ · 2H₂O 0.025g KH₂PO₄ 0.175g

[0056] NaCl 0.025g Soil extract (土壤提取液) 30mL

[0057] FeCl₃ · 6H₂O 0.005g Fe-EDTA 1mL

[0058] 蒸馏水余量

[0059] 其中 1 升微量元素母液配方: H₃BO₃ 6.0g、ZnSO₄ · 7H₂O 4.5g、MnCl₂ · H₂O 0.75g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.35g、CuSO₄ · 5H₂O 0.75g、Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.15g、蒸馏水余量。

[0060] 比较例 2

[0061] 培养基基本组成同实施例 2,不同的是培养基中未加入 Na₂SO₃ 这种组分,培养条件和过程与实施例 2 相一致。培养结果分析测得的细胞密度只有 8.11g/L,油脂占细胞干重的含量也只有 28.2%。

[0062] 根据上述实验结果可以看出,在同样基础培养基条件下,使用 Na₂SO₃ 对小球藻的培养效果影响比较明显,在有 Na₂SO₃ 存在下,尤其是在使用菌渣预处理液的情况下,小球藻更容易利用有机碳源进行生长,并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用。

[0063] 同时氮源以及微量元素的改变也会对小球藻的培养起到一定的促进作用,他们共同作用,使培养效果得到改善。

[0064] 实施例 3

[0065] 在 250mL 摇瓶中加入 100mL 如下所示的培养基,接种比例为 10% (即种子液体积占培养体积的 10%),所用种子来自普通小球藻,该小球藻未经过异养驯化培养过程,直接对其异养培养 (装液量 100mL,温度 30 度,摇床转速 100rpm) 48 小时,结果测得细胞密度最大为 11.30g/L,油脂含量为 28.6% (细胞内总油脂量占总细胞干重的百分数)。

[0066] 每升培养基组成如下:

[0067] 葡萄糖 30g Na₂SO₃ 0.020g

[0068] KNO₃ 0.25g 微量元素母液 0.1mL

[0069] K₂HPO₄ · 3H₂O 0.075g MgSO₄ · 7H₂O 0.075g

[0070] CaCl₂ · 2H₂O 0.025g KH₂PO₄ 0.175g

[0071] NaCl 0.025 Soil extract (土壤提取液) 30mL

[0072] FeCl₃ · 6H₂O 0.005g Fe-EDTA 1mL

[0073] 蒸馏水余量

[0074] 其中 1 升微量元素母液配方: H₃BO₃ 6.0g、ZnSO₄ · 7H₂O 4.5g、MnCl₂ · H₂O 0.75g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.35g、CuSO₄ · 5H₂O 0.75g、Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.15g、蒸馏水余量。

[0075] 比较例 3

[0076] 培养基基本组成同实施例 3, 其中未添加 Na_2SO_3 和微量元素母液, 所用藻种为来自普通小球藻, 该小球藻未经过异养驯化培养过程, 直接对其异养培养, 培养条件和过程与实施例 3 相一致。培养结果分析测得的细胞密度只有 4.26g/L, 油脂占细胞干重的含量也只有 25.4%。

[0077] 根据上述实验结果可以看出, 在同样基础培养基条件下, 使用 Na_2SO_3 与微量元素母液配合使用对普通小球藻的培养效果影响比较明显, 在有 Na_2SO_3 存在下, 小球藻更容易利用有机碳源进行生长, 并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用。

[0078] 与实施例 1 和 2 相比, 小球藻通过异养驯化以后, 更能有效地利用有机碳源在异养与自养条件均具备的情况下, 驯化小球藻可以更有效地实现混合培养过程。

[0079] 实施例 4

[0080] 在 250mL 摇瓶中加入 100mL 如下所示的培养基, 接种比例为 10% (即种子液体积占培养体积的 10%), 其中种子为经过异养驯化的小球藻, 异养培养 (装液量 100mL, 温度 30 度, 摇床转速 100rpm) 48 小时, 结果测得细胞密度最大为 20.30g/L, 油脂含量为 32.8% (细胞内总油脂量占总细胞干重的百分数)。

[0081] 其中菌渣处理液的处理方法同实施例 2。

[0082] 每升培养基组成如下:

[0083] 菌渣处理液 35g Na_2SO_3 0.050g

[0084] NaNO_3 0.35g 微量元素母液 0.7mL

[0085] $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.075g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075g

[0086] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025g KH_2PO_4 0.175g

[0087] NaCl 0.025g Soil extract (土壤提取液) 30mL

[0088] $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005g Fe-EDTA 1mL

[0089] 番茄提取液 10mL 蒸馏水余量

[0090] 其中 1 升微量元素母液配方: H_3BO_3 6.0g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.5g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.35g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15g、蒸馏水余量。

[0091] 番茄提取液配制: 称取 100% 原汁番茄汁, 用蒸馏水溶解配制成 150g/L 浓度的溶液, 将其离心去固体杂质, 得到上清液, 即为番茄提取液。

[0092] 实施例 5

[0093] 在 250mL 摇瓶中加入 100mL 如下所示的培养基, 接种比例为 10% (即种子液体积占培养体积的 10%), 其中种子为经过异养驯化的小球藻, 进行混合培养 (装液量 100mL, 温度 30 度, 摇床转速 100rpm, 通入空气和二氧化碳的混合气体, 通气量为 0.5vvm, 光照强度为 3000lx, 培养过程中控制 pH 值小于 10) 48 小时, 结果测得细胞密度最大为 22.15g/L, 油脂含量为 38.0% (细胞内总油脂量占总细胞干重的百分数)。

[0094] 其中菌渣处理液的处理方法同实施例 2。

[0095] 每升培养基组成如下:

[0096] 菌渣处理液 50g Na_2SO_3 0.020g

[0097] NaNO_3 0.35g 微量元素母液 0.7mL

[0098] $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.075g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075g

[0099] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025g KH_2PO_4 0.175g
[0100] NaCl 0.025g Soil extract(土壤提取液)30mL
[0101] $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005g Fe-EDTA 1mL
[0102] 番茄提取液 10mL 蒸馏水余量
[0103] 其中 1 升微量元素母液配方: H_3BO_3 6.0g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.5g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.35g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15g、蒸馏水余量。番茄提取液的配制同实施例 4。

[0104] 从实施例 1、2、4 与 5,以及比较例 1 与 2,可以看出,在优选的 Na_2SO_3 用量范围内,在有 Na_2SO_3 存在下,尤其是在使用菌渣预处理液的情况下,小球藻更容易利用有机碳源进行生长,并且对自身后期的油脂积累也有较大的促进作用。并且由实施例 5 可知,该驯化小球藻在组合物培养基条件下可以实施异养与自养混合培养过程,小球藻的培养品质均得到了相应提高。

[0105] 实施例 6

[0106] 该实施例中对普通小球藻进行异养驯化。出发藻种为一种自养小球藻,对自养小球藻进行异养条件驯化培养:

[0107] 每升培养基组成如下:

[0108] 菌渣处理液 20g Na_2SO_3 0.020g
[0109] NaNO_3 0.30g 微量元素母液 0.5mL
[0110] $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.070g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075g
[0111] $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025g KH_2PO_4 0.2g
[0112] NaCl 0.025g Soil extract(土壤提取液)40mL
[0113] $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005g Fe-EDTA 1mL
[0114] 葡萄糖 10g 蒸馏水余量
[0115] 其中 1 升微量元素母液配方: H_3BO_3 6.0g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0g、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.70g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.40g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.75g、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15g、蒸馏水余量。

[0116] 异养驯化培养条件为,避光情况下 30°C 、120rpm、空气浴摇床培养 10d;经过 8 批次异养驯化之后,对异养驯化藻种进行分离纯化:将培养在异养条件下的指数期藻液稀释涂布于 SE 培养基(为该领域内所熟知的基本培养基)所做的固体平板上,弱光条件培养 15d,得到若干单藻落,将此单藻落挑取后,划到 SE 固体斜面培养基中培养,待生长后,即可获得纯种混养藻种,即驯化小球藻。

[0117] 由上述多个实施例与比较例可以确定,该小球藻培养基在使用菌渣处理液以及 Na_2SO_3 、番茄提取液和微量元素母液时培养出来的小球藻品质最为突出,尤其是使用该异养培养基驯化后的小球藻作为出发小球藻藻种的情况下,驯化小球藻在该优化培养组合物培养后获得的生长与生产能力比原始普通小球藻的培养品质均有较大提高。同时通过实施例 5 可以看出,该组合物驯化获得小球藻在通过异养自养混合培养之后,小球藻的培养品质最为突出。