

一种快速培养小球藻的方法

申请号：[201210552185.8](#)

申请日：2012-12-19

申请(专利权)人 [盐城工学院](#)

地址 224051 江苏省盐城市迎宾大道9号

发明(设计)人 [许伟](#) [颜秀花](#) [吴乔林](#) [齐志涛](#) [邵荣](#)

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 103114041A

公开(公告)日 2013-05-22

专利代理机构

代理人



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103114041 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201210552185. 8

(22) 申请日 2012. 12. 19

(71) 申请人 盐城工学院

地址 224051 江苏省盐城市迎宾大道 9 号

(72) 发明人 许伟 颜秀花 吴乔林 齐志涛
邵荣

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006. 01)

C12R 1/89(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速培养小球藻的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速培养小球藻的方法,属于生物技术领域。该培养方法包括以新鲜自来水为溶剂,配制标准 BG-11 培养基,用于小球藻的基础培养基;向标准培养基中添加一定量的有机碳源和 NaHCO_3 ,使其终浓度分别为 $0.5 \sim 1.0\text{g/L}$ 和 $0.2 \sim 0.5\text{g/L}$;将上述培养基,放入培养容器中,并接种 $10\% \sim 20\%$ 的小球藻液,封口,将藻液放置在光照强度 $3000 \sim 4000\text{Lx}$ 、光暗比 $12\text{h} : 12\text{h}$ 、温度 $22 \sim 28^\circ\text{C}$ 的环境下培养。用本发明方法可使小球藻的细胞密度在较短的培养周期里达到比较高的水平,比用基础培养基培养的增加 6 倍左右。同时,该方法还具有工艺操作简单、培养基不需要灭菌、不需要调节培养基的 pH 值等优点,可广泛用于工业化生产中小球藻的培养。

1. 一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:该培养方法包括以下步骤:

1) 以新鲜自来水为溶剂,配制标准 BG-11 培养基,用于小球藻的基础培养基;所述的标准 BG-11 培养基成分(g/L): NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5.24×10^{-2} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-2} ; CaCl_2 , 2.72×10^{-2} ; 柠檬酸, 6.562×10^{-3} ; 柠檬酸铁铵, 6.0×10^{-3} ; $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1×10^{-3} ; Na_2CO_3 , 2.0×10^{-2} ; H_3BO_3 , 2.86×10^{-3} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.86×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.9×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.0×10^{-5} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-5} 。

2) 向标准培养基中添加一定量的有机碳源和 NaHCO_3 , 使有机碳源的终浓度为 0.5 ~ 1.0g/L, NaHCO_3 的浓度为 0.2 ~ 0.5g/L;

3) 将上述培养基,放入培养容器中,并接种 10% ~ 20% 的小球藻液,封口,将藻液放置在光照强度 3000 ~ 4000Lx、光暗比 12h : 12h、温度 22 ~ 28℃ 的环境下培养。

2. 如权利要求 1 所述的一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:所述的小球藻的藻种为 *Chlorella vulgaris*。

3. 如权利要求 1 所述的一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:以新鲜自来水为溶剂配制的标准 BG-11 培养基不需要灭菌,即可用于小球藻的培养。

4. 如权利要求 1 所述的一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:所述的用于小球藻快速生长的培养基不需要调节 pH 值。

5. 如权利要求 1 所述的一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:小球藻培养于 5 ~ 10L 的管式玻璃容器、透明的塑料瓶、光生物反应器、发酵罐等。

6. 如权利要求 1 所述的一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:所述的有机碳源为糖类,如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖等。

一种快速培养小球藻的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及在混养条件下的一种快速培养小球藻的方法。

背景技术

[0002] 小球藻为绿藻门小球藻属 (*Chlorella*) 单细胞绿藻,分布广泛,环境适应能力强、生长周期短,是一种新型的低碳环保资源。小球藻含有丰富的蛋白质、多糖、脂类、叶绿素、维生素和生物活性物质,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,具有重要的开发潜力。因此,快速、简便、廉价地获得大量优质小球藻细胞显得尤为重要。

[0003] 迄今为止,已报道的快速培养小球藻的方法很多,但适合工业化大规模培养的方法较少。如申请号为 200510047218.3 的中国发明专利采用在海洋绿藻的培养基中添加微量营养元素的方法,提高了藻细胞的生长速率,使培养 6 ~ 8 天藻密度能达到 $2.0 \times 10^6 \sim 2.50 \times 10^6$ 个细胞/mL。申请号为 200610025618.9 的中国发明专利提出了用三个阶段(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)高密度高品质培养小球藻的方法,异养培养结束时细胞密度可达到 45 ~ 55g/L。申请号为 200610078003.2 的中国发明专利公开了在通气培养瓶中加入含葡萄糖的培养基和少许添加剂 CSL,并在异养条件下快速培养小球藻的方法,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。

[0004] 小球藻的营养方式有三种:自养培养、异养培养和混养培养。自养培养是利用直接利用太阳光能及无机养料进行培养。这种营养方式耗能少、容易生长,但生长速率较低、细胞密度较低、生长周期长。异养生长是在自养培养基中加入有机碳源或有机氮源,在黑暗的条件下需氧发酵生长,但异养培养能耗高,培养成本高。混养又称兼养,是在利用光能和 CO₂ 等无机碳源的同时,以有机碳(如葡萄糖、醋酸盐等)作为补充碳源和能源的一种培养方法,是光和有机物联合作用的结果。混养可以达到高密度的培养,提高活性物质的产量。史成颖等(史成颖,甘旭华,汪本凡等.螺旋藻混养培养条件的优化.池州师专学报,2004,18(5):38 ~ 40.)研究了混养培养基可明显地提高螺旋藻的生物量和藻胆蛋白含量。YannaLiang 等(Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. Biomass and lipid Productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 2009, 78:1 ~ 7.)对普通小球藻在自养、异养及混养条件下的生物量和油脂的生产进行了研究,结果表明当使用 1% 浓度(w/v)的葡萄糖作为碳源时,达到最佳的细胞生长($2\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和油脂产率($54\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。

[0005] 工业大规模培养微藻的瓶颈是灭菌能耗成本高、培养周期长、工艺操作复杂、pH 的调节不准确,这些问题直接影响了微藻的生长及采收。本发明针对这些瓶颈问题,提供了一些技术方案,有效的解决了工业大规模培养的难题。这些技术方案未见相关文章及专利的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种快速培养小球藻的方法,利用该方法的小球藻培养周期短、工艺操作简单、培养基不需要灭菌、不需要调节培养基的 pH 值,非常适合于工业化大规模的培养。

[0007] 本发明所采用的技术方案是:一种快速培养小球藻的方法,其特征在于:该培养方法包括以下步骤:

[0008] 1) 以新鲜自来水为溶剂,配制标准 BG-11 培养基,用于小球藻的基础培养基;所述的标准 BG-11 培养基成分(g/L): NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5.24×10^{-2} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-2} ; CaCl_2 , 2.72×10^{-2} ; 柠檬酸, 6.562×10^{-3} ; 柠檬酸铁铵, 6.0×10^{-3} ; $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1×10^{-3} ; Na_2CO_3 , 2.0×10^{-2} ; H_3BO_3 , 2.86×10^{-3} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.86×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.9×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.0×10^{-5} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-5} 。

[0009] 2) 向标准培养基中添加有机碳源和 NaHCO_3 ,使有机碳源的浓度为 0.5 ~ 1.0g/L, NaHCO_3 的浓度为 0.2 ~ 0.5g/L;

[0010] 3) 向其中接种 10% ~ 20% 的小球藻液,封口,将藻液放置在光照强度 3000 ~ 4000Lx、光暗比 12h : 12h、温度 22 ~ 28℃ 的环境下培养。

[0011] 根据本发明的一个优选实施方式,步骤(1)中培养基的配制采用的是新鲜自来水。

[0012] 根据本发明的另一个优选实施方式,步骤(2)所述的有机碳源为糖类,如葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖等。

[0013] 根据本发明的另一个优选实施方式,步骤(2)所述的培养基不需要灭菌,可以直接用于小球藻的培养。

[0014] 根据本发明的另一个优选实施方式,步骤(3)中小球藻培养于 5 ~ 10L 的管式玻璃容器、透明的塑料瓶、光生物反应器、发酵罐等。

[0015] 根据本发明的另一个优选实施方式,步骤(3)中小球藻的生长情况以 680nm 处的吸光度 OD 值来间接表示。

[0016] 与现有技术相比,本发明的优点在于,以新鲜自来水为溶剂、培养基不需要灭菌以及不需调节 pH、小球藻的生长速率快、大规模培养的效率,很适合于工业化应用。

附图说明

[0017] 图 1 添加有机碳源葡萄糖对小球藻生长的影响。

[0018] 图 2 添加有机碳源果糖对小球藻生长的影响。

[0019] 图 3 添加有机碳源蔗糖对小球藻生长的影响。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。

[0021] 实施例 1

[0022] 1) 以新鲜自来水为溶剂,配制标准 BG-11 培养基,用于小球藻的基础培养基;所述的标准 BG-11 培养基成分(g/L): NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5.24×10^{-2} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-2} ; CaCl_2 , 2.72×10^{-2} ; 柠檬酸, 6.562×10^{-3} ; 柠檬酸铁铵, 6.0×10^{-3} ; $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

1.1×10^{-3} ; Na_2CO_3 , 2.0×10^{-2} ; H_3BO_3 , 2.86×10^{-3} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.86×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.9×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.0×10^{-5} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-5} 。

[0023] 2) 向标准培养基中添加一定量的葡萄糖和 NaHCO_3 , 使其终浓度分别为 0.5g/L 和 0.2g/L。

[0024] 3) 将上述培养基, 放入培养容器中, 并接种 10% 的小球藻液, 将藻液放置在光照强度 3500Lx、光暗比 12h : 12h、温度 25℃ 的环境下培养。

[0025] 每天测定藻液在 680nm 处的 OD 值, 间接的表示了小球藻的生长情况。5 天后, 添加了葡萄糖的 OD_{680} 值为 0.410, 是未添加葡萄糖的 6.3 倍左右。

[0026] 实施例 2

[0027] 1) 以新鲜自来水为溶剂, 配制标准 BG-11 培养基, 用于小球藻的基础培养基; 所述的标准 BG-11 培养基成分 (g/L): NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5.24×10^{-2} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-2} ; CaCl_2 , 2.72×10^{-2} ; 柠檬酸, 6.562×10^{-3} ; 柠檬酸铁铵, 6.0×10^{-3} ; $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1×10^{-3} ; Na_2CO_3 , 2.0×10^{-2} ; H_3BO_3 , 2.86×10^{-3} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.86×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.9×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.0×10^{-5} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-5} 。

[0028] 2) 向标准培养基中添加一定量的果糖和 NaHCO_3 , 使终浓度分别为 0.5g/L 和 0.2g/L。

[0029] 3) 将上述培养基, 放入培养容器中, 并接种 10% 的小球藻液, 封口, 将藻液放置在光照强度 3500Lx、光暗比 12h : 12h、温度 25℃ 的环境下培养。

[0030] 每天测定藻液在 680nm 处的 OD 值, 间接的表示了小球藻的生长情况。5 天后, 添加了果糖的 OD_{680} 值为 0.433, 是未添加果糖的 6.7 倍左右。

[0031] 实施例 3

[0032] 1) 以新鲜自来水为溶剂, 配制标准 BG-11 培养基, 用于小球藻的基础培养基; 所述的标准 BG-11 培养基成分 (g/L): NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5.24×10^{-2} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5×10^{-2} ; CaCl_2 , 2.72×10^{-2} ; 柠檬酸, 6.562×10^{-3} ; 柠檬酸铁铵, 6.0×10^{-3} ; $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1×10^{-3} ; Na_2CO_3 , 2.0×10^{-2} ; H_3BO_3 , 2.86×10^{-3} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.86×10^{-3} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.9×10^{-4} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2×10^{-4} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.0×10^{-5} ; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-5} 。

[0033] 2) 向标准培养基中添加一定量的蔗糖和 NaHCO_3 , 使其终浓度分别为 0.5g/L 和 0.2g/L。

[0034] 3) 将上述培养基, 放入培养容器中, 并接种 10% 的小球藻液, 封口, 将藻液放置在光照强度 3500Lx、光暗比 12h : 12h、温度 25℃ 的环境下培养。

[0035] 每天测定藻液在 680nm 处的 OD 值, 间接的表示了小球藻的生长情况。5 天后, 添加了蔗糖的 OD_{680} 值为 0.161, 是未添加蔗糖的 2.5 倍左右。

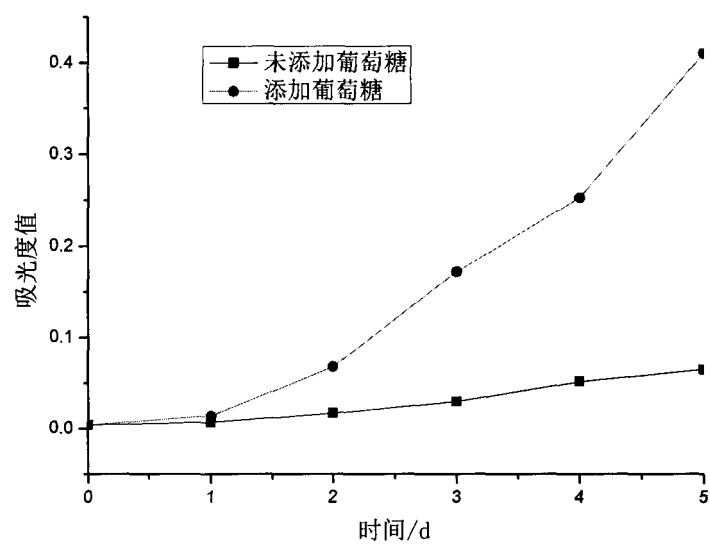


图 1

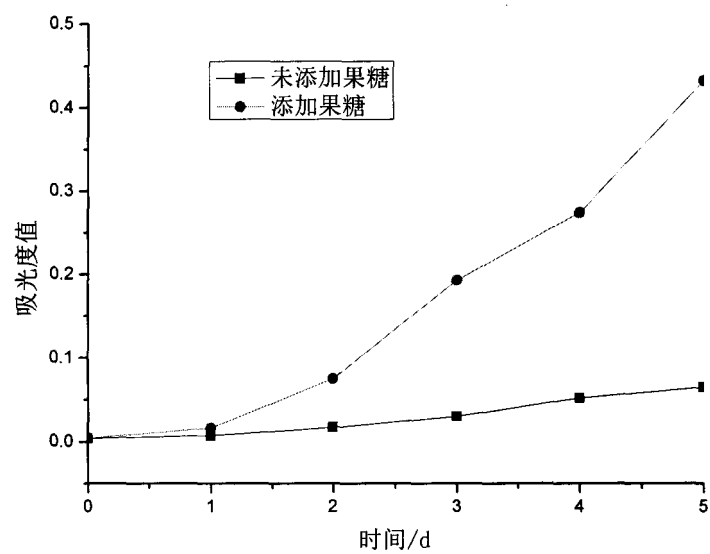


图 2

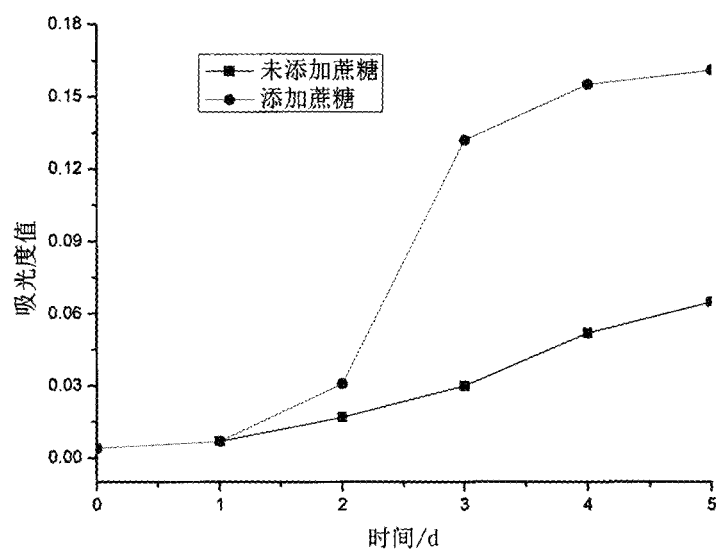


图 3