[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1083110A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93104652.1

[51]Int.Cl[5]

[43]公开日 1994 年 3 月 2 日

C12P 17/04

[22]申请日 93.3.18

[30]优先权

[32]92.3.18 [33]US[31]853,379

[71]申请人 生物技术资源L.P.

地址 美国威斯康星州

[72]发明人 罗纳德·J·赫斯 杰弗里·A·朗宁

托马斯·J·斯卡特鲁德

[74]专利代理机构 上海专利事务所

代理人 林蕴和

C12N 1/14 C12N 15/01

//(C12P17/04,C12R1:89)

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 L-抗坏血酸的微生物生产法

[57]摘要

用产生抗坏血酸的微藻（特别是小球藻属）作为微生物源在控制碳源供给模式下培育获得了改良的抗坏血酸异养生物合成产物。也获得了抗坏血酸与供给的总碳源比率的极大提高以及发酵罐中抗坏血酸浓度的提高。C.pyrenoidosa UV101-158 已于 1985 年 6 月 27 日保藏在 A.T.C.C，保藏号为 53170。

权 利 要 求 书

1、一种L—抗坏血酸的生产方法，包括以下步骤：(a)在一个含有适当碳源和溶解氧(每一种用量足以满足细胞生长和L—抗坏血酸的生产)的促生长营养培养基中异养培育能异养产生L—抗坏血酸的微生物细胞。

(b)在初始阶段让微生物生长到高细胞密度，伴有初始量的抗坏血酸的形成和导致碳源几乎完全耗尽。

(c)把细胞保持在几乎完全没有碳源有溶解氧的条件下直到(i)细胞生长几乎停止和(ii)随后加入控制量的碳源使在细胞密度几乎不增加的同时形成额外量的L—抗坏血酸和

(d)在氧存在下继续控制碳源加入直到在细胞密度几乎不增加的情况下达到所需要的L—抗坏血酸的产量增加。

2、权利要求1的方法，其中在步骤(d)中所产生的L—抗坏血酸的总量与总细胞密度的比例远大于在细胞生长几乎停止和细胞密度停止增长的步骤(c)中这种比例。

3、权利要求1的方法，其中抗坏血酸从基本上不含细胞内物质的细胞中收集。

4、权利要求1的方法，其中碳源以非抑制性用量存在。

5、权利要求4的方法，其中的碳源是一种葡萄糖源。

6、权利要求5的方法，其中的碳源是在发酵过程中在培养基中原位转化为葡萄糖的一种糖或多糖。

7、权利要求5的方法，其中的葡萄糖源包括葡萄糖。

8、权利1的方法，其中的微生物是一种绿色微藻。

9、权利要求8的方法，其中的微藻是小球藻属的一种。

10、权利要求 9 的方法，其中的种名为Pyrenoidosa。

11、权利要求 10 的方法，其中的微生物是被一株指定为 UV101 — 158 的 C. Pyrenoidosa 藻株，它是 C. PyrenoidosaUTEX1663 的一个突变株，具有 A. T. C. C. 保藏号 53170。

12、具有 A. T. C. C 保藏号 53170 的Chlorella Pyrenoidosa 藻株。

13、Chlorella Pyrenoidosa 藻株 UV232—1，它是用紫外线照射从C. Pyrenoidosa 突变来的。

说　明　书

L—抗坏血酸的微生物生产法

本申请是1991年3月5日提交的卷号为07/650,886的美国申请的连续部分。后者是1985年7月1日申请1991年3月19日公布的美国专利5，001，059的连续申请。

本发明涉及一种在含有合适碳源的营养培养基中使用微生物特别是微藻改进L—抗坏血酸产量的异养方法。具体地说，本发明涉及生产高浓度的L—抗坏血酸（特别是每单位细胞团中的高浓度）的方法。本发明还提供了适用于本发明L—抗坏血酸的生产方法的诱变的微藻新种。

L—抗坏血酸是一种重要的营养补充物，广泛用于维生素胶囊中和作为一种营养补充物用于人和其它需要维生素C的动物的食物中。L—抗坏血酸是一种疏松性化学物，价格敏感性较高，市场上需要经济有效的产品。因此，开发使用微生物的方法（该方法提供了营养物的有效转化）生产有效的L—抗坏血酸产品是有实际价值的。

Loewus，F. A.，在L—抗坏血酸：新陈代谢，生物合成，功用（The Biochemistry of Plant，vol. 3，Academic Press，Inc.，PP. 77—99，1980）中对L—抗坏血酸的来源和生物合成进行了综述。用藻类生产抗坏血酸的描述可参见Vaidya等，Sciencl and Culture（1971）37：383—384；Subbulakshmi等，Nutrition Reperts International（1976）14：581—591；Aaronson等，

Arch. Microbiol. (1997) 112：57—59；Shigeoka 等，J. Nutr. Sci. Vitaminol (1979) 29：29—307；Shigeoka 等，Agric. Biol. Chem. (1979) 43：2053—2058；Bayanova 和 Trubachev，Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobidogyia (1981) 17：400—407 (VDC 582. 26：577. 16)；和 Ciferri，Microbiological Reviews (1983) 47：551—578。

现有技术中的异养方法并不能完全满足于商业应用：一般生产抗坏血酸中的碳源利用率较低而且维生素以不合乎要求的低浓度被生产。

本发明的一个目的是提供一种从碳源中异养生物合成 L—抗坏血酸的方法，它能使碳源的利用率提高。另一个目的是提供生产高产量维生素的方法。还有一个目的是提供新的 L—抗坏血酸的高产微生物。

因而，本发明是提供了一种生产 L—抗坏血酸的改进方法，它包括在一种含有适合生长和 L—抗坏血酸生产所需量的碳源和溶解氧的营养培养基中异养生长一种生产 L—抗坏血酸的微生物细胞，使该微生物从原始状态生长到高细胞密度，此过程伴随着细胞内 L—抗坏血酸的产生，和碳源基本上完全耗尽，在基本耗尽碳源状态下维持这些细胞直到细胞生长基本上停止，然后加入控制量的碳源在细胞密度很少或没有增加的同时产生额外量的 L—抗坏血酸，继续加入控制量的碳源直至在细胞密度很少或没有增加的同时 L—抗坏血酸产量达到所需要的增加。

因此，可观察到与 L—抗坏血酸的产生有关的碳源利用率的提高，因而获得提高的产率，这可被用毫克 L—抗坏血酸/升溶液表示的总 L—抗坏血酸的增加和最好用每克细胞干重中的

L—抗坏血酸毫克数表示的L—抗坏血酸特异形成的增加来证实。

本发明还提供了一种新的L—抗坏血酸高产诱变微藻，尤其是源于Chlorella Pyreniodosaisolate UTEX1663的Chlorella PyrenoidosaUV101—158（于85年6月27日保藏于美国典型培养物收藏中心。保藏号为53170)；源于C. regularisUTEX1808R的Chlorella regularisUV5—280；源于Prototheca zopfiiUTEX1438的P. zopfiiUV3—132；源于Ankistrodesmus brauniiATCC12744的Ankistrodesmus brauniiUV2—370。UTEX是在Austin的Texas大学的藻类培养物收藏处。

下面更为详细地描述本发明方法中这些新的微藻类的产生和它们对L—抗坏血酸生产的有效作用。

总的来说，本发明方法包括三个主要阶段：(1) 初始细胞培育阶段，是在含有初始浓度的有效碳源和溶解氧（二者用量足以满足伴随细胞内产生L—抗坏血酸和基本完全耗尽碳源的同时把微生物培育到高细胞密度）的发酵罐中异养培育能异养生产L—抗坏血酸的一种微生物，优选微藻类；(2) 碳源几乎完全耗尽的阶段，是把这种微生物的细胞维持在这种碳源耗尽的状态下直到细胞生长基本停止；和 (3) 控制碳源加入阶段，是在发酵罐中加入碳源并维持低于初始浓度的第二浓度，以便在溶解氧存在下，有效地产生额外量的L—抗坏血酸而不引起细胞密度的实质上的增加。

继续加入低浓度的碳源，此时L—抗坏血酸的产生优于细胞的生长，直到该微生物产生L—抗坏血酸的能力大体上用尽。这个终点能用在整个过程中随时监测L—抗坏血酸浓度和细胞密度的方法测定。

该方法的其它阶段包括按照现有技术的已知方法收集细胞并分离和回收几乎不含细胞物的L—抗坏血酸。

从细胞（生物量）中回收的L—抗坏血酸能被这样应用：换句话说，被载入生物量的抗坏血酸本身能用作富含维生素C的动物饲料组合物或饲料补充物（包括用于水养殖鱼）。

本发明所用的微生物可广泛地变化，只要它们是L—抗坏血酸的产生者，尤其是能异养产生细胞内的L—抗坏血酸的这类生物体。优选微生物是产生L—抗坏血酸的绿色微藻类，特别出于经济的原因所称的高产者，有时称作为超产者。可以用伴有产生L—抗坏血酸的细胞生长的标准发酵法来分辨出具有高产L—抗坏血酸的潜能生物体。最好再把它们用物理或化学诱变处理方法如紫外光，X—光，N—甲基—N′—亚硝基胍，硫酸二甲酯或现有技术中已知的类似试剂进行诱变处理。用氧化还原染色能明显测定用这类方法处理产生的诱变处理后的L—抗坏血酸超产者。而且，可通过使用抗坏血酸代谢中间体或抗坏血酸合成的抑制剂的类似物来选择能够在化学干扰物存在下保持或增加L—抗坏血酸产生的微生物。

上述过程优选的子代是提供改进的L—抗坏血酸特异形成的微生物（以每克细胞（干重为准）中L—抗坏血酸的毫克数测量）。然后进一步把这些子代分为单个克隆，并且进一步进行上述过程。

一种优选生物是绿色微藻类小球藻属的微生物，特别是Chlorella Pyrenoidosa藻株，UV101—158，一种由藻株UTEX16-63经紫外光诱变处理转变而来的高产L—抗坏血酸突变体。C. PyrenoidosaUV101—58已保藏于美国典型培养物保藏中心，保藏号为53170。另一个优选的C. Pyrenoidosa藻株是UV232—1，

为目前细胞内 L—抗坏血酸最高产生者。其它典型的和适合的小球藻属的品种有：Chlorella regularis 藻株 UTEX1808；和C. regularisUV5—280，一种藻株 UTEX1808 的由紫外光产生的 L—抗坏血酸的高产突变株。还有其他也能异养生长产生 L—抗坏血酸的适当微藻类是那些属于Prototheca 和Ankistrodesmus 属微藻。典型的Prototheca 品种是P. zopfii 藻株 UTEX1438 和P. zopfiiUV3—132，一个 UTEX1438 的由紫外光产生的 L—抗坏血酸的高产突变株。典型的Ankistrodesmus 品种是A. brauniiATCC12744 和A. brauniiUV2—370，一个 ATCC12744 的由紫外光产生的 L—抗坏血酸的高产突变体。

还应注意到上述情况的每一诱变子代是比它的亲代生物体较高的 L—抗坏血酸的产生者。而且，如下所示，每一个生物在如上述所定义的本发明条件下比现有技术的常规条件下能产生更高的 L—抗坏血酸的最大浓度（以毫克 L—抗坏血酸/升营养性培养液表示）。

在该方法的实施中，是把一种生长活跃的微生物培养物接种到营养培养基上，接种量足以在适当生长期后引起高细胞密度，通常伴随的首先是低浓度的 L—抗坏血酸。典型的初始细胞密度范围一般是 0. 15 到 0. 4g/L（以细胞干重为准）。该培养基包括碳源，各种盐还常有微量金属。它还包括分子氧源，一般为空气，加入的量是与促进生长的碳源用量一起促进生长的量。换句话说，有效的碳源和氧二者必须用来使微生物生长到高细胞密度。

碳源一般是 L—半乳糖或 D—葡萄糖源，由于经济原因，优选的是葡萄糖。葡萄糖源可以是任一能原位转化为葡萄糖的糖类，如糖浆，玉米糊等。所用葡萄糖源的总量随特殊微生物和

所要求的结果的不同而广泛变化。一般地，对高产L—抗坏血酸的生物体，例如C. PyrenoidosaUV232—1来说，所用葡糖源总量，如果没有代谢，提供大约65到90，更常用大约为75到85，最佳为80g/L左右（按葡萄糖计）的浓度。通常最初大约加入总葡萄糖量的15到30%，更为常用的是总葡萄糖量的20到25%。一般葡萄糖是在开始和发酵期间与以后所指的其它添加物一起加入的。在开始加入葡糖源和发酵期间（细胞生长不受抑制），为未限定细胞生长期。细胞生长到相当高的细胞密度，常伴有一个相当低的浓度的L—抗坏血酸的形成。

发酵罐中葡糖源的量应当是非阻遏/非限制的用量，也就是说，它应最令人满意地促进而不是抑制或过分限制细胞的生长。葡萄糖源的非生长限制的最佳浓度可随生物体不同而变化，并且对任一特殊生物用实验很容易测得。例如，对C. PyrenoidosaUV101—158来说，及时添加使葡糖源浓度维持在15—30g/L范围，可以足够促进细胞生长的同时避免葡萄糖抑制生长。

最好的是，其它添加物开始就与葡萄糠源一起存在，它们在营养培养基中的浓度通常也是靠连同续加的葡糖源依次加入相同的添加物来持续提供。这些添加物的浓度与葡糖源的浓度比在整个发酵中可以相同也可以不同。

添加物添加量与加入到发酵罐中的总量的比例与葡萄糖不同，这些添加物是碱金属磷酸盐，例如磷酸钠和磷酸钾，优选磷酸二氢钠和磷酸氢二钾。磷酸二氢钠的总用量一般大约是1到2g/L，常用量大约1到1.5g/L，最好大约为1.3g/L，存在于发酵罐中的磷酸二氢钠起始量一般大约为所加磷酸二氢钠总量的35到50%，更常用的大约是40到45%。磷酸氢二钾的总量一般大约为1.5到3g/L，最常用的大约为到2.5g/L。起始

存在量一般大约为总量的 40 到 50%，最常用的大约为总量的 45 到 50%。

除上述添加的外，可有利地加入一种生物相容的螯合剂，如柠檬酸三钠，其总量大约为 0. 8 到 1. 2g/L，通常大约为 1g/L。通常存在的磷酸氢二钠是大约 0. 8 到 1g/L，优选的是约 0. 95 到 1g/L。加入一种生物相容的无机酸来保持溶液中的微量金属，同时也用来中和常用作氮源的氨。用于这种目的较为方便的是浓硫酸，其用量大约为 1 到 2，最常用的量大约为 1. 2 到 1. 5ml/L。在微量金属中，镁存在量大约为 0. 1 到 0. 2g/L，优选 0. 1 到 0. 15g/L，特别是以一种生理上可接受的盐，例如硫酸盐的形式。所用铁和铜的量是被限制的，因为这些金属抑制抗坏血酸的形成。铁的初始存在量大约为 5 到 7mg/L，优选的大约为 5. 5 到 6mg/L，并且不再后续加入。铜的存在量相对微小，一般大约为 1 到 50μg/g 葡萄糖。

下面描述的微量金属溶液常用总量大约为 10 到 15ml/L，更常用的大约为 12 到 14ml/L。依据葡萄糖，该微量金属溶液相应为 0. 1 到 0. 2ml/g。

根据需要，制备在发酵过程中加入的合适溶液，该溶液具有下列组分。

表 1　　培养基配方

组　　分	浓度(相对于葡萄糖)
葡萄糖	1.0
枸橼酸三钠二水合物	0.0125
无水硫酸镁	0.0082
磷酸氢二钠	0.0116

磷酸氢二钾	0.0238
磷酸二氢钠	0.0121
微量金属混合物	0.1675ml/g
98%硫酸(W/W)	0.0329

用无水氨补充氮，它也用作 PH 调节剂。培养基中实际氮的含量是用培养基的酸度和培养基的缓冲能力来测定。

该微量金属混合物和溶液含有下列组分：

表 2　　微量金属溶液

组　　分	浓度(浓缩的存放液)mg/L
二氯化钙二水合物	3102
硫酸镁一水合物	400
硫酸铜一水合物	0.4
二氯化钴五水合物	40
硼　　酸	160
硫酸锌七水合物	400
钼酸钠二水合物	19
硫酸氧钒盐二水合物	20
硝酸镍六水合物	8
亚硒酸钠	18

微量金属存放液的制备是把适量的各种化合物溶于含微量盐酸的蒸馏水中使最后容量为 1 升并含有 20ml 浓 Hcl。蒸馏水是用来保证微量金属组分的适当比例的。

当一些盐提到是一元或二元时，应当理解为这是为了方便

而不是必需的。这些化合物作为缓冲液，它们的质子化程度将随培养基的 PH 值变化。

在发酵进行中，把磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶于大约总培养基的 75 到 90%，通常大约为总培养基的 80 到 90%中，加入到发酵罐中。

制备在发酵过程中增加的溶液是按适当比例把单个成分组合起来。把葡萄糖溶于大约 75 到 85%，优选大约为 80%的备用的水中。在含有大约 5 到 15%，常用的大约 10%水的含水培养基中把枸橼酸盐，镁和硫酸组分组合在一起，同时把磷酸盐溶解在大约 5 到 15%，常用的大约为 10%备用水中，然后把微量金属溶液加入到含备用水的大约 5 到 15%，常用的大约为 8 到 10%中。在含有一定比例的磷酸盐的发酵罐中加入铁盐和大约 20%上述制备的葡萄糖盐浓缩液。加入过程是无菌的，避免引入任何外界微生物。

然后把营养培养基加热到所需温度。该温度是随微生物而变化的，但一般在大约 30 到 40℃范围内，优选 35℃左右。用接种物给发酵罐接种，一般给出大约 0.1 到 0.4g/L 的初始细胞密度。在发酵过程中可以加入少量的消沫剂。

在发酵的第一阶段，细胞生长到高细胞密度为最后有较高 L—抗坏血酸的总产量提供基础，细胞继续生长直到碳源几乎完全被耗尽，即其葡萄糖当量浓度一般少于 0.1g/L 溶液（即，无细胞上清液）。所需要的时间随微生物变化，但一般包含在大约 35 到 50 小时期间，常用的大约为 40 到 45 小时之间，其生长率大约为 0.1 到 0.15/小时。

按需要，加入无水氨调节培养基的 PH 值在所要限制的范围内，一般大约 6.5 到 8.0 之间。

在这种生长期间振荡培养基和通气都是有益的。振荡率一般大约为 200 到 1000 转/分，同时通气率一般在大约为 0.2 到 0.6L 空气/分范围内。尽管这些随微生物和其他发酵条件而有所改变。通气给培养基提供了分子氧(O_2)，它是细胞生长和产生L—抗坏血酸所必需的。也能用其它氧源，包括用除 N_2 外的惰性气体稀释或没有稀释的氧气。不管什么氧源，在发酵过程中都应控制培养基中溶解氧的含量以保证细胞较快生长和细胞内较高的 L—抗坏血酸的含量。用普通方法(方便的是用一种氧探测电极)来监控营养培养基中氧的含量。

用常规方法如葡萄糖氧化酶试验，HPLC，或其它已知方法在上清液(即，无细胞的培养基组分)中监控在初始生长阶段可被微生物利用的葡萄糖。当葡萄糖浓度下降时，按需要通过加入等分试样，然而要保证总的葡萄糖浓度维持在低于抑制生长的水平，如上所述一般低于大约 30g/L。保持葡萄糖的可利用度直到达到所要求的高细胞密度，如对C. PyrenoidosaUV101—158 来说大约为 35 到 45g/L，优选 40g/L 左右。细胞密度按细胞干重计算。为此，如果还没有达到这个状态，可使培养基中的葡萄糖含量几乎完全耗尽。

当所要求的高细胞密度达到和培养基中葡萄糖含量几乎完全耗尽时，保持这种葡萄糖耗竭状态，即，在这个期间生物体处于饥饿状态，细胞生长几乎停止，L—抗坏血酸的产生也几乎停止。尽管这样，细胞一般能利用贮存的淀粉来维持细胞功能包括产生一些少量的 L—抗坏血酸。

持续几乎耗尽的葡萄糖和没有生长的阶段，直到又给生物体提供葡萄糖源为止，但控制葡萄糖源用量，开始在很少或没有增长细胞密度下产生额外量的 L—抗坏血酸。这种饥饿期可从

几分钟或更短延伸到几小时或更长，一般大约 1 到 4 小时，更常用的是 2 到 4 小时。对任何特殊生物体的量佳饥饿时间和给发酵罐中加入葡萄糖源的最佳用量和比例可以用加入小实验量的葡萄糖并监测其随时间对 L—抗坏血酸含量和细胞密度的影响来测定。在生长期间当 L—抗坏血酸的增长与任何时候细胞密度的增长比例大于 L—抗坏血酸与细胞密度的比例的最大值时，一般用按相同时间增长量，利于 L—抗坏血酸的形成超过利于细胞密度增长的用量和比例来饲喂葡萄糖源来继续提高的 L—抗坏血酸产生阶段。对任何特殊微生物来说，理想用量和饲喂率都能用试验容易地测定。一般地，拿C. PyrenoidosaUV101—158 来说，饲喂率在大约 0.005 到 0.05 克葡萄糖/小时/克细胞(以细胞干重计)葡萄糖的含量维持在低于促进生长的浓度，例如，低于大约 0.1g/L 溶液。

本主题方法高产率地生产细胞内的 L—抗坏血酸，远高于其他自然生产源象玫瑰蔷薇果所生产的。能达到超过 3.5%生物量物质水平到 4.0%水平和更高。L—抗坏血酸的浓度能够超过 1.45g/L 能够是 3.3g/L 或更高。以消耗的基质为准，得到至少约 0.01 左右的摩尔产率。

提供以下实施例用于进一步说明而不用作限定。

实施例 1

在 1 升的发酵罐中灭菌 0.6 升蒸馏水，0.23 克磷酸二氢钠和 0.27 克磷酸氢二钾。然后向磷酸盐溶液无菌加入 11.2 毫克硫酸铁(七水合物)的 5 毫升蒸馏水和 20 毫升无菌葡萄糖盐浓缩液(用下列各营养组分别灭菌，再冷却后混合制备)：

组　　1

56 克葡萄糖，食物级一水合物（无水基质）（80g/L）在 80 毫升水中。

组　　2

0.7 克枸橼酸三钠二水合物（1.0g/L）

无水硫酸镁（0.6g/L）

1 毫升硫酸（1.4g/L）

在 10 毫升水中。

组　　3

0.65 克磷酸氢二钠（0.97g/L）

1.3 克磷酸氢二钾（1.9g/L）

0.6 克磷酸二氢钠（0.97g/L）

在 10 毫升水中。

组　　4

9.4 毫升微量金属溶液

把温度升至 35℃，开始以 200 转/分搅拌。以 0.2 升/分钟（lpm）的速率给培养基通入空气，加入 50 毫升浓度约 0.3g 细胞/l 的 Chlorella Pyrenoidosa UV101—158。五小时后搅拌速度增至 400 转/分，空气流速为 0.4lpm。16 小时后，搅拌速度增至 550 转/分，空气流速为 0.6lpm。以后如表 3 所示把搅拌速度增到 700，然后 800 转/分，而在剩下的操作中将空气流速稳定在 0.6lpm。

下表描述了发酵条件和分析结果。

表　3

时间（小时）	PH	细胞密度 G/L	抗坏血酸 mg/L	注释
0	6.9	—		
5	6.6	0.7		400 转/分；空气 0.4lpm
16	6.9	3.8		550 转/分；空气 0.6lpm
21	7.0	9.5		700 转/分；加 20ml
24	6.9	14.2		800 转/分；加 20ml
36				葡萄糖耗尽
40	7.1	38.6	538	加 4ml＋
45	7.2	38.6	654	
48				加 4ml＋
51	7.6	38.1	775	加 2ml＋
65	7.7	37.8	966	
68	7.8		1050	加 4ml＋
92	7.6	37.2	1292	
101	7.3	36.1	1459**	

* 葡萄糖/盐浓缩液

＋20%葡萄糖，在发酵过程中周期性地重复加入。

** 相当于 0.04 克 L—抗坏血酸/克细胞干重或 4%生物

量干重。

所用的测定L—抗坏血酸的方法已由Gun和Loewus，在Analytical Biochemistry(1983)130：191—198中描述。该方法是一种离子交换方法，使用了一支7.8×300mm有机酸分析柱，HPX—87(Bio—Rao Laboratories，Richmond，(A)。条件为：流动相，0.013M硝酸，流速0.8ml/分，压力1500磅/英寸^2，检测，UV245—254NM。用上述条件可以分离L—抗坏血酸和异抗坏血酸。

用以下方法来测定每升细胞克数。把一个生物量的试样(5ml)移到一只称量盘上并把5ml上层清液移到第二只称量盘上。离心上层清液。在对流烘箱干燥这两只称量盘(105℃3小时)。在干燥器中冷却后，称出称量盘的含量。每升细胞克数按(试样重—上层清液重)×200测得。

基于以上述结果，使以每克细胞中抗坏血酸克数计的特定形成至少达到0.04并且以消耗每摩尔的葡萄糖形成L—抗坏血酸的摩尔数定义的摩尔产率至少为0.01或更高。另外，抗坏血酸的浓度至少提高至1.5g/L左右。

实施例2—10

基本上重复实施例1的方法使用以下所描述的微生物：Chlorela Pyrenoidosa藻株UTEX1663，藻株UV101—158(如上所述紫外光引起的藻株1663的突变体)和藻株UTEX343；Chlorella regularis藻株UTEX1808和藻株UV5—280(由紫外光引起的藻株1808的突变体)，Prototheca zopfii藻株UTEX1438和藻株UV3—132(由紫外光引起的藻株1438的突变体)；Ankistrodesmus braunii藻株ATCC12744和藻株UV2—370，(由

紫外光引起的藻株 12744 的突变体)。

应当注意到在这些实施例中选来详细说明本发明的三个微藻属(即,Chlorella,Prototheca 和 Ankistrodesmus)在分类学上是有广泛分叉的并且被认为是有代表性的产生 L—抗坏血酸的异养性微藻。

上述种类的每一个都被在一个分批饲喂的带搅拌的一升发酵罐中培育到大约 40g/L 细胞密度(以干重为准)。加入氨来提供营养氮并调节 PH。在细胞耗尽葡萄糖基质营养物后,细胞进入一个 1 到 3 小时不加葡萄糖的阶段,然后每 3 小时给每克干重细胞加入 0.3 克葡萄糖(下表给出了生长后加入的葡萄糖),直到每天两次的分析显示出抗坏血酸的合成已达到最高值和正在下降。在下列表中小标题"生长后加入葡萄糖"栏下的"有"来表示。

用相同藻株在相同分批饲喂条件下进行对照实验直到葡萄糖耗尽,但在葡萄糖耗尽后不加入营养物。在"生长后加入葡萄糖"栏下用"没有"来表示。

表 4

实施例	微生物	生长后加入葡萄糖	抗坏血酸浓度最大值 (mg/l)	特定形成最大值(mg/g 细胞)
Chlorella pyrenoidosa				
对照	UTEX1663	没有	38	1.07
2	UTEX1663	有	54	1.24

对照	UV101—158	没有	570	12.9
3	UV101—158	有	753	17.0
对照	UTEX343	没有	38	0.7
4	UTEX343	有	38	0.66
Chlorella regularis				
对照	UTEX1808	没有	15	0.34
5	UTEX1808	有	28	0.38
对照	UV5—280	没有	26	0.54
6	UV5—280	有	32	0.65
Prototral zopfii				
对照	UTEX1438	没有	24	0.7
7	UTEX1438	有	56	2.1
对照	UV3—132	没有	50	2.5
8	UV3—132	有	57	6.8
Ankistrodesmus braunii				
对照	ATCC12744	没有	25	0.56
9	ATCC12744	有	30	0.40
对照	UV2—370	没有	49	1.4
10	UV2—370	有	65	1.2

表列结果表明四个种和它相应衍生的抗坏血酸高产藻株中的每一个单独的藻株在本发明加入葡萄糖条件下生长能引起抗坏血酸产率的提高以抗坏血酸浓度 mg/L 的最大值表示，与生长后不加葡萄糖的简单分批饲喂条件下的生长相对应。这个结果也表明C. PyrenoidosaUTEX1663 和它的 L—抗坏血本的高产突变株 UV5—280，以及P. zopfiiUTEX1438 和它的 L—抗坏血酸高产突变株 UV3—132 都在本发明条件下提高了特定抗坏血酸形成(mg/g 细胞)也表明产生抗坏血酸的碳源利用率的提高(与在初始生长和葡萄糖耗尽状态后不加葡萄糖获得的碳源利用率相比)。

还应注意到C. Pyrenoidosa 藻株 343，与其它C. Pyrenoidosa 藻株不同在两种条件下都不能引起抗坏血酸的产率增加，而且尽管每一Ankistrodesmus braunii 藻株在本发明条件下都产生较高浓度的抗坏血酸，但没有一个能引起抗坏血酸特定形成的改进。然而，在这一点上应注意到，在初始生长和葡萄糖耗尽阶段后所用的这套特定条件对C. Pyrenoidosa 藻株 UTEX1663 是最佳的，没有试图控制条件以提高C. PyrenoidosaUTEX343 或A. brauniiATCC12744 或 UV2—370 之一的抗坏血酸的产量。同样可以相信用这些微生物也可能得到改进的结果。

实施例 11(最佳方式)

除以下几点外重复实施例 1 的方法：(a)5.6ml 硫酸亚铁，替代 11.2mg 用于初始 0.6 升蒸馏水装料中；(b)营养液组成：28 克葡萄糖在 40ml 蒸馏水中；0.53 克枸橼酸三钠二水合物加 0.2 克硫酸镁，在 20ml 蒸馏水中；0.65 克磷酸二氢钾和磷酸氢二钠在 20ml 蒸馏水中；和 4.7ml 微量金属液加 1ml 硫酸在 15ml 蒸

馏水中，和(c)表 1 的 UV232—1 藻株的活性生长培养物。

把温度升到 35℃，开始以 350 转/分搅拌，空气通入培养基的流速为 0.2 升/分(lpm)，用加到空气流中的无水氨调 PH 到 6.9，把 UV232—1 藻株加入培养基中。在整个操作中饲喂氨作为营养氮源和 PH 调节剂。6.2 小时后把空气流速增加到 0.4lpm，搅拌速度为 400 转/分。11.8 小时后把空气流速增加到 0.6lpm，后续实验中保持不变，搅拌速度增到 650 转/分。12.4 小时后，把 40 多 ml 含葡萄糖的营养液加到发酵罐中，以后在 24.4 小时加入 20 多 ml，在 26.3 小时加入 15ml 多；同时，在 22.8 小时搅拌速度增至 750 转/分，然后在 34.8 小时调到 900 转/分，其后实验中速度不变。

在 31.7 小时，培养基中的葡萄糖含量耗尽，在这时细胞密度(C、D)是 19.5，L—抗坏血酸浓度是 322mg/L。在 41.7 到 94.8 小时中每 3 小时一次把葡萄糖(10%溶液 2 毫升)喂给发酵罐中。随时间改变的细胞密度和 L—抗坏血酸浓度以及计算出的生物量的 L—抗坏血酸列于下列表中。

表　5

时间（小时）	PH	C、D (g/l)	L-抗坏血酸 (mg/L)	注释	L-抗坏血酸
0	6.9	—			
6.2	6.9				
11.8	6.9			在 12.4 小时有 40ml 葡萄糖	

22.8				在 24.4 小时有 20ml 在 26.3 小时有 15ml
31.7	6.9			葡萄糖耗尽
34.8	7.0	19.5	322	
46.9	7.7	18.7	429	
	22.9			
53.6	7.8		528	
58.6	7.8	17.9	613	
	34.2			
70.8	7.9		694	
77.7	7.9	17.3	819	
	47.3			
82.8	7.8		915	
94.8	7.6	17.6	945	
	53.7			

* 在 41.7 小时加入 2ml10%葡萄糖以后每 3 小时一次直到 94.8 小时。

上述方法重复 4 次多，基本上如上所述。在 5 次实验以上 L

—抗坏血酸百分含量平均为 5.2%生物量干重。

基于本发明的这些描述和某种特定程度的实施例应认为以上权利要求将不应太受限制的，而将是与权利要求及其等同物各个要素所表达的范围相适应。