



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107384801 A

(43)申请公布日 2017. 11. 24

(21)申请号 201710719225.6

(22)申请日 2017.08.21

(71)申请人 李彤

地址 830092 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市水磨沟区西虹东路555号4单元901
室

(72)发明人 李彤

(74)专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务
所 65105

代理人 蒙海云 汤建武

(51)Int.Cl.

C12N 1/12(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12R 1/89(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养
方法

(57)摘要

本发明涉及微藻培养方法技术领域,是一种用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,按下述方法进行:将微孔薄膜的一个表面作为微藻细胞接种面,与微藻细胞接种面相对的微孔薄膜另一个表面作为供给面,将微藻细胞接种在微藻细胞接种面上。本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,将微藻生物物质与营养液通过微孔薄膜隔开,彻底解决了细胞脱离和生物膜脱落的问题,通过微孔薄膜的隔离作用,能够防止营养液中的杂菌等污染物到达微藻生物物质中,再通过透明薄膜的覆盖隔离作用,从而避免了外界杂菌等污染物对微藻生物物质的污染,从而提高了微藻生物物质的纯度(纯度达到99%以上)和品质。

1. 一种用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于按下述方法进行:将微孔薄膜的一个表面作为微藻细胞接种面,与微藻细胞接种面相对的微孔薄膜另一个表面作为供给面,将微藻细胞接种在微藻细胞接种面上,微藻细胞不能穿过微孔薄膜的微孔到达供给面,接种后,将微藻细胞接种面采用透明薄膜覆盖,含有二氧化碳的气体相和培养液从供给面供给于微藻细胞,二氧化碳和培养液能穿过微孔薄膜的微孔到达接种面为微藻细胞的培养提供养分,光照通过透明薄膜提供给接种于微藻细胞接种面上的微藻细胞,在微藻细胞的培养过程中,当微藻细胞和/或微藻次生代谢产物的浓度达到期望值后,对微藻生物质进行收获。

2. 根据权利要求1所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于微孔薄膜为孔径小于微藻细胞的过滤材料,过滤材料为滤纸或滤膜或纤维织物;和/或,透明薄膜为透明无毒的薄膜材料,透明薄膜为半透膜或无孔透明薄膜,半透膜的孔径 $\leq$ 微孔薄膜微孔的孔径。

3. 根据权利要求1或2所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于微孔薄膜和透明薄膜的表面为平面或曲面。

4. 根据权利要求1或2或3所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于含有二氧化碳的气体相和培养液分别从微孔薄膜的供给面供给于微藻细胞;或者,将含有二氧化碳的培养液从微孔薄膜的供给面供给于微藻细胞。

5. 根据权利要求1或2或3或4所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于微藻为雨生红球藻栅藻或小球藻或微拟球藻或共生藻;微藻次生代谢产物指由微藻细胞生产的次要代谢产物,次要代谢产物为虾青素、类胡萝卜素和甲藻素中的一种以上。

6. 根据权利要求1或2或3或4或5所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于微藻生物质和微藻次生代谢产物的积累为单独积累或顺次积累或同时进行积累。

7. 根据权利要求1或2或3或4或5或6所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于光照的光源为自然光和/或人工光源。

8. 根据权利要求1或2或3或4或5或6或7所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于接种是指能将微藻细胞安放到微藻细胞接种面的方法,接种方法采用过滤或涂抹或喷涂或注射;和/或,收获是指能从微藻细胞接种面采集微藻细胞的方法,收获方法采用刮铲和/或冲洗。

9. 根据权利要求1或2或3或4或5或6或7或8所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于培养液是指含有微藻细胞生长所需的全部营养成分的液体培养基,营养成分包括氮、磷、碳、微量元素和调节因子,调节因子包括诱导因子和/或胁迫因子。

10. 根据权利要求1或2或3或4或5或6或7或8或9所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,其特征在于气体相为空气或其他气体。

用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微藻培养方法技术领域,是一种用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法。

背景技术

[0002] 微藻是指真核或原核并可进行光合作用的微生物。有些微藻的蛋白质含量较高,可以作为食品、水产饵料或畜禽饲料(如螺旋藻);有些微藻在特定条件下能够大量合成次生代谢物,如油脂、色素、多糖等(如雨生红球藻产生的虾青素),这些产物可以被用在功能食品、食品添加剂、制药、生物能源等领域,具有可观的经济价值。另外,生物质提取微藻油脂并转化生产生物柴油被认为是固碳减排的最重要途径之一。目前,在全球范围内,微藻生物技术已经形成了一条完整的规模巨大的产业链,其中微藻的工业化生产是最重要的一个环节。

[0003] 当前已经投入生产的工业化微藻培养系统均采用液体浸没式培养,在浸没式培养系统中,微藻细胞分散于培养液中(生物质含量小于1%)。浸没式培养系统包括开放式培养池与密闭式光生物反应器(photobioreactor, PBR)两种形式。开放式培养池的优点主要为建造和运行的成本较低。但由于开放池的开放面积/体积比较小,只有靠近液体表层的微藻细胞能够接受较充足的光照;同时,由于系统的开放性和快速的混合搅拌,杂菌进入系统后迅速扩散,导致系统极易受到污染。PBR通常是采用透光材料(如玻璃、有机玻璃、塑料薄膜等)制成的封闭结构,由于光径短、培养体系光照面积/体积比较大,所以细胞光照较充分;同时,系统的封闭性降低了系统的杂菌感染率。但PBR通常造价昂贵、运行成本高、维护困难。介于微藻细胞浸没生长的特点,二氧化碳(CO₂)需经过培养液才能到达微藻细胞,因此浸没式培养系统的补碳效率较低。同时,大体积的培养液导致了浸没式培养系统的高运行成本:培养液的搅拌循环、控温、通气等环节中的大量能源消耗;培养液本身,包括无机养分和水的大量消耗。同时,鉴于浸没式培养系统生物质含量低的特点,收获时需要耗费大量的能量对收获的悬浮液进行脱水(可达总运行费用的30%)。

[0004] 近年来,通过对系统的改进,浸没式微藻培养系统效率低的问题得到了一定改善。例如开放池的浅池运行、拆流挡板强化混合、补碳强化(申请号为200510126465.2的中国专利文献公开了用于大规模培养微藻的补碳装置及其使用方法;申请号为200610018771的中国专利文献公开了微藻养殖池补充二氧化碳的装置);螺旋管式、管道式、气升式等各种密闭式光生物反应器的结构改进,以及开放式跑道池与密闭式光生物反应器的耦联组合(申请号为2010101363004的中国专利文献公开了一种用于微藻规模培养的装置和培养方法)等。但这些改进并非系统本质上的突破。简而言之,由于浸没式培养系统的局限性,这些针对浸没式培养系统的进一步优化并没有大幅度地提高系统的光利用效率、提高单位面积产量或降低成本。因此,从本质上革新微藻培养技术,特别是提高单位体积培养液所含微藻细胞的量(细胞浓度),以降低建造、运行成本,减少物耗能耗,减少占地,进而提高空间利用率,是目前微藻产业的核心需求。同时,为了满足生产更高品质微藻产品(如药品)的需求,

对微藻生物物质的质量和纯度要求也越来越严格,因此开发更高效更低成本生产高品质微藻生物物质的培养系统,成为了当前微藻培养技术开发的首要任务之一。

[0005] 从理论上讲,大部分微藻并不一定需要在悬浮的环境中进行生长,例如,以微藻为主要组成成分的光合生物膜就广泛分布于自然界。生物膜的生物物质含量(大于30%)远远高于浸没式培养系统的悬浮液。目前,已经存在利用光合生物膜进行微藻生物物质的生产的系统(例如:Setlik I, Sust V, Malek I. Dual purpose open circulation unit for large scale culture of alga in temperate zones. I. Basic design considerations and scheme of pilotplant. Algological Studies 1970;1: 111-164)。相比于传统的浸没式培养系统的悬浮液,生物膜式系统的主要优势在于收获时生物膜的高生物物质浓度,基于此,收获后生物物质脱水的成本可大大降低,从而有效的降低生产成本。现有生物膜式系统的主要是将光合生物膜浸没在一层较浅的培养液中进行培养,这样的系统设置,相比于传统的浸没式培养系统,虽然有效提高了生物物质的浓度,但在其他方面并无显著的改善。例如,系统的光利用率较低、系统易受污染、系统运行成本高和/或系统补碳效率低的问题并没有从根本上得到改善。同时,使用这种浸没式的生物膜系统也产生了其他问题:由于培养液的流动(或生物膜运动)产生的应力,细胞脱离、生物膜脱落后进入培养液,导致光利用率的进一步下降和生物物质产量的降低。文献也报道了一种非浸没式的生物膜系统(申请号为201010250866.X的中国专利文献公开了一种用于微藻工业化生产的半固态培养方法),在此培养系统中,微藻被接种在具有存水能力的材料上,如此,微藻细胞不需要被浸没也可被保持湿润并生长,以上所述的系统降低了系统运行所需的培养液量,在提高生物物质浓度的同时降低了运行成本。但是,该文献所描述的系统并没有从根本上解决细胞和/或生物膜脱离进入培养液。申请号为201210051158.2的一种用于微藻工业化生产的半固态贴壁培养装置和申请号为201210051552.6的一种插板式微藻半固态贴壁培养装置的中国专利文献,其装置在运行过程中,细胞可在存水材料内部进行生长,从而堵塞系统,增加系统运行维护成本,并且当杂菌进入营养液后,杂菌会跟随营养液到达微藻接种面,从而使微藻生物物质容易被杂菌污染,降低微藻生物物质的品质和纯度,上述专利文献中的系统大型化后,难以进行封闭无菌培养。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,克服了上述现有技术之不足,其能有效解决现有微藻培养方法存在微藻生物物质容易被杂菌等污染物污染的问题。

[0007] 本发明的技术方案是通过以下措施来实现的:一种用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,按下述方法进行:将微孔薄膜的一个表面作为微藻细胞接种面,与微藻细胞接种面相对的微孔薄膜另一个表面作为供给面,将微藻细胞接种在微藻细胞接种面上,微藻细胞不能穿过微孔薄膜的微孔到达供给面,接种后,将微藻细胞接种面采用透明薄膜覆盖,含有二氧化碳的气体相和培养液从供给面供给于微藻细胞,二氧化碳和培养液能穿过微孔薄膜的微孔到达接种面为微藻细胞的培养提供养分,光照通过透明薄膜提供给接种于微藻细胞接种面上的微藻细胞,在微藻细胞的培养过程中,当微藻细胞和/或微藻次生代谢产物的浓度达到期望值后,对微藻生物物质进行收获。

[0008] 下面是对上述发明技术方案的进一步优化或/和改进:

上述微孔薄膜为孔径小于微藻细胞的过滤材料,过滤材料为滤纸或滤膜或纤维织物;和/或,透明薄膜为透明无毒的薄膜材料,透明薄膜为半透膜或无孔透明薄膜,半透膜的孔径 $\leq$ 微孔薄膜微孔的孔径。

[0009] 上述微孔薄膜和透明薄膜的表面为平面或曲面。

[0010] 上述含有二氧化碳的气体相和培养液分别从微孔薄膜的供给面供给于微藻细胞;或者,将含有二氧化碳的培养液从微孔薄膜的供给面供给于微藻细胞。

[0011] 上述微藻为雨生红球藻栅藻或小球藻或微拟球藻或共生藻;微藻次生代谢产物指由微藻细胞生产的次要代谢产物,次要代谢产物为虾青素、类胡萝卜素和甲藻素中的一种以上。

[0012] 上述微藻生物质和微藻次生代谢产物的积累为单独积累或顺次积累或同时进行积累。

[0013] 上述光照的光源为自然光和/或人工光源。

[0014] 上述接种是指能将微藻细胞安放到微藻细胞接种面的方法,接种方法采用过滤或涂抹或喷涂或注射;和/或,收获是指能从微藻细胞接种面采集微藻细胞的方法,收获方法采用刮铲和/或冲洗。

[0015] 上述培养液是指含有微藻细胞生长所需的全部营养成分的液体培养基,营养成分包括氮、磷、碳、微量元素和调节因子,调节因子包括诱导因子和/或胁迫因子。

[0016] 上述气体相为空气或其他气体。

[0017] 本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,将微藻生物质与培养液通过微孔薄膜隔开,彻底解决了细胞脱离和生物膜脱落的问题,通过微孔薄膜的隔离作用,能够防止培养液中的杂菌等污染物到达微藻生物质中,再通过透明薄膜的覆盖隔离作用,从而避免了外界杂菌等污染物对微藻生物质的污染,从而提高了微藻生物质的纯度(纯度达到99%以上)和品质;同时,能够保持微藻细胞集中位于微藻细胞接种面上,进而能够减少收获时的生物质脱水成本,能够提高微藻生物质的产量,提高了微藻生物质和其代谢产物的生产效率;由于不会堵塞微孔薄膜微孔,所以省去了解决堵塞问题的维护费用;本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法不仅保留了现有光合生物膜式培养的优点;而且相比于浸没式培养,使用本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法后,能够减少培养液的使用量,得到1Kg干生物质需要培养液小于10L,其培养液使用量为传统浸没式培养的0.05至0.07倍。

附图说明

[0018] 附图1为本发明实施例1中的微孔薄膜在使用状态下的示意图。

[0019] 附图中的编码分别为:1为微孔薄膜,2为微藻细胞接种面,3为供给面,4为透明薄膜,5为微藻细胞,6为微藻构成的生物质(微藻构成的光合生物膜),7为微藻生物质(光合生物膜)与气体相的物质交换,8为微藻生物质(光合生物膜)与液体相的物质交换,9为光照。

具体实施方式

[0020] 本发明不受下述实施例的限制,可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体

的实施方式。本发明中所提到各种化学试剂和化学用品如无特殊说明,均为现有技术中公知公用的化学试剂和化学用品;本发明中的百分数如没有特殊说明,均为质量百分数;本发明中的常温、室温一般指15℃到25℃的温度,一般定义为25℃。

[0021] 下面结合实施例对本发明作进一步描述:

实施例1:如附图1所示,该用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,按下述方法进行:将微孔薄膜1的一个表面作为微藻细胞接种面2,与微藻细胞接种面2相对的微孔薄膜1另一个表面作为供给面3,将微藻细胞5接种在微藻细胞接种面2上,微藻细胞5不能穿过微孔薄膜1的微孔到达供给面3,接种后,将微藻细胞接种面2采用透明薄膜4覆盖,含有二氧化碳的气体相和培养液从供给面3供给于微藻细胞5,二氧化碳和培养液能穿过微孔薄膜1的微孔到达接种面为微藻细胞5的培养提供养分,光照通过透明薄膜4提供给接种于微藻细胞接种面2上的微藻细胞5,在微藻细胞5的培养过程中,当微藻细胞5和/或微藻次生代谢产物的浓度达到期望值后,对微藻生物质进行收获。

[0022] 这里的微藻生物质是指整个微藻细胞群落,即微藻构成的生物质6。

[0023] 本实施例所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,将微藻生物质与营养液通过微孔薄膜1隔开,彻底解决了细胞脱离和生物膜脱落的问题,并且,微孔薄膜1不仅作为微藻细胞5的接种媒介,而且二氧化碳和营养液可以从供给面3向接种面(微藻细胞接种面2)上的微藻细胞5提供养分。通过微孔薄膜1的隔离作用,能够防止营养液中的杂菌等污染物到达微藻生物质中,再通过透明薄膜4的覆盖隔离作用,从而避免了杂菌等污染物对微藻生物质的污染,从而提高了微藻生物质的纯度(纯度达到99%以上)和品质;

同时,能够保持微藻细胞5集中位于微藻细胞接种面2上,进而能够减少收获时的生物质脱水成本,能够提高微藻生物质的产量(微藻生物质干重达到了收获时生物质总重量的22%以上),提高了微藻生物质(干生物质产量可达1kg每平方米占地面积每天)和其代谢产物的生产效率;由于不会堵塞微孔薄膜1微孔,所以省去了解决堵塞问题的维护费用。

[0024] 本实施例所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法保留了现有光合生物膜式培养的优点;同时,相比于浸没式培养,使用本实施例所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法后,能够减少培养液的使用量,得到1Kg干生物质需要培养液小于10L,其培养液使用量为传统浸没式培养的0.05至0.07倍。

[0025] 实施例2:作为上述实施例的优化,微孔薄膜1为孔径小于微藻细胞5的过滤材料,过滤材料为滤纸或滤膜或纤维织物;和/或,透明薄膜4为透明无毒的薄膜材料,透明薄膜4为半透膜或无孔透明薄膜,半透膜的孔径 $\leq$ 微孔薄膜1微孔的孔径。

[0026] 过滤材料可以采用现有价格低廉的材料,从而降低生产成本。

[0027] 实施例3:作为上述实施例的优化,微孔薄膜1和透明薄膜4的表面为平面或曲面。

[0028] 实施例4:作为上述实施例的优化,含有二氧化碳的气体相和培养液分别从微孔薄膜1的供给面3供给于微藻细胞5;或者,将含有二氧化碳的培养液从微孔薄膜1的供给面3供给于微藻细胞5。

[0029] 实施例5:作为上述实施例的优化,微藻为雨生红球藻栅藻或小球藻或微拟球藻或共生藻;微藻次生代谢产物指由微藻细胞生产的次要代谢产物,次要代谢产物为虾青素、类胡萝卜素和甲藻素中的一种以上。

[0030] 实施例6:作为上述实施例的优化,微藻生物质和微藻次生代谢产物的积累为单独

积累或顺次积累或同时进行积累。

[0031] 实施例7:作为上述实施例的优化,光照的光源为自然光和/或人工光源。

[0032] 实施例8:作为上述实施例的优化,接种是指能将微藻细胞5安放到微藻细胞接种面2的方法,接种方法采用过滤或涂抹或喷涂或注射;和/或,收获是指能从微藻细胞接种面2采集微藻细胞5的方法,收获方法采用刮铲和/或冲洗。

[0033] 实施例9:作为上述实施例的优化,培养液是指含有微藻细胞生长所需的全部营养成分的液体培养基,营养成分包括氮、磷、碳、微量元素和调节因子,调节因子包括诱导因子和/或胁迫因子。

[0034] 诱导因子、胁迫因子均为现有微藻培养的公知技术。

[0035] 实施例10:作为上述实施例的优化,气体相为空气或其他气体。

[0036] 实施例11:该用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,按下述方法进行:将长0.5m、宽0.1m、厚度为1mm的玻璃纤维网格(方形网孔,长宽均为1cm)竖直放置于直径为0.12m、高度为0.55m的透明有机玻璃管中。利用蠕动泵从玻璃纤维网格的上方,向玻璃纤维网格中添加BBM培养液,培养液流量为 3mLmin^{-1} ,培养液总体积为1L并储存在一个容积为1.2L的容器中。在有机玻璃管的下方,用漏斗收集流出的培养液并倒流回培养液存储瓶中。在无菌环境下利用过滤的方式将纯净的栅藻细胞接种在尼龙滤膜的表面(接种区域边界与尼龙薄膜边界距离0.05m),接种生物质量为 5g m^{-2} 。接种后使用长0.5m、宽0.1m、厚度为0.1mm的FED透明薄膜4将尼龙微孔薄膜接种的一面覆盖,并将四周封闭。然后将尼龙微孔薄膜1放置到如上所述的有机玻璃管中,并将尼龙微孔薄膜未接种的一面贴在玻璃纤维网格的表面。培养过程中,使用钠光灯向接种的尼龙滤膜表面提供光照,光强为 $1000\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$,并使用16:8光照——黑暗循环(接近于自然光),培养时环境温度为 26°C 。培养过程中通过进气口向有机玻璃管内提供二氧化碳含量为3%的压缩空气,流量为 1Lmin^{-1} 。

[0037] 结果表明,栅藻生物质的产量最高达到了 $26\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$ 尼龙滤膜,换算为单位占地面积生物质产量后为 $1140\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$,比使用跑道系统(使用自然光)的目前有记录的最高产量($360\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$)高3.2倍。直接收获后的生物质干重为总重量的21%,远远大于浸没式系统(小于1%)。

[0038] 同时对收获后生物质的显微镜观察表明,经过20天的培养,生物质没有受到任何杂菌的污染。

[0039] 综上所述,本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法,将微藻生物质与营养液通过微孔薄膜隔开,彻底解决了细胞脱离和生物膜脱落的问题,通过微孔薄膜的隔离作用,能够防止营养液中的杂菌等污染物到达微藻生物质中,再通过透明薄膜的覆盖隔离作用,从而避免了外界杂菌等污染物对微藻生物质的污染,从而提高了微藻生物质的纯度(纯度达到99%以上)和品质;同时,能够保持微藻细胞集中位于微藻细胞接种面上,进而能够减少收获时的生物质脱水成本,能够提高微藻生物质的产量,提高了微藻生物质和其代谢产物的生产效率;由于不会堵塞微孔薄膜微孔,所以省去了解决堵塞问题的维护费用;本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法不仅保留了现有光合生物膜式培养的的优点;而且相比于浸没式培养,使用本发明所述的用于工业化生产微藻的封闭生物膜式培养方法后,能够减少培养液的使用量,得到1Kg干生物质需要培养液小于10L,其培养液使用量为传统浸没式培养的0.05至0.07倍。

[0040] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

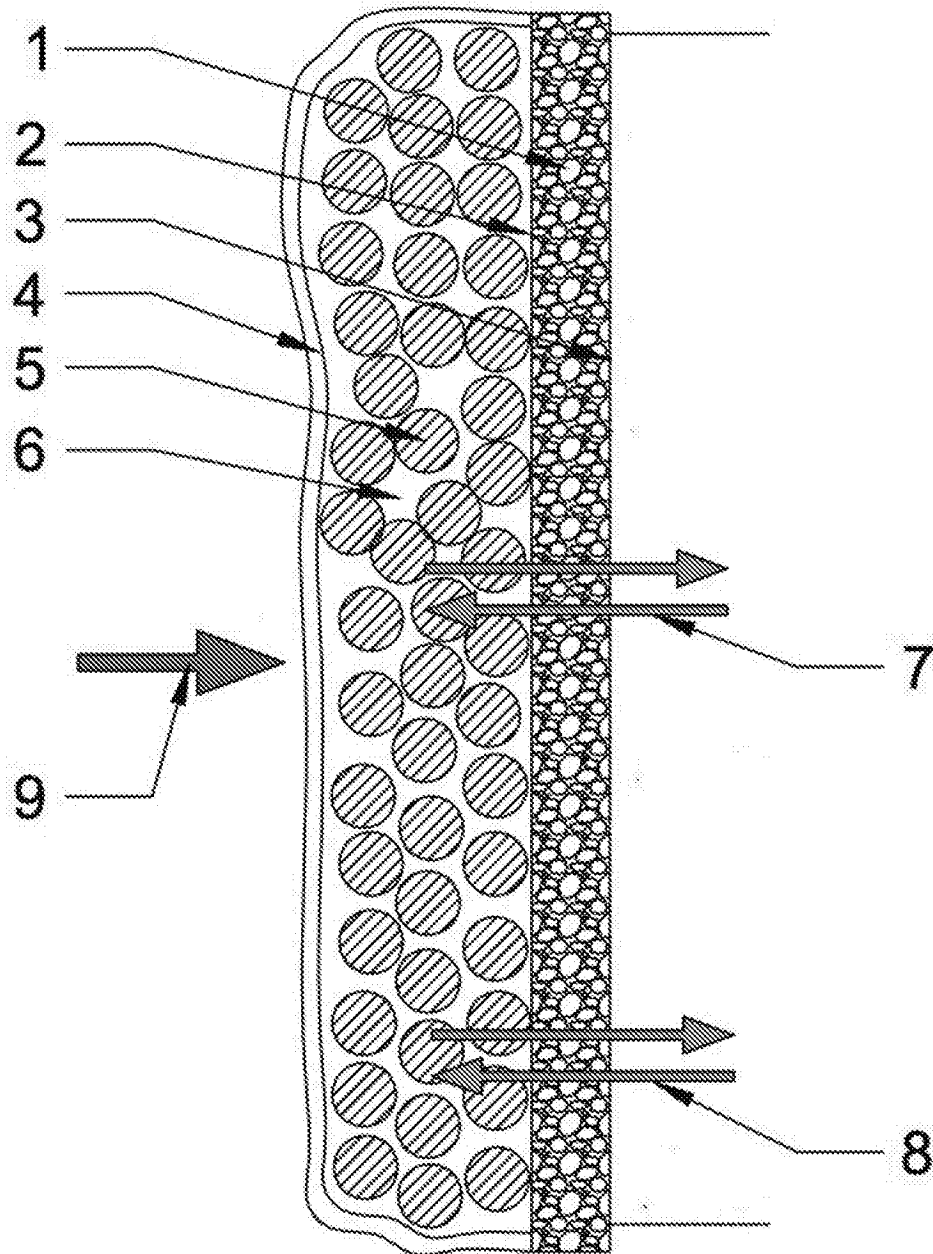


图1