

一种促进小球藻快速生长的方法

申请号：[200910070786.3](#)

申请日：2009-10-14

申请(专利权)人 [天津师范大学](#)

地址 [300387 天津市西青区宾水西道393号](#)

发明(设计)人 [刘丽丽](#)

主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)

分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#) [C12Q1/06\(2006.01\)I](#) [C12R1/89\(2006.01\)N](#)

公开(公告)号 [101705187A](#)

公开(公告)日 [2010-05-12](#)

专利代理机构 [天津市杰盈专利代理有限公司 12207](#)

代理人 [朱红星](#)



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101705187 A

(43) 申请公布日 2010.05.12

(21) 申请号 200910070786.3

(22) 申请日 2009.10.14

(71) 申请人 天津师范大学

地址 300387 天津市西青区宾水西道 393 号

(72) 发明人 刘丽丽

(74) 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司 12207

代理人 朱红星

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006.01)

C12Q 1/06(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

一种促进小球藻快速生长的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种促进小球藻快速生长的方法。为了寻找到小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) SD-0701 快速生长的条件和方法,通过采用不同种类培养基培养小球藻并比较其生长状况,然后结合小球藻生长动力学研究,获得了小球藻最佳的快速生长的条件和方法。结果表明,本发明驯化筛选的小球藻在 Liu-SD-0701 培养基中长势最好,代时最短,繁殖率最高。为工业化高效率发酵培养小球藻奠定了基础。

1. 一种促进小球藻快速生长的方法,其特征在于按如下的步骤进行:

(1) 配制小球藻的 Liu-SD-0701 培养基,其组成为:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g;

(2) 将配制好的 Liu-SD-0701 培养基 10 ~ 300mL, 121℃ 灭菌 20min 备用;

(3) 在超净工作台中,取小球藻接种至 Liu-SD-0701 液体培养基中, 5 ~ 40℃ 下静置培养,每天定时摇动 10-15 次,培养周期 7 ~ 45d ;其中的比生长速度为 1.366 个 /d,平均世代为 5.287h,代时为 12.177h。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中小球藻生长的测定方法为:将 2.86×10^8 个 /mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个 /mL ;取藻液 1.25mL,加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养,接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个 /mL,培养方法同前 ;24h 计数一次,培养周期 15d,直至其生长状态处于下降趋势。

3. 权利要求 1 或 2 所述的促进小球藻快速生长的方法,在进行各种单细胞藻类培养方面的应用。

一种促进小球藻快速生长的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及小球藻快速生长的方法,更具体的说一种通过采用特定培养基培养小球藻快速生长的方法。

背景技术

[0002] 小球藻是一种理想的蛋白质资源,被联合国粮食及农业组织(FAO)列为二十一世纪人类的绿色营养源健康食品[李师翁,李虎乾.植物单细胞蛋白资源-小球藻开发利用研究的现状,生物技术,1997,7(3):45-48.].小球藻含有丰富的蛋白质、脂质、多糖、食用纤维、维生素、微量元素和一些活性代谢产物[潘欣,李建宏,戴传超,浩云涛等.小球藻异养培养的研究,食品科学,2002,23(4)28-33.],具有良好的保健和药理作用,可广泛应用于食品、医药、饲料、化工等领域,有广阔的开发应用前景[余若黔,刘学铭,梁世中等.小球藻(*Chlorella vulgaris*)异养特性研究[J],海洋通报,2000,19(3):58-61.].当前,美国、日本、以色列等国家开发出现代化的小球藻培养技术,已成为小球藻的主要生产地[李师翁,李虎乾.植物单细胞蛋白资源-小球藻开发利用研究的现状,生物技术,1997,7(3):45-48.].但国内,在该领域尚属空白。

[0003] 微藻是具有重要经济价值的生物资源。自1953年Lewin等[Lewin J C. Heterotrophy in diatoms[J]. Gen Microbiol, 1953, 9:305-313.]首先发现了某些种类能利用有机物作为唯一碳源和能源进行异养生长以来,受到科学界广泛重视。小球藻细胞除了在自养条件下利用光能和二氧化碳进行正常的自养生长外,还可以在异养培养条件下利用有机碳源进行生长和繁殖[陈颖,李文彬,张利明,孙勇如.小球藻对5种常用基因工程抗生素的敏感性研究[J],海洋与湖沼,1999,30(5):500-504.].由于光合自养条件下微藻生产速率慢,生物量低。近年来对小球藻混养、异养的研究越来越受到关注,当培养液或培养基中含有葡萄糖等有机碳源时,小球藻的营养方式可以由自养转变为混养、异养,这种培养方式可以使小球藻的生长速度大大加快,细胞密度大幅度提高。生物反应器高密度培养是近年的研究热点,小球藻的生长速率是制约生物反应器高密度培养和大规模生产微藻产品的关键因素[邢翔,张小葵,杜宗军,赵丽华.两种生物反应器高密度培养小球藻研究[J],科技导报,2008,26(23)56-58.],因此,小球藻快速生长是当前微藻生物技术的重要研究方向之一。

[0004] 小球藻是单细胞浮游种类,细胞微小,圆形或略椭圆形,细胞壁薄,细胞内有1个杯形或曲带形载色体,细胞老熟时载色体分裂成数块。小球藻在我国分布甚广,生活于含有有机质的河流、沟渠、池塘等水中,在潮湿的土壤上也有分布。小球藻是一种单细胞的绿藻,是一种高效的光合藻类,富含蛋白质、脂质、多糖、膳食纤维、维生素、微量元素和活性代谢产物,小球藻中的维生素、矿物质含量与螺旋藻差别不大,但是小球藻中的某些功能成分如生物素、叶绿素、叶酸等远比螺旋藻含量高,保健效果显著。尤其重要的是,近年来,科学家研究发现了小球藻独有的特殊功能成分-CGF(活性生长因子)。CGF是生物活性物质,具有诱发干扰素,激发人体免疫组织的防御能力,具有抗肿瘤、抗辐射、抗病原微生物等作用,尤其

对于放化疗之后的消化性溃疡有明显的改善。小球藻其丰富、均衡的营养成分,近乎人体营养学及世界卫生组织、农林组织所推荐的比例要求,是“药食同源”的纯天然保健食品。

[0005] 当前国内外小球藻生产中使用较多的是开放式或封闭式池塘培养系统,即光能自养培养方式,这种培养系统造价和运转费用较低,但最大的问题是在相同培养时间下小球藻细胞浓度太低,通常收获小球藻细胞的量为干重小于 1g/L,从而造成小球藻的实际生产和后加工成本很高。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种促进小球藻快速生长的方法,它包括如下的步骤:

[0007] (1) 配制小球藻 Liu-SD-0701 培养基,其组成为:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g;

[0008] (2) 将配制好的 Liu-SD-0701 液体培养基 10 ~ 300mL, 121℃ 灭菌 20min 备用;

[0009] (3) 在超净工作台中,取小球藻接种至 Liu-SD-0701 液体培养基中, 5 ~ 40℃ 下静置培养,每天定时摇动 10 ~ 15 次,培养周期 7 ~ 45d;其中的比生长速度为 1.366 个/d,平均世代为 5.287h,代时为 12.177h。

[0010] 本发明进一步公开了小球藻生长动力学的测定方法:它是将 2.86×10^8 个/mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个/mL;取藻液 1.25mL,加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养,接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个/mL,培养方法同前;24h 计数一次,培养周期 15d,直至其生长状态处于下降趋势,再进行小球藻生长动力学分析。

[0011] 本发明更加详细的试验方法如下:

[0012] 1 藻种

[0013] 本发明选用的小球藻为:小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*)SD-0701,藻种由天津师范大学微生物实验室筛选,并保存。(刘丽丽:小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*)SD-0701 快速生长的研究,天津市微生物学会会员代表大会暨学术年会会议论文,2009:66-70。)

[0014] 2 培养基

[0015] Liu-SD-0701 培养基:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g。

[0016] SE 培养基(邢翔等.两种生物反应器高密度培养小球藻研究.科技导报,2008,26(23):56-58。);

[0017] 克氏培养基(陈颖等.小球藻对 5 种常用基因工程抗生素的敏感性研究[J],海洋与湖沼,1999,30(5):500-504。);

[0018] Knop 异养培养基(韩兴梅等.转兔防御素基因小球藻异养培养基的培养基优化研究[J],水生生物学报,2006,30(5):547-552。);

[0019] 3 不同培养基对小球藻生长的影响结果

[0020] 小球藻的培养方法:

[0021] 500mL 三角瓶加入 Liu-SD-0701 液体培养基 10 ~ 300mL, 121℃ 灭菌 20min。在超净工作台中,取小球藻接种至培养基中, 5 ~ 40℃ 下静置培养,每天定时摇动 10 ~ 15 次,培

养周期 3 ~ 45d, 本实验设置 3 次重复。

[0022] 小球藻的计数方法：

[0023] 接种后, 每天定时用血球计数板进行显微计数, 测定藻液中的藻细胞密度 (个 / mL)。采用 25×16 规格的计数板, 每次计数选 5 个中方格, 即 4 个角和中央的中格共 80 个小格中的菌体进行计数, 位于格线上的菌体一般只数上方和右边线上的。计数一个样品要从两个计数室中计得的值来计算样品的含藻量。样品稀释度要求每小格内约有 5 ~ 10 个藻细胞为宜。计数时间间隔为 24h。培养和计数周期为 15d。

[0024] 实验结果表明, 小球藻在不同种类的培养基中生长的速度是不一样的, 在 SE 培养基中的生长速度最慢, 在 Liu-SD-0701 培养基中生长速度最快, 见表 1。

[0025] 表 1 各种培养基里的小球藻生长情况

[0026]

培养基种类	SE 培养基	克氏培养基	Liu-SD-0701 培养基	Knop 异养培养基
小球藻生长状况	+	++	++++	++
培养 7d 的藻液观察	淡绿色	绿色	深绿色	绿色

[0027] 实验结果显示, 小球藻在克氏培养基、Liu-SD-0701 培养基、Knop 异养培养基中的生长速度均高于 SE 培养基, 说明培养基不同, 小球藻的生长速度也不同, 在 Liu-SD-0701 培养基中小球藻的长势最好, 生长周期最短, 代时最短, 在显微镜下可见许多似亲孢子。4 小球藻生长动力学研究

[0028] 将 2.86×10^8 个 / mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个 / mL ; 取藻液 1.25mL, 加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养, 接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个 / mL, 培养方法同前 ; 24h 计数一次, 培养周期 15d, 直至其生长状态处于下降趋势。

[0029] 以 Liu-SD-0701 液体培养基培养小球藻, 进行小球藻生长动力学研究, 实验中的数据结果采用 SPSS Statistics 软件分析归纳为表 2。为了获得小球藻生长动力学曲线, 将实验数据分别进行数学处理, 取 log 值见表 2。小球藻生长动力学曲线见图 1。

[0030] 表 2 实验数据的 Spss 软件分析结果和小球藻生长动力学的数据 lg 值

[0031]

实验天数 (d)	N	均值 (个 / mL)	lg 值
0	3	7.1500 ± 0.00000	0.854306
1	3	14.3333 ± 1.20185	1.156347
2	3	820.0000 ± 67.88471	2.913814
3	3	$53500.0000 \pm 3785.93890$	4.728354

实验天数 (d)	N	均值 (个 /mL)	lg 值
4	3	$(30.567 \pm 1.79869)E+05$	6.485248
5	3	$(48.535 \pm 1.87625)E+06$	7.686055
6	3	$(113.02 \pm 7.46382)E+06$	8.053142
7	3	$(136.50 \pm 7.09460)E+06$	8.135133
8	3	$(11.345 \pm 1.31989)E+07$	8.054805
9	3	$(128.17 \pm 9.27512)E+06$	8.107775
10	3	$(177.68 \pm 7.23016)E+06$	8.249647
11	3	$(244.55 \pm 6.91183)E+06$	8.388368
12	3	$(283.92 \pm 3.80880)E+06$	8.453191
13	3	$(304.27 \pm 3.18987)E+06$	8.483254
14	3	$(276.33 \pm 4.63756)E+06$	8.441433
总数	45	$(12.197 \pm 1.66004)E+07$	8.086248

[0032]

[0033] 由图 1 可见,小球藻在无菌条件下接种入 Liu-SD-0701 液体培养基后,小球藻初始的细胞密度的 Log 值为 0.854306。经过了短暂生长适应期后,进入快速生长时期。培养至第 4 天时,培养基的颜色由黄棕色变为浅绿色,显微镜下观察时,细胞个体增多,细胞为绿色,多数细胞处于分裂期。培养至第 7 天时,小球藻的细胞密度已达到 $(136.50 \pm 7.09460) \times 10^6$ 个 /mL。7d 以后,其生长进入了稳定期,恒定增长阶段,溶液的颜色变为深绿色。15d 以后进入衰亡时期。

[0034] 5 小球藻生长动力学的分析结果

[0035] 参照文献 [潘欣,李建宏,戴传超,浩云涛等. 小球藻异养培养的研究,食品科学,2002,23(4)28-33.] 和文献 [Droop M R. Auxotrophy and organic compounds in the nutrition of marine phytoplankton, J. Gen. Microbiol, 1957, 16 :286-293.] 的方法,分析小球藻生长动力学的比生长速度 ;比生长常数 ;平均世代 ;代时。计算公式为 :

[0036] 比生长速度 $\mu = (\lg N_t - \lg N_0) / t$

[0037] 比生长常数 $K = 2.303 (\lg N_t - \lg N_0) / t$

[0038] 平均世代 $T = 0.693 / K$

[0039] 代时 $T_g = 0.6931/\mu$

[0040] 式中： N_0 为小球藻初始计算密度， N_t 为培养 T 时间后小球藻的计算密度，t 为培养时间，单位为 h(以 1d 为 24h 计算)。

[0041] 通过对小球藻生长动力学的分析，表明通过将小球藻培养在不同条件下比较其生长速度的方式，获得了小球藻最佳培养基为 Liu-SD-0701 培养基的实验结果。通过小球藻生长动力学的研究证明小球藻在 Liu-SD-0701 培养基中的比生长速度为 1.366 个/d，平均世代为 5.287h，代时为 12.177h。通过计算小球藻的代时和平均世代，结果显示本实验室筛选的小球藻在 Liu-SD-0701 培养基条件下，代时低于参考文献[潘欣，李建宏，戴传超，浩云涛等. 小球藻异养培养的研究，食品科学，2002，23(4)28-33.]中所述，代时缩短了大约二分之一的的时间，平均世代也远低于参考文献[王逸云. 大连理工大学博士学位论文，小球藻外源基因转化系统的建立及其表达植酸酶的研究，2005 年 9 月.]中所述，平均世代缩短了大约 30 倍。说明本发明的小球藻在 Liu-SD-0701 培养基中，能够充分利用各种养分，迅速的生长。

[0042] 本发明采用 Liu-SD-0701 培养基的方式培养的小球藻，其比生长速度 μ 为 1.366，均高于参考文献[桂林. 华中农业大学硕士学位论文，蛋白核小球藻培养方式的比较及其叶黄素的提取检测，2001 年 5 月，研究方向：微生物高价值产物，专业：农产品加工与贮藏.]中的小球藻在自养(μ 为 0.13)、异养(μ 为 0.76)和混养(μ 为 0.81)三种培养方式中的生长参数。说明本发明获得了小球藻的最佳生长条件，最佳培养小球藻的方式。

[0043] 本发明采用 Liu-SD-0701 培养基的方式培养的小球藻与现有技术相比所具有的积极效果在于：

[0044] (1) 采用本发明 Liu-SD-0701 培养基方法获得的小球藻，提高了小球藻的生长速度，极大地缩短了小球藻平均世代时间。平均世代时间缩短了大约 30 倍。本发明的小球藻在 Liu-SD-0701 培养基中，能够充分利用各种养分，迅速的生长。以本发明的方式建立工厂化生产模式，或改造旧的生产方式。可以通过缩短生产周期，从而提高了小球藻的产量，降低了小球藻的生产成本，增加了生产效益。

[0045] (2) 应用本发明对小球藻生长动力学的研究结果，人们由图 1 可知，采用本专利方法培养小球藻，在第 6 天收获小球藻时，可以得到量大、质高的小球藻；在第 2 至 5 天收获时，可以得到生长旺盛的小球藻。

[0046] (3) 本发明所述方法适用于其他各种单细胞藻类的培养。

[0047] 说明书附图。

[0048] 图 1 为小球藻的生长动力学曲线。

具体实施方式

[0049] 为了简单和清楚的目的，下文恰当的省略了公知技术的描述，以免那些不必要的细节影响对本技术方案的描述。以下结合较佳实施例，对本发明做进一步的描述，特别加以说明的是，本发明的各种培养基原料可以从市场上买到。本发明选用的小球藻为：小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)SD-0701，藻种由天津师范大学微生物实验室筛选，并保存。

[0050] 实施例 1

[0051] (1) 在 500mL 三角瓶加入 Liu-SD-0701 液体培养基 20mL，121℃灭菌 20min 备用；

[0052] (2) 在超净工作台中,取小球藻接种至 Liu-SD-0701 液体培养基中,20℃下静置培养,每天定时摇动 10 次,培养周期 10d;其中的比生长速度为 1.366 个/d,平均世代为 5.287h,代时为 12.177h;

[0053] 其中的 Liu-SD-0701 培养基为:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g。

[0054] 小球藻生长的动力学测定方法:它是将 2.86×10^8 个/mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个/mL;取藻液 1.25mL,加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养,接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个/mL,培养方法同前;24h 计数一次,培养周期 15d,直至其生长状态处于下降趋势。

[0055] 实施例 2

[0056] (1) 在 500mL 三角瓶加入 Liu-SD-0701 液体培养基 100mL,121℃灭菌 20min 备用;

[0057] (2) 在超净工作台中,取小球藻接种至 Liu-SD-0701 液体培养基中,30℃下静置培养,每天定时摇动 15 次,培养周期 10d;其中的比生长速度为 1.366 个/d,平均世代为 5.287h,代时为 12.177h;

[0058] 其中的的 Liu-SD-0701 培养基为:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g。

[0059] 小球藻生长的动力学测定方法:它是将 2.86×10^8 个/mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个/mL;取藻液 1.25mL,加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养,接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个/mL,培养方法同前;24h 计数一次,培养周期 15d,直至其生长状态处于下降趋势。

[0060] 实施例 3

[0061] (1) 在 500mL 三角瓶加入 Liu-SD-0701 液体培养基 300mL,121℃灭菌 20min 备用;

[0062] (2) 在超净工作台中,取小球藻接种至 Liu-SD-0701 液体培养基中,40℃下静置培养,每天定时摇动 10 次,培养周期 10d;其中的比生长速度为 1.366 个/d,平均世代为 5.287h,代时为 12.177h;

[0063] 其中的的 Liu-SD-0701 培养基为:葡萄糖 5g/L,酵母粉 4g/L,牛肉膏 2g/L, KNO_3 0.9g/L, K_2HPO_4 0.4g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0g/L, CaCl_2 0.012g/L, FeCl_3 0.001g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g。

[0064] 小球藻生长的动力学测定方法:它是将 2.86×10^8 个/mL 的原藻液稀释至 2.86×10^2 个/mL;取藻液 1.25mL,加入到 50mL, Liu-SD-0701 液体培养基中培养,接种后培养基中的小球藻浓度为 7.15 个/mL,培养方法同前;24h 计数一次,培养周期 15d,直至其生长状态处于下降趋势。

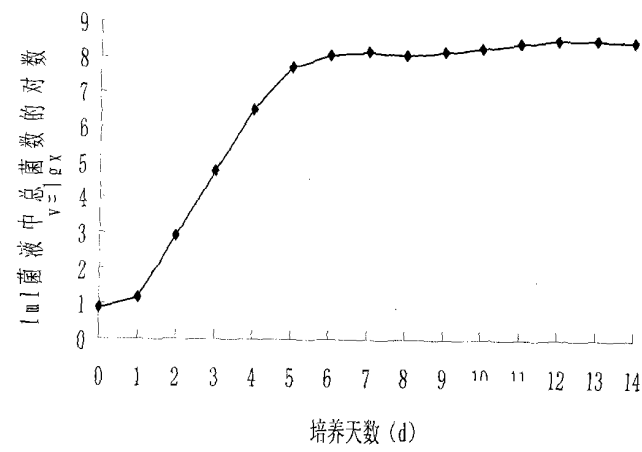


图 1