

# 一株小球藻及其培养方法和应用

申请号：[201110145547.7](#)

申请日：2011-05-31

申请(专利权)人 [中国科学院青岛生物能源与过程研究所](#)

地址 [266101 山东省青岛市崂山区松岭路189号](#)

发明(设计)人 [刘君寒 李福利 何茹 袁程 胡光荣](#)

主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)

分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#) [C02F3/32\(2006.01\)I](#) [C12P7/64\(2006.01\)I](#)  
[C12P21/00\(2006.01\)I](#) [C12P19/04\(2006.01\)I](#)  
[C12P19/34\(2006.01\)I](#) [C12P23/00\(2006.01\)I](#)  
[C12P17/18\(2006.01\)I](#) [B01D53/84\(2006.01\)I](#)  
[B01D53/62\(2006.01\)I](#) [C12R1/89\(2006.01\)N](#)

公开(公告)号 [102229889A](#)

公开(公告)日 [2011-11-02](#)

专利代理机构 [中科专利商标代理有限责任公司 11021](#)

代理人 [王旭](#)



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102229889 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 02

(21) 申请号 201110145547. 7 *C12P 19/34* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 05. 31 *C12P 23/00* (2006. 01)

(83) 生物保藏信息 *C12P 17/18* (2006. 01)

CGMCC No. 4652 2011. 03. 04 *B01D 53/84* (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研 *B01D 53/62* (2006. 01)

究所 *C12R 1/89* (2006. 01)

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路  
189 号

(72) 发明人 刘君寒 李福利 何茹 袁程  
胡光荣

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

*C12N 1/12* (2006. 01)

*C02F 3/32* (2006. 01)

*C12P 7/64* (2006. 01)

*C12P 21/00* (2006. 01)

*C12P 19/04* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

序列表 2 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一株小球藻及其培养方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一株小球藻藻株 *Chlorella* sp. MRA-1, 其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No. 4652, MRA-1 的生长可适应多种培养基、温度、氮源浓度、CO<sub>2</sub> 浓度条件, 在低氮条件下的油脂含量和产率高, 本发明也公开了 MRA-1 的培养方法及其应用领域, 其应用领域包括 CO<sub>2</sub> 的固定, 废水的净化, 油脂、蛋白质、色素、淀粉、多糖、核酸等生物物质的生产。

1. 一株小球藻藻株 *Chlorella* sp. MRA-1, 其特征在于保藏编号为 CGMCC No. 4652, 在其基因组中包含核酸序列 18S rDNA (SEQ ID NO :1) 和 ITS (SEQ ID NO :2) 或者它们的互补序列。

2. 权利要求 1 所述的藻株用于获得藻株高生物质产量的应用 ; 用于废水净化和 / 或废气净化的应用 ; 以及用于生产油脂、脂肪酸、蛋白质、淀粉、色素、多糖和 / 或核酸的应用。

3. 权利要求 2 所述的应用, 其中所述废水为含高浓度氮、磷的废水。

4. 权利要求 2 所述的应用, 其中所述废气为含 CO<sub>2</sub> 的废气。

5. 权利要求 2 所述的应用, 其中所述脂肪酸主要为 16 碳酸和 18 碳酸, 其中所述色素包括叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素。

6. 一种得到微藻高生物质产量的方法, 其特征在于 : 采用权利要求 1 所述的小球藻藻株 *Chlorella* sp. MRA-1 ; 采用工业、养殖业等产生的含有机质的废水, 或者利用工业加工的各种糖类配置的培养基, 或 N8、M8、BG-11 培养基或改良 BG-11 培养基作为培养基 ; 培养温度为 15-34℃, 优选地 22-28℃ ; 光照强度为 50-2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ; 向 MRA-1 藻株的培养物中通入含 0.03-30% (v/v) CO<sub>2</sub> 的气体或空气, 优选地 5% -20% (v/v) 的空气混合气。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述培养基中包含 1.5g/L-5g/L 的 NaNO<sub>3</sub>。

8. 权利要求 6 的方法, 其中所述培养基中氮的浓度为 29.7mM, 磷的浓度为 7.1mM。

9. 一种利用权利要求 1 所述的藻株获得高油脂产量的方法, 其特征在于, 将权利要求 1 所述的小球藻藻株 *Chlorella* sp. MRA-1 在 5-10% 浓度 CO<sub>2</sub> 下, 0.375g/L 浓度的 NaNO<sub>3</sub> 下进行培养。

## 一株小球藻及其培养方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及利用生物的方法,处理人类活动产生的生产、生活废水,或含高浓度二氧化碳的废气,并且将由此生产的生物质用于进一步的资源开发,包括能源、食品、保健品、肥料、饲料等产品。本发明属于环境处理和生物产品开发领域。

### 背景技术

[0002] 当前人类社会面临两大难题:气候变暖和环境恶化。气候变暖的一大诱因是工业革命以来由于化石能源的消耗造成的大气中  $\text{CO}_2$  含量的上升。工业生产部门的  $\text{CO}_2$  集中排放是大气中新增  $\text{CO}_2$  的主要来源,以国内某大型城市为例,2007 年“热电厂”、“工业与建筑业”、“交通”各类  $\text{CO}_2$  排放分担率分别为 35.4%、34.4%。工厂高 COD 污水的排放,农业肥料的使用和畜牧业粪便处理的不当,使我国工农业发达地区水体的污染和富营养化日益严重。

[0003] 微藻也称单细胞藻类,种类约占全球已知藻类的 70%。藻类大多具有从水相中吸收有毒物质或降解有机污染物的能力。微藻具有资源丰富、光合效率高、生长速度快、适应性强的特点,20 世纪 50 年代,Osward 和 Gotaas 最早提出利用微藻处理污水的想法。自 20 世纪 80 年代以来,生物技术的飞速发展,使藻类大规模培养技术逐步完善。国内外对进一步发挥藻类净化污水的潜力进行了大量研究,使藻类净化污水的机理研究取得了很大进展。

[0004] 微藻是以水为电子供体的光能自养生物。光合作用过程中,它们以光能为能源,利用简单的无机物合成有机物,同时消耗、同化污水中大量的氮、磷等营养物质,使水源得到净化。微藻对氮磷等营养物质的主要去除途径一般包括吸收和吸附。微藻利用水中溶解的  $\text{CO}_2$ 、 $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  作为碳源进行光合作用的同时,使废水的 pH 升高,从而导致氨态氮的挥发和正磷酸盐的沉淀,这也是氮磷等营养物质去除的一条途径。微藻消化吸收无机氮磷转化成生物量的能力可以有效的进行氮磷化合物解毒。同时,由于微藻能有效地进行光合作用,将光能、 $\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CO}_2$  和无机盐(如  $\text{NH}_4^+$ ) 转化为体内有机化合物,产生大量氧气,提高溶氧水平,使水体 pH 值升高;在细菌的作用下使  $\text{H}_2\text{S}$  变成无毒的硫酸盐,从而达到净化污水和保持良好水环境的目的。

[0005] 微藻生物质有许多潜在的应用价值,因为藻类富含油脂、蛋白质、色素、维生素和矿物质。其主要的潜能有:用于食料和医药业(人和动物的营养补充物:维生素、蛋白质、脂肪酸、多糖等);提取化工产品如化妆品、精细化工产品等;作为能源产生沼气、燃料;用于饵料和饲料业(鱼虾、甲壳动物等水产动物的饵料,家禽饲料);农业上作为土壤调节剂、肥料等。

[0006] 近年来随着能源问题的日益突出,寻找合适的可再生能源成为研究领域的热点。微藻能源具备多个优势,成为备受关注的焦点。首先,微藻的生长迅速,且不占用耕地,可以在滩涂、盐碱地等边际土地上养殖;其次,微藻生长可吸收  $\text{CO}_2$  作为碳源,可缓解全球温室效应;再次,若以污水中的有机物和离子作为微藻生长的营养,收获微藻的同时可以净化

污水。

## 发明内容

### [0007] 技术问题

[0008] 本发明要解决的技术问题是提供一株小球藻,并利用工农业废弃物或人工培养基培养该小球藻获得生物物质,从中可开发多种产品,或应用于废水净化。

### [0009] 技术方案

[0010] 为实现上述技术问题的解决,本发明采用如下技术方案:

[0011] 本发明提供一株小球藻 (*Chlorella* sp.) (分离自青岛市崂山区某村庄生活污水排放渠),命名为MRA-1(*Chlorella* sp.),已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其特征在于其基因组包含核酸序列 18SrDNA (SEQ ID NO:1) 和 ITS (SEQ ID NO:2) 或者它们的互补序列。根据 序列比对,本发明的MRA-1藻株与已公布的藻株的18S rDNA数据存在差异。

[0012] MRA-1藻株与已报道的其近缘种 *Chlorella vulgaris* 和 *Chlorella* cf. *minutissima* 的18S rDNA序列至少有2个碱基的差异(缺失),与 *Chlorella sorokiniana* 至少有10个碱基的差异。

### [0013]

18S rDNA 比对结果	碱基差异数
<i>Chlorella vulgaris</i> strain CCAP 211/82	2
<i>Chlorella</i> cf. <i>minutissima</i> CCAP 211-52	2
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain CCALA 260	10

[0014] 本发明的小球藻藻株 *Chlorella* sp. MRA-1 已经于2011年3月4日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,其保藏编号为CGMCC No. 4652。

[0015] 本发明还提供一种MRA-1藻株的培养物,所述培养物通过将MRA-1藻株在培养基中培养获得,所述培养基可以为N8、M8、BG-11、以及4种改良的BG-11培养基,培养基具体的成分可以见实施例1中所述。

[0016] 本发明还提供培养本发明的MRA-1藻株的方法,包括自养培养方式和异养培养方式。所述自养培养方式,其特征在于温度为15-37℃,优选15-34℃,更优选22-28℃,接受50-2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (优选50-600  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) 的灯光或太阳光光照,向MRA-1藻株的培养物中通入含0.03-30% CO<sub>2</sub> 的气体或空气。所述异养培养方式,其特征在于采用工业、养殖业等产生的含有机质的废水,或者利用工业加工的各种糖类配置的培养基,温度为15-37℃,在培养过程中连续或半连续的搅拌或通入气体。所述的有机质的来源为工业、养殖业等产生的含有机质的废水,所述的CO<sub>2</sub> 的来源包含工厂产生的废气或者空气,在通入气体中CO<sub>2</sub> 的含量不超过30%。

[0017] 发明人发现,当培养基中的氮或/和磷源的浓度较高时(比如氮的浓度从9.9mM提高到29.7mM,磷的浓度从0.17mM提高到7.1mM),有利于MRA-1藻株生物物质的获得。并且发现,MRA-1藻株优选在22-28℃下生长。在1.5g/L至5g/L的硝酸钠浓度下,MRA-1均有较好的生长,过高的硝酸钠浓度(10g/L),MRA-1的生长受到一定的抑制。在0.375g/L的硝酸钠浓度下培养时,获得最高的油脂含量达到52%,其中中性脂的含量占到总脂的90%

以上,其他浓度硝酸钠培养获得的油脂含量为28%至34%之间;而最高的14天油脂产量是在0.375g/L的硝酸钠浓度下获得的,为1.87g/L;最低的油脂为0.96g/L,是在10g/L的硝酸钠浓度下获得的。

[0018] 将在0.375g/L的硝酸钠浓度下获得的油脂经过柱层析分离出中性脂成份,使用气相色谱-质谱技术分析脂肪酸的组成,发现主要为18碳酸和16碳酸,最多的油酸占到脂肪酸总量的57%

[0019] 此外,发明人还发现,MRA-1藻株优选在低浓度的CO<sub>2</sub>浓度下生长;在5%的CO<sub>2</sub>浓度下,MRA-1的油脂含量为33.5%,14天油脂产量为1.51g/L;相对于5%和10%CO<sub>2</sub>浓度,20%的CO<sub>2</sub>浓度获得了较低的油脂含量和产量,分别为24.7%和0.79g/L。

[0020] 本发明还提供MRA-1藻株用于生产油脂、脂肪酸、蛋白质淀粉、色素、多糖和/或核酸的应用。在一个实施方案中,所述脂肪酸主要为18碳酸和16碳酸。所述藻株的应用领域包含能源、食品、饲料、保健品和医药。此外,本发明还提供MRA-1藻株用于废水的净化的应用。

[0021] 本发明提供下列:

[0022] 1. 一株小球藻藻株*Chlorella* sp. MRA-1,其特征在于保藏编号为CGMCC No. 4652,在其基因组中包含核酸序列18S rDNA(SEQ ID NO:1)和ITS(SEQ ID NO:2)或者它们的互补序列。

[0023] 2.1 所述的藻株用于获得藻株高生物质产量的应用;用于废水净化和/或废气净化的应用;以及用于生产油脂、脂肪酸、蛋白质、淀粉、色素、多糖和/或核酸的应用。

[0024] 3.2 所述的应用,其中所述废水为含高浓度氮、磷的废水。

[0025] 4.2 所述的应用,其中所述废气为含CO<sub>2</sub>的废气。

[0026] 5.2 所述的应用,其中所述脂肪酸主要为16碳酸和18碳酸,其中所述色素包括叶绿素a,叶绿素b和类胡萝卜素。

[0027] 6. 一种得到微藻高生物质产量的方法,其特征在于:采用1所述的小球藻藻株*Chlorella* sp. MRA-1;采用工业、养殖业等产生的含有机质的废水,或者利用工业加工的各种糖类配置的培养基,或N8、M8、BG-11培养基或改良BG-11培养基作为培养基;培养温度为15-34℃,优选地22-28℃;光照强度为50-2000 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>(优选50-600 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>);向MRA-1藻株的培养物中通入含0.03-30% (v/v) CO<sub>2</sub>的气体或空气,优选地5%-20% (v/v)的空气混合气。培养时间一般为12天到16天。

[0028] 7.6 的方法,其中所述培养基中包含1.5g/L-5g/L的NaNO<sub>3</sub>。

[0029] 8.6 的方法,其中所述培养基中氮的浓度为29.7mM,磷的浓度为7.1mM。

[0030] 9. 一种利用1所述的藻株获得高油脂产量的方法,其特征在于,将1所述的小球藻藻株*Chlorella* sp. MRA-1在5-10%浓度CO<sub>2</sub>下,0.375g/L浓度的NaNO<sub>3</sub>下进行培养。

[0031] 有益效果

[0032] 工业社会以来,人类的生产生活活动,对自然环境产生了多方面的不良影响。首先是化石燃料的使用造成了CO<sub>2</sub>排放增多,引起了全球的气候变暖问题,成为了当前人类社会面临的重要挑战。其次,工农业生产和人类的生活,带来了废水的大量排放,废水中往往含有高浓度的氮磷等营养物,这些营养物进入江河湖海,引起了水体的富营养化问题,已经深刻影响到了人们的生活和养殖业。

[0033] 本发明提供的 MRA-1 藻株可以利用废水中的氮磷营养生长,同时作为自养生物,可固定转化  $\text{CO}_2$  为生物质。若以废水和废气培养 MRA-1,一方面可以减轻高浓度的氮磷等营养物流入自然水体,一方面有减少  $\text{CO}_2$  排放的效果。生产的生物质,有开发成多种工业产品的潜力。以生产生物柴油的原料——油脂为例,在低氮条件下培养 14 天, MRA-1 的油脂产量可达到 1.86g/L,总脂的含量占到干重的 53%;平均油脂产率为 1.33g/L,高于绝大多数的文献报道,也是目前已报道的小球藻中自养条件下最高的油脂产率;作为生物柴油的原料部分,中性脂在总油脂中的含量高达 90%,其脂肪酸组成也适合生物柴油的生产。

#### 附图说明

- [0034] 图 1 为不同培养基中 MRA-1 的生物质产量 (a),油脂含量和产量 (b)
- [0035] 图 2 为温度对微藻生长的影响
- [0036] 图 3 为硝酸钠浓度对 MRA-1 生长 (a)、油脂含量和产量 (b) 的影响
- [0037] 图 4 为  $\text{CO}_2$  浓度对 MRA-1 生长 (a)、油脂含量和产量 (b) 的影响
- [0038] 图 5 为 MRA-1 的中性脂中的脂肪酸甲酯化后的质谱图 (a) 和脂肪酸组成 (b)
- [0039] 图 6 为 MRA-1 在 0.375g/L 硝酸钠浓度下色素含量变化
- [0040] 图 7 为 MRA-1 的 18S rDNA 核酸序列 (SEQ ID NO :1)
- [0041] 图 8 为 MRA-1 的 ITS 核酸序列 (SEQ ID NO :2)

#### 具体实施方式

[0042] MAR-1 分离自青岛市崂山区某村庄生活污水排放渠,具体过程为:用无菌瓶取适量排放渠污水,在实验室无菌条件下,涂布 BG-11 培养基平板,置光照培养箱,25℃条件下培养至出现藻落,挑取多个藻落再进行多次划线分离的步骤,直至得到完全纯化的藻落。其中的一株命名为 MRA-1,经 18S rDNA 和 ITS 序列的测序分析,鉴定为 *Chlorella* sp.。

[0043] 实施例 1. MRA-1 藻株在多种培养中的培养

[0044] 配置 N8、M8、BG-11、以及 4 种改良的 BG-11 培养基中,采用柱式培养器(直径为 42mm,长度为 600mm,壁厚 2mm,材质为普通玻璃),从底部通入含 5%  $\text{CO}_2$  的空气,光照强度为  $200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,在 25℃恒温室采用上述培养基培养 MRA-1 藻株,接种浓度为  $\text{OD}_{750}$  为 0.2。培养基的配方如表 1 和表 2;P 培养基为将 BG-11 培养基中的磷源的浓度从 0.175mM 调整到 7.1mM, Mg 为将 BG-11 培养基中的镁盐的浓度从 0.30mM 调整到 1.63mM, P-Mg 为将 BG-11 培养基中的磷源和镁盐的浓度分别调整到 7.1mM 和 1.63mM, P-Mg-Fe 为将 BG-11 培养基中的磷源、镁盐和铁盐的浓度调整到 7.1mM、1.63mM 和 0.49mM。

[0045] 表 1BG-11 培养基的配置

[0046]

母液 1	NaNO <sub>3</sub>	150 g/100ml
母液 2	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	4.0 g/100ml
母液 3	(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	7.5 g/100ml
母液 4	(CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	3.6 g/100ml
母液 5	(Citric acid)	0.6 g/100ml
母液 6	( Ferric ammonium citrate)	0.6 g/100ml
母液 7	EDTA·2Na	0.1 g/100ml
母液 8	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.0 g/100ml
A5	硼酸(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	2.86 g/L
	氯化锰(MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	1.81 g/L
	硫酸锌(ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.222 g/L
	钼酸钠(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.39 g/L
	硫酸铜(CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.08 g/L
	氯化钴(CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.01 g/L

[0047] 蒸馏水 984ml, 加入母液 110ml, 母液 3、4、5、7、8、A5 各 1ml, 高压灭菌后, 加入单独灭菌的母液 2 和 6 各 1ml。

[0048] 表 2N8、M8 培养基的配置

[0049]

	N8 (mg/L)	M8 (mg/L)
KNO <sub>3</sub>	1000	3000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	740	740
NaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	260	260
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	13	13
Fe EDTA	10	10
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	—	130
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50	400
A5	1ml	1ml

[0050] 培养 14 天 (培养条件如上段所述), MRA-1 藻株在 M8 培养基中有最高的生物产量, 达到 8.16g/L; 在 BG-11 中有最高的油脂含量和产量, 分别为 45.3% 和 1.83g/L (图 1a 和图 1b)。获得较高生物量的培养基有 M8、P、P-Mg 和 P-Mg-Fe, 它们的特点是氮或 / 和磷源的浓度较高, 说明氮或 / 和磷源浓度的适当提高 (比如氮的浓度从 9.9mM 提高到 29.7mM, 磷的浓度从 0.17mM 提高到 7.1mM), 有利于微藻生物质的获得。

[0051] 生物质的产量通过测定收获得到的藻细胞的干重获得, 方法为: 收获藻液, 5000rpm 离心 10 分钟获得藻泥, 使用冷冻干燥机 (Alpha1-2LD plus, 德国 Martin Christ, 温度 -55℃) 将藻泥冻干 24 小时得到干燥粉。在微量天平上称重, 并根据收获藻液的体积



计算生物质产量。

[0052] 油脂含量的测定通过重量分析法获得,具体操作为:配置氯仿-甲醇(2:1, v:v)混合液,每50mg藻粉添加6ml的氯仿-甲醇混合液与玻璃管中(配四氟乙烯塞子),在30℃下180rpm振荡过夜,2500rpm离心10分钟后取上清液于新的玻璃管中,并添加适量的甲醇和水,使氯仿、甲醇、水的体积比为10:10:9,振荡混匀后,经2500rpm离心10分钟后取下层氯仿层于新的玻璃管中,并采用通氮气的方法使氯仿挥发干,残留的油脂经冷冻干燥24小时后称重分析。(Bligh EG,Dyer WJ.A rapid method of total lipid extraction and purification.Can J Biochem Physiol 1959 ;377 :911-7.)

[0053] 实施例2. MRA-1在多个温度下的生长

[0054] 将MRA-1藻株接种到新鲜的BG-11培养基中,接种后培养液的OD750为0.2左右,分装至多个三角瓶,分别置于15、19、22、25、28、30、34和37℃8个温度的光照培养箱中,光照强度为 $100\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,每天摇动一次。每2天测定培养液的OD750,MRA-1在22-28℃下生长最好,15-34℃均能生长;37℃下不能生长。结果如图2所示。

[0055] 实施例3. MRA-1藻株在不同氮源浓度下的生长和油脂积累

[0056] 采用柱式培养器,在BG-11培养基中,25℃,在 $200\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照条件,5% CO<sub>2</sub>(v/v,下同)浓度的空气培养条件下,设置0.375、1.5、2.5、5和10g/L的硝酸钠浓度,1.5至5g/L的硝酸钠浓度下,MRA-1藻株均有较好的生长,过高的硝酸钠浓度(10g/L),MRA-1的生长受到一定的抑制。在0.375g/L的硝酸钠浓度下培养时,获得最高的油脂含量达到52%,其中中性脂的含量占到总脂的90%以上,其他浓度硝酸钠培养获得的油脂含量为28%至34%之间;而最高的14天油脂产量是在0.375g/L的硝酸钠浓度下获得的,为1.87g/L;最低的油脂为0.96g/L,是在10g/L的硝酸钠浓度下获得的。结果如图3a和图3b所示。

[0057] 将在0.375g/L的硝酸钠浓度下获得的油脂经过硅胶柱层析(使用100目左右的硅胶作为填料)分离出中性脂成份(主要为甘油三酯),使用气相色谱(7890A,Agilent)-质谱(5975C,Agilent)技术分析脂肪酸的组成,发现主要为18碳酸和16碳酸,最多的油酸占到脂肪酸总量的57%。结果如图5a,图5b所示。

[0058] 中性脂的分离方法为:在22mm直径层析柱中依次添加氯仿、无水硫酸钠、100目左右的硅胶(含水量6%)和无水硫酸钠,添加时需保持氯仿液面一直在无水硫酸钠、硅胶的上方,无水硫酸钠的厚度需达到20-30mm,硅胶添加前要使10g的硅胶与50ml的氯仿混匀,然后轻轻倒入层析柱,避免气泡的产生。硅胶柱制作好后,将溶解在2ml氯仿中的油脂样品滴加到上层硫酸钠,用100ml的氯仿洗脱得到含中性脂的洗脱液。将洗脱液旋蒸至体积为2-6ml,将其移入玻璃管,通氮气使残留的氯仿挥发掉。冷冻干燥中性脂样品24小时,微量天平称重分析获得中性脂的含量。

[0059] 气相色谱-质谱联用分析条件:采用HP-Innowax Polyethylene Glycol column(30m×250μm×0.25μm)柱,载气为氮气,进样口温度为250℃,初始温度为25℃,以25℃/分钟的速率升高到200℃,再以3℃/分钟的速率增高到230℃,保持230℃恒定11分钟,脂肪酸的组成以各自占脂肪酸总脂的百分比的形式表示。

[0060] 实施例4. MRA-1藻株在不同CO<sub>2</sub>浓度下的生长和油脂积累

[0061] 采用柱式培养器,在BG-11培养基中,25℃,在 $200\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照条件

下,考察了 5%、10%、20%和 30% (体积比) 的  $\text{CO}_2$  含量的空气混合气对微藻生长和产油的影响。30% 的  $\text{CO}_2$  浓度下, MRA-1 的生长受到了明显的抑制。低浓度的  $\text{CO}_2$  浓度有利于 MRA-1 的生长, 5% 的  $\text{CO}_2$  浓度下, MRA-1 的油脂含量为 33.5%, 14 天油脂产量为 1.51g/L; 相对于 5% 和 10% 的  $\text{CO}_2$  浓度, 20% 的  $\text{CO}_2$  浓度获得了较低的油脂含量和产量, 分别为 24.7% 和 0.79g/L。结果如图 4a 和图 4b 所示。

[0062] 实施例 5. MRA-1 藻株中色素的提取测定

[0063] 将 MRA-1 接种到 BG-11 培养基中, 其中  $\text{NaNO}_3$  的浓度为  $0.375\text{g L}^{-1}$ , 接种密度调至 OD750 为 0.2, 在  $220\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  条件下, 通含 3% 的  $\text{CO}_2$  的空气培养, 培养容器为直径为 42mm 的柱式培养器。色素在接种后 4 天内有较高的含量。随后色素总量有一定的下降, 叶绿素 a 的下降幅度较大 (图 6)。

[0064] 叶绿素的提取即测定方法为: 收集 2ml 的藻液 (OD750 为 1 左右), 3000rpm, 离心 10 分钟; 添加 5ml 的 95% 乙醇, 黑暗中静置提取 12 小时; 3000rpm, 离心 10 分钟后取上清; 测定上清在 665, 649, 470nm 处的吸光值。根据如下公式计算各个色素的含量 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (参考文献: Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extract in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 603, 591-592) :

[0065]  $\text{Ca} = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$

[0066]  $\text{Cb} = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$

[0067]  $\text{Cchl} = \text{Ca} + \text{Cb}$

[0068]  $\text{Ccar} = (1000A_{470} - 2.05\text{Ca} - 114.8\text{Cb}) / 245$

[0069] Ca, Cb, Cchl 和 Ccar 分别表示叶绿素 a, 叶绿素 b, 叶绿素总量和类胡萝卜素的含量 ( $\text{mg L}^{-1}$ )。

[0070] 实施例 6. MRA-1 藻株中蛋白质的提取测定

[0071] 将 MRA-1 接种到 BG-11 培养基中, 其中  $\text{NaNO}_3$  的浓度为  $0.375\text{g L}^{-1}$ , 接种密度调至 OD750 为 0.2, 在  $220\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  条件下, 通含 3% 的  $\text{CO}_2$  的空气培养, 培养容器为直径为 42mm 的柱式培养器。6 天和 12 天时的蛋白含量分别为 11.1% 和 9.6%。

[0072] 微藻蛋白提取及测定步骤:

[0073] 1. 取 1ml 藻液, 离心, 10000rpm, 2min

[0074] 2. 弃上清, 枪尖吸掉离心管内壁残留水珠

[0075] 3. 加 0.5N 的 NaOH 溶液 1ml

[0076] 4. 煮沸 10min

[0077] 5. 冰浴冷却, 离心, 10000rpm, 2min

[0078] 6. 按照贝博生物生物试剂公司 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明, 在 96 孔板中添加待测样品和反应试剂,  $30^\circ\text{C}$  温浴 30 分钟。

[0079] 7. 多功能酶标仪 (Synergy HT, 美国 BioTek) 测定 562nm 吸光值

[0080] 8. 制作标准曲线, 并计算样品的蛋白含量 (根据藻液中细胞干重, 可以计算蛋白的百分含量)。

[0001]

SEQUENCE LISTING  
IB110834 序列表

&lt;110&gt; 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

&lt;120&gt; 一株小球藻及其培养方法和应用

&lt;130&gt; IB110834

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1839

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Chlorella sp. MRA-1

<400> 1  
tgattacgcc agcttgcattg cctgcaggtc gacgattcac ctacggaaac cttgttacga 60  
cttctccttc ctctaggtgg gagggtttaa tgaacttctc ggccggccgag agcggagacc 120  
gccccaggtc gccaatccga acatttcacc agcacacca atcggtagga gcgacgggag 180  
gtgtgtacaa agggcaggga cgtaataaac gcaagctgat gacttgcgct tactaggcat 240  
tcctcgttga agattaataa ttgaataat ctatcccat cagatgcag ttctgaagat 300  
taccggggcc tctcgccaa ggctaggctc gttgaatgca tcagtgtagc gcgctgagg 360  
cccagaacat ctaaggcat cacagacctg ttattgcctc atgcttccat tggctagtcg 420  
ccaatagtcc ctctaagaag tccgcggct ggccaacaa ccgtgactat ttagcaggct 480  
gaggctcgt tcgttaccgg aatcaacctg acaaggcaac ccaccaacta agaacggcca 540  
tgcaccacca cccatagaat caagaagag ctctcaatct gtcaatctc actatgtctg 600  
gacctggtaa gttttccgt gttgagtc aaataagccg aggcctccag cctggtggtg 660  
cccttcgctc aatttcctta agtttcagcc ttgcgacct actcccccg gaacccaaaa 720  
actttgattt ctcataaggt gccggcggag tcatcgaaga aacatccgcc gatccctagt 780  
cggcategtt tatggttag actaggacgg tatctaactg tcttcgagcc cccaacttc 840  
gttcttgatt aatgaaaaca tcttgccaa atgctttcgc agtagttcgt ctttcataaa 900  
tccaagaatt tcacctctga caatgaaata cgaatgcccc cgactgtccc tcttaatcat 960  
tactccgctc ctacagacca acagatagg ccagagtcct atcgtgttat tccatgctaa 1020  
tgtattcaga gcgtaggcct gctttgaaca ctctaattta ctcaaagtaa cagcgcggac 1080  
tccgagtcgc ggacagtga gcccaggagc ccgtccccgg caacaagggtg agccctgcca 1140  
gtgcacaccg aaacggcgga ccggcaggct ccacccgaaa tccaactacg agctttttaa 1200  
ctgcagcaac ttaaatatac gctattggag ctggaattac cggcgctgct ggcaccagac 1260  
ttgccctcca attgatctc gtttaagggt ttagattgta ctcatccaa ttaccagacc 1320

[0002]

## IB110834 序列表

tgaaaaggcc cagtattgtt atttattgtc actacctccc tgtgtcagga ttgggtaatt	1380
tgcgcgcctg ctgccttcct tggatgtggg agccgtttct caggctccct ctccggaatc	1440
gaaccctaata cctccgtcac ccgttaccac catggtaggc ctctatccta ccatcaaaag	1500
ttgatagggc agaaatttga atgaaacatc gccggcaciaa ggccatgcga ttcgtgaagt	1560
tatcatgatt caccgcgagt cgggcagaag cccggtcggc cttttatcta ataaatacgt	1620
cccttcaga agtcgggatt tacgcacgta ttagctctag atttactacg ggtatccgag	1680
tagtaagtac catcaataaa actataactg atttaatgag ccattcgcag ttccacagta	1740
taaagcagtt tatacttaga catgcatggc ttaatctttg acaagcaatc tctagaggat	1800
ccccgggtac cgagctcgaa tcaatgccgt cgtatccta	1839

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 725

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Chlorella sp. MRA-1

&lt;400&gt; 2

tttggttaacc actcgtcccc ctgcctcgat gtcgccctct cttaggagag tgcgatcgg	60
cgagcgtcgg tccccggct gtggctcccc cgagctgttg ctcaggctccg gcgggcgtcc	120
cttcacatgt gggaccctt ctttttgagg ggacactccc ctttgagga tccgacgtcg	180
gaaattccaa ctcaactcaa cccaccccaa actgaaactt attctaaagc accttgttgt	240
tggcagctcg tctgccgtcc actccaaacc aaatacaact ctcaacaacg gatatcttgg	300
ctcccgatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgatacgta gtgtgaattg cagaattccg	360
tgaaccatcg aatctttgaa cgcaacttgc gcctgaggct tcggccaaag gcatgtctgc	420
ctcagcgtcg gctcaccccc tcgcctcccc atctcctttg attgggaagg cggatctgac	480
cttcccgtt ccgccgtca ctctgtattg gcgccgggtc ggttgaagct cagaggtatg	540
agcatggacc ccgttcgcag ggtaatggct tggtaggtag gcattcccta cgcacctgc	600
cgttgcccga ggggactttg ctggagacct agcaggaatt cggatgcttg ggcaccccc	660
gacaccgaaa ctcttcattt cgacctgagc tcaggcaaga ctacccgtg aacttaagcc	720
atata	725

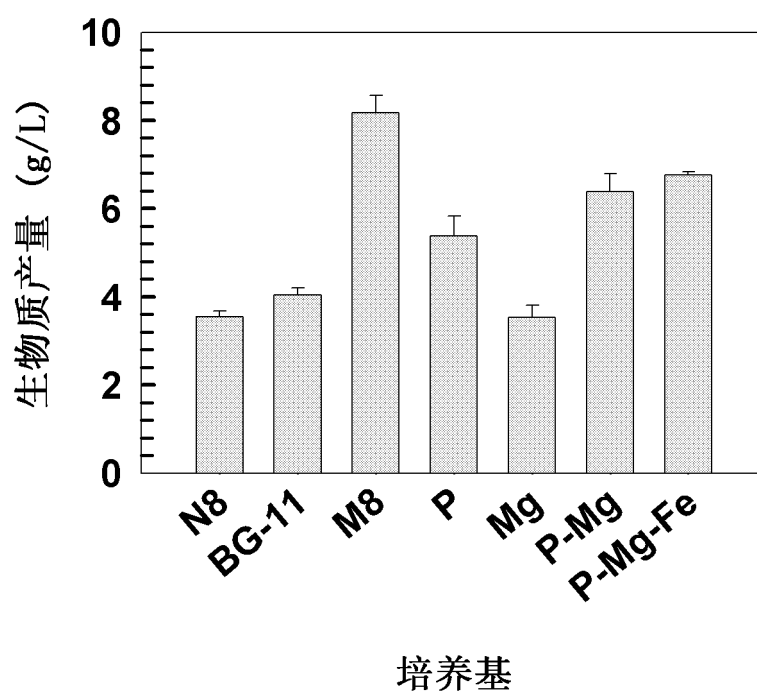


图 1a

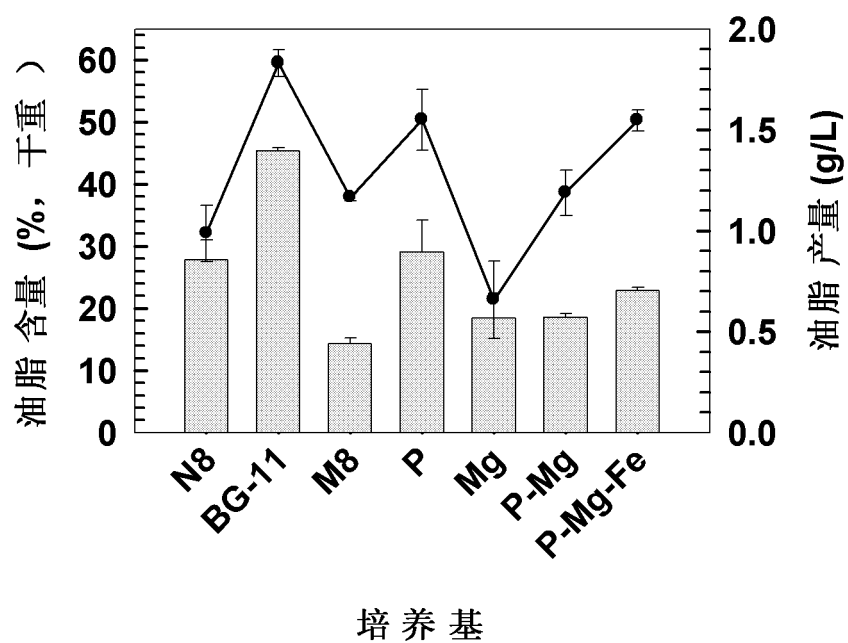


图 1b

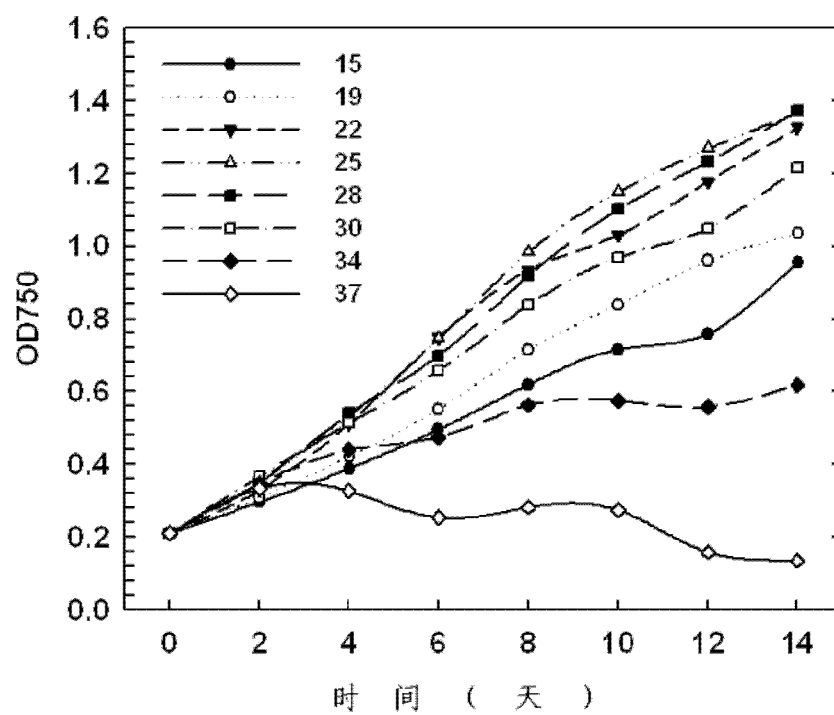


图 2

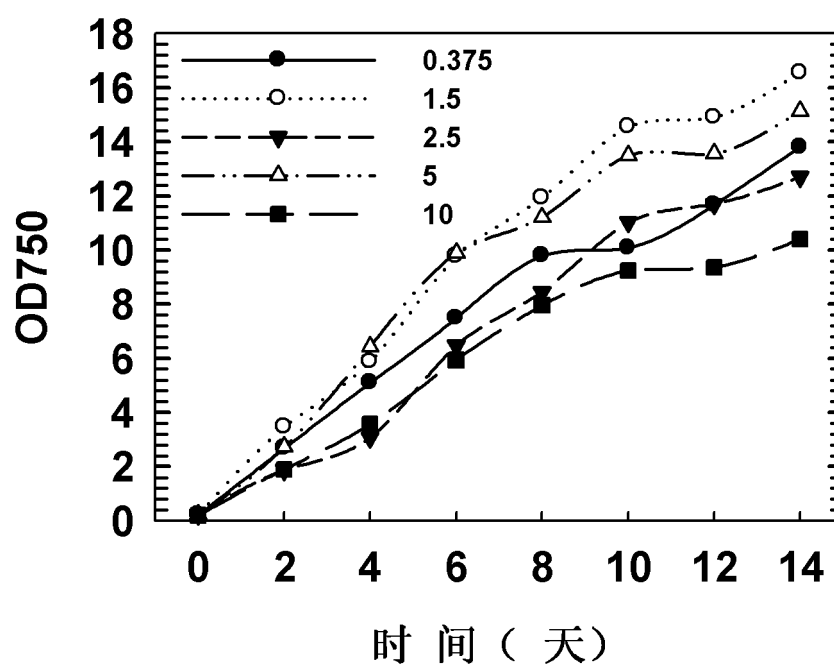


图 3a

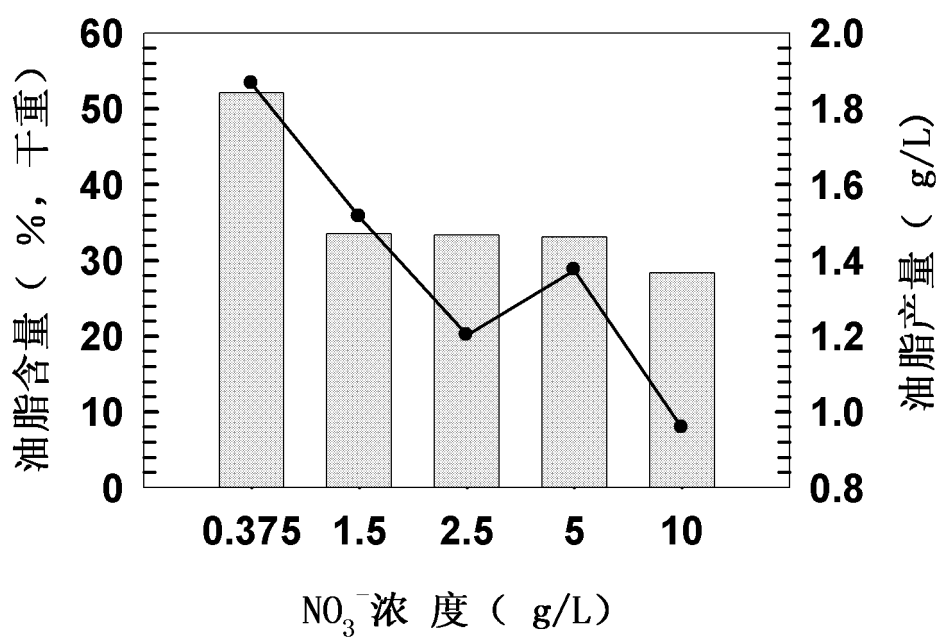


图 3b

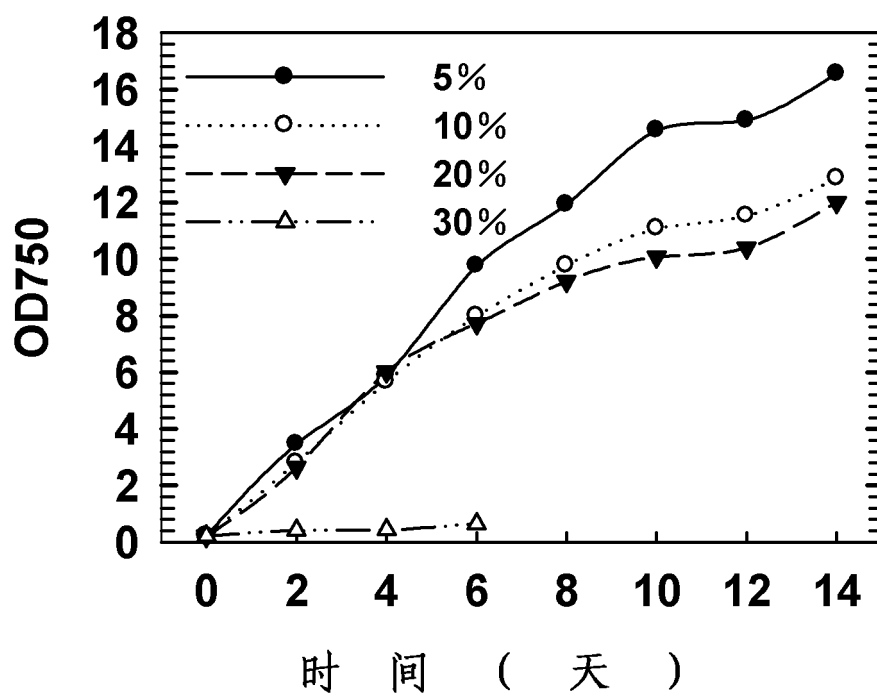


图 4a

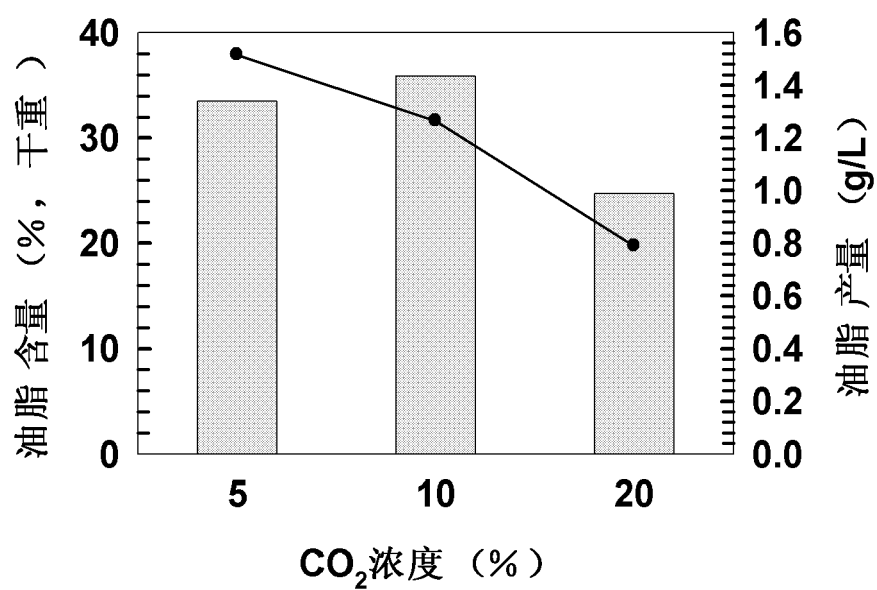


图 4b

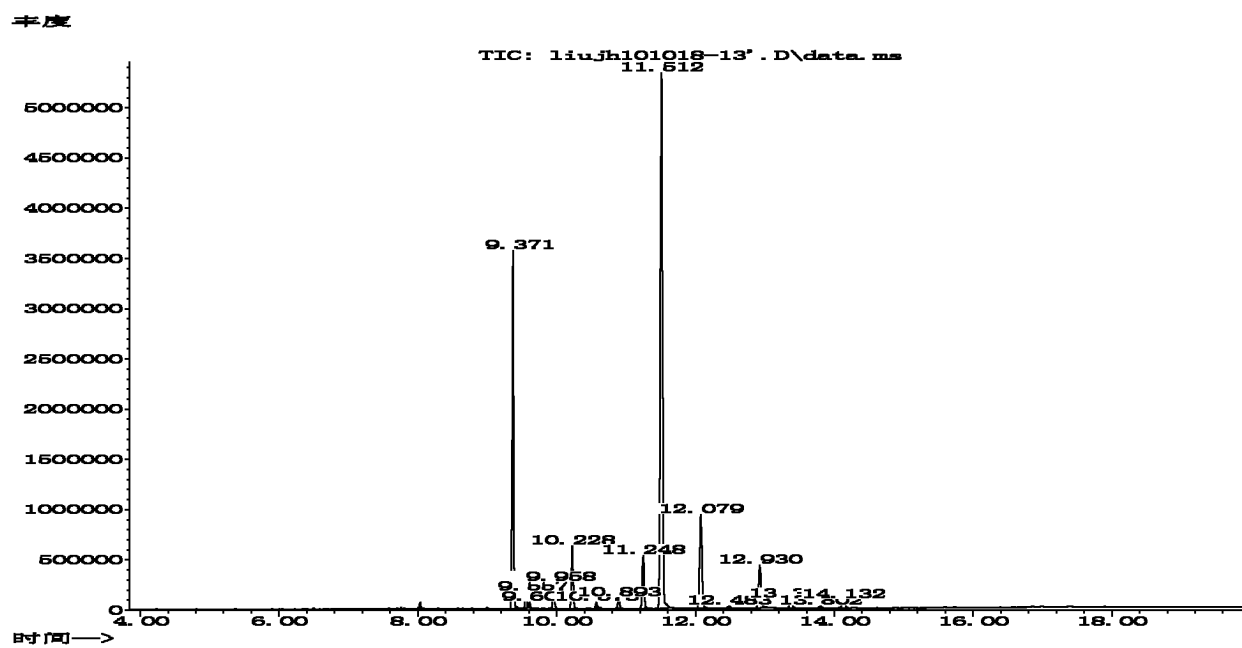


图 5a



脂肪酸组分	MRA-1
C16:0	13.43%
C16:1	1.00%
C16:2	1.62%
C16:3	5.75%
C18:0	2.55%
C18:1	57.33%
C18:2	6.94%
C18:3	9.14%

图 5b

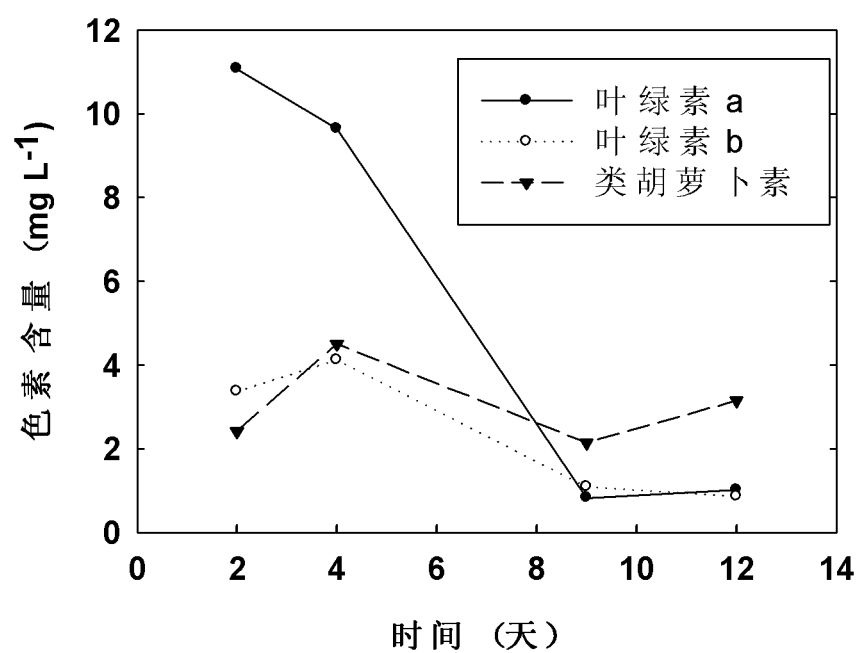


图 6

SEQ ID NO:1

TGATTACGCCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTACCTACGG  
AAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTCTAGGTGGGAGGGTTTAATGA  
ACTTCTCGGCGGCCGAGAGCGGAGACCGCCCCAGGTGCGCAATCCG  
AACACTTCACCAGCACACCCAATCGGTAGGAGCGACGGGCGGTGTG  
TACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCGCTT  
ACTAGGCATTCTCGTTGAAGATTAATAATTGCAATAATCTATCCCC  
ATCACGATGCAGTTTCGAAGATTACCCGGGCCTCTCGGCCAAGGCT  
AGGCTCGTTGAATGCATCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCCAGAACAT  
CTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCATGCTTCCATTGGCTAG  
TCGCCAATAGTCCCTCTAAGAAGTCCGCCGGCTGGCGAACCAACCG  
TGACTATTTAGCAGGCTGAGGTCTCGTTTCGTTACCGGAATCAACCTG  
ACAAGGCAACCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATA  
GAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTCACTATGTCTGGA  
CCTGGTAAGTTTTCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCAC  
GCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCGA  
CCATACTCCCCCGGAACCCAAAACTTTGATTTCTCATAAGGTGCC  
GGCGGAGTCATCGAAGAAACATCCGCCGATCCCTAGTCGGCATCGT  
TTATGGTTGAGACTAGGACGGTATCTAATCGTCTTCGAGCCCCCAAC  
TTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAAATGCTTTCGCAGT  
AGTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTCACCTCTGACAATGAAATA  
CGAATGCCCCCGACTGTCCCTCTTAATCATTACTCCGGTCTTACAGA  
CCAACAGGATAGGCCAGAGTCCTATCGTGTTATTCCATGCTAATGT  
ATTCAGAGCGTAGGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTACTCAAAGTAA  
CAGCGCCGACTCCGAGTCCCGGACAGTGAAGCCCAGGAGCCCGTCC  
CCGGCAACAAGGTGAGCCCTGCCAGTGCACACCGAAACGGCGGAC  
CGGCAGGTCCCACCCGAAATCCAACACTACGAGCTTTTTAACTGCAGC  
AACTTAAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGC  
ACCAGACTTGCCCTCCAATTGATCCTCGTTAAGGGGTTTAGATTGTA  
CTCATTCCAATTACCAGACCTGAAAAGGCCCAGTATTGTTATTTATT  
GTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAAATTTGCGCGCCTGCTGC  
CTTCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCG  
AACCCTAATCCTCCGTCACCCGTTACCACCATGGTAGGCCTCTATCC  
TACCATCAAAAGTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAAACATCGCCG  
GCACAAGGCCATGCGATTCTGTGAAGTTATCATGATTCACCGCGAGT  
CGGGCAGAAGCCCGGTGCGCCTTTTATCTAATAAATACGTCCCTTCC  
AGAAGTCGGGATTTACGCACGTATTAGCTCTAGATTTACTACGGGT  
ATCCGAGTAGTAAGTACCATCAAATAAACTATAACTGATTTAATGA  
GCCATTCGCAGTTTCACAGTATAAAGCAGTTTATACTTAGACATGCA  
TGGCTTAATCTTTGACAAGCAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCG  
AGCTCGAATCACTGCCGTCGTATCCTA

图 7

SEQ ID NO:2

TTTGTAACCACTCGTCCCCCTCGTCCGATGTCGCCCTCTCTTAGGAG  
AGTGCGATGCGGCGAGCGTCGGTCCCCTGGCTGTGGCTCCCCCGAG  
CTGTTGCTCAGGTCCGGCGGGCGTCCCTTCACATGTGGGACCCCTTC  
TTTTTGAGGGGACACTCCCCTTTGGAGGATCCGACGTCGGAAATTCC  
AACTCAACTCAACCCACCCCAAACCTGAAACTTATTCTAAAGCACCTT  
GTGGTTGGCAGCTCGTCTGCCGTCCACTCCAAACCAAATACAACCTCT  
CAACAACGGATATCTTGGCTCCCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAACCATCGAATCTTT  
GAACGCAACTTGCGCCTGAGGCTTCGGCCAAAGGCATGTCTGCCTC  
AGCGTCGGCTCACCCCTCGCCTCCCCATCTCCTTTGATTGGGAAGG  
CGGATCTGACCTTCCCGGTTCCGCCGGTCACTCGTGATTGGCGCCGG  
GTCGGTTGAAGCTCAGAGGTATGAGCATGGACCCCGTTCGCAGGGT  
AATGGCTTGGTAGGTAGGCATTCCCTACGCATCCTGCCGTTGCCCCGA  
GGGGACTTTGCTGGAGACCTAGCAGGAATTCGGATGCTTGGGCACC  
CCCCGACACCGAAACTCTTCATTTGACCTGAGCTCAGGCAAGACTA  
CCCGCTGAACTTAAGCCATATA

图 8