

一种能够无光照异养生长小球藻的培养方法

申请号：[200510086288.X](#)

申请日：2005-08-25

申请(专利权)人 [北京科技大学](#)
地址 [100083北京市海淀区学院路30号](#)
发明(设计)人 [闫海](#) [王素琴](#) [张宾](#) [李迎霞](#) [吕乐](#)
主分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)
分类号 [C12N1/12\(2006.01\)I](#)
公开(公告)号 [1766082](#)
公开(公告)日 [2006-05-03](#)
专利代理机构 [北京科大华谊专利代理事务所](#)
代理人 [刘月娥](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086288.X

[43] 公开日 2006 年 5 月 3 日

[11] 公开号 CN 1766082A

[22] 申请日 2005.8.25

[21] 申请号 200510086288.X

[71] 申请人 北京科技大学

地址 100083 北京市海淀区学院路 30 号

[72] 发明人 闫海 王素琴 张宾 李迎霞
吕乐

[74] 专利代理机构 北京科大华谊专利代理事务所

代理人 刘月娥

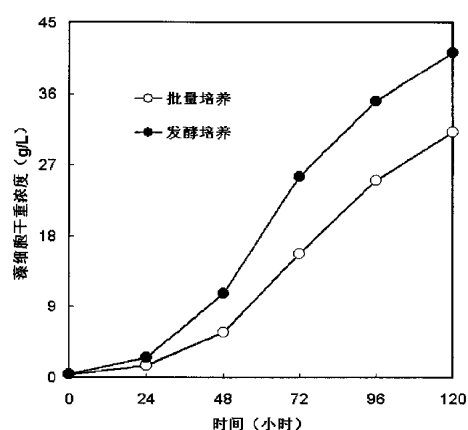
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种能够无光照异养生长小球藻的培养方法

[57] 摘要

本发明提供了一种能够无光照异养生长的小球藻藻种及培养方法,属于生物技术领域。采用无光照异养批量和发酵培养方法,可以在 3~6 天时间内培养出小球藻 - USTB01 cgmcc No1448,保藏日期:2005 年 8 月 25 日,细胞干重浓度达到 20~50g/L 的小球藻培养物。本发明的优点在于:将培养出的小球藻 - USTB01 细胞经过离心、干燥和压片后可以作为人类健康食品或医药品。



1、一种能够无光照异养生长小球藻种的筛选和无光照异养培养的方法,其特征在于:
具体工艺为:

a、小球藻筛选和培养用培养基:小球藻培养基(1000 ml 去离子水中) 组成:葡萄糖 10.0~80 g, 尿素 1.0~5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5~2.0 g, KH_2PO_4 0.1~1.0 g, K_2HPO_4 2.0~10.0 g, NaCl 0.1~5.0 g, CaCl_2 10.0~50.0 mg, FeSO_4 1.0~10.0 mg, ZnCl_2 1.0~10.0 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 mg, CuCl_2 0.1~1.0 mg; 此配制的培养基初始 pH 为 7.0~8.0, 将配制好的液体培养基放入三角瓶, 将瓶口用脱脂棉封闭后在 120~130℃ 高温、0.10~0.18 MPa 高压下进行灭菌 10~30 分钟, 然后在洁净工作台内紫外线照射灭菌 10~30 分钟, 待温度降低到 20~35℃ 后使用;

b、异养小球藻种的筛选: 在液体培养基中加入 1.0~2.0% (重量/体积) 的琼脂, 经过 120~130℃ 高温、0.10~0.18 MPa 高压下进行灭菌后倒入到培养皿中冷却, 制备出小球藻的对应固体培养基平板; 取采自于天然水体含有绿藻的水样, 经离心机离心后倒去上清液, 用灭菌后的液体培养基悬浮沉淀于离心管底部的藻细胞, 然后再经过离心机离心后倒去上清液; 重复 3~5 次后, 用液体培养基将沉于离心管底部的藻细胞悬浮, 吸取藻细胞悬浮液加入到培养皿上的固体培养基上, 涂抹均匀后放在温度 20~35℃ 无光照条件下培养; 培养 5~10 天后, 在固体培养基表面可以观察到长出的绿色单克隆藻菌落, 用接种针调取单克隆藻菌落重新接种于液体培养基中, 再次进行涂平板筛选绿色藻单克隆菌落; 采用这种方法, 经多次重复后, 筛选出了一株能够异养生长的小球藻种-USTB01, 其液体培养物绿色, 细胞直径在 3-10 微米;

c、小球藻的无光照异养培养: 在无菌条件下, 接种小球藻培养物于装在三角瓶内的灭菌后液体培养基中进行无光照异养批量培养, 其条件是: 振荡转速 100~300 转/分, 温度 20-35℃; 连续培养 3~6 天后获得较高的藻生物量, 藻细胞干重浓度达到 20-35 g/L;

d、小球藻的无光照异养发酵培养: 将液体培养基加入到发酵罐中, 经 120~130℃ 的高温灭菌并冷却后, 接种藻培养物后进行发酵培养; 培养条件是搅拌转速 200~800 转/分, 通空气供给氧气, 通过全自动流加 NaOH 或 HCl 溶液, 使 pH 控制在 6.0~9.0 之间, 温度通过恒温循环水保持在 20~35℃; 实验开始第 1 天以后, 每天通过蠕动泵流加灭菌后的葡萄糖溶液, 培养 3~6 天获得小球藻细胞干重浓度达到 30~50 g/L 的小球藻培养物。

一种能够无光照异养生长小球藻的培养方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，特别是提供了一种能够无光照异养生长的小球藻-USTB01 (*Chlorella*-USTB01) (cgmcc N.1448, 保藏日期: 2005 年 8 月 25 日, 保藏单位: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心) 及培养方法。采用无光照异养批量或发酵培养, 在 3~6 天时间内可以培养出藻细胞干重浓度达到 20~50 g/L 的小球藻培养物。收获小球藻细胞并加工处理后, 可以作为一种人类健康食品。

背景技术

小球藻属有大约 10 种小球藻, 都富含蛋白质、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、维生素和藻因子等多种重要生命活性物质, 具有极高的营养价值和提高免疫力的功能, 已被列为二十一世纪人类的健康食品。随着人们生活水平的日益提高, 对小球藻的需求会越来越大。

一般认为小球藻属于低等植物, 主要吸收无机碳通过光合作用合成有机物。但采用光照自养培养方法, 当藻细胞浓度增加到一定数量后, 必然阻挡光线进入培养物内, 使培养出的藻细胞浓度很低。但进入二十世纪七十年代以来, 国外学者发现, 有些小球藻可以在无光照条件下生长于有机物, 不仅大幅度提高了小球藻的生长速度, 而且获得了很大的藻生物量, 从而引起了单细胞藻类培养的一次重要革命。虽然国外和我国香港学者在利用异养培养小球藻生产叶黄素方面进行了大量的研究, 但因为真正能够异养快速生长的小球藻种类非常稀少, 我国大陆目前研究使用的异养小球藻种全部由国外或我国香港引进。因此有必要在大陆依据我们的实验条件和研究能力, 筛选出具有我国自主知识产权能够异养生长的小球藻种并研究确定异养培养超高细胞浓度小球藻的方法。在此研究领域我们经过艰苦的努力与探索, 终于成功筛选出了一株能够无光照异养生长并可以培养到很高细胞浓度的小球藻种-USTB01 (cgmcc N.1448, 保藏日期: 2005 年 8 月 25 日), 在异养批量和发酵培养条件下, 在 120 小时内可以培养获得藻细胞干重浓度分别达到了 20-35 g/L 和 30-50 g/L 的水平, 具有重要的应用前景和开发价值。

据我们研究发现, 此筛选出的小球藻-USTB01 既可以采用光照自养培养, 也可以采用无光照异养培养。在无光照摇床批量培养时, 120 小时获得了藻细胞干重浓度为 20—35 g/L 的藻生物量。在 50 升发酵罐流加碳源培养时, 120 小时培养出了藻细胞干重浓度为 30—50 g/L 的小球藻发酵液。应用我们筛选出的小球藻种-USTB01 和培养控制方法, 能够培养出大量的小球藻细胞, 经过收获藻细胞、干燥和压片等工艺, 可以生产出人类健康食品。

发明内容

本发明的目的在于筛选出能够异养生长小球藻种, 并确定获得超高细胞浓度小球藻的优化培养控制条件, 使培养出的藻细胞干重浓度达到了 20—50 g/L, 以解决小球藻很

难培养出超高细胞浓度的问题, 实现超高细胞浓度小球藻培养的产业化生产。

本发明实验所用藻种为一株我们自己筛选的能够无光照异养生长的小球藻-USTB01 (*Chlorella* sp), cgmcc N.1448, 保藏日期: 2005 年 8 月 25 日。

在筛选异养生长小球藻的研究工作中, 我们从含有绿藻的天然水体中筛选出了能够在无光照条件下生长于乙酸钠或葡萄糖的异养小球藻种-USTB01 (*Chlorella* sp), cgmcc N.1448, 保藏日期: 2005 年 8 月 25 日。经在放大 1600 倍下的显微镜观察, 发现此筛选藻种细胞圆形, 具有小球藻特有的杯状色素体, 细胞直径在 3—10 微米范围。具体工艺为:

1、小球藻筛选和培养用培养基: 其组成如下(1000 ml 去离子水中): 葡萄糖 10.0~80 g, 尿素 1.0~5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5~2.0 g, KH_2PO_4 0.1~1.0 g, K_2HPO_4 2.0~10.0 g, NaCl 0.1~5.0 g, CaCl_2 10.0~50.0 mg, FeSO_4 1.0~10.0 mg, ZnCl_2 1.0~10.0 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 mg, CuCl_2 0.1~1.0 mg。此配制的培养基初始 pH 为 7.0~8.0。将配制好的液体培养基放入三角瓶, 将瓶口用脱脂棉封闭后在高温(120~130℃)高压(0.10~0.18 MPa)下灭菌 10~30 分钟, 然后在洁净工作台内紫外线照射灭菌 10~30 分钟后使用。

2、异养小球藻种的筛选: 在液体培养基中加入 1.0~2.0% (重量/体积) 的琼脂, 经过高温(120~130℃)高压(0.10~0.18 MPa)溶解后倒入到培养皿中冷却, 可以制备出小球藻的对应固体培养基平板。取采自于天然水体含有绿藻的水样, 经离心机离心后倒去上清液, 用灭菌后的液体培养基振荡悬浮保留在离心管底部的藻细胞, 然后再经过离心后倒去上清液。重复 3~5 次清洗离心藻细胞后, 用液体培养基将沉于离心管底部的藻细胞悬浮, 吸取藻细胞悬浮液加入到培养皿上的固体培养基上, 涂抹均匀后放在温度 20~35℃无光照条件下的培养箱中培养。培养 5~10 天后, 可以在固体培养基表面观察到长出的绿色单克隆藻菌落, 用接种针调取单克隆藻菌落重新接种于液体培养基中, 再次进行涂平板筛选绿色藻单克隆菌落。采用这种方法, 经多次重复后, 我们终于筛选出了一株能够异养生长的小球藻种-USTB01, 其液体培养物绿色。经在放大 1600 倍下的显微镜观察, 发现此筛选藻种细胞圆形, 具有小球藻特有的杯状色素体, 细胞直径在 3-10 微米。

3、小球藻的无光照异养批量培养: 在洁净工作台内, 接种小球藻培养物于装在三角瓶内已灭菌的液体培养基中后进行无光照异养批量培养, 其培养条件是: 振荡转速 100~300 转/分, 温度 20-35℃; 连续培养 3~6 天获得较高的藻生物量, 藻细胞干重浓度达到 20-35 g/L。

4、小球藻的无光照异养发酵培养: 将液体培养基加入到发酵罐中, 经 120~130℃的高温灭菌并冷却后, 接种小球藻培养物后进行发酵培养; 培养条件是搅拌转速 200~800 转/分, 通空气供给氧气, 通过全自动流加 NaOH 或 HCl 溶液, 使 pH 控制在 6.0~

9.0 之间, 温度通过恒温循环水保持在 20~35℃; 培养 1 天以后, 每天通过蠕动泵流加灭菌后的葡萄糖溶液, 培养 3~6 天获得小球藻细胞干重浓度达到 30~50 g/L 的小球藻培养物。经进一步采用大型发酵罐培养后, 可以进行异养小球藻的产业化生产。

5、小球藻人类健康食品的生产: 采用无光照异养批量或发酵培养小球藻的方式, 可以获得大量的小球藻细胞。通过离心收获藻细胞、干燥藻细胞和小球藻干粉压片等工艺, 可以生产出作为人类健康食品的小球藻片。

本发明采用异养无光照批量培养条件, 120 小时可以使藻细胞干重浓度达到 31.2 g/L (图 1), 远远高于国外引进藻种批量培养获得小球藻细胞干重浓度为 10 g/L 左右的水平。采用 50 升发酵罐通过流加葡萄糖进行异养发酵培养, 在 120 小时可以培养获得藻细胞干重浓度达到 41.2 g/L 的小球藻发酵液(图 1)。

本发明的优点在于: 采用异养批量或发酵培养筛选的小球藻-USTB01, 可以在 120 小时使培养出的藻细胞干重浓度达到 20-50 g/L, 整个培养过程完全在人为可控制的温度 and 无菌条件下进行, 解决了采用池塘培养小球藻细胞浓度低、容易受杂菌污染和受天气变化影响大的缺点。将培养出的小球藻细胞经过收获、干燥和压片后, 可以作为人类健康食品或医药品进行应用。

附图说明

图 1 为本发明采用无光照异养批量和发酵培养下, 小球藻-USTB01 的生长动力学过程。横坐标为培养时间小时, 纵坐标为小球藻培养物中的藻细胞干重浓度 g/L。

具体实施方式

1、异养小球藻筛选和培养的液体培养基: 其组成如下 (1000 ml 去离子水中): 葡萄糖 10.0 g, 尿素 3.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 4.0 g, NaCl 1.0 g, CaCl_2 20.0 mg, FeSO_4 5.0 mg, ZnCl_2 5.0 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg, CuCl_2 0.5 mg。此配制的培养基初始 pH 为 7.5 左右。用 500 毫升三角瓶加入配制好的液体培养基 100 毫升, 将瓶口用脱脂棉封闭后在高温 (124℃) 高压 (0.15 MPa) 下灭菌 10 分钟, 然后在洁净工作台内紫外线照射灭菌 20 分钟后使用。

2、异养小球藻种的筛选: 在液体培养基中加入 1.5% (重量/体积) 的琼脂, 经过高温高压溶解后倒入到培养皿中冷却, 可以制备出小球藻的对应固体培养基平板。取采自于清河含有绿藻的水样 100 ml, 经离心 (5000 转/分, 5 分钟) 后倒去上清液, 用 10 ml 灭菌的液体培养基振荡悬浮保留在离心管底部的藻细胞, 然后再经过离心 (5000 转/分, 5 分钟) 后倒去上清液。重复 3 次后, 用 5 ml 液体培养基将沉于离心管底部的藻细胞悬浮, 吸取 0.3 ml 藻细胞悬浮液加入到培养皿上的固体培养基上, 涂抹均匀后放入培养箱中在温度 30℃无光照条件下进行培养。培养 7 天后, 可以在固体培养基表面观察到长出的绿色单克隆藻菌落, 用接种针调取单克隆藻菌落后, 重新接种于液体培养基中, 再次进行涂平板筛选绿色藻单克隆菌落。采用这种方法, 我们终于筛选出了一株能够异养

生长的小球藻种-USTB01, 经在放大 1600 倍下的显微镜观察, 发现此筛选藻种细胞圆形, 具有小球藻特有的杯状色素体, 细胞直径在 3~10 微米。

3、小球藻的无光照异养批量培养: 小球藻液体培养基中葡萄糖浓度增加到 70 g/L, 其它化合物组成和用量相同。在洁净工作台内无菌条件下, 接种 1 ml 小球藻液于装在 100 ml 三角瓶内的 20 ml 液体培养基中, 在恒温旋转振荡培养箱中进行批量培养, 条件是: 转速 200 转/分, 温度 30℃。小球藻生长的动力学过程见图 1, 在 120 小时获得了 31.2 g/L 的藻细胞干重浓度。

4、小球藻的无光照异养发酵培养: 液体培养基中葡萄糖初始浓度增加到 20 g/L, 其它化合物组成和用量相同。采用 50 升发酵罐, 首先加入 20 升液体培养基, 经 124℃ 20 分钟灭菌并冷却后, 接种 1000 ml 小球藻液进行培养。培养条件是搅拌转速从开始时的 200 转/分逐渐增加到 800 转/分, 通空气量 20 升/分, 通过全自动流加 10%NaOH 或 10%HCl 使 pH 控制在 7.5-8.0 之间, 通过恒温循环水保持温度在 30℃。实验开始 24 小时后, 每 24 小时通过蠕动泵流加灭菌后 90%(重量/体积) 葡萄糖溶液 450 ml。图 1 显示了异养发酵培养小球藻生长的动力学过程, 培养 120 小时可获得小球藻细胞干重浓度达到 41.2 g/L 的小球藻发酵液。经进一步采用更大型发酵罐进行扩大培养后, 可以实现小球藻异养培养的产业化生产。

5、小球藻人类健康食品的生产: 采用无光照异养批量或发酵培养小球藻的方式, 可以获得大量的小球藻细胞。通过离心收获藻细胞、干燥藻细胞和小球藻干粉压片等工艺, 可以生产出作为人类健康食品的小球藻片。

综上所述, 本发明是在筛选出能够异养生长小球藻种的基础上, 利用无光照异养培养技术, 可以培养获得超高细胞浓度的小球藻, 在发展藻类生物技术和人类健康食品的生产方面都具有非常重要的意义和价值。

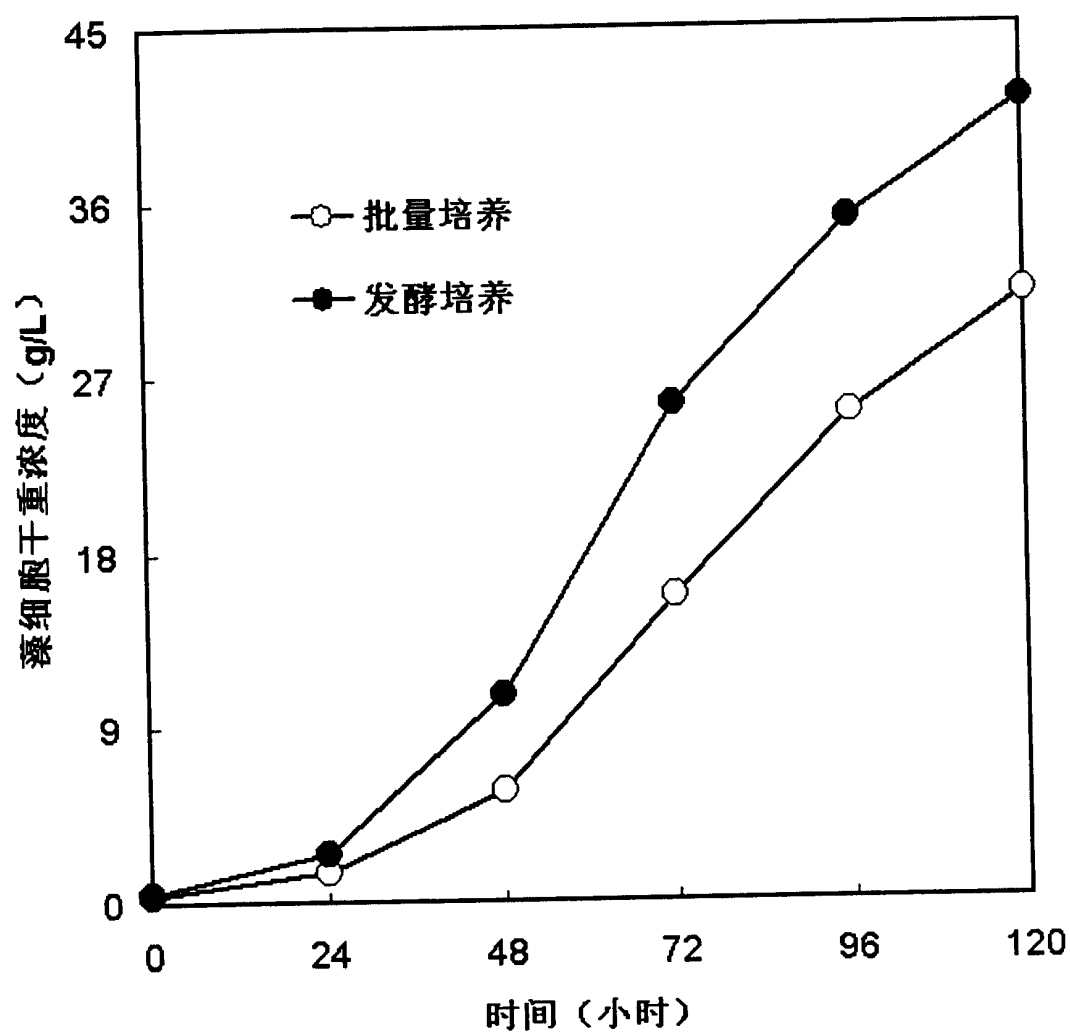


图 1