



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102943045 A

(43) 申请公布日 2013.02.27

(21) 申请号 201210388351.5

(22) 申请日 2012.10.12

(71) 申请人 广东省微生物研究所

地址 510070 广东省广州市先烈中路 100 号

(72) 发明人 陈爱美 施庆珊 冯劲 林万泉

黄小茉 欧阳友生 陈仪本

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限

公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006.01)

C12N 1/38(2006.01)

C12R 1/89(2006.01)

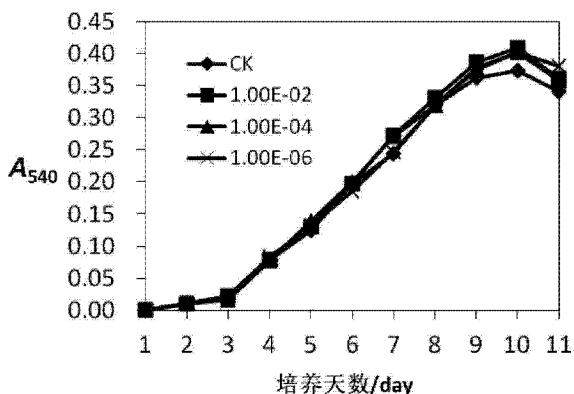
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

促进普通小球藻生长的培养基及用其培养小球藻的培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种促进普通小球藻生长的培养基及用其培养小球藻的培养方法。促进普通小球藻生长的培养基是在常规的 OECD 培养液中加入可溶性稀土化合物,稀土离子终浓度为 10⁻⁶~10⁻²mM。促进普通小球藻生长的培养方法是以所述的促进普通小球藻生长的培养基对小球藻进行培养。本发明通过在 OECD 藻类培养液中加入可溶性稀土化合物,如硝酸铈或氯化铈,用其培养普通小球藻,所培养的普通小球藻细胞到达稳定期时,每升培养液可获得细胞干物质 43~59mg,比未添加稀土化合物的 OECD 藻类培养液提高 34~69%,有效的提高了小球藻的产量,具有广阔的应用前景。



1. 一种促进普通小球藻生长的培养基,其特征在于,在常规的 OECD 培养液中加入可溶性稀土化合物,稀土离子终浓度为 $10^{-6}\sim 10^{-2}$ mM。

2. 根据权利要求 1 所述的促进普通小球藻生长的培养基,其特征在于,所述的稀土化合物为硝酸铈或氯化铈。

3. 一种促进普通小球藻生长的培养方法,其特征在于,以权利要求 1 或 2 所述的促进普通小球藻生长的培养基对小球藻进行培养。

4. 根据权利要求 3 所述的促进普通小球藻生长的培养方法,其特征在于,所述的培养方法具体为:将小球藻细胞接种到权利要求 1 或 2 所述的促进普通小球藻生长的培养基中,初始接种量为 $10^5\sim 10^6$ cells/mL,在温度 $23\sim 28^\circ\text{C}$,光照强度 $2200\sim 2800$ lux,光暗比 12h :12h,进行培养。

促进普通小球藻生长的培养基及用其培养小球藻的培养方法

技术领域：

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种促进普通小球藻生长的培养基及用其培养小球藻的培养方法。

背景技术：

[0002] 小球藻(*Chlorella*)作为一种重要的微藻资源，具有极其丰富的营养成分和优良的医疗保健作用。其蛋白质含量 50%–67%，其中含有人体所必需的 20 种氨基酸、多种维生素和微量元素，以及亚麻酸、亚油酸、胡萝卜素等成分。其中二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)，医学临床已经证明这两种成分具有多种重要的生理功能。其次，小球藻含有的多糖和蛋白质具有显著的抗瘤抗癌、增强免疫及抗病毒感染的活性。在水产养殖上，单细胞的小球藻可直接作为草食性鱼类和鱼苗的饵料，或者作为肉食性鱼类仔鱼开口期食用的丰年虫等动物的饵料。此外，小球藻在其生长时能消耗掉污水水体中的部分氮、磷，从而达到改善水质的目的，具有很高的经济价值。

[0003] 目前，小球藻的培养方式可分为自养培养和异养培养。小球藻的自养培养既可利用自然光，也可利用人工光照，培养基主要由无机化合物组成，最适 pH 为 6.5–7.5，最适光照强度为 $36\text{--}90\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，温度为 $20\text{--}30^\circ\text{C}$ 。目前，关于小球藻的自养培养技术已经成熟，但是随着细胞的不断增殖，进入培养物的光照被阻挡，导致光合作用减弱，从而限制了其生物量的进一步提高。

发明内容：

[0004] 本发明的第一目的是提供一种促进普通小球藻生长的培养基。

[0005] 本发明的促进普通小球藻生长的培养基，其特征在于，在常规的 OECD 培养液中加入可溶性稀土化合物，稀土离子终浓度为 $10^{-6}\sim 10^{-2}\text{mM}$ 。

[0006] 所述的稀土化合物优选为硝酸铈或氯化铈。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种促进普通小球藻生长的培养方法，其特征在于，以上述促进普通小球藻生长的培养基对小球藻进行培养。

[0008] 优选，所述的培养方法具体为：将小球藻细胞接种到促进普通小球藻生长的培养基中，初始接种量为 $10^5\sim 10^6\text{cells/mL}$ ，在温度 $23\sim 28^\circ\text{C}$ ，光照强度 $2200\sim 2800\text{lux}$ ，光暗比 12h:12h，进行培养。

[0009] 本发明通过在 OECD 藻类培养液中加入可溶性稀土化合物，如硝酸铈或氯化铈，用其培养普通小球藻，所培养的普通小球藻细胞到达稳定期时，每升培养液可获得细胞干物质 $43\sim 59\text{mg}$ ，比未添加稀土化合物的 OECD 藻类培养液提高 $34\sim 69\%$ ，有效的提高了小球藻的产量，具有广阔的应用前景。

附图说明：

[0010] 图 1 是用本发明的促进普通小球藻生长的培养基对普通小球藻进行培养后的生长曲线图。

具体实施方式：

[0011] 以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是对本发明的限制。

[0012] 本发明的促进普通小球藻生长的培养方法的具体步骤如下：

[0013] 配制 OECD 培养液：

[0014] 表 1 :OECD 培养液的配方

	试剂	浓度	取用体积	总体积
储备液 1 121 °C, 15 min 灭菌	NH ₄ Cl	1.5 g/L	10 mL	用去离子水定容至 1000 mL
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.2 g/L		
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1.8 g/L		
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1.5 g/L		
	KH ₂ PO ₄	0.16 g/L		
储备液 2 0.22μm 滤膜过滤除菌	FeCl ₃ ·6 H ₂ O	64 mg/L	1 mL	
	Na ₂ EDTA·2 H ₂ O	100 mg/L		
储备液 3 121 °C, 15 min 灭菌	H ₃ BO ₃	185 mg/L	1 mL	
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	415 mg/L		
	ZnCl ₂	3 mg/L		
	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	1.5 mg/L		
	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0.01 mg/L		
	NaMoO ₄ ·4 H ₂ O	7 mg/L		
储备液 4 0.22μm 滤膜过滤除菌	NaHCO ₃	50 g/L	1 mL	

[0016] (1)按照储备液 1 的配方,取各化合物溶于去离子水中,121 °C,15min 灭菌,得到储备液 1。按照储备液 2 的配方,取各化合物溶于去离子水中,0.22 μ m 滤膜过滤除菌,得到储备液 2。按照储备液 3 的配方,取各化合物溶于去离子水中,121 °C,15min 灭菌,得到储备液 3。按照储备液 4 的配方,取各化合物溶于去离子水中,0.22 μ m 滤膜过滤除菌,得到储备液 4。再取储备液 110mL、储备液 21mL、储备液 31mL 和储备液 41mL,混合后,用去离子水定容至 1L,得到 OECD 培养液,该 OECD 培养液为藻类常规培养液。

[0017] (2)添加稀土化合物:将稀土化合物加入到步骤(1)获得的 OECD 培养液中,使稀土离子的终浓度为 10^{-6} ~ 10^{-2} mM,得到促进普通小球藻生长的培养基。

[0018] (3)步骤(2)所述的稀土化合物可选择硝酸铈或氯化铈。

[0019] (4) 接种细胞 : 无菌条件下, 将活化的普通小球藻细胞接种至含有步骤(2) 获得的促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 使细胞初始浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL。

[0020] (5) 培养条件 : 将步骤(4) 中已接种小球藻细胞的培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 $23 \sim 28^\circ\text{C}$, 光照强度 $2200 \sim 2800$ lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天定时摇动培养瓶数次。

[0021] (6) 小球藻细胞生长情况测定 : 培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当小球藻细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0022] (7) 收集藻细胞 : 取 50mL 完成培养的小球藻细胞培养液, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜通过真空抽滤器收集藻细胞进行细胞干重测定以及叶绿素含量测定。

[0023] (8) 细胞干重测定 : 将步骤(7) 获得的收集有藻细胞的滤膜, 置于 105°C 烘箱中烘干 4h, 干燥冷却后称量并计算, 获得单位体积培养液中细胞干物质含量 (mg/L)。

[0024] (9) 叶绿素含量测定 : 将步骤(7) 获得的收集有藻细胞的滤膜, 浸入 10mL 95% 乙醇溶液中, 75°C 水浴 15min 后离心, 用分光光度计测定上清液的 OD665 和 OD649, 获得单位体积培养液中叶绿素的含量 (mg/L), 计算公式 :

[0025] 叶绿素 a 的浓度 C_a (mg/L) = $13.95A_{665} - 6.88A_{649}$

[0026] 叶绿素 b 的浓度 C_b (mg/L) = $24.96A_{649} - 7.32A_{665}$ 。

[0027] 实施例 1 :

[0028] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压 (121°C , 15min) 灭菌储备液 1 和 3, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入硝酸铈, 使铈离子终浓度为 10^{-2} mM, 得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^5 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 23°C , 光照强度 2200 lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0029] 培养结果 : 获得小球藻细胞干重 47mg/L, 比对照组 (未添加硝酸铈的 OECD 培养液) 按照同样条件培养的提高 47%, 见图 1。

[0030] 实施例 2 :

[0031] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压 (121°C , 15min) 灭菌储备液 1 和 3, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入硝酸铈, 使铈离子终浓度为 10^{-4} mM, 由此得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^6 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 25°C , 光照强度 2500 lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0032] 培养结果 : 获得小球藻细胞干重 43mg/L, 比对照组 (未添加硝酸铈的 OECD 培养液) 按照同样条件下培养的提高 34%, 见图 1。

[0033] 实施例 3 :

[0034] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压(121℃, 15min) 灭菌储备液 1 和 3, 0.22 μm 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入硝酸铈, 使铈离子终浓度为 10^{-6} mM, 得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^5 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 28℃, 光照强度 2800lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0035] 培养结果: 获得小球藻细胞干重 54mg/L, 比对照组(未添加硝酸铈的 OECD 培养液) 按照同样条件培养的提高 69%, 见图 1。

[0036] 实施例 4 :

[0037] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压(121℃, 15min) 灭菌储备液 1 和 3, 0.22 μm 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入氯化铈, 使铈离子终浓度为 10^{-2} mM, 得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^5 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 24℃, 光照强度 2300lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0038] 培养结果: 获得小球藻细胞干重 49mg/L, 比对照组(未添加氯化铈的 OECD 培养液) 按照同样条件培养的提高 45%。

[0039] 实施例 5 :

[0040] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压(121℃, 15min) 灭菌储备液 1 和 3, 0.22 μm 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入氯化铈, 使铈离子终浓度为 10^{-3} mM, 得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^5 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 26℃, 光照强度 2400lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0041] 培养结果: 获得小球藻细胞干重 46mg/L, 比对照组(未添加氯化铈的 OECD 培养液) 按照同样条件培养的提高 38%。

[0042] 实施例 6 :

[0043] 按照表 1 的配方, 配制 OECD 培养液的 4 个储备液, 高温高压(121℃, 15min) 灭菌储备液 1 和 3, 0.22 μm 滤膜过滤除菌储备液 2 和 4, 取 10mL 储备液 1, 储备液 2、3 和 4 各 1mL, 混合后用去离子水定容至 1000mL, 加入氯化铈, 使铈离子终浓度为 10^{-5} mM, 得到促进普通小球藻生长的培养基。接种普通小球藻细胞到含有促进普通小球藻生长的培养基的培养瓶中, 细胞初始浓度为 10^6 cells/mL; 将培养瓶置于光照培养箱中静置培养, 温度 27℃, 光照

强度 2600lux, 光暗比 12h:12h, 培养期间每天摇动培养瓶两次。培养期间, 每天从培养瓶中取少量培养液用血球计数板对小球藻细胞计数或用分光光度计测定培养液在 540nm 处的光密度, 确定藻细胞的生长阶段, 当细胞数量或 OD540 稳定时即完成培养。

[0044] 培养结果: 获得小球藻细胞干重 59mg/L, 比对照组(未添加氯化铯的 OECD 培养液)按照同样条件培养的提高 66%。

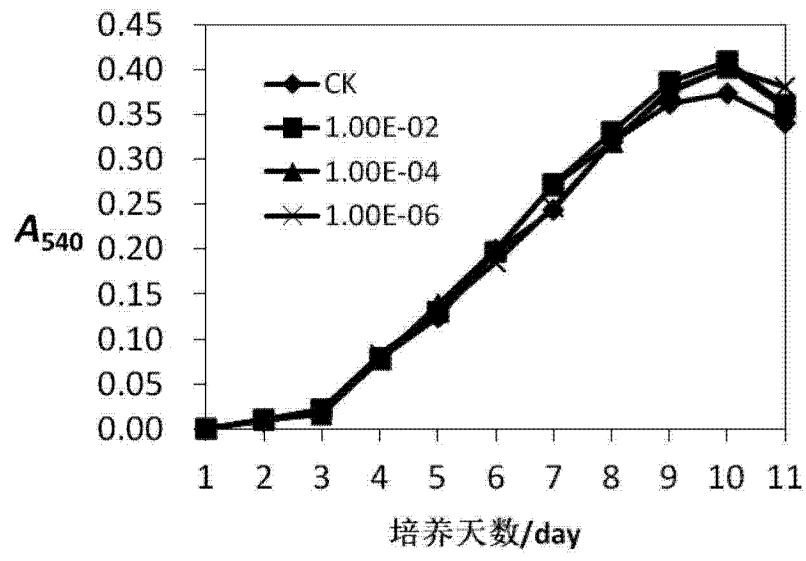


图 1