

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/04

A61K 35/78 C12P 19/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03119101.0

[43] 公开日 2004年9月22日

[11] 公开号 CN 1530439A

[22] 申请日 2003.3.14 [21] 申请号 03119101.0

[71] 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市大沽南路 1038 号

[72] 发明人 贾士儒 苏建宁 乔长晟

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理
事务所

代理人 李宏伟

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 发菜细胞培养及其培养产物

[57] 摘要

本发明公开了一种发菜细胞培养及其培养产物。解决了发菜多糖只能从发菜藻体中提取的问题。技术方案是：从发菜藻体中进行细胞分离，得到具有旺盛生命力的发菜细胞，将其接入培养基中，经培养得到发菜细胞种，置 8 - 12℃，500lux 弱光下保藏，一月转接一次，或用冷冻干燥保藏法长期保藏；细胞种扩培后进行培养，得到发菜细胞培养物；从细胞培养物或培养液中提取发菜多糖。本发明改变了只能从发菜藻体中提取发菜多糖的现状；细胞种可长期保藏，经扩大培养直接用于生产，不消耗野生发菜资源，不破坏发菜生长地生态环境；调整培养基组成及控制培养条件，可改变细胞培养物成分，使某些特定细胞产物得到积累；细胞培养物可直接作为生产功能性食品或药物的原料。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种发菜细胞培养，其特征是以发菜细胞为培养材料，具体包括如下步骤：

- (1) 取少许发菜经表面消毒冲洗后,从中进行细胞分离，得到具有旺盛生命力的发菜细胞；
- (2) 将发菜细胞接入培养基中，经培养得到发菜细胞种，细胞种置 8—12℃，弱光下保藏，一月转接一次，或采用冷冻干燥保藏法长期保藏；
- (3) 发菜细胞种经扩培，再接入培养基中进行培养，经收集得到细胞培养物；

2、根据权利要求 1 所述的发菜细胞培养，其特征是从发菜藻体中进行细胞分离得到的发菜细胞是用酶解法或机械分离法。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的发菜细胞培养，其特征在于将分离得到的发菜细胞接入培养基中，其培养基以碳酸盐为碳源，以一种或两种硝酸盐或铵盐为氮源，添加磷酸盐、钾盐、硫酸盐、镁盐、铁盐、钼酸钠、硼酸、氯化钙、氯化钴中的部分或全部；培养温度为 24—32℃，光照培养时间 10—15 天。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的发菜细胞培养，其特征在于将发菜细胞种扩培后，接入培养基中采用光反应器对发菜细胞进行培养；以碳酸盐或二氧化碳为碳源，不加氮源或以一种或两种硝酸盐和铵盐为氮源，添加矿质元素。

5、根据权利要求 1—4 中任一权利要求所得到的发菜细胞培养产物，其特征是从细胞培养物、培养液中直接提取发菜多糖或直接作为食品、保健品或药物生产的原料。

发菜细胞培养及其培养产物

技术领域

本发明涉及一种细胞培养技术特别涉及一种发菜细胞培养技术及发菜多糖的生产技术。

背景技术

发菜 (*Nostoc flagelliforme*) 是一种陆生性蓝藻, 富含多糖、氨基酸和微量元素, 长期以来作为一种名贵食品受到人们的喜爱。近年来, 发菜的药用价值日益受到重视, 发菜中所含多糖物质可增强机体免疫力, 发菜热水抽提物经实验证明具有抗肿瘤活性。从发菜中提取出一种多糖 Nostoflan, 经实验证实对一些具封套的病毒如 1 型单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒和流感病毒等具有抗病毒活性, 并可杀死离体培养的肿瘤细胞。国外已开发出以发菜为主要原料的保健品, 市场十分畅销。

目前发菜多糖是从发菜藻体中提取。发菜多糖的生产及一些功能性食品、药物的生产和开发均需要大量的发菜作为原料。发菜迄今不能人工种植生产, 而发菜有着特殊的生态环境要求和地理分布, 主要生长在荒漠——半荒漠草原地带, 生长极为缓慢, 自然蕴藏量相当有限。对发菜无节制地大量采收已使发菜资源遭受严重破坏, 以致濒临枯竭。宁夏是我国发菜主产地之一, 据调查, 宁夏 20 世纪 60 年代发菜生长地面积约 360.7 万公顷, 至 80 年代中期减少到 173.3 万公顷, 到 20 世纪 90 年代末已减至不足 100 万公顷, 发菜的产量则从 70 年代的每公顷 3—7.5 公斤下降至目前的每公顷约 0.1 公斤。对发菜的不合理采收还对发菜生长地的植被造成严重破坏, 致使土地沙化, 生态环境日益恶化。鉴于这一局面, 我国政府从 2000 年 7 月起全面禁止发菜的采收、加工和销售, 以发菜为原料的生产因此而无法进行, 发菜多糖作为一种具有良好应用前景的生物活性物质, 其开发和生产因没有原料来源而难以开展。

发明内容

本发明是针对上述问题进行的研究，其目的是改变发菜多糖只能从发菜藻体中提取的现状，利用细胞培养技术，分离得到发菜细胞，对发菜细胞进行培养，从培养物、培养液中提取发菜多糖或直接作为功能性食品、药物生产的原料，从根本上解决了原料问题对发菜多糖应用的制约。

本发明的技术方案是：以发菜细胞为培养材料，步骤如下：

(1)取少许发菜藻体经表面消毒冲洗后，从中进行细胞分离，得到具有旺盛生命力的发菜细胞；(2)将发菜细胞接入培养基中，经培养得到发菜细胞种，细胞种置 8—12℃，弱光下保藏，一月转接一次，或采用冷冻干燥保藏法长期保藏；(3)用发菜细胞种扩培，再接入培养基中进行培养，经收集得到细胞培养物。

本发明得到的细胞培养物、培养液可直接提取发菜多糖或直接作为功能性食品、药物生产的原料。

发菜细胞培养具体方法如下：

(1)分离发菜细胞：称取少量发菜于三角瓶中，表面消毒冲洗后，用酶解法或机械分离法进行细胞分离。酶解法：无菌条件下加入过滤除菌的离析酶溶液 30mL，转速 120r/min 振荡 1——2 小时，最后一次更换酶液后加入玻璃珠，使细胞分散，经过滤后，过滤液离心收集发菜细胞；机械分离法：加适量生理盐水或培养基，充分研磨，过滤，过滤液离心收集发菜细胞。

(2)培养发菜细胞种：将少量发菜细胞接入培养基中，pH 8.5—9.0，温度 24—32℃，时间为 15-18 天培养得到发菜细胞种，细胞种置 8—12℃，弱光下保藏，一月转接一次，或采用冷冻干燥保藏法长期保藏；

(3)扩培——培养——培养物：将少量保藏的发菜细胞种扩培后，接入培养基中，pH 8.5—9.0，培养温度为 24—32℃，光照培养时间为 10-15 天。培养液离心处理后，弃上清液，得细胞培养物。

从本发明得到的细胞培养物、培养液中提取发菜多糖具体方法如下：

培养物加水，沸水浴后，离心，或培养液离心，上清液浓缩，加入乙醇，沉淀离心，沉淀物用无水乙醇洗涤，真空干燥，得到发菜多糖或直接作为食品、保健品或药物生产的原料。

本发明的优点和积极效果是：由于采用细胞培养法生产发菜多糖，改变了只能从发菜藻体中提取多糖的现状；发菜细胞种可长期保藏，经扩大培养

直接用于生产，不消耗野生发菜资源，不破坏发菜生长地生态环境；通过调整培养基组成及控制培养条件，可改变细胞培养物成分组成，使某些特定细胞产物得到积累；细胞培养物、培养液可提取发菜多糖或直接作为食品、保健品或药物生产的原料。解决了因禁止发菜的采收、加工和销售，而使发菜为原料的生产无法进行，从而限制了发菜多糖作为一种具有良好应用前景的生物活性物质其应用开发研究受到制约的问题等。节省了发菜自然资源，使发菜资源免受破坏，保护了生态环境。

具体实施方式

实施例 1:

(1)分离发菜细胞:

称取 1g 发菜于三角瓶中，表面消毒，无菌水冲洗。无菌条件下加入过滤除菌的离析酶溶液 30mL，酶溶液中含果胶酶 0.5%，甘露醇 0.8%，硫酸葡聚糖钾 1%。三角瓶置于摇床上，转速 120r/min，冲程 4—5cm，温度 25℃，时间 2 小时，其间每 30min 更换一次酶液，第三次更换酶液后三角瓶中加入直径 2mm 的玻璃珠。两小时后酶解液用 800 目金属网过滤，过滤液 3000r/min 离心 15 分钟，收集发菜细胞。

(2)培养发菜细胞种:

发菜细胞用培养基冲洗 3 次后，接入培养基中，培养基组成：碳酸氢钠 1.2%，硝酸钠 0.12%，硝酸铵 0.03%，添加磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、钼酸钠、硼酸、氯化钴，pH 8.5，24℃，4000lux 光强静置培养 10 天，光暗比 12: 12，得发菜细胞种。细胞种置 8℃，500lux 弱光下保藏，一月转接一次，或采用冷冻干燥保藏法长期保藏。

(3)扩培——培养——培养物:

先将发菜细胞种扩培，然后以 15%接种量接入 15L 气升式光反应器中，其培养基的组成是：碳酸氢钠 1.2%，硝酸钠 0.18%，添加磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁，pH 8.5，培养温度为 28℃，光照培养 10 天。培养液 4000r/min 离心 30 分钟，弃上清液，得发菜细胞培养物。

实施例 2:

称取 1g 发菜，表面灭菌后置于研钵中，加入约 30mL 无菌生理盐水或培养基，无菌条件下充分研磨，800 目金属网过滤，过滤液离心，收集发菜细胞，

培养得发菜细胞种。细胞种置 10℃保藏，或扩培后接入培养基中，接种量 20%，pH 9，培养温度为 30℃，光照培养 15 天，其余同实施例 1。

实施例 3:

发菜细胞种置 12℃保藏。细胞种扩培后以 15%接种量接入反应器中，培养基组成：碳酸氢钠 1.6%，硝酸钠 0.12%，硝酸铵 0.03%，添加磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁，pH 8.75，32℃，4500lux 光强，光暗比 16: 8，光照培养 12 天。其余同实施例 1 或实施例 2。

实施例 4:

发菜细胞种扩培后以 15%接种量接入反应器中，培养基组成：碳酸氢钠 1.6%，添加磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁，硝酸钠，硫酸亚铁。光照培养 12 天。其余同实施例 1 或实施例 2。

实施例 5:

提取发菜多糖：培养物加水，置沸水浴中 1 小时，3000r/min 离心 30 分钟，上清液 80℃浓缩 4 倍，加入 2 倍体积的 95%乙醇，沉淀 8h，4000r/min 离心 15 分钟，沉淀物用无水乙醇洗涤，55℃，750mmHg 真空干燥，得到发菜多糖，其余同实施例 1 或 2、或 3、或 4。

实施例 6:

培养液 3000r/min 离心 30 分钟，取上清液，浓缩 4 倍，加入 2 倍体积的 95%乙醇，沉淀 8 小时，4000r/min 离心 15 分钟，沉淀物用无水乙醇洗涤，55℃，750mmHg 真空干燥，提取发菜多糖，其余同实施例 1 或 2、或 3、或 4。

实施例 7:

培养液膜式蒸发器蒸发浓缩，所得藻泥 60℃，750mmHg 真空干燥，得发菜藻粉，用于生产保健品或药品。其余同实施例 1 或 2、或 3、或 4。