



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02138828.8

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1174090C

[22] 申请日 2002.7.26 [21] 申请号 02138828.8

[71] 专利权人 中国科学院水生生物研究所

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 毕永红 胡征宇 徐敏 韩丹翔

邓中洋 罗玮 赵先富 陈珊

梅洪

审查员 李岚

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 一种培养发菜细胞的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种培养发菜细胞的方法，1. 培养液的配制：将配制好的贮藏液加入水中的顺序是，硝酸钠、磷酸氢二钾、七水硫酸镁、二水氯化钙、九水硅酸钠、微量金属元素溶液 PIV、土壤浸出液按比例配制；2. 藻细胞匀浆的制备，首先将野生发菜丝状体用乙醇和蒸馏水洗涤，无菌培养液浸泡 8-10 小时；其次是用玻璃匀浆器将丝状体匀浆破碎，匀浆液用于细胞培养；3. 藻种无菌纯化；4. 藻细胞培养；5. 实时监控；6. 收获；7. 干燥；8. 继续培养。本发明方法简单，操作方便，安全无污染，生长周期短，生产效率高，营养成分全面，营养含量高，广泛适用于城乡规模化生产培养。

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

1、一种培养发菜细胞的方法，包括下列步骤：

A、培养液配制，将配制好的贮藏液加入水中的顺序是，硝酸钠 490—500mg/L、磷酸氢二钾 35—40mg/L、七水硫酸镁 70—75mg/L、二水氯化钙 35—36mg/L、九水硅酸钠 55—60mg/L、微量元素 PIV3ml/L、土壤浸出液 3ml/L，配制好的培养液用 118—122℃ 高温干热灭菌，60-90 分钟冷却后使用；

B、藻细胞匀浆的制备，首先将发菜丝状体用 95%乙醇溶液浸泡 0.5-1.0 分钟，再用蒸馏水洗涤 3-4 次，在灭菌的培养液中洗涤 2-3 次，再使用灭菌的培养液浸泡 8-10 小时，将丝状体放在玻璃匀浆器中，加入石英砂，研磨成浆状物质；

C、藻种无菌纯化，匀浆液接种到无菌培养液中，置于 24~26℃ 的光照培养箱静置培养，培养 40d 后，在无菌室内显微镜下挑出单根藻丝体或单细胞，用无菌培养液洗涤 4-5 次，进行静置再培养，重复该操作 5-8 次，得到该藻的无菌藻种，将分纯的藻种接种到无菌培养液，在玻璃容器中通以过滤空气进行培养，制备得到该藻的扩大培养用藻种；

D、藻细胞培养，培养条件是温度 24~26℃，光照 40~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12 小时：12 小时，气体流量 5L/分钟左右通气培养；

E、实时监控，监控条件和标准是：温度 24-26℃，光照 40~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12 小时：12 小时，pH8.0-8.5；

F、收获，在藻液浓度达到 $\text{OD}_{750\text{nm}}$ 值在 0.5-1.0 的时候采收，使用 200 目的筛绢网进行采收；

G、干燥，藻泥在 45℃ 以下晒干、风干或烘干；

H、继续培养，在收集藻泥后的培养容器保留藻液，更换培养液，进行继续培养。

一种培养发菜细胞的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，更具体涉及一种培养发菜细胞的方法。

背景技术

念珠藻是蓝藻门 Cyanophyta 蓝藻纲 Cyanophyceae 段殖藻目 Hormogonales 念珠藻科 Nostocaceae 的一类分布地域广、生态环境复杂、形态结构多样的藻类类群，其植物体胶状或革状，成熟植物体有球形、叶状、丝状、泡状等多种形状，中空或实心，营漂浮或着生生长。念珠藻是许多极端环境中的主要组成种类，在高温、严寒、强紫外线照射、极低光照强度、高盐度等极端环境中都可以发现念珠藻的踪迹，其中的一些种类如发菜（*Nostoc flagelliforme*）、地木耳（*Nostoc commune*）、葛仙米（*Nostoc sphaeroides*）营养丰富可供食用，并具有一定的药用价值。自古以来发菜、葛仙米、地木耳就是中华民族的天然传统食品，其中发菜因其丰富的营养和吉祥的发音（与“发财”谐音）长期受到消费者的青睐，在许多古籍中都有详细记载。发菜又名头发菜、地毛，学名发状念珠藻，是世界性分布的可食用陆生蓝藻，在我国西部和西北部的荒漠半荒漠地区经常可以见到，其食用和药用历史可以追溯到三千年前，近几十年来对其形态学、生态学、生理学以及发育生物学等方面已经有了一定的研究。发菜具有食疗、保健、滋补等功能，一直远销海内外，目前的资源开发所带来的环境恶化与草场保护等的矛盾日益尖锐，有研究称采掘 1 公斤发菜可以毁掉 3 公顷草原，可见过度的采掘产生的生态环境破坏和自然资源萎缩衰退状况是极其严重的。巨大的市场需求与有限的资源量间存在着难以调和的矛盾，解决的唯一出路是开展发菜的人工培养和集约化养殖生产。由于发菜生长分布于荒漠半荒漠和草原地带，生活环境具有一定的特异性，其生长所需要的条件如温度、水分、光照、光暗周期、营养等要求严格，目前难以人工培养出成熟的发菜丝状体，即使是发菜细胞，至今也没有连续培养成功的报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种培养发菜细胞的方法，以期在丝状体难以人工培养得到的情况下获得具有基本发菜营养成分的人工培养物，该方法简单易行，操作方便，培养物具备发菜的营养成分，可以制作各类保健饮品，缓解发菜市场需求的问题。

为了达到上述目的，本发明采取了以下技术措施：1、培养首先考虑的是培

养液的配方,本发明从8个适合蓝藻生长的培养液中比较筛选出最适宜发菜细胞培养的培养液配方是HGZ培养液, NaNO_3 490-500mg/L, K_2HPO_4 35-40mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 70-75mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35-36mg/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 55-60mg/L, PIV 3ml/L, 土壤浸出液 3ml/L。以下是其它7个培养液的配方: 1[#]培养液: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.2g/L, K_2HPO_4 0.075g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, Na_2CO_3 0.2g/L, 0.5% Na_2MoO_4 4ml, 0.5% HBO_3 4ml, 1% $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5ml, 1% $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5ml/L; 2[#]培养液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.6mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.0mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.0mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 36.0mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12.6mg/L, H_3BO_3 618.4mg/L; 3[#]培养液: 1[#]: 2[#]=1: 1000; 4[#]培养液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, NaCl 0.2g/L, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005g/L, CaCO_3 1.0g/L; 5[#]培养液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 125mg/L, KNO_3 250mg/L, CaCl_2 27mg/L, NaOH 3.76mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg/L, A_5 1.0ml; 6[#]培养液: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04g/L, K_2HPO_4 0.01g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025g/L, Na_2CO_3 0.02g/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.025g/L, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.003g/L, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.003g/L; 7[#]培养液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.125g/L, Na_2HPO_4 0.075g/L, CaCO_3 0.1g/L, 1% $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5ml/L, 1% $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5ml/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5ml/L, A_5 1ml/L, B_6 1ml/L。2、培养液营养盐在藻种制备阶段使用分析纯级,溶解在无菌蒸馏水中;扩大培养和生产培养可使用化学纯,溶解在经净化过滤处理的自来水中即可。配制时营养盐严格按照顺序加入,杜绝沉淀的产生,然后将配制好的培养液进行灭菌。3、藻种制备: A、原种,野外采集发菜丝状体,经消毒清洗后制备匀浆液; B、藻丝体或藻细胞的纯化培养,使用多级分纯的方法进行纯化,直到没有杂菌和杂藻为止(可以显微镜镜检观察)。C、扩大制种,将分纯的藻种接种到无菌培养液,在玻璃容器中通气培养,制备藻种。4、藻细胞培养,在进行通气规模化培养发菜细胞时,适宜的方式是逐级培养,原因是一次培养的细胞生命周期是12-14d左右,由微小的匀浆液培养在10多天内不可能达到理想的效果,需要不断地更换培养液(由少到多)和容器(由小到大),逐渐增加培养细胞的浓度,得到高浓度的藻液;培养条件是温度24~26℃,光照40~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗周期12小时:12小时,气体流量5L/分钟通气培养。5、培养过程的实时监控,建立监控条件和监控标准是:温度24-26℃,光照40~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗周期12小时:12小时, pH8.0-8.5;根据藻体生长的最佳参数适时调整培养条件。需要的设备有温度计、照度计、分光光度计、pH计、显微镜、计算机以及常规的实验室设备和技术支持。定期进行科学合理的监测,所有参数收集到计算机中建立数据库,用于分析藻细胞的生长情况;6、收获,在藻液浓度达到 $\text{OD}_{750\text{nm}}$ 值在0.5-1.0的时候,使用200目的筛绢网进行采收;7、干燥,藻泥在45℃以下晒干、风干或烘干均可;8、收获时在培养液中留一定浓

度的藻液作藻种，更换一定体积的培养液，可以进行连续培养。

本发明具有以下优点和效果：设备简单，操作方便，清洁无污染，安全性好，营养丰富；同时与其他发菜发明相比，该技术所得到的产品并非人造发菜或发菜替代品，而是真正意义上具有发菜营养和口味的发菜制品。使用该技术生产发菜细胞可以吸收空气中的二氧化碳并固定氮气，向大气中释放氧气，有净化空气的作用，不产生有毒有害物质，培养液盐度低，生产周期短，14天左右就可以完成对数生长，效率高，广泛适用于城乡规模化培养。

具体实施方式

实施例：

培养发菜细胞的步骤：

1、培养液配制：将配制好的贮藏液加入水中的顺序是：硝酸钠 496mg/L、磷酸氢二钾 39mg/L、七水硫酸镁 75mg/L、二水氯化钙 36mg/L、九水硅酸钠 58mg/L、微量金属元素 PIV 3ml/L、土壤浸出液 3ml/L，配制好的培养液用 118-122℃ 高温干热灭菌，大约 60-90 分钟冷却后使用。

2、藻细胞匀浆的制备：首先将野生发菜丝状体使用 95%乙醇溶液浸泡 0.5—1.0 分钟，再用蒸馏水洗涤 3—4 次，在灭菌的培养液中洗涤 2—3 次，再使用灭菌的培养液浸泡 8-10 小时；其次是用玻璃匀浆器加入少量的石英砂，将丝状体破碎匀浆，匀浆液用于细胞培养；

3、藻种无菌纯化，匀浆液接种到无菌培养液中，置于 24~26℃ 的光照培养箱静置培养，培养 40d 后，在无菌室内显微镜下挑出单根藻丝体或单细胞，用无菌培养液洗涤 4-5 次，进行静置再培养，重复该操作 5-8 次，得到该藻的无菌藻种，将分纯的藻种接种到无菌培养液，在玻璃容器中通过过滤空气进行培养，制备得到该藻的扩大培养用藻种；

4、藻细胞培养

(1) 培养场地和培养器（光生物生物器 photo-bioreactor）：选择采光条件良好、水源清洁、水量充裕、交通便利的地方作为培养场地。在实验室（也可在塑料大棚、玻璃温室或普通房屋内）安装光生物反应器。光生物反应器有一个进样口（添加培养液和接种物，在反应器的上部）、一个排液口（排放培养液，收获藻泥，位于反应器底部）、一个通气口（通入空气、保持培养处于动态，在反应器底部）。

(2) 藻种原种匀浆液或无菌纯化的藻细胞液以每升培养液 1.0g 湿重的比例接种于光生物反应器中，在培养容器中用空气充气泵以 5L/分钟的速度从通气口通气（起搅动和增加 CO₂ 的作用），空气使用棉花和过滤器过滤，并置于温度 25℃，光照 40~50μmol·m⁻²·s⁻¹，光暗周期 12 小时：12 小时的条件下进行培养

5、实时监控；

建立的监控条件和标准：温度 24-26℃，光照 40~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12 小时：12 小时，pH8.0-8.5，其他微生物如细菌、真菌和杂菌检测：（1）涂平板，将培养液涂布在细菌培养的基本培养基上，37℃温育 24 小时以上，观察是否有菌落出现；（2）显微镜下观察是否有杂藻存在。营养盐浓度检测方法参看美国出版的 Standard Methods for Water and Waste Water 一书。

6、收获：在藻液浓度达到 $\text{OD}_{750\text{nm}}$ 为 0.6 的时候，将培养的藻液从光生物反应器的排液口排出，使用 200 目的筛绢网收集，所收集的藻泥就是我们的目标产品。

7、干燥：藻泥在 25℃风干。

8、继续培养：在收集藻泥后的培养容器保留一部分藻液，更换一定的培养液可以用于继续培养。