(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115595272 A
(43)申请公布日 2023.01.13

(21)申请号 202210154607.X

(22)申请日 2022.02.18

(30)优先权数据
10-2021-0088867 2021.07.07 KR
10-2021-0112040 2021.08.25 KR

(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72)发明人 沈相俊 成咏俊 赵胜俊

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 刘振佳

(51)Int.Cl.
C12N 1/12(2006.01)
C12N 1/38(2006.01)
C12N 3/00(2006.01)
C12N 13/00(2006.01)
C12P 23/00(2006.01)
C12R 1/89(2006.01)

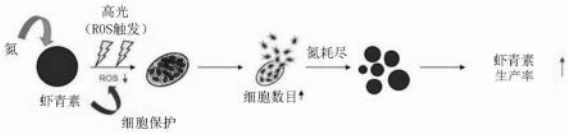
权利要求书1页 说明书8页 附图7页

(54)发明名称

用于培养含有大量虾青素的雨生红球藻的方法

(57)摘要

用于培养含有大量虾青素的雨生红球藻的方法。本发明涉及用于培养含有大量虾青素的雨生红球藻(Haematococcus pluvialis)的方法。根据一个实施方案,所述方法包括在自养条件下培养雨生红球藻以制备含有其中积累了虾青素的孢囊的培养物,以及向所述培养物添加氮源以诱导所述孢囊萌发。



CN 115595272 A

1.用于培养雨生红球藻(Haematococcus pluvialis)的方法,其包括(a)在自养条件下培养雨生红球藻以制备含有其中积累了虾青素的孢囊的培养物,以及(b)向所述培养物添加氮源以诱导所述孢囊萌发。

2.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)中诱导萌发之前,所述培养物中细胞的初始浓度为0.7至1.7g/L。

3.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)中用强度为200至400μE/m^2/s的光进行辐照。

4.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)中,所述孢囊萌发成游动孢子,并且当所述培养物被耗尽所述氮源时,所述游动孢子转回成其中积累了大量虾青素的孢囊。

5.根据权利要求1所述的方法,其中步骤(b)以半连续过程进行。

6.根据权利要求5所述的方法,其中步骤(b)包括(b1)在诱导萌发之后,在其中所述培养物被耗尽所述氮源的状态下,从所述培养物中收获一些细胞,以及(b2)进一步向剩余培养物添加所述氮源以再诱导萌发,并且其中依次重复子步骤(b1)和(b2)。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法在向其供应LNG燃制烟气的室外光生物反应器中进行。

用于培养含有大量虾青素的雨生红球藻的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于培养含有大量虾青素(astaxanthin)的雨生红球藻(Haematococcus pluvialis)的方法,并且更具体地,涉及用于生物质(biomass)产生的技术,其中使用微藻雨生红球藻的固有萌发特征来增强来自雨生红球藻的生物质和虾青素的生产率(productivity)。

背景技术

[0002] 虾青素是属于类胡萝卜素的叶黄素家族的色素。虾青素因其例如抗氧化、抗癌和抗炎活性的功能在医学应用中引起了相当大的关注。虾青素分为天然虾青素和合成虾青素。特别地,合成虾青素由于其可以以低成本产生而占市场供应的超过95%。然而,合成虾青素由于其是从石油资源(petroleum resource)中获得的,因此其在稳定性和持续供应方面存在若干问题。因此,许多研究都集中在天然虾青素的合成上。雨生红球藻(单细胞绿藻)将虾青素积累至其细胞干重的高至4%。出于这个原因,雨生红球藻作为用于产生天然存在的虾青素的来源而备受关注。用于通过光合作用经济地产生虾青素的技术可以与碳捕获、利用和储存技术相组合。例如,已经进行了关于使用来自发电厂(power plant)的烟气(flue gas)作为碳源且阳光作为能源从雨生红球藻产生虾青素的一些研究。然而,这种用于虾青素产生的方法经受以下问题,例如真菌污染、虾青素在高温下的低生理活性以及雨生红球藻生长缓慢,限制了其商业用途。

发明内容

[0003] 本发明是为了解决上述问题而进行的,并且本发明的一个方面是为了提供用于通过将雨生红球藻的孢囊(cyst)萌发应用于半连续过程(semi-continuous process)来培养能够有效地产生虾青素的雨生红球藻的方法。

[0004] 根据本发明的一个实施方案,用于培养雨生红球藻的方法包括:(a)在自养条件下培养雨生红球藻以制备含有其中积累了虾青素的孢囊的培养物以及(b)向培养物添加氮源以诱导孢囊萌发。

[0005] 根据本发明的一个实施方案,在步骤(b)中诱导萌发之前,培养物中细胞的初始浓度可以为0.7至1.7g/L。

[0006] 根据本发明的一个实施方案,在步骤(b)中可以用强度为200至400μE/m^2/s的光进行辐照。

[0007] 根据本发明的一个实施方案,在步骤(b)中,孢囊可以萌发成游动孢子(zooid),并且当培养物被耗尽氮源时,游动孢子可以转回成其中积累了大量虾青素的孢囊。

[0008] 根据本发明的一个实施方案,步骤(b)可以以半连续过程进行。

[0009] 根据本发明的一个实施方案,步骤(b)可包括(b1)在诱导萌发之后,在其中培养物被耗尽氮源的状态下,从培养物中收获一些细胞以及(b2)进一步向剩余培养物添加氮源以再诱导萌发,并且可以依次重复子步骤(b1)和(b2)。

[0010] 根据本发明的一个实施方案，该方法可以在向其供应LNG燃制烟气(LNG-fired flue gas)的室外光生物反应器(outdoor photobioreactor)中进行。

[0011] 本发明的特征和优点将根据以下参考附图的描述而变得明显。

[0012] 在详细描述本发明之前，应理解，鉴于本发明人能够恰当地定义术语和词语的概念以用最佳方法描述他/她的发明的原则，说明书和权利要求书中所使用的术语和词语不应被解释为具有常见和字典含义，而应被解释为具有与本发明的技术精神相对应的含义和概念。

[0013] 根据本发明，将雨生红球藻的孢囊萌发应用于半连续过程，使得可以在自养条件下，以经济且简单的方式大规模产生含有大量虾青素的雨生红球藻，创造了高附加价值。具体地，本发明消除了在常规分批培养中遇到的低生产率和低效率的问题，并且克服了常规半连续过程的限制，在所述过程中，反应器的使用和空间利用是低效率的，并且光强度条件根据细胞生长和虾青素积累而变化。因此，预期本发明有助于自雨生红球藻产生的生物质的商业利用。

[0014] 另外，本发明使得能够在短时段内大量产生生物质。因此，本发明在与用于降低二氧化碳排放的技术组合使用时，可用于高效率地显著降低二氧化碳排放。

附图说明

[0015] 根据以下实施方案的描述，结合附图，本发明的这些和/或其他方面和优点将变得明显且更容易理解，在附图中：

[0016] 图1是示意性地示出了根据本发明一个实施方案的用于培养雨生红球藻的方法的流程图。

[0017] 图2示出了显示根据本发明一个实施方案的在培养雨生红球藻期间细胞形态变化的图像。

[0018] 图3示出了根据本发明一个实施方案的用于通过用于培养雨生红球藻的方法增强虾青素产生的过程。

[0019] 图4示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后细胞数目的变化。

[0020] 图5示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后(a)残余氮浓度的变化和(b)活性氧类(reactive oxygen species,ROS)水平的变化；

[0021] 图6示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后(a)细胞密度的变化和(b)虾青素含量的变化；

[0022] 图7示出了在半连续过程和在分批过程(batch process)中产生的(a)虾青素浓度的变化和(b)虾青素积累量的变化。

[0023] 图8示出了(a)当在半连续过程中培养时和(b)当在分批过程中培养时雨生红球藻中四种基因psy、crtO、bkt2和crtR-B的表达水平；以及

[0024] 图9示出了当将半连续过程和分批过程分别应用于使用烟气的大规模室外培养系统时(a)细胞密度的变化和(b)虾青素含量的变化。

具体实施方式

[0025] 本发明的目的、具体优点和新特征将从以下详细描述和优选实施方案中变得更加

明显,其实例在附图中示出。在本发明的说明书中,当认为相关技术的详细说明可能不必要地使本发明的本质模糊时,省略相关技术的详细说明。

[0026] 现在将参考附图详细地描述本发明的一些优选实施方案。

[0027] 图1是示意性地示出了根本发明一个实施方案的用于培养雨生红球藻的方法的流程图,图2示出了显示根据本发明一个实施方案的在培养雨生红球藻期间细胞形态变化的图像,以及图3示出了根据本发明一个实施方案的用于通过用于培养雨生红球藻的方法增强虾青素产生的过程。

[0028] 如图1至3中所示,该方法包括在自养条件下培养雨生红球藻以制备含有其中积累了虾青素的孢囊的培养物,以及向培养物添加氮源以诱导孢囊的萌发。

[0029] 本发明涉及用于培养含有大量虾青素的雨生红球藻的方法。

[0030] 雨生红球藻是生长在淡水中的微藻物种,并能够将虾青素(类胡萝卜素)积累至其干重的3%至4%。雨生红球藻形成孢囊以抵抗多种应激,例如营养耗竭、暴露于强光、盐度提高和极低或极高的温度。在此过程中,雨生红球藻积累次级代谢物例如脂质和类胡萝卜素以抵抗应激。特别地,虾青素(3,3′-二羟基-β,β'-胡萝卜素-4,4′-二酮),即红色的酮类胡萝卜素,因其作用例如抗氧化、抗癌和抗炎活性在医学应用中引起了广泛关注。雨生红球藻是能够产生虾青素的微藻物种,并且其经历了两个不同的阶段:生长阶段和用于虾青素积累的孢囊阶段。雨生红球藻细胞周围的细胞壁由70%碳水化合物(66%己糖)、3%纤维素、6%蛋白质和3%乙酰解抗性物质构成。虾青素在雨生红球藻孢囊的厚细胞壁中积累。

[0031] 用于通过光合作用经济地产生虾青素的技术可以与碳捕获、利用和储存技术相组合。例如,已经进行了关于使用来自发电厂的烟气作为碳源且阳光作为能源从雨生红球藻产生虾青素的一些研究。然而,这种用于虾青素产生的方法经受以下问题,例如真菌污染、虾青素在高温下的低生理活性以及雨生红球藻生长缓慢,限制了其商业用途。

[0032] 微藻培养条件分为自养、异养和混养条件。自养条件下的微藻培养使用不挥发性二氧化碳作为碳源,而不供应任何有机碳源和光能来合成有机化合物。自养条件比异养和混养条件更适合于长期培养,因为它们更安全地不受致病细菌和真菌污染。然而,尽管它能够产生含有大量虾青素的生物质,但在自养条件下的培养由于培养时间长而受到限制。

[0033] 由于生物过程的特征,其仅提供每单位面积有限的CO_2排放降低。由于此限制,对于其中排放大量温室气体且应处理大量二氧化碳的设施,需要改进的基于微藻的生物质产生过程的二氧化碳降低能力。

[0034] 因此,本发明旨在为雨生红球藻的常规培养方法的问题提供解决方案。

[0035] 如上所述,根据本发明的用于培养雨生红球藻的方法包括(S100)制备培养物和(S200)诱导萌发(S200)。

[0036] 在步骤(S100)中,培养雨生红球藻以制备含有培养的雨生红球藻细胞的培养物。雨生红球藻的培养在自养条件下进行,并且培养物中存在的细胞是其中积累了虾青素的孢囊。

[0037] 培养物可以以分批过程制备。可将雨生红球藻接种到反应器中的培养基中,并向其辐照光并供应二氧化碳以形成孢囊。雨生红球藻在培养期间经历生长和诱导阶段以形成其中积累了虾青素的孢囊。在生长阶段可以辐照强度为40至80μE/m^2/s的弱光,而在诱导阶段可以辐照强度为200至400μE/m^2/s的强光。

[0038] 在步骤(S200)中,向培养物添加氮源以诱导孢囊萌发。培养培养物中存在的细胞并在不存在氮源的情况下转变成孢囊。氮源的添加导致孢囊内的细胞分裂,并使孢囊周围的细胞壁更薄,最终导致大量游动孢子通过细胞壁释放。作为结果,细胞数目提高。在没有任何氮源的培养环境中形成的孢囊会迅速消耗添加的氮源,直到培养物变得耗尽氮源。在此,当氮源耗尽为虾青素产生创造有利条件时,游动孢子会转回成孢囊。游动孢子的直径为10至20μm尺寸,而孢囊生长至尺寸为20至50μm。因此,较大的孢囊比游动孢子产生更多的生物质。综上所述,根据用于通过孢囊萌发产生生物质的方法,可以有效使用强光进行辐照,可仅通过供应氮源来有效提高细胞数目,并且快速的氮源消耗使游动孢子转变成孢囊,在那里可以有效增强生物质产生。

[0039] 细胞的初始浓度和光强度对于有效的虾青素产生是重要的。在诱导萌发之前,培养物中的细胞(即,用于萌发的细胞)的初始浓度优选地为0.7至1.7g/L。还优选地用强度为200至400μE/m^2/s的辐照光。将参考以下实验性实施例对细胞的初始浓度和光强度进行详细说明。

[0040] 在步骤(S200)中,可以在半连续过程中诱导萌发。作为实例,步骤(S200)可包括(S210)收获一些细胞和(S220)再诱导萌发,并且可以依次重复子步骤(S210)和(S220)。具体地,在子步骤(S210)中,在诱导萌发之后,在其中培养物被耗尽氮源的状态下,从培养物中收获一些细胞。在子步骤(S220)中,进一步向剩余的培养物添加氮源以再诱导萌发。在子步骤(S220)中,优选地,待萌发细胞的初始浓度维持在0.7至1.7g/L,并且光强度为200至400μE/m^2/s。通过依次重复子步骤(S210)和(S220)数次,可以产生大量的生物质和虾青素。

[0041] 用于培养雨生红球藻的方法可以在向其供应LNG燃制烟气的室外光生物反应器中进行。

[0042] 将参考以下实验性实施例更详细地解释本发明。

[0043] 1.材料和方法

[0044] 1.1.品系和培养条件

[0045] 在本实验中,将从日本国立环境研究所(National Institute for Environmental Studies,NIES)获得的雨生红球藻品系NIES-144的细胞在NIES-C培养基中培养。使用HEPES用作缓冲液将pH维持在恒定水平。将30mL培养物引入到100mL瓶中,随后在25℃下在5%CO_2培养箱(Vision Scientific,South Korea)中培养。在生长阶段用强度为50μ$Em^{-2}s^{-1}$的光进行辐照。

[0046] 1.2.以分批过程培养和光合自养诱导

[0047] 将在生长阶段中的细胞接种到250mL瓶中的100mL NIES-C培养基中,并在5%CO_2培养箱中以130rpm和25℃培养。以分批过程进行两阶段培养以增强光合自养虾青素的产生。将生长阶段中的细胞在NIES-C中培养。在生长阶段中用强度为50μ$Em^{-2}s^{-1}$的光进行辐照,并且在诱导阶段中将其强度更改为250μ$Em^{-2}s^{-1}$用于虾青素产生。在分批过程中的生长和诱导阶段分别持续8天和20天。

[0048] 1.3.以半连续过程培养

[0049] 对于以半连续过程培养,将100mL NIES-C培养基引入到250mL瓶中,并在5%CO_2培养箱中以130rpm和25℃进行培养。

[0050] 在诱导阶段将红色孢囊离心并将其重悬在NIES-C中。此时,用强度为250μ$Em^{-2}s^{-1}$

的光进行辐照。在0.3、1.2、2.1和3.0gL^{-1}的不同初始生物质浓度下培养细胞。

[0051] 1.4.在作为室外培养系统的光生物反应器中的大规模培养

[0052] 将来自液化天然气(liquefied natural gas,LNG)工厂的烟气用作CO_2源。烟气由CO_2(3至6%)、O_2(11.99±0.73%)、CO(1.43±4.03ppm)和NO_x(21.72±3.72ppm)构成。将烟气以0.1vvm的流量供应给作为室外培养系统的光生物反应器(PBR,Photobioreactor)。对于分批过程,将在生长阶段培养的细胞以0.03gL^{-1}的生物质浓度接种,在生长阶段用强度为50μEm^{-2}s^{-1}的光进行辐照,并且在诱导阶段用强度为250μEm^{-2}s^{-1}的光进行辐照。对于半连续过程,用强度为250μEm^{-2}s^{-1}的光进行辐照。整个实验时期中的平均温度为22±4℃。

[0053] 1.5.硝酸盐浓度和细胞数目

[0054] 用显微镜(Olympus CKX41,Japan)观察处于萌发阶段的细胞,并用血细胞计数器(Incyto,South Korea)测量细胞数目(细胞/mL)。硝酸盐浓度用Spectroquant®测试试剂盒(Merck,1.14773.0001)确定。

[0055] 1.6.活性氧类水平的确定

[0056] 使用2′,7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯(H_2DCFDA)根据先前报道的方法(Shim,S.J,Hong,M.E,Chang,W.S,Sim,S.J,2020.Repeated-batch production of omega-3 enriched biomass of Chlorella sorokiniana via calcium-induced homeoviscous adaptation .Bioresour.Technol.303,122944.)测量胞内活性氧类(ROS)水平。将细胞离心并重悬在含有5μM H_2DCFDA的提取缓冲液中。将细胞悬液在25℃下孵育10分钟并避光。将如此处理的细胞离心并用提取缓冲液洗涤两次。此后,将细胞悬液匀质化并提取二氯荧光素(dichlorofluorescein,DCF)。将所得样品离心,并用Tecan多能阅读器(Tecan multireader)测量上清液中活性氧类水平的水平。

[0057] 1.7.RNA提取和实时qPCR

[0058] 为了找出与分批过程中相比半连续过程中虾青素含量快速提高的原因,进行了实时qPCR分析以分析参与虾青素生物合成的基因的相对表达水平。

[0059] 1.8.干重分析

[0060] 使用GF/F玻璃微纤维过滤器测量生物质干重。在每个样品通过微纤维过滤器之后,将附着有生物质的过滤器在75℃下干燥。计算处理之前和之后过滤器重量的差异并将其确定为生物质干重。

[0061] 1.9.虾青素提取与分析

[0062] 将细胞悬液离心,并用Tissue Lyser II(Qiagen,USA)使用玻璃珠和甲醇提取虾青素。在用10mM KOH溶液皂化之后,通过HPLC分析虾青素含量。

[0063] 2.结果和讨论

[0064] 2.1.孢囊萌发对细胞数目的作用

[0065] 雨生红球藻的孢囊萌发主要取决于氮浓度和光强度。以0.3、1.2、2.1、3.0gL^{-1}的不同初始生物质浓度添加氮源以诱导孢囊萌发,并分析取决于初始生物质浓度的雨生红球藻细胞数目的变化。结果示于图4中。图4示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后细胞数目的变化。

[0066] 由于向每个样品中引入了相同量的氮源,因此预计细胞数目的提高将在最低初始生物质浓度下最大。参考图4,在最低初始生物质浓度(0.3gL^{-1})下观察到细胞数目的最大提

高(962%)(1.2gL^{-1}时为314%,2.1gL^{-1}时为137%,和3.0gL^{-1}时为23%)。在除了最低生物质浓度(0.3gL^{-1})下样品之外的样品中,初始观察到细胞数目无变化,并且在24小时之后细胞数目开始提高。与其他生物质浓度下的相比,在最低生物质浓度下细胞数开始提高花了两倍长的时间。由于自遮蔽效应(self-shading effect)在低细胞浓度下最小化,因此可将细胞立即暴露于强光和活性氧类(ROS)相关的应激条件下,导致对外部刺激的响应减慢和细胞分裂的抑制。

[0067] 孢囊在萌发期间转变成游动孢子,并在60小时之后,大多数游动孢子都转回成孢囊以保护其自身免受氧化应激,而在最低生物质浓度(0.3gL^{-1})下除外。这是由于孢囊对光的敏感性较低,因此其比游动孢子能更有利地避光。

[0068] 在60小时之后,在3.0、2.1和1.2gL^{-1}的初始生物质浓度下,转变成孢囊(总细胞中孢囊的比例)分别为100%、98.6%和92.6%。

[0069] 萌发之后细胞数目的提高和游动孢子迅速转变成孢囊是细胞中有效的虾青素积累的原因。

[0070] 2.2.萌发期间的氮消耗和活性氧类形成

[0071] 将不同浓度的成熟红色孢囊接种到补充有2.2mM硝酸盐的新鲜NIES-C培养基中。由于氮是细胞生长和萌发的重要营养物,因此可以通过分析培养基中残余氮的浓度来推断细胞生理变化。图5示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后(a)残余氮浓度的变化和(b)活性氧类(ROS)水平的变化。

[0072] 如图5(a)中所示,氮消耗率根据初始生物质浓度而变化。换言之,初始生物质浓度越高,则氮耗尽得越快。在2.1和1.2gL^{-1}的初始生物质浓度下,氮在2天内耗尽,而在3gL^{-1}的初始生物质浓度下,氮在一天内耗尽。在第4天,在所有浓度下培养基中无氮剩余。

[0073] 在细胞数目因孢囊萌发而迅速提高之后,氮源的耗尽使得在细胞中能够有效地虾青素积累。当通过用高强度光产生ROS时,氧化应激会导致细胞损伤。雨生红球藻细胞产生虾青素,所述虾青素有效地抵抗氧化应激以抑制ROS的释放。

[0074] 当初始细胞数目小时,每个细胞可获得相对大量的氮。添加氮源恢复了细胞代谢,但保护性色素包括虾青素可以吸收光以降低光合能量产生。因此,促进了虾青素的降解,并且延迟了对虾青素合成重要的氮源的耗尽,以便在其中初始细胞数目小的培养条件下有效使用光能。作为结果,当细胞在以低浓度培养时,低浓度的虾青素不能有效地抑制由强光诱导的ROS,导致ROS水平提高。这一结果通过在低细胞浓度下提高的ROS水平被确定(参见图5(b))。

[0075] 2.3.萌发期间生物质浓度和虾青素含量的比较

[0076] 在通过引入氮源诱导萌发之后,测量细胞密度和虾青素含量。结果示于图6中。图6示出了在不同的初始生物质(雨生红球藻)浓度下萌发之后(a)细胞密度的变化和(b)虾青素含量的变化。

[0077] 参考图6(a),在萌发期间细胞数目提高,导致细胞密度持续提高。然而,细胞过度暴露于由强光诱导的氧化应激抑制了孢囊的生长。作为结果,在低生物质浓度(0.3gL^{-1})下,单独细胞显著暴露于诱导过度氧化应激的强光,导致细胞密度提高效率低。

[0078] 相比之下,在高初始细胞浓度下,由于氮浓度相对低,观察到有限的生物质提高。分别在3、2.1、1.2和0.3gL^{-1}的初始生物质浓度下测得了生物质生产率为0.12、0.17、0.21和

0.11gL^{-1}d^{-1}。换言之，细胞密度的最有效提高是在1.2gL^{-1}的初始生物质浓度下实现的。氮抑制了参与虾青素合成的基因的表达并诱导萌发。强光是用于虾青素产生的最重要因素之一。因此，需要将强光辐照到培养物上，以便使由氮源供应引起的虾青素积累的降低最小化。

[0079] 参考图6(b)，在萌发4天时虾青素含量稳定降低，并且此后其开始提高。在1.2gL^{-1}的初始生物质浓度下，最高的虾青素生产率为11.7mgL^{-1}d^{-1}。总之，在半连续过程中，初始生物质浓度为1.2gL^{-1}下的氮介导的萌发可以使虾青素产生最大化。

[0080] 2.4.以分批过程和半连续过程产生的虾青素量的比较

[0081] 通过雨生红球藻产生的虾青素的市场价值一直在上升。在这样的情况下，已经开发了多种类型的半连续过程来增强生物质生产率。根据常规的半连续过程，向处于生长阶段的高度生理活性细胞供应新鲜培养基以使延滞期最小化，从而导致改善细胞生长。

[0082] 然而，其中培养条件和细胞状态完全不同的其他常规半连续过程在从雨生红球藻细胞中产生虾青素方面效率低下。相比之下，根据本发明的方法，将作为雨生红球藻的独特生物学现象的萌发应用于半连续过程以高效产生虾青素。为了验证本发明的作用，将其中应用了最佳萌发诱导条件(初始生物质浓度为1.2gL^{-1})的半连续过程中的虾青素生产率与分批过程中的虾青素生产率进行比较。图7示出了在半连续过程和分批过程中产生的(a)虾青素浓度的变化和(b)虾青素积累量的变化。

[0083] 参考图7(a)，将在分批过程中获得的成熟红色孢囊用于半连续过程的第一个周期。作为结果，与分批过程相比，半连续过程可维持更高的虾青素浓度，并且在重复培养周期时没有发现虾青素含量降低。

[0084] 在第一分批过程之后，将半连续过程中积累的虾青素量与分批过程中积累的虾青素量进行比较。参考图7(b)，在半连续过程和分批过程中60天分别产生了700.4和331.7mgL^{-1}的虾青素。虾青素不能在分批过程中连续积累，因为需要营养细胞的生长来提高细胞数目。相比之下，含虾青素细胞的数目在半连续过程中因萌发而提高，从而导致虾青素产生提高。

[0085] 总之，与常规分批过程相比，基于萌发的半连续过程可以将虾青素生产率提高2.1倍因数。

[0086] 2.5.萌发期间类胡萝卜素生物合成基因的转录表达

[0087] 通过实时qPCR在0、2、4和6天内测量半连续过程和分批过程中与胡萝卜素生物合成相关的四种基因psy、crtO、bkt2和crtR-B的表达水平。八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase，psy)是虾青素生物合成中的关键酶。crtO和bkt2是通过crtR-B的作用促进虾青素生物合成的β-胡萝卜素酮醇酶/加氧酶。已知crtR-B的表达水平与虾青素具有显著相关性。图8示出了(a)当在半连续过程中培养时和(b)当在分批过程中培养时雨生红球藻中四种基因psy、crtO、bkt2和crtR-B的表达水平。

[0088] 时程分析显示这四种基因在半连续过程中显示出相同的表达谱(参见图8(a))。在氮添加之后2天基因表达水平降低，在此期间残余的氮源作为营养物被消耗，导致抑制类胡萝卜素的生物合成。当细胞在氮耗尽之后用强光进行辐照时，所有类胡萝卜素相关基因的表达水平连续提高。这些结果得出以下结论，高强度的光会提高基因psy、crtO、bkt2和crtR-B的表达水平。

[0089] 相比之下,类胡萝卜素相关基因的表达水平维持低位,并且由于其中细胞数目提高的生长阶段,虾青素在分批过程中几乎没有积累(参见图8(b))。

[0090] 总之,用于孢囊萌发的氮添加和高光强度增强了基因的表达水平,有助于在孢囊萌发之后有效的虾青素产生。

[0091] 2.6.使用烟气进行的虾青素大规模室外产生

[0092] 基于前述实验性实施例,半连续过程和分批过程二者均在使用来自液化天然气(LNG)工厂的烟气的室外系统中进行。在此,使用了由聚合物膜制成的光生物反应器(PBR)。

[0093] 基于萌发的半连续过程每30天进行,与分批过程中虾青素诱导阶段的时期相同。图9示出了当将半连续过程和分批过程分别应用于使用烟气的大规模室外培养系统时(a)细胞密度的变化和(b)虾青素含量的变化。

[0094] 与用于实验室培养的那些相比,用于室外培养的光生物反应器体积庞大(bulky),因此难以将光有效地传输至单独细胞。此外,由于考虑到操作成本和能源消耗,没有使用复杂的温度控制系统,因此与在实验室培养中相比时,在室外培养中生物质和虾青素生产率偏低。

[0095] 然而,与应用分批过程时相比,当将基于萌发的半连续过程应用于使用烟气的室外系统时,生物质(参见图9(a))和虾青素生产率(参见图9(b))分别提高了1.8倍和2.6倍。在大规模光生物反应器中成功地重复了半连续过程。

[0096] 由于半连续过程的培养周期短于分批过程的培养周期,因此需要更多的能量以收获细胞并引入培养基和细胞。然而,由于虾青素的市场价格非常高,因此细胞中虾青素含量的提高可以抵消另外能量输入的缺点。另外,由于用于提取积累在雨生红球藻细胞中的虾青素的下游过程占整个产生操作成本的最大部分,因此在处理相同量的生物质时,高虾青素含量可以节省操作成本。

[0097] 总之,半连续过程需要另外的能量输入和提高的操作成本,但由于其增强的虾青素生产率,因此在总体经济效率方面是有利的。

[0098] 尽管本文中已经参考一些具体实施方案描述了本发明,但是这些实施方案并不用来限制本发明,而是出于举例说明性目的而陈述。对于本领域技术人员来说将明显的是,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行修改和改进。

[0099] 本发明的这样的简单修改和改进属于本发明的范围,并且本发明的具体范围将由所附权利要求书明确限定。

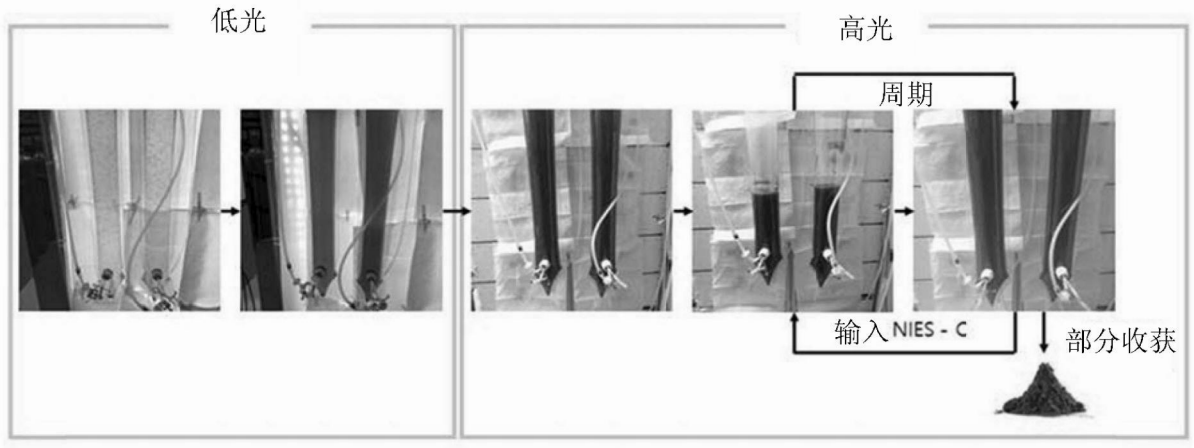

低光
高光
周期
输入NIES - C
部分收获

图1

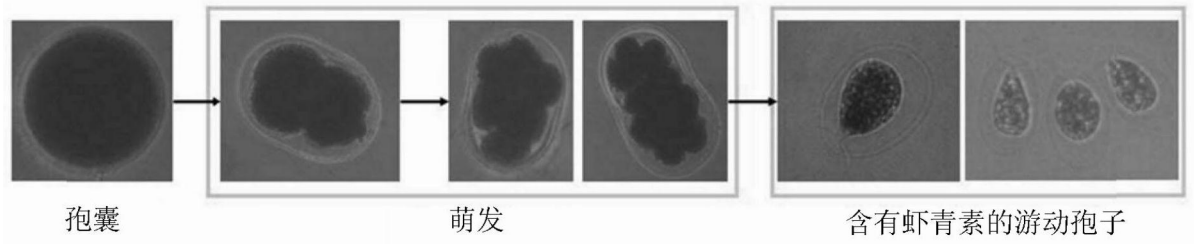

孢囊
萌发
含有虾青素的游动孢子

图2

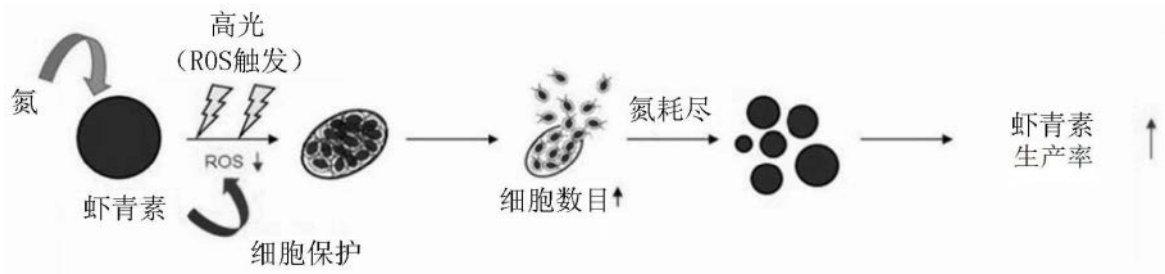

高光
(ROS触发)
氮
ROS
虾青素
细胞保护
细胞数目
氮耗尽
虾青素
生产率

图3

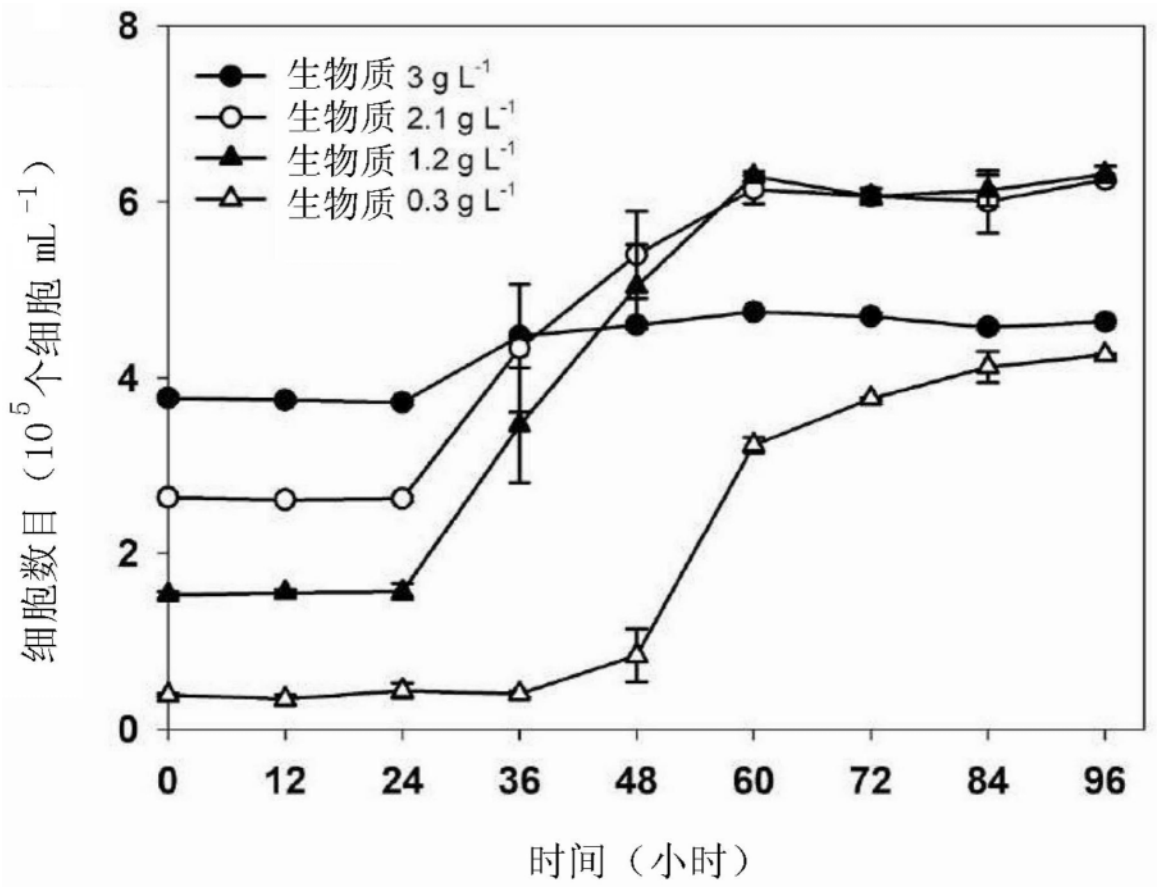

生物质 3 g L-1
生物质 2.1 g L-1
生物质 1.2 g L-1
生物质 0.3 g L-1
细胞数目（10^5个细胞 mL^-1）
时间（小时）
0
2
4
6
8
0
12
24
36
48
60
72
84
96

图4

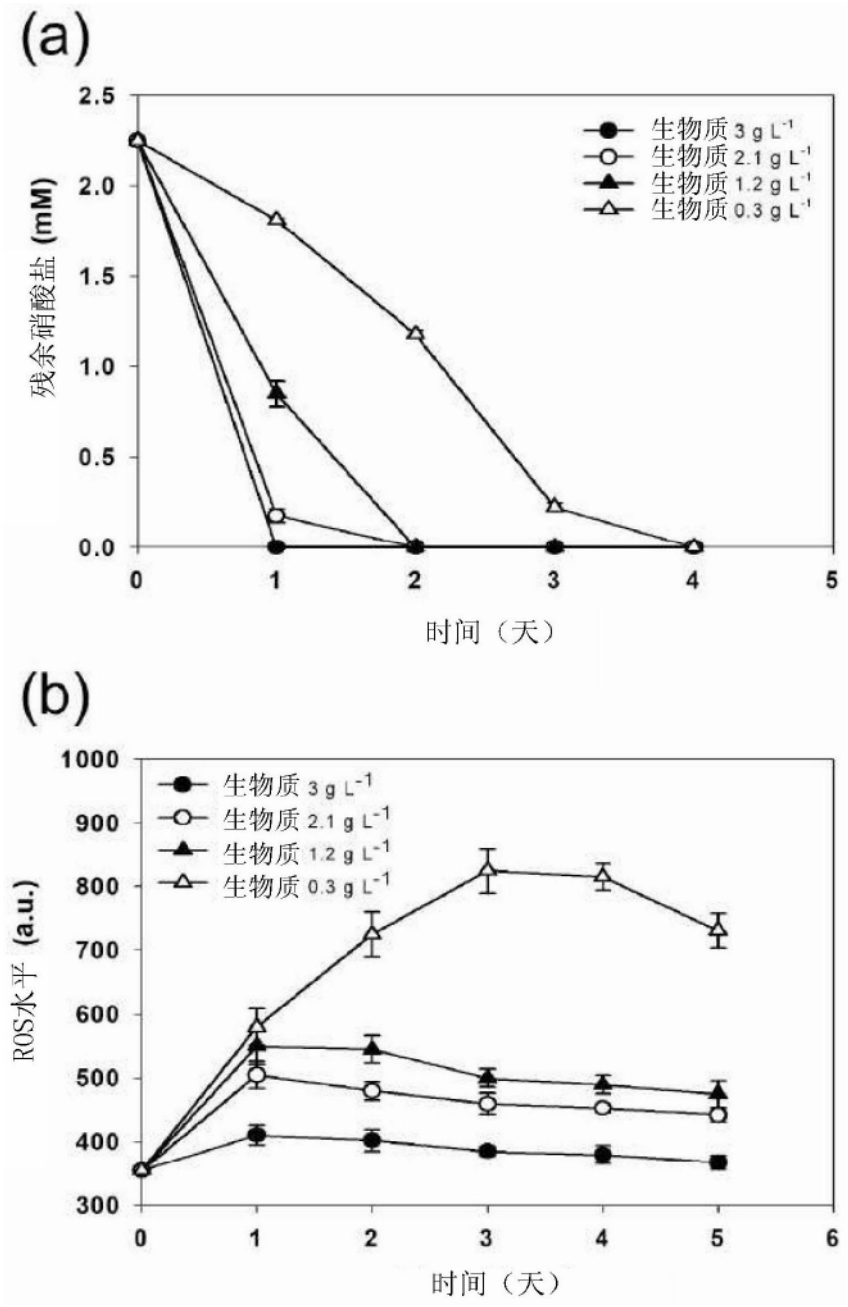

(a)
残余硝酸盐 (mM)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
时间（天）
生物质 3 g L-1
生物质 2.1 g L-1
生物质 1.2 g L-1
生物质 0.3 g L-1
(b)
ROS水平 (a.u.)
1000
900
800
700
600
500
400
300
0
1
2
3
4
5
6
时间（天）
生物质 3 g L-1
生物质 2.1 g L-1
生物质 1.2 g L-1
生物质 0.3 g L-1

图5

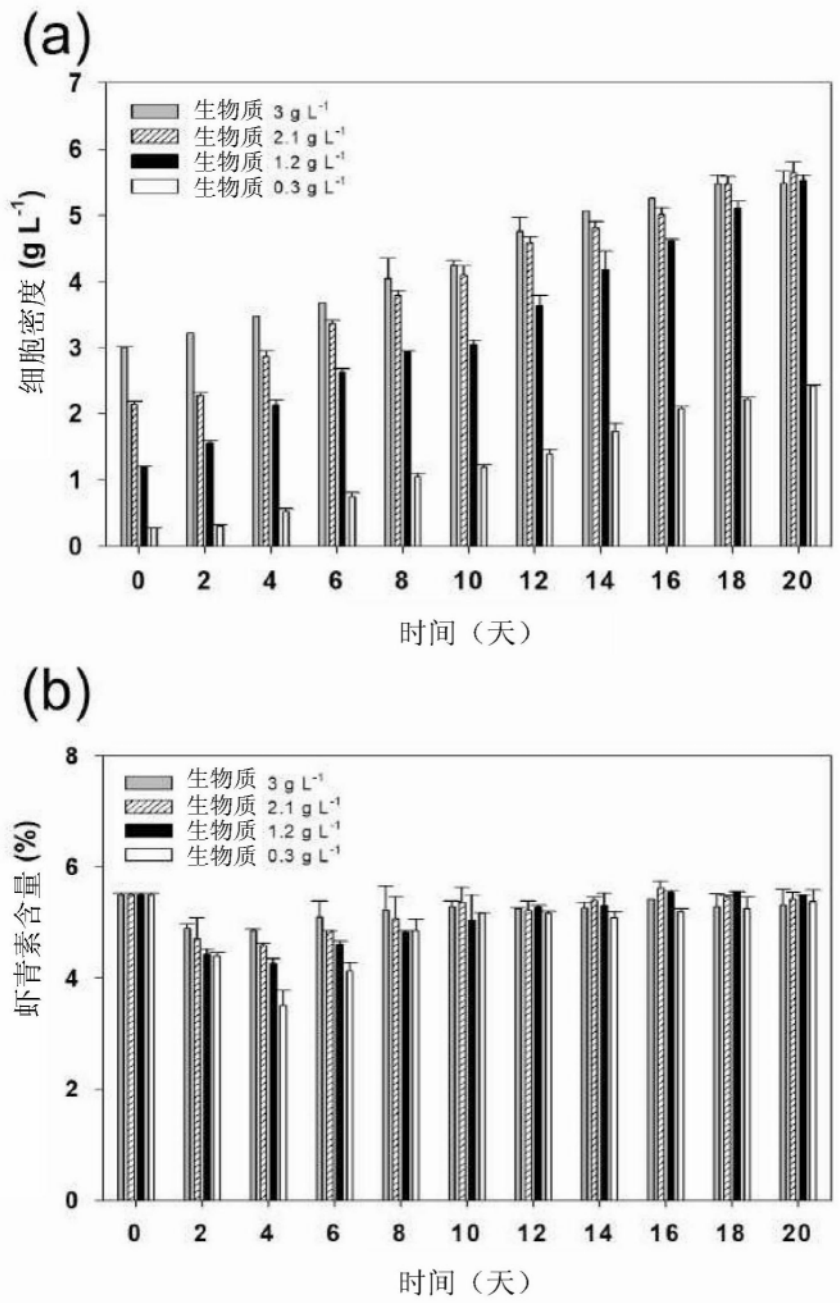

(a)
细胞密度 (g L-1)
生物质 3 g L-1
生物质 2.1 g L-1
生物质 1.2 g L-1
生物质 0.3 g L-1
0 1 2 3 4 5 6 7
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
时间（天）
(b)
虾青素含量 (%)
生物质 3 g L-1
生物质 2.1 g L-1
生物质 1.2 g L-1
生物质 0.3 g L-1
0 2 4 6 8
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
时间（天）

图6

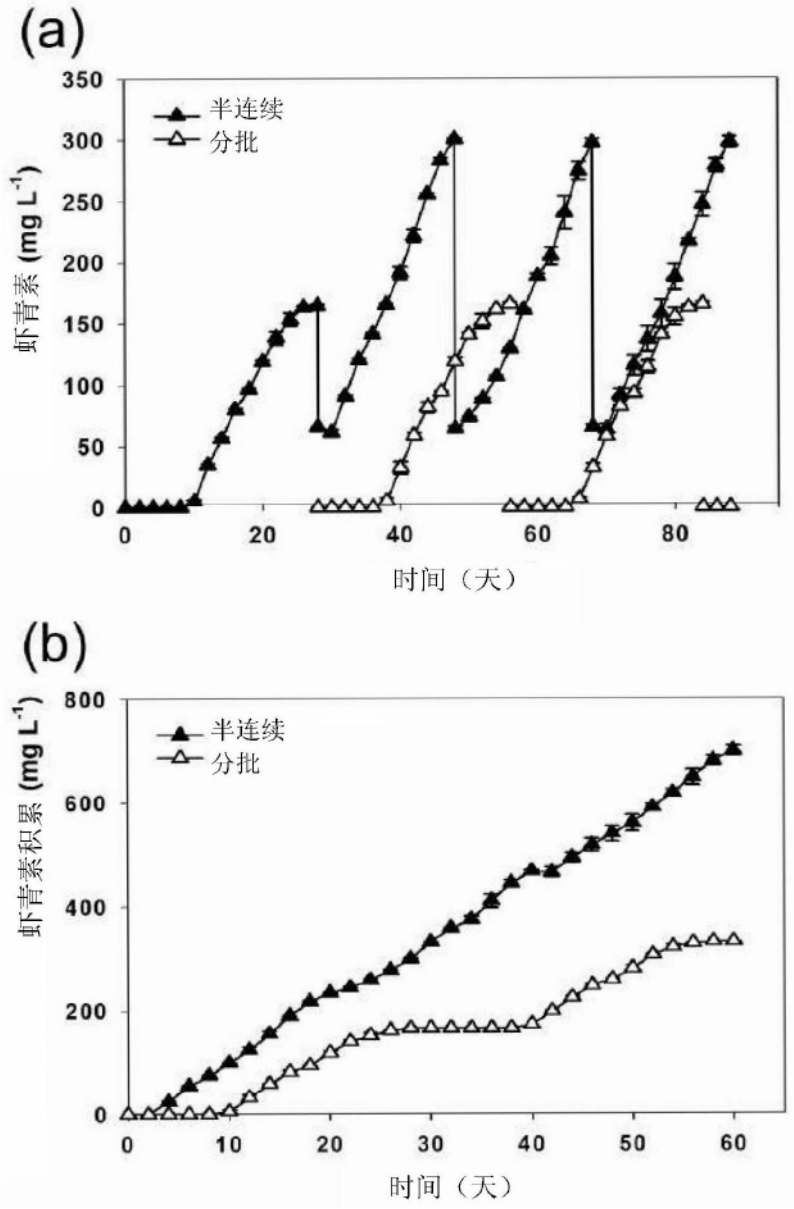


图7

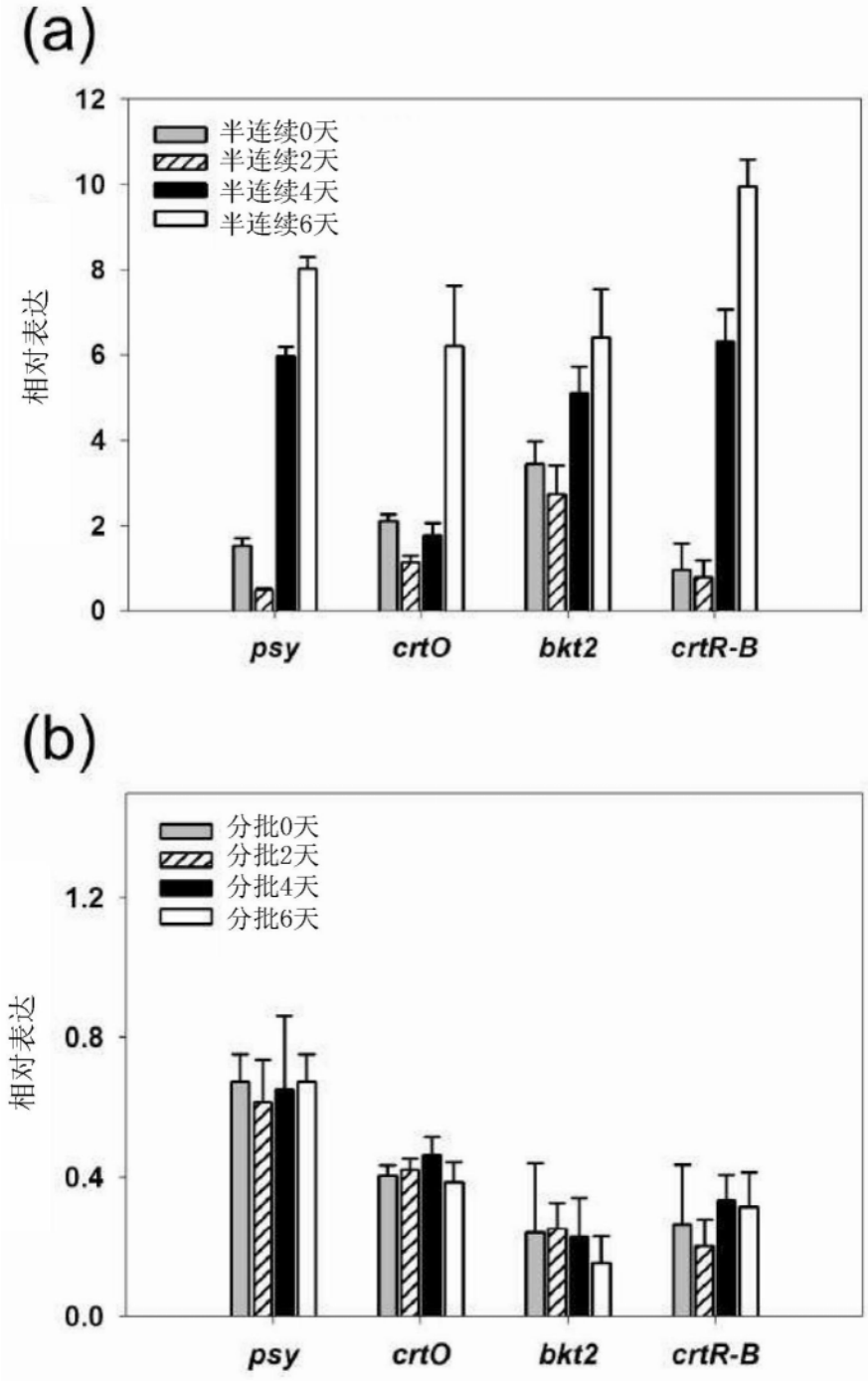

(a)
12
10
8
6
4
2
0
相对表达
半连续0天
半连续2天
半连续4天
半连续6天
psy
crtO
bkt2
crtR-B
(b)
1.2
0.8
0.4
0.0
相对表达
分批0天
分批2天
分批4天
分批6天
psy
crtO
bkt2
crtR-B

图8

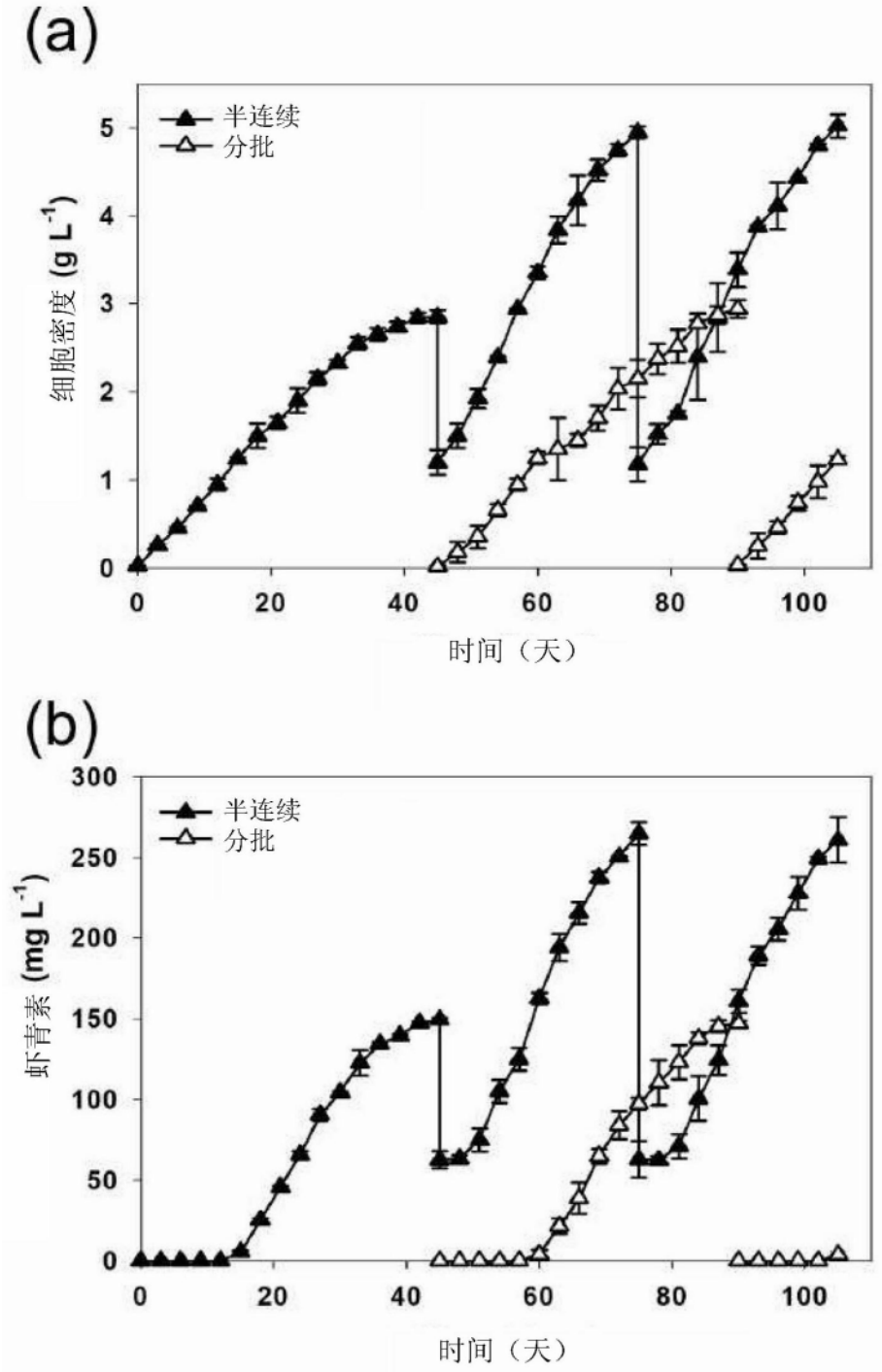

(a)
半连续
分批
细胞密度 (g L-1)
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80
100
时间（天）
(b)
半连续
分批
虾青素 (mg L-1)
0
50
100
150
200
250
300
0
20
40
60
80
100
时间（天）

图9