

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610128162.9

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1928066A

[22] 申请日 2006.9.6

[21] 申请号 200610128162.9

[30] 优先权

[32] 2005.9.6 [33] JP [31] 2005-258299

[71] 申请人 雅马哈发动机株式会社

地址 日本静冈县磐田市

[72] 发明人 张 凯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称

虾青素含量高的绿藻及其制造方法

[57] 摘要

本发明公开了在供给二氧化碳的条件下,以 25000 $\mu\text{mol} - \text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以上的光合成有效光量子通量输入进行光照,在营养培养基中培养胞囊化的绿藻,以便获得含有的虾青素量在 700pg/细胞或以上的绿藻,含有浓度 5wt% 或以上的虾青素的绿藻干制品,和含有浓度 150mg/L 培养物悬浮液的虾青素的绿藻的培养悬浮液。优选属于红球藻属的绿藻。

1. 一种生产绿藻的方法，该方法包括在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述营养培养基是自养培养基。
3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述光合成有效光量子通量输入是 $750000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以下。
4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述绿藻含有的虾青素在 $700\text{p g}/$ 细胞或以上。
5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述绿藻所含有的虾青素浓度按藻体湿重计在 $1.2\text{wt}\%$ 或以上以上。
6. 一种绿藻，其虾青素含量在 $700\text{ pg}/$ 细胞或以上。
7. 一种绿藻，其虾青素浓度按藻体湿重计在 $1.2\text{wt}\%$ 或以上。
8. 权利要求 6 所述的绿藻，其是属于红球藻属 (*Haematococcus*) 的单细胞藻类。
9. 权利要求 8 所述的绿藻，其是雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 。
10. 一种生产绿藻干制品的方法，该方法包括在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻，和

干燥获得的绿藻。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述培养基是自养培养基。

12. 权利要求 10 所述的方法，其中所述光合成有效光量子通量输入是 $750000 \mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以下。

13. 权利要求 10 所述的方法，其中所述干制品含有的虾青素浓度在 5wt%以上。

14. 绿藻干制品，其含有的虾青素浓度在 5wt%或以上。

15. 权利要求 14 所述的绿藻干制品，其中所述绿藻是属于红球藻属的单细胞藻类。

16. 权利要求 15 所述的绿藻干制品，其中所述绿藻为雨生红球藻。

17. 一种绿藻培养液的制备方法，该培养液含有的虾青素浓度为每 1L 培养液中含有 150mg 或以上，该方法包括：

在供给二氧化碳的条件下，以 $25000 \mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻。

18. 权利要求 17 所述的方法，其中所述培养基为自氧培养基。

19. 权利要求 17 所述的方法，其中所述光合成有效光量子通量输入是 $750000 \mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以下。

20. 绿藻培养液，其包含的虾青素浓度为每 1L 培养液中含有 150mg 或以上。

21. 权利要求 20 所述的绿藻培养液，其中所述绿藻是属于红球藻属的单细胞藻类。

22. 权利要求 21 所述的绿藻培养液，其中所述绿藻为雨生红球藻。

23. 一种生产虾青素的方法，包括：

在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻；
使所获得的绿藻干燥；和
从得到的绿藻干制品中抽提虾青素。

虾青素含量高的绿藻及其制造方法

【技术领域】

本发明涉及虾青素的高效生产。更具体而言，涉及虾青素含量高的绿藻及其制造方法。

【背景技术】

已知虾青素是红色类胡萝卜素之一，具有很强的抗氧化作用。因此用作食物、化妆品、保健食品和医药品中的色素。虾青素除了化学合成，还可来自天然产物。来自天然产物的虾青素从螯蛄虾（euphausiids）、南极磷虾（*Pandalus borealis*）等虾类（Eucarida）、法夫（*Phaffia*）酵母和藻类等中提取而来。但是在螯蛄虾等虾类和酵母中虾青素的含量很低，不能有效地抽提虾青素。

另一方面，藻类适应外界环境改变而形成胞囊并在藻体内集聚虾青素。为此对以藻类生产虾青素进行了研究。非专利文献 1 中，报道了 2 步培养方法，即将红球藻（*Haematococcus*）的营养细胞以每天 10~40% 的量置换培养液进行培养（流加式培养），再在光照条件下批式培养 15 天。专利文献 1 中报道了在培养末期改变培养基成分中碳元素和氮元素的比率培养红球藻生成虾青素的方法。专利文献 2 报道了用添加了金属盐的培养基培养红球藻生成虾青素的方法，但该文献没有记载藻体中虾青素的含量。

专利文献 3 以干的藻体中虾青素含量的实例，记载了其数值为 0.3~10wt%，但在限制氮源、以 40000 勒克斯（lx）光照的培养条件下培养的实例中，达到大约 2% 的水平，并未得到虾青素浓度达到或超过 10wt% 的藻体。而专利文献 4 报道在室外培养池中培养的红球藻中虾青素含量可达按藻体计的 4.5wt%。

另外，在每个藻体内虾青素含量的研究方面，例如在专利文献 5 和非专利文献 2 中，报道了在 30℃、有铁离子和乙酸存在的条件下，产生约 600 pg/细胞的虾青素。而在专利文献 6 中，报道有可能将虾青素含量提高到 700 pg/细胞或以上。但实际上并未得到含有如此高浓度虾青素的藻类，即使在专利文献 6 实施例中记载的最高值也不过 156 pg/细胞。

专利文献 7 中，公开报道了将含有叶黄素的微藻，例如形成胞囊的微藻接种到营养培养基中使营养细胞生长生长，并进一步使其形成胞囊，高效制造叶黄素的方法。在该专利文献 7 的实施例中，干燥藻体中叶黄素(虾青素)的最高含量是 3.5wt%。

为了高效制造虾青素，希望得到含有更高浓度虾青素的藻类。

【专利文献 1】特表平 2-501189 号公报

【专利文献 2】特开平 1-187082 号公报

【专利文献 3】特开平 3-83577 号公报

【专利文献 4】特开 2000-60532 号公报

【专利文献 5】特开平 7-39389 号公报

【专利文献 6】特开 2004-129504 号公报

【专利文献 7】国际公开第 2005/116238 号单行本

【非专利文献 1】Fabregas 等、J.Biotech.,89,p.65-71,(2001)

【非专利文献 2】Tjahjono 等、BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol.16,p133-138,(1994)

发明概述

本发明的目的是提供一种在细胞内虾青素浓度高的藻类。

本发明提供一种制造绿藻的方法，该方法包括在供给二氧化碳的

条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻的工艺。

本发明还提供含有 $700\text{ pg}/\text{细胞}$ 或以上虾青素的绿藻。

本发明还提供含有按藻体湿重计虾青素浓度在 $1.2\text{wt}\%$ 或以上的绿藻。

本发明还提供绿藻干制品的制造方法，该方法包括：

在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻的工艺，以及

将获得的绿藻干燥。

本发明还进一步提供含有虾青素浓度在 $5\text{wt}\%$ 或以上的绿藻干制品。

本发明还进一步提供为每 1L 培养液中含有的虾青素浓度为 150mg 或以上的绿藻培养液制备方法，该方法包括：

在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻。

本发明还提供每 1L 培养悬浮液中含有的虾青素浓度为 150mg 或以上的绿藻培养悬浮液。

本发明还提供生产虾青素的方法，该方法包括：

在供给二氧化碳的条件下，以 $25000\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入进行光照，在营养培养基中培养胞囊化的绿藻；干燥得到的绿藻；和

从得到的绿藻干制品提取虾青素。

在一个实施方案中，在上述方法中营养培养基为自养培养基。

在一个实施方案中，上述方法中的光合成有效光量子束投入量是750000 $\mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 以下。

在一个实施方案中，绿藻是属于红球藻属 (*Haematococcus*) 的单细胞藻类，优选雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 。

根据本发明，提供虾青素含量为 700p g/细胞或以上的绿藻。因为绿藻每细胞的虾青素含量低，通过使用这种绿藻，虾青素的生产效率比以前大大提高。

附图简述

图 1 表示每个细胞虾青素含量随培养时间发生变化的坐标图。

图 2 表示每个细胞虾青素生成速率随培养时间发生变化的坐标图。

图 3 表示按干藻体计虾青素含量随培养时间发生变化的坐标图。

图 4 表示培养悬浮液中虾青素浓度随培养时间发生变化的坐标图。

图 5 表示每单位体积培养悬浮液中虾青素生成速率随时间发生变化的坐标图。

图 6 表示培养悬浮液中固形物的干重随培养时间发生变化的坐标图。

发明详述

通过本发明，可以提供每个细胞含有虾青素 700p g /细胞或以上，优选 1000p g /细胞或以上的绿藻。该绿藻可在光照培养条件下诱导胞囊生成而获得。优选是将已成胞囊的绿藻接种在营养培养基中，在通气泡条件下，于强光照射的条件中培养来获取。采用这种培养方法，可以得到按干重计虾青素浓度在 5wt%(50mg/g 干燥藻体)或以上，优选 6wt%(60mg/g 干燥藻体)或以上的绿藻干制品。甚至培养液虾青素浓度

达到 150mg/L 或以上,优选为 200/L 或以上, 优选为 250mg/L 或以上。

以下就虾青素含量为 700p g/细胞或以上的绿藻、虾青素含量 5wt%(50mg/g 干燥藻体)或以上的绿藻以及含有的虾青素浓度达到 150mg/L 的绿藻培养悬浮液加以说明。

本发明的方法,其特征是将含有虾青素的绿藻,优选是形成胞囊的绿藻接种到生长培养基中使之生长,再在光照下使其形成胞囊。将含有虾青素的绿藻,优选是大量积聚虾青素的的形成胞囊的绿藻接种到生长培养基中使之生长时,形成胞囊的绿藻释放出含有虾青素的游动孢子。该游动孢子成为含有虾青素的营养细胞。如此,通过使这种生长含有虾青素的绿藻(营养细胞)再形成胞囊,新的虾青素便在绿藻中产生和积聚。因此,通过本发明的方法形成胞囊的绿藻中,除本来存在于绿藻内的虾青素外,还含有新产生的虾青素,因而提高了虾青素的含量。

绿藻

在本发明中采用的绿藻,只要有产生虾青素能力的绿藻即可,无特别限制。例如可以优选采用属于红球藻属(Haematococcus)的单细胞藻类。可用的绿藻的例子,有雨生红球藻(H.pluvialis)、湖生红球藻(H.lacustris)、红球藻(H.capensis)、红球藻(H.droebakensi)和津巴布韦红球藻(H.zimbabwiensis)等。

雨生红球藻(H.pluvialis)的藻株包括保藏在独立行政法人国立环境研究所的 NIES144 株、保藏在美国德克萨斯大学藻类保藏机构的 UTEX2505 株、保藏在丹麦哥本哈根大学植物学研究所斯堪的纳维亚藻类和原生动物保藏中心(Scandinavian Culture Center for Algae and Protozoa, Botanical Institute)的 K0084 株等。

湖生红球藻(H.lacustris)藻株有保藏在 ATCC 的 ATCC30402 株

和 30453 株、保藏在东京大学应用微生物学研究所的 IAM C-392、IAMC-393、IAMC-394 株和 IAMC-339 株、或 UTEX16 株及 IAM294 株等。

红球藻 (*H.capensis*) 有 UTEX LB1023 株。

红球藻 (*H.droebakensi*) 有 UTEX55 株。

津巴布韦红球藻 (*H.zimbabwiensis*) 有 UTEX LB1758 株等。

其中雨生红球藻最适采用。

(胞囊形成)

本发明中，采用含有虾青素的上述绿藻。绿藻在受到来自环境的营养不足、存在氧化物等胁迫因子作用时，便积聚虾青素，形成休眠孢子。进入休眠状态即称为胞囊形成。本说明书中，胞囊形成指从进入休眠状态开始积聚虾青素的状态到完全形成胞囊成为休眠孢子的全部状态。为提高虾青素含量起见，应采用尽可能多形成胞囊，大量积聚虾青素的绿藻。同时，此处使用的所谓[培养形成了胞囊的绿藻]，也包含在绿藻达到胞囊状态后，接种已经在营养培养基生长了的含有虾青素的绿藻。

(培养基)

培养绿藻所用的培养基并无特别限制。一般使用含有为生长生长必需的氮源、微量金属的无机盐（例如磷、钾、镁、铁等）、维生素类（例如硫胺素等）等的培养基。例如 VT 培养基、C 培养基、MC 培养基、MBM 培养基、MDM 培养基等（这些培养基可参见《藻类研究法》，千原光雄、西泽一俊编，共立出版（1979））、OHM 培养基（参见非专利文献 1）BG-11 培养基及将它们加以改变的培养基。本发明中，为防止杂菌混入，优选采用实际上不含有机碳源的自养培养基。

可以根据这些培养基的使用目的来选择生长培养基，所述目的例如生长或形成胞囊。例如为生长生长绿藻，采用含氮源成分多的培养基（富营养培养基：含氮源 0.15g/L 以上的培养基）。为形成胞囊，则采用含氮源成分少的培养基（胞囊形成培养基：含氮源 0.02g/L 以下的培养基）。任选也采用氮源浓度处于上述两种培养基氮源浓度之间的培养基（低营养培养基：含氮源 0.02g/L 以上，0.15g/L 以下）。

培养基中的氮源浓度，磷浓度和培养基的其他性质最好根据待接种绿藻的量来确定。例如，当开始培养时绿藻浓度为 10^5 的程度，如果采用低营养培养基，则绿藻只有一定程度的生长生长，因为氮源不足，生长生长很快停止。在这种情况下，低营养培养基适合于连续进行以单步骤（批式）生长和胞囊形成。此外，将 N/P 比（摩尔比）调整到 10~30，优选为 15~25，可以诱导胞囊形成。

当用于接种的绿藻浓度更高时，可以采用富营养培养基进行上述培养。

可以根据各种条件来确定这些培养基的成分。而优选适用于本发明的培养基，即自养培养基，由于几乎不含有乙酸或葡萄糖等有机碳源，即使培养时间很长，也几乎没有杂菌混入。

（培养装置）

绿藻的培养装置没有特别限制，只要能供给二氧化碳并能光照培养悬浮液即可。例如在小型培养试验中，可以优选使用扁平培养瓶。大规模培养时，可以用玻璃或塑料等透明板材构成的培养罐，必要时其装备了照明设备和搅拌机培养罐。这类培养罐的例子是平板型培养罐，管型培养罐，充气型（airdome）培养罐或中空圆筒型培养罐等等。任何情况下优选是密闭的容器。

（培养条件）

培养条件没有特别限制，采用一般培养绿藻的温度和 pH 等。绿藻的培养可在例如 15~35℃，优选 20~25℃下进行。整个培养过程中的 pH 保持 6~8 即可。二氧化碳以 0.2~2 vvm 的速率通入含有 1~3v/v% 二氧化碳的气体来供应。在采用平板培养罐罐时，通过供给二氧化碳而搅拌培养液，使得绿藻收到均匀的光照。

（光照）

本发明中，对绿藻的培养物施以光照，使得光合成有效光量子通量输入为 25000 $\mu\text{mol-光子}/\text{m}^3/\text{s}$ （此单位以下简化为 $\mu\text{mol-p}/\text{m}^3/\text{s}$ ）水平的。为增加虾青素生成量起见，可以用 30000 $\mu\text{mol-p}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上的光合成有效光量子通量输入，更优选 40000 $\mu\text{mol-p}/\text{m}^3/\text{s}$ 或以上。此外，由于强光会抑制光合成而停止细胞的生长生长，所以光合成有效光量子束投入量应在 750000 $\mu\text{mol-p}/\text{m}^3/\text{s}$ 以下。从开始培养到形成胞囊为止的培养全过程中都以这样的光合成有效光量子通量输入进行光照，虾青素的产量将增加非常多。

光合成有效光量子通量输入通过先测定光合成有效光量子通量密度（PPFD）来求出。在培养装置的几个部位安装平面光量子传感器-LI-190(LICOR 公司，Lincoln，美国)，测定光照的各部位的 PPFD，将测定值平均，即可求出 PPFD。有多个光源时的 PPFD，则将每个光源所接受的 PPFD 加以合计。在用玻璃或丙烯酸树脂等透明板材构成的装置中，通过透明板测定 PPFD，然后测定根据获得测定的 PPFD 所需的光源强度或光源的距离，配置光源。采用两块透明平板构成的培养罐罐，从培养罐两侧照射光时，则其数值为两侧的 PPFD 值相加。

光合成有效光量子通量输入根据以下公式求出

$$\text{光合成有效光量子通量输入} = \frac{\text{PPFD} (\mu \text{mol-p}/\text{m}^2/\text{s}) \times \text{受光面积} (\text{m}^2)}{\text{培养液体积} (\text{m}^3)}$$

（培养方法）

适当选择上述培养基、培养装置、培养条件等并加以组合，在光照条件下进行培养。培养方法有两种。一种是在同一培养基中使形成胞囊的绿藻连续生长生长和形成胞囊，这是一步培养法；另一种是二步培养法，使形成胞囊的绿藻生长生长的培养基和是生长的绿藻形成胞囊的培养基是不同的培养基，并且分别进行生长生长和形成胞囊。

（一步培养法）

一步法是从接种形成胞囊的绿藻到营养培养基中开始到培养结束，不更换培养基连续培养形成胞囊的绿藻的方法。即，用预定的培养基在同一培养罐罐中进行绿藻的生长生长和胞囊形成。采用这种一步培养法，绿藻一旦生长生长，在以下的至少一种胁迫下即转而形成胞囊状态：消耗了培养基中的营养成分而受到营养缺少的胁迫，受到光照的胁迫生长。用这种一步法得到的形成胞囊的绿藻，可以用于以后的一步培养或用于接种到下述的二步法培养的培养基中。

接种含有虾青素的绿藻，优选是形成胞囊的绿藻到营养培养基中，绿藻释放出 2^n ($n=1\sim 4$) 个含有虾青素的游动孢子。这些游动孢子变成仍含有虾青素的营养细胞，所以增加了含虾青素的营养细胞数目（换言之即绿藻生长可以生长）。通过将含有虾青素的营养细胞形成胞囊，即在绿藻中原有包含的虾青素的基础上积聚了新的虾青素，因而显著提高了细胞内虾青素的含量。

据信如果连续使营养细胞生长生长，营养细胞内的虾青素浓度最终将会降低，因此生长应在细胞内保留着虾青素的点停止生长。

为了在营养细胞生长生长到某种程度时的点停止绿藻生长，优选把培养基设计为营养不足的状态。为此，在一步法中，优选含氮源浓度较低的培养基，例如上述低营养培养基。在大量接种形成胞囊的细

胞时，则，应采用高氮源培养基，例如上述高营养培养基。

此外，当绿藻在低营养培养基中生长不充分时，也可以追加高营养培养基或低营养培养基，使绿藻生长到所需浓度。

再者，采用低营养培养基时，将 N/P 比（摩尔比）调整到 10~30，更合适为 15~25，可以使生长后顺利形成胞囊。

采用一步法，优点是工艺管理简便，由于不必转移到其它培养罐，可防止杂菌污染，而且只用一个培养罐，不仅如此，还可以简便地得到含有高浓度虾青素的绿藻。

（二步培养法）

二步培养法是先使形成胞囊的绿藻在营养培养基中生长，然后用形成胞囊的培养基代替营养培养基，使之形成胞囊的培养方法。换句话说，二步培养包含首先将会形成胞囊的绿藻接种到营养培养基，最好是高营养培养基中使绿藻生长的第一步，以及收集绿藻，并转移到几乎不含有氮源的形成胞囊培养基中使之形成胞囊的第二步。

在第一步工艺中，绿藻的生长必须在虾青素保留在营养细胞中的时候停止，所以在营养培养基中的培养时间要短。如果培养开始时采用高营养培养基，营养细胞的生长速度要比在低营养培养基中更快，所以优选采用高营养培养基。生长结束后收集绿藻，转移到形成胞囊的培养基中，在第二步形成胞囊。

第一步和第二步，可以分别在不同的培养罐中进行批式培养。也可以在第一步结束后，将生长的绿藻洗净回收，放回同一培养罐进行第二步。

采用这种二步培养法可以得到虾青素含量高的绿藻细胞。这种二

步培养法的优点是比一步培养法生长工艺时间短，但中途必须经过将生长的绿藻加以转移的操作。

得到的形成胞囊的绿藻，一部分可以用于回收虾青素，剩下的部分则可用于再接种到营养培养基中。

（虾青素量的测定）

通过上述培养，可得到每 1L 培养悬浮液含虾青素（游离的或未酯化的形式）浓度达到 150mg/L 或以上，优选 150~250mg/L，更优选为 200~250mg/L 的绿藻培养悬浮液。单位体积培养悬浮液中虾青素量可通过收集预定体积的培养悬浮液并测定收集的培养悬浮液中所含虾青素的量来求得。

样品（培养悬浮液）中虾青素量（游离或未酯化的形式）可采用例如以下方法测定。首先，收集一定量样品，清洗，置于干净的玻璃珠细胞研磨专用小管中。向同一小管中加入氧化锆珠，加入丙酮，用玻璃珠细胞研磨破碎。破碎后，将样品离心分开上清液和沉淀，回收上清液（即，丙酮级分）。向沉淀中再加入丙酮，进行同样操作，如此反复直至沉淀完全成白色。将回收的丙酮级分组合，用二甲亚砜（DMSO）稀释 100 倍，测定 492nm 波长下的吸光度（ A_{492} ）和 750nm 波长下的吸光度（ A_{750} ）。回收的丙酮级分（样品）中的虾青素浓度用以下公式计算，根据此测定值，可求得培养液中虾青素的含量。

$$\text{样品中的虾青素浓度} (\mu\text{g/mL}) = 4.5 \times 100 \times (A_{492} - A_{750})$$

（含虾青素的湿藻体）

按上述条件进行的培养，可以得到含有 700p g/细胞或以上，优选 800p g/细胞或以上，更优选 900p g/细胞或以上，更优选 1000p g/细胞或以上的虾青素（游离体）的绿藻。用本发明的方法，可得到含有 1100p g/细胞，或以上（例如 1200p g/细胞）虾青素的绿藻。

此处所谓湿藻体，指未从藻体中除去水分，藻体内充满液体的藻体。例如存在于培养悬浮液中的绿藻。

此外，收集预定量的绿藻，根据测定收集的绿藻细胞数量和从细胞中抽提出的虾青素量，可以求得每个细胞中虾青素的量。细胞数量可以用诸如测定粒径分布的装置（SYSMEX FPI-3000）来测定。

（含虾青素的绿藻干制品）

采用本领域技术人员通用的干燥手段（转鼓干燥，热风式干燥、喷雾干燥、或冷冻干燥）将上述含虾青素的湿藻体进行干燥，即可得到绿藻干制品。

得到的绿藻干制品，含有虾青素（游离或未酯化形式）的浓度在5wt%或以上。优选为5~8wt%，更优选为6~7wt%。而此处所指的“干制品”中所含水分7wt%或以下，优选为5wt%，更优选为大约2wt%。

（虾青素的制造方法）

从得到的绿藻干燥物抽提虾青素和收集提取的虾青素，可以制造虾青素。虾青素的抽提收集方法并无特别限制，采用本领域技术人员通常使用的方法。例如将绿藻干燥物加以机械破坏后，然后从其中抽提虾青素。抽提方法包括用氯仿、己烷、丙酮、甲醇、乙醇等有机溶剂，或用食用油脂抽提的化学方法，或通过压榨绿藻干燥物抽提的物理方法。或者也可以采用超临界抽提法抽提回收。抽提后，采用浓缩、结晶、合成树脂分部分离等方法可以纯化虾青素。

实施例

以下用雨生红球菌（*H.pluvialis*）K0084株为例来说明本发明，但本发明并不限于此实施例。

在本实施例中，虾青素量和细胞数用上述方法测定。

绿藻干重量的测定方法如下所述。首先，采取预定体积的培养液，在减压下抽滤到 GC50 玻璃纤维滤器（TOYO·ADVANTEC 制）上，为溶解无机盐，用 5mL pH4 的盐酸水溶液洗涤两次。然后将吸收绿藻的滤器置 105℃ 恒温干燥箱中干燥 3 小时，在真空干燥器中于室温下冷却 1 小时，测定干重。GC50 玻璃纤维滤器要预先在上述恒温干燥箱中 105℃ 干燥 1 小时，并测定它的质量。将吸附了绿藻的干燥滤纸的质量减去预先测定的滤纸的干重，求出绿藻的干重。再根据一定量培养液中虾青素量的测定值，求出相应于每单位干重的虾青素量。

实施例 1

（形成胞囊的绿藻的制备）

将雨生红球菌（*H.pluvialis*）K0084 株接种到含有表 1 所述成分的培养基（低营养培养基）中。

表 1

成分	G/L
KNO ₃	0.41
K ₂ HPO ₄	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
柠檬酸（无水）	0.006
柠檬酸铁（III）铵	0.006
EDTA · 2Na	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00286
H ₃ B0 ₄	0.00181
MnCl ₄ · 4H ₂ O	0.00022
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.00008
Na ₂ MoO ₄	0.000021
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.000000494

更具体而言，即把形成胞囊的 K0084 株接种到装了 1L 低营养培养基的 1.5L 扁平培养瓶中。用白色荧光灯以 $25000\mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 的光合成有效光量子通量输入进行光照，以 0.5L/分的速率通入含 3vol% CO_2 的空气（即通气速率 0.5vvm），在 25°C 培养 K0084 株 7 天。7 天后，收集形成胞囊的 K0084 株，用低营养培养基调整藻体细胞浓度为 1.5×10^6 个/ml。

（主培养）

丙烯酸透明板制培养罐对向排列，使其内壁之间隔 3cm 的扁平培养罐，装入 9L 低营养培养基，接种 1L 上述形成胞囊的 K0084 株，以 1.5×10^5 个/ml 的浓度开始培养。在此扁平培养罐两侧各装 6 支白色荧光灯，以 $25000\mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 的光合成有效光量子通量输入进行光照，以 5L/分的速率通入含 3% 体积 CO_2 的空气（通气速率 0.5vvm），在 25°C 培养 21 天。培养过程中定期用上述方法测定培养悬浮液中虾青素含量、细胞数以及从培养液中取得的藻体干重。结果示于表 2 和图 1~6。

活细胞数在第 3 天为 6.5×10^5 个/ml，约 4 倍增长，以后即缓缓减少（图中未表示）。按每活细胞计的虾青素含量，如图 1 所示，第 14 日达到 600p g/细胞，第 18 日达到 800p g/细胞以上，第 19 日达到 900p g/细胞以上，第 21 日更达到 1000p g/细胞。又由图 2 可见，按每细胞计的虾青素生成速率，在培养的第 7 日左右达到最高，每个细胞 1 天产生约 54pg。此后每个细胞 1 天产生约 45p g。

此外，如图 3 所示，按每干燥藻体计的虾青素含量，在细胞的营养生长在第 3 日即减少，此时细胞已经植物性生长，但胞囊化开始后，其开始急剧增加，在第 7 日达到 6wt%（60mg/g 干燥藻体）。如果继续培养，按每藻体计的虾青素含量缓缓增加，到第 21 日达到 6.8wt%（68mg/g 干燥藻体）。

图 4 表示培养液中虾青素浓度随培养时间而发生的变化。在培养的第 7 日每升培养液中浓度高达 150mg，第 10 日后浓度为 200mg/L，第 21 日浓度为 250mg/L。又如图 5 所示，每 1ml 培养液每日虾青素生成速率，在培养的第 7 日左右达到最高，每培养液每日约为 19mg。此后虾青素的生成速率即渐渐降低。

图 6 表示随着培养时间延长，培养液中固形物的质量逐渐增加，到第 13 日达到高峰，以后即几乎无变化。如果考虑到活细胞缓缓减少的情况，固形物质量的增加，可认为是由于胞囊形成而造成细胞重量增加所引起的。

(比较例 1)

除了以 $12000\mu\text{mol}\cdot\text{光子}/\text{m}^3/\text{s}$ 的光合成有效光量子通量输入进行光照之外，用与实施例 1 相同条件培养，在第 21 日测定按每湿藻体计的虾青素浓度、干燥藻体中虾青素浓度、以及每升培养液中虾青素的含量。结果表示在表 2 中。

(比较例 2)

方法，除采用按非专利文献 2 所述的 $8000\mu\text{mol}\cdot\text{p}/\text{m}^3/\text{s}$ 的光合成有效光量子通量输入进行光照外，用与实施例 1 相同条件进行培养，在第 21 日测定按每湿藻体计的虾青素浓度、干燥藻体中虾青素浓度、以及每升培养液中虾青素的含量。结果表示在表 2 中。

表 2

	光合成有效光量子通量输入* ¹	第 21 日的虾青素浓度			
		pg/细胞	%(w/w 每湿藻体)	%(w/w 每干燥藻体)	mg/L 培养液
实施例 1	25000	1000	2.7	6.8	250
比较例 1	12000	650	1.8	4.7	140
比较例 2	8000	250	1.3	3.1	120

*¹: $\mu\text{mol}\cdot\text{p}/\text{m}^3/\text{s}$

在产业上应用之可能性

因为本发明的藻类比以往通用的藻类含有更高浓度虾青素，从而可以大大提高虾青素的生成效率，所述虾青素在抗氧化剂、食品、医药品、化妆品等领域使用。因此，在有效制造虾青素的方法中，本发明的藻类非常有用。

本发明可以以其他形式实施而不偏离本发明的精神或关键的特征。本发明公开的实施方案应当在所有的方面被视为示例性的而不是限制性的。本发明的范围由权利要求指明，而不是由上述说明书指明，处于与权利要求等同的含义和范围的所有改变应当包括在内。

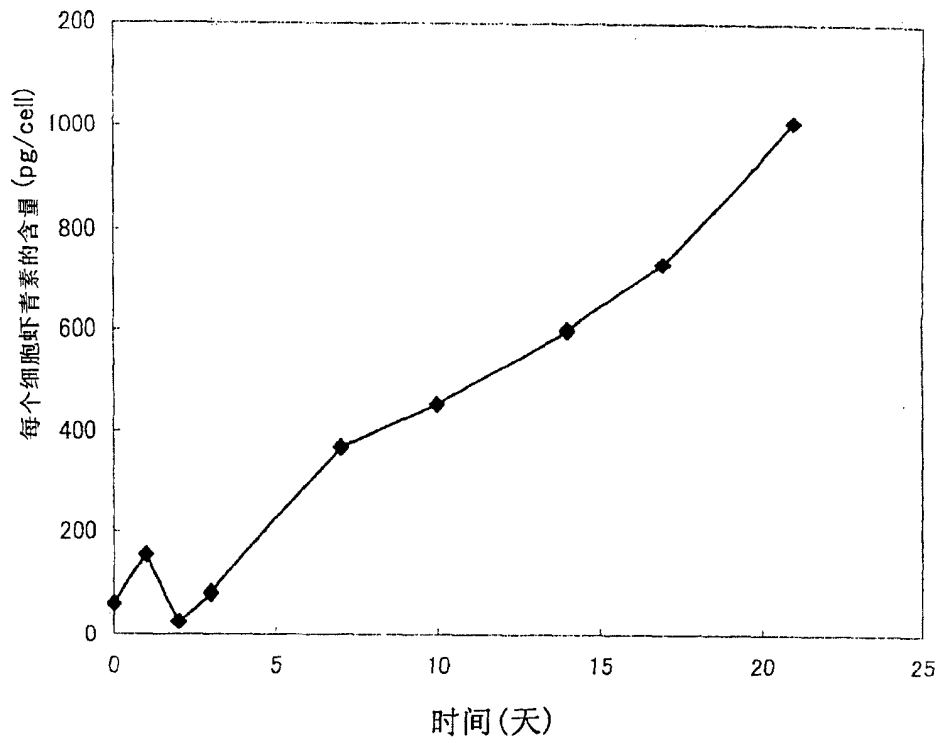


图1

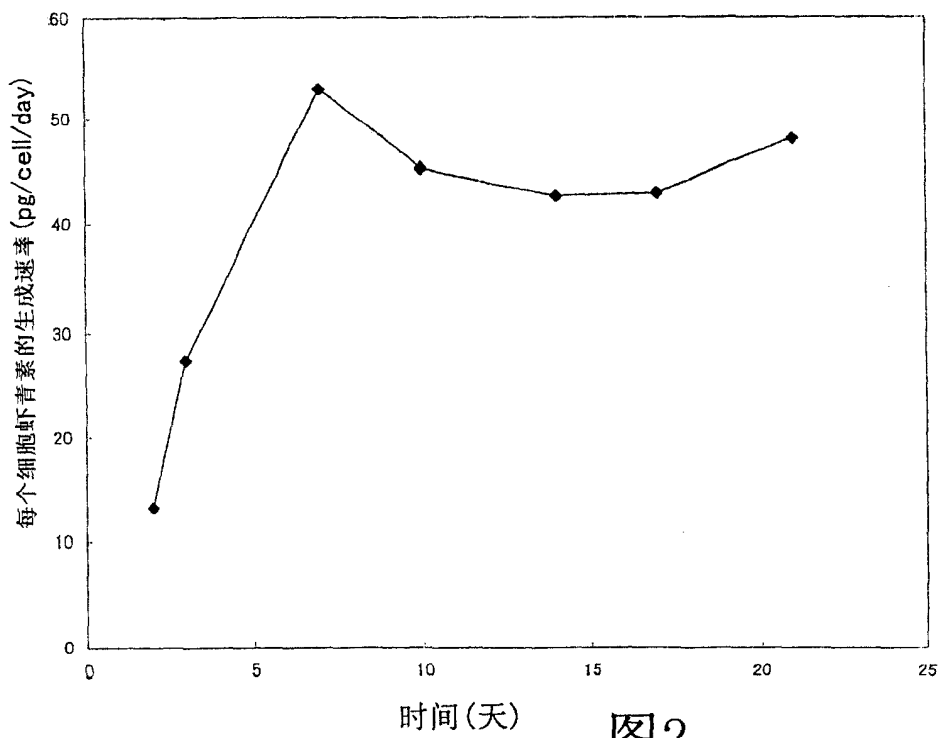


图2

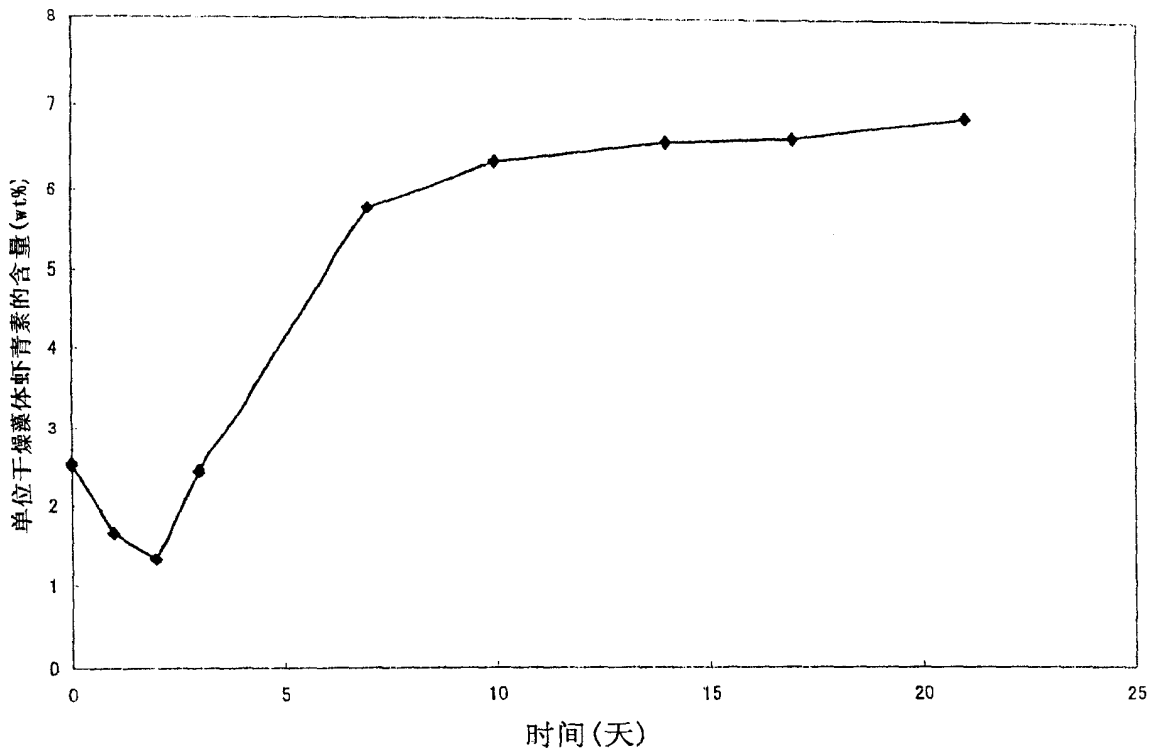


图3

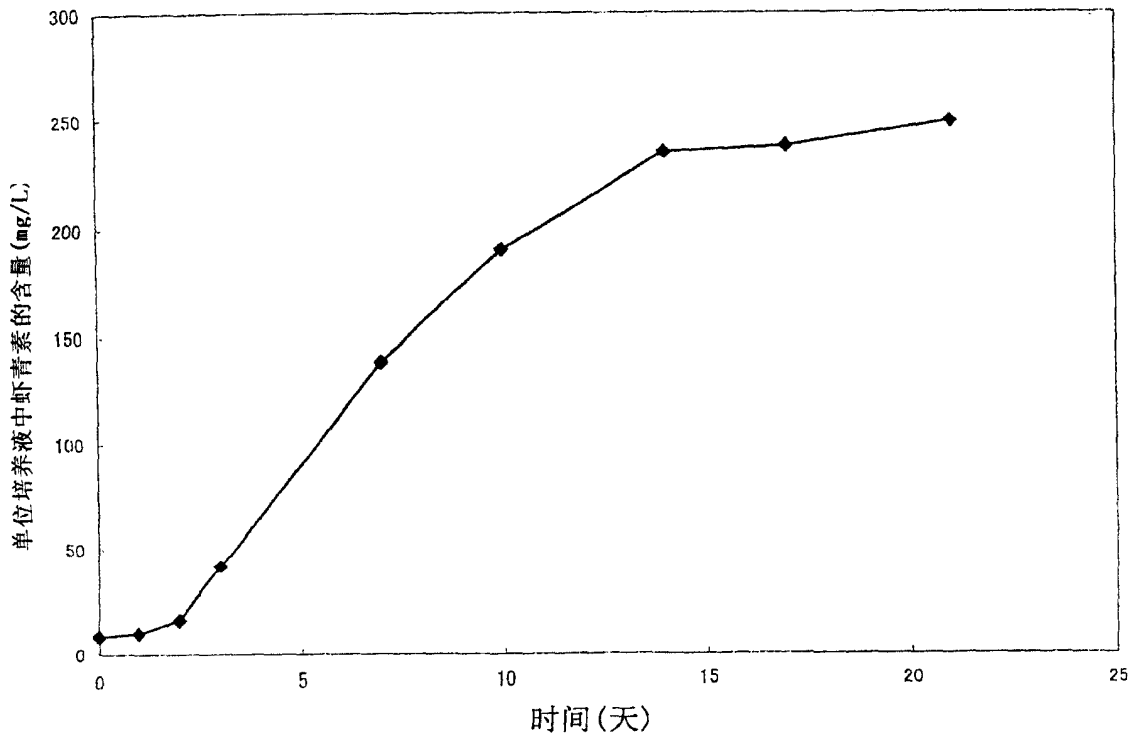


图4

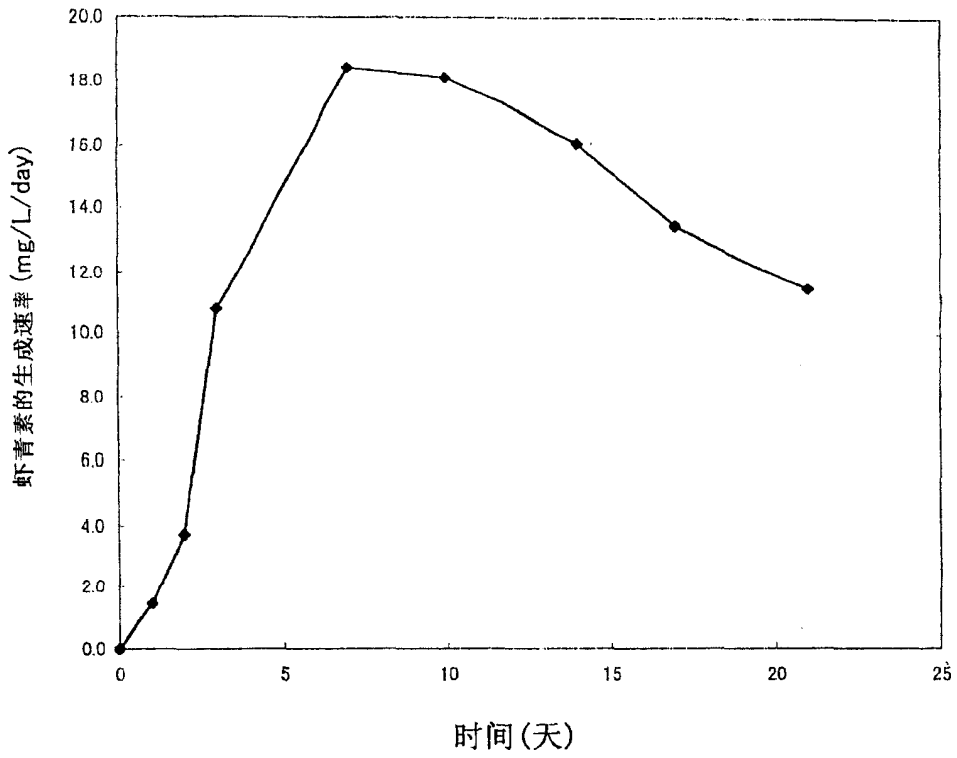


图5

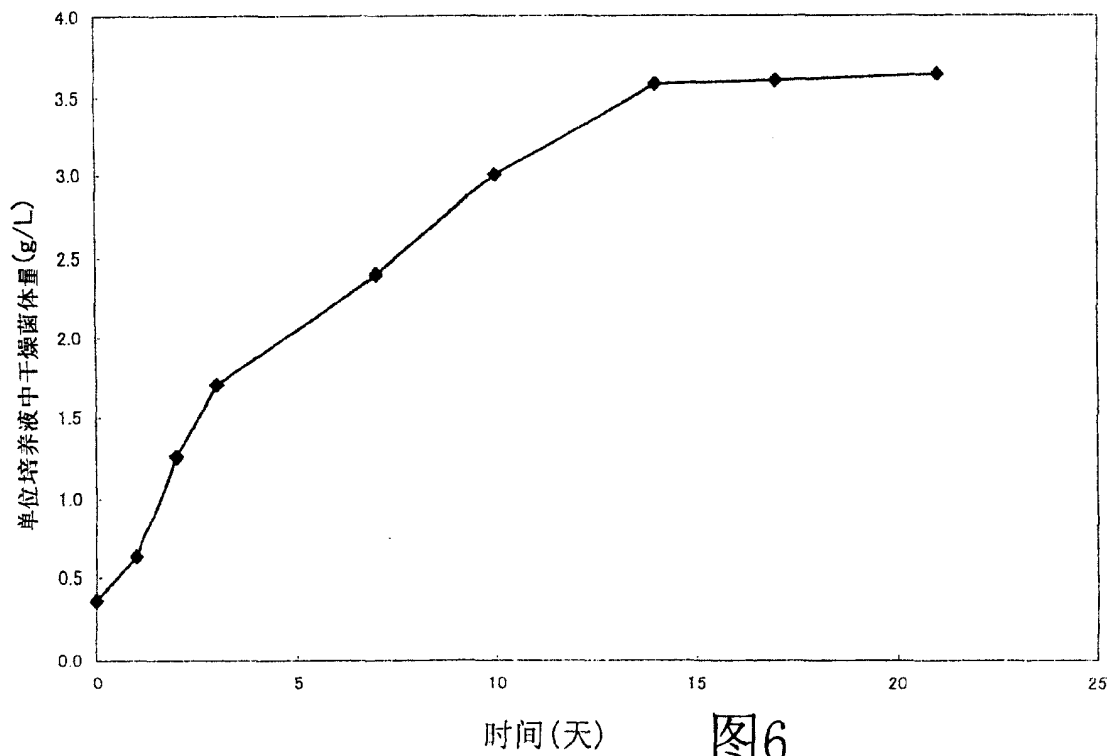


图6