



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102271525 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 200980149978. 1

(22) 申请日 2009. 10. 14

(30) 优先权数据

61/105, 121 2008. 10. 14 US

61/157, 187 2009. 03. 03 US

61/173, 166 2009. 04. 27 US

61/246, 070 2009. 09. 25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 06. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/060692 2009. 10. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/045368 EN 2010. 04. 22

(83) 生物保藏信息

PTA-10396 2009. 10. 13

PTA-10397 2009. 10. 13

(73) 专利权人 索拉兹米公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·布鲁克斯 S·富兰克林

J·阿维拉 S·M·戴克尔

E·巴利乌 W·莱基特斯基

J·皮斯基 D·兹达尼斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隗永良

(51) Int. Cl.

A23D 7/005(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5547699 A, 1996. 08. 20,

US 5547699 A, 1996. 08. 20,

吴庆余. 自养小球藻转化为异养代谢生长后细胞的超微结构与相关生化组成. 《南京大学学报(自然科学版)》. 1993, (第04期),

NI Krinsky, A Gordon, AI Stern.

The Appearance of Neoxanthin during the Regreening of Dark-grown Euglena. 《Plant Physiology》. 1964, 第39卷(第3期),

R. James Henderson, John W. Leftley, John R. Sargent. Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. 《Phytochemistry》. 1988, 第27卷(第6期),

LAHAYE. Determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some sea vegetable. 《Journal of the Science of Food and Agriculture》. 1991, 第54卷(第4期), 587-594页.

审查员 吕茜

权利要求书8页 说明书84页

序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

微藻生物质的食品组合物

(57) 摘要

本发明提供与一种或多种其它可食用成分组合的藻类物质、藻油、包含微藻生物质的食品组合物、全微藻细胞和/或微藻油, 以及通过合并藻类物质或藻油与其它可食用成分来制作这种组合物的方法。在优选的实施例中, 微藻组分得自异养生长和繁殖的微藻培养物, 其中藻细胞包含按干重计至少10%的藻油。

1. 一种食品组合物,包含至少 0.1% w/w 的来自原壳小球藻品种的藻的藻类物质和一种或多种其它可食用成分,其中所述藻类物质 (i) 在异养条件下产生;(ii) 包含按干重计至少 10% 的油,以及 (iii) 绿色色素减少,其中不到 5 重量%的油是二十二碳六烯酸 (DHA) (22:6)。

2. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含按干重计 25% 到 35% 的油。

3. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中至少 50 重量%的所述藻油是单不饱和油。

4. 根据权利要求 3 所述的食品组合物,其中至少 50 重量%的所述藻油是 18:1 脂质,并且以甘油脂的形式含在其中。

5. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中不到 2 重量%的所述藻油是二十二碳六烯酸 (DHA) (22:6)。

6. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻油主要或完全地包裹在所述生物质的细胞内部。

7. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含 4-7% 的游离糖。

8. 根据权利要求 7 所述的食品组合物,其中所述游离糖包括至少一种选自葡萄糖、蔗糖和麦芽糖的糖。

9. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含按干重计 20% 到 40% 的碳水化合物。

10. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含按重量计至少 20% 的总膳食纤维。

11. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含 15-25% 的可溶性纤维。

12. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含 5-10% 的不溶性纤维。

13. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类物质包含 0-115mcg/g 的总类胡萝卜素。

14. 根据权利要求 13 所述的食品组合物,其中所述总类胡萝卜素包含 0-70mcg/g 的黄体素。

15. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述生物质主要是溶解的细胞。

16. 根据权利要求 15 所述的食品组合物,其中所述生物质是匀浆。

17. 根据权利要求 16 所述的食品组合物,其中所述匀浆是微化的匀浆。

18. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其为色拉调味品、蛋制品、烘烤食品、面包、食棒、意大利面、沙司、汤饮、饮料、冷冻甜食、黄油或果酱。

19. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述色拉调味品是乳脂状色拉调味品。

20. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述色拉调味品选自日本豆酱、牧场酱和蜂蜜芥末。

21. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述沙司是荷兰沙司。

22. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述果酱是蛋黄酱。

23. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述烘烤食品选自布朗尼、蛋糕和甜点。

24. 根据权利要求 23 所述的食品组合物,其中所述烘烤食品不含面筋。
25. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述面包是速制面包。
26. 根据权利要求 25 所述的食品组合物,其中所述速制面包是薄烤饼或饼干。
27. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述面包不含面筋。
28. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述意大利面不含面筋。
29. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述饮料选自奶、果汁、思慕雪、营养饮料和粗粉代替饮料。
30. 根据权利要求 18 所述的食品组合物,其中所述食棒选自能量棒、格兰诺拉麦片棒、蛋白质棒或粗粉代替棒。
31. 根据权利要求 29 所述的食品组合物,其中所述饮料不含乳糖。
32. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中向所述藻类生物质中添加助流剂。
33. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中向所述藻类生物质中添加抗氧化剂。
34. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述生物质已微化,并且包含按干重计至少 30%的藻油。
35. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其为非熟食品。
36. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其为熟食品。
37. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,不算归于所述生物质的藻油,其含有按重量计不到 25%的油或脂肪。
38. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,不算归于所述生物质的藻油,其含有按重量计不到 10%的油或脂肪。
39. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其不含除了归于所述生物质的藻油以外的油或脂肪。
40. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其不含蛋类。
41. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其不含归于所述生物质的藻油以外的油。
42. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质包含至少 5mg/100g 的总生育酚。
43. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质包含至少 0.15mg/g 的总生育三烯酚。
44. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质包含 0.5%到 1.2% w/w 的藻磷脂。
45. 根据权利要求 44 所述的食品组合物,其中所述磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇的组合。
46. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述食品组合物含有来自不超过单个微藻株的藻类生物质。
47. 根据权利要求 1 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质的蛋白质组分具有的氨基酸谱为,蛋氨酸:总蛋白质的 2.25% $\pm$ 0.12%;半胱氨酸:总蛋白质的 1.69% $\pm$ 0.09%;赖氨酸:总蛋白质的 4.87% $\pm$ 0.25%;苯丙氨酸:总蛋白质的 4.31% $\pm$ 0.21%;亮氨酸:总蛋白质的 8.43% $\pm$ 0.43%;异亮氨酸:总蛋白质的 3.93% $\pm$ 0.20%;苏氨酸:总蛋白质的 5.62% $\pm$ 0.29%;缬氨酸:总蛋白质的 6.37% $\pm$ 0.32%;组氨酸:总蛋白质的 2.06%

±0.11% ;精氨酸 :总蛋白质的 6.74% ±0.34% ;甘氨酸 :总蛋白质的 5.99% ±0.30% ;天门冬氨酸 :总蛋白质的 9.55% ±0.48% ;丝氨酸 :总蛋白质的 6.18% ±0.31% ;谷氨酸 :总蛋白质的 12.73% ±0.64% ;脯氨酸 :总蛋白质的 4.49% ±0.23% ;羟脯氨酸 :总蛋白质的 1.69% ±0.09% ;丙氨酸 :总蛋白质的 10.11% ±0.51% ;酪氨酸 :总蛋白质的 1.87% ±0.10% ;和色氨酸 :总蛋白质的 1.12% ±0.06% 。

48. 根据权利要求 1 所述的食物组合物,其中所述藻类物质得自对一种或多种选自以下的序列具有至少 90% 的 23S rRNA 基因组序列一致性的藻 :SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27。

49. 根据权利要求 48 所述的食物组合物,其中所述组合物不含有来自微藻的可检测的 23S rRNA 序列,所述微藻是除了列在权利要求 48 中的微藻以外的微藻。

50. 根据权利要求 1 所述的食物组合物,其中所述藻类物质来自藻,所述藻是在包括原料的培养基中培养的,所述原料包含至少一种选自纤维素物质、5- 碳糖和 6- 碳糖的碳底物。

51. 根据权利要求 50 所述的食物组合物,其中所述碳底物选自葡萄糖、木糖、蔗糖、果糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖以及它们的任意组合。

52. 根据权利要求 1 所述的食物组合物,其中所述藻类物质得自在良好生产规范 (GMP) 条件下培养和干燥的藻。

53. 根据权利要求 1 所述的食物组合物,其中所述一种或多种其它可食用成分包括谷物、水果、蔬菜、蛋白质、草本植物和 / 或香料成分。

54. 根据权利要求 1 所述的食物组合物,其重量为至少 50 克。

55. 一种食物组合物,包含按重量或体积计至少 10% 的藻油和至少一种其它可食用成分,其中藻油来自藻类物质,所述藻类物质 (i) 来自原壳小球藻 ;(ii) 在异养条件下产生,并且 (iii) 绿色色素减少,且藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6) 。

56. 根据权利要求 55 所述的食物组合物,其为包含按体积计至少 10% 的藻油的液体。

57. 一种制作食物组合物的方法,包括合并含有至少 10 重量 % 藻油的藻类物质与至少一种其它可食用成分,其中所述藻类物质 (i) 来自原壳小球藻 ;(ii) 在异养条件下产生,且 (iii) 绿色色素减少,并且其中所述藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6) 。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,包括 :

(i) 使用在所述物质中藻油的比例和在没有藻类物质的常规形式的食物组合物中的油或脂肪的量来确定所述藻类物质的量 ;和

(ii) 合并所述藻类物质与至少一种其它可食用成分和不到含在常规食物制品中的量的油或脂肪以形成食物组合物。

59. 根据权利要求 58 所述的方法,其中除了所述物质中的藻类油以外,不加油或脂肪以形成所述食物组合物。

60. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述藻类生物质是匀浆。
61. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述匀浆是粉末。
62. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述匀浆是浆料。
63. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述匀浆是微化的。
64. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述生物质已微化,并且包含按干重计至少 25%的藻油。
65. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述藻类生物质得自对一种或多种选自以下的序列具有至少 90%的 23S rRNA 基因组序列一致性的藻:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27。
66. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述生物质含有磷脂,所述磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇的组合。
67. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述食品组合物含有来自不超过单个微藻株的藻类生物质。
68. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述藻类生物质包括主要是完整的细胞。
69. 根据权利要求 58 所述的方法,其中以所述藻类生物质代替常规食物制品中基本上全部或全部的油或脂肪。
70. 根据权利要求 57 所述的方法,其中与所述至少一种其它成分合并的藻类生物质的量是常规食物制品中的油和 / 或脂肪的质量或体积的 0.25-4 倍。
71. 根据权利要求 70 所述的方法,其中藻类生物质的量是常规食物制品中的油和 / 或脂肪和 / 或蛋类的质量或体积的 0.25-1 倍。
72. 根据权利要求 57 所述的方法,进一步包括提供含有所述藻类生物质的食品组合物的食谱,其中所述食谱指示添加常规食物制品中的油或脂肪的质量的 0.25-4 倍的藻类生物质。
73. 根据权利要求 72 所述的方法,其中藻类生物质的量是常规食物制品中的油和 / 或脂肪和 / 或蛋类的质量或体积的 0.25-1 倍。
74. 根据权利要求 57 所述的方法,进一步包括在 GMP 条件下制备所述藻类生物质。
75. 根据权利要求 74 所述的方法,其中所述制备包括在高压下匀质化所述生物质以形成微化的藻匀浆。
76. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述生物质还包含至少 45%的单不饱和脂质。
77. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述单不饱和脂质包括甘油酯形式的 18:1 脂质。
78. 一种制作食品组合物的方法,包括合并藻油与一种或多种其它可食用成分以形成所述食品组合物,其中所述藻油获得自藻类生物质,所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,且 (iii) 绿色色素减少,且所述藻油包含少于以重量计 5%的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。
79. 一种制备藻类物质的方法,包括:

在 GMP 条件下干燥藻类培养物以提供包含按干重计至少 15% 藻油的藻类生物质, 其中所述藻油 50% 以上是单不饱和脂质, 其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻; (ii) 在异养条件下产生, 且 (iii) 绿色色素减少, 且其中所述藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

80. 根据权利要求 79 所述的方法, 进一步包括匀质化所述藻类生物质。

81. 根据权利要求 80 所述的方法, 其中所述匀质化在所述干燥步骤之前进行。

82. 根据权利要求 80 所述的方法, 其中所述藻类生物质是微化的。

83. 根据权利要求 79 所述的方法, 其中所述藻类生物质来自不超过单个的微藻株。

84. 根据权利要求 79 所述的方法, 进一步包括合并所述藻类生物质与含有脂质的另外的株或品种的干藻类生物质, 所述干藻类生物质包含的总脂质的 2% 以上为 DHA。

85. 根据权利要求 79 所述的方法, 其中所述藻类生物质包含按干重计至少 40% 的藻油, 进一步包括在所述干燥步骤之前匀质化所述生物质的步骤。

86. 根据权利要求 79 所述的方法, 进一步包括将所述藻类生物质与另外的干藻类生物质共混, 所述另外的干藻类生物质含有按干重计至少 40% 的蛋白质。

87. 根据权利要求 86 所述的方法, 其中含有按干重计至少 15% 藻油的藻类生物质与含有按干重计至少 40% 蛋白质的藻类生物质是相同的品种。

88. 根据权利要求 87 所述的方法, 其中含有按干重计至少 15% 藻油的藻类生物质与含有按干重计至少 40% 蛋白质的藻类生物质是相同的株。

89. 根据权利要求 79 所述的方法, 进一步包括包裹所述藻类生物质作为用于递送单位剂量生物质的片剂或胶囊。

90. 根据权利要求 79 所述的方法, 进一步包括提供带有用于合并所述藻类生物质与其它可食用成分的指示的标签。

91. 一种制备藻油的方法, 包括:

在 GMP 条件下收获来自藻类生物质的藻油, 所述藻类生物质包含按干重计至少 15% 的藻油, 其中所述藻油 50% 以上是 18:1 脂质, 且所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻, (ii) 在异养条件下产生, 和 (iii) 绿色色素减少, 且其中所述藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

92. 根据权利要求 91 所述的方法, 其中将所述藻油包裹在胶囊中用于递送单位剂量的藻油。

93. 一种食品成分组合物, 包含至少 0.5% w/w 的藻类生物质和至少一种其它可食用成分, 所述藻类生物质含有按干重计至少 10% 的藻油, 其中通过向所述食品成分组合物中添加液体可以将所述食品成分转化成重构的食物制品, 其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻; (ii) 在异养条件下产生, 和 (iii) 绿色色素减少, 且其中所述藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

94. 根据权利要求 93 所述的食品成分组合物, 其中所述藻类生物质主要是完整的细胞。

95. 根据权利要求 93 所述的食品成分组合物, 其为干意大利面。

96. 根据权利要求 93 所述的食品成分组合物, 其中所述藻类生物质是微化的, 并且是粉末形式的。

97. 根据权利要求 96 所述的食品成分组合物,其中所述重构的食物制品是液体食物制品。

98. 根据权利要求 96 所述的食品成分组合物,其中所述重构的食物制品是乳液。

99. 根据权利要求 96 所述的食品成分组合物,其中所述重构的食物制品是色拉调味品、汤、沙司、饮料、黄油或果酱。

100. 一种产生适合人食用的油或含油微藻生物质的方法,包括:

(i) 提供原壳小球藻品种的微藻群;和

(ii) 在原料的存在下培养所述微藻群,所述原料不是得自适合人食用的物质,

其中所述微藻群将至少一些比例的所述原料转化成甘油三酯油,所述油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6),并且

其中包含油的微藻生物质在异养条件下产生且其绿色色素减少。

101. 根据权利要求 100 所述的方法,其中所述原料是解聚纤维素物质。

102. 根据权利要求 100 所述的方法,其中所述甘油三酯油至少 50% 是 18:1 脂质。

103. 根据权利要求 100 所述的方法,其中所述油包含超过 60% 的 18:1 和至少 0.20mcg/g 生育三烯酚。

104. 一种食品组合物,包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种可食用成分,其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻, (ii) 在异养条件下产生, (iii) 绿色色素减少,且 (iv) 包含按干重计至少 40% 的蛋白质,并且其中所述藻类生物质包含藻油,所述藻油的少于以重量计 5% 为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

105. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻油的少于以重量计 2% 为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

106. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述蛋白质至少 40% 是可消化粗蛋白。

107. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质还包含至少 10% 的可溶性纤维。

108. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质还包含至少 30% 的不溶性纤维。

109. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质还包含至少 50% 的总膳食纤维。

110. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其为非熟食品。

111. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其为熟食品。

112. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质来自不超过单个的微藻株。

113. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质得自在培养基中培养的藻,所述培养基包括至少一种选自有机氮源、酵母提取物、玉米浆、玉米浆粉、无机氮源、 NH_4OH 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的氮源。

114. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述藻类生物质得自在良好生产规范条件下培养和干燥的藻。

115. 根据权利要求 104 所述的食品组合物,其中所述一种或多种其它可食用成分包括

谷物、水果、蔬菜、蛋白质、草本植物、维生素和 / 或香料成分。

116. 根据权利要求 104 所述的食物组合物,其为素食汉堡小面饼、意大利面、烘烤食品、面包、能量棒、蛋白质棒、奶、果汁、思慕雪或粗粉代替饮料。

117. 根据权利要求 104 所述的食物组合物,其重量为至少 50 克。

118. 根据权利要求 104 所述的食物组合物,其中所述藻类生物质没有可检测量的藻类毒素。

119. 一种食品成分组合物,包含至少 0.5% w/w 的藻类生物质和至少一种其它可食用成分,所述藻类生物质含有按干重计至少 40% 的蛋白质,其中通过向所述食品成分组合物中添加液体可以将所述食品成分转化成重构的食物制品,且其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,和 (iii) 绿色色素减少,且包含藻油,所述藻油的少于以重量计 5% 为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

120. 根据权利要求 119 所述的食物组合物,其中所述藻类生物质没有可检测量的藻类毒素。

121. 藻类生物质,其 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,(iii) 绿色色素减少,(iv) 含有以干重计至少 40% 蛋白质,(v) 包含藻油,所述藻油的少于以重量计 5% 为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6),以及 (vi) 在 GMP 条件下生产,其中所述蛋白质包含至少 60% 的可消化粗蛋白。

122. 根据权利要求 121 所述的藻类生物质,其中所述藻油的不到 2 重量%为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

123. 一种动物食物制品,包含按重量计至少 10% 的藻油和 / 或至少 10% 的藻蛋白,其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,和 (iii) 绿色色素减少,且其中所述藻油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

124. 根据权利要求 123 所述的动物食物制品,其为马食、狗食或猫食。

125. 根据权利要求 123 所述的动物食物制品,还包含一种或多种选自肉制品、肉味香精、脂肪酸、蔬菜、水果、谷物、淀粉、维生素、矿物质、抗氧化剂和益生素的其它可食用成分。

126. 根据权利要求 125 所述的动物食物制品,其为猫食,并且所述食品还包含牛磺酸。

127. 一种动物食物制品,包含至少 0.1 重量%的脱脂藻类生物质和一种或多种其它可食用成分,其中所述藻类生物质 (i) 在异养条件下从原壳小球藻产生,(ii) 绿色色素减少,且 (iii) 包含藻油,其少于以重量计 5% 为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

128. 根据权利要求 127 所述的动物食物制品,其是为耕畜配制的。

129. 根据权利要求 127 所述的动物食物制品,其中所述一种或多种可食用成分包括谷物。

130. 一种粉末形式的藻类生物质匀浆,包含至少 25 重量%的油,其中藻类生物质在异养条件下从原壳小球藻产生,且绿色色素减少,且其中所述油包含少于以重量计 5% 的二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

131. 根据权利要求 130 所述的藻类生物质匀浆,其中所述匀浆中的微粒主要是不到 2 μ m 的。

132. 根据权利要求 130 所述的藻类生物质匀浆,具有按重量计为 5% 或更少的水分含量。

133. 一种制作食品组合物的方法,其中用含有至少 10 重量%藻油的藻类生物质代替常规食物制品中的脂肪或油,其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,且 (iii) 绿色色素减少,且其中所述藻油包含少于以重量计 5%的二十二碳六烯酸(DHA) (C22:6)。

134. 一种导致饱足感的方法,包括在食物制品中掺杂藻类生物质,其中所述藻类生物质 (i) 在异养条件下从原壳小球藻产生,(ii) 绿色色素减少,且 (iii) 包含油,其少于以重量计 5%为二十二碳六烯酸 (DHA) (C22:6)。

135. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含按细胞干重计 25% -35%的油。

136. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含 20-40%的碳水化合物。

137. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含 4-8%的游离糖。

138. 根据权利要求 137 所述的方法,其中所述游离糖包括至少一种选自葡萄糖、蔗糖和麦芽糖的糖。

139. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含至少 10%的总膳食纤维。

140. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含 10-25%的可溶性纤维。

141. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含 3-15%的不溶性纤维。

142. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述藻类生物质包含 0-115mcg/g 的总类胡萝卜素。

143. 根据权利要求 134 所述的方法,其中所述总类胡萝卜素包含 0-70mcg/g 的叶黄素。

144. 一种食品组合物,包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种其它可食用成分,其中所述藻类生物质包含按干重计至少 16%的藻油,并且与得到它的株相比,其为色素形成减少的颜色突变体,且其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,且 (iii) 绿色色素减少,且其中所述藻油包含少于以重量计 5%的二十二碳六烯酸(DHA) (C22:6)。

145. 根据权利要求 144 所述的食物组合物,其中所述藻是于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏所的原壳小球藻 33-55。

146. 根据权利要求 144 所述的食物组合物,其中所述藻是于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏所的原壳小球藻 25-32。

147. 一种食品组合物,包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种其它可食用成分,其中所述藻类生物质包含按干重计至少 40%的蛋白质,并且与得到它的株相比,其为色素形成减少的颜色突变体,其中所述藻类生物质 (i) 来自原壳小球藻;(ii) 在异养条件下产生,且 (iii) 绿色色素减少,且其中所述藻油包含少于以重量计 5%的二十二碳六烯酸(DHA) (C22:6)。

148. 根据权利要求 147 所述的食物组合物,其中所述藻是于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏所的原壳小球藻 33-55。

149. 根据权利要求 147 所述的食物组合物,其中所述藻是于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏所的原壳小球藻 25-32。

微藻生物质的食品组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请按 35U. S. C. 119(e) 要求 2008 年 10 月 14 提交的美国临时专利申请 No. 61/105, 121、2009 年 3 月 3 日提交的美国临时专利申请 No. 61/157, 187、2009 年 4 月 27 日提交的美国临时专利申请 No. 61/173, 166 和 2009 年 9 月 25 日提交的美国临时专利申请 No. 61/246, 070 的权益。为所有目的将上述申请每个的全文以引用的方式并入本文。

[0003] 引用序列表

[0004] 本申请包括第 1-10 页随附的序列表。

技术领域

[0005] 本发明的领域为微生物学、食品制备和人类及动物的营养学。

背景技术

[0006] 随着人口的不断增长,越来越需要有额外的食物来源,特别是可廉价生产但营养丰富的食物来源。此外,至少在大部分发达国家中,许多主食目前还依赖于肉类,这极大地促进了温室气体的排放,因此需要生产同样可口、营养丰富但对环境危害较小的新食品原料。

[0007] 藻类的生长只需要“水和阳光”,因此其一直被期待作为潜在的食物源。虽然某些藻类(主要是海草)确实为人类的消费提供了重要的食品原料,但以藻类作为食品原料的愿望还没有成为现实。以在户外池塘或光生物反应器中光合生长的藻类制成的藻粉末是可商购的,但其颜色深绿(来自叶绿素),并具有强烈的、令人不快的味道。当将这些藻粉末配制到食物制品当中或作为营养补品时,它们使食物制品或营养补品产生视觉上没有吸引力的绿颜色,并且具有难闻的鱼腥或海草味。

[0008] 目前有若干种藻类用在食品原料中,多数是大型藻,如海带、紫菜(紫菜属,用于海苔片)、红皮藻(红藻)和海莴苣(石莼)。微藻(如螺旋藻(钝项节旋藻))是在开放池塘中商业化种植的(光合),用作营养补品,或者少量地掺于思慕雪或果汁饮料中(通常不到 0.5% w/w)。其它微藻(包括一些种类的小球藻)在亚洲国家中流行作为营养补品。

[0009] 除了这些产品外,具有高二十二碳六烯酸(DHA)含量的藻油是用在婴儿配方中的成分。DHA 是高度多不饱和油。DHA 具有抗炎特性,是众所周知的补品以及用在食品原料制备中的添加剂。然而,DHA 并不适合熟食品,因为它经热处理会发生氧化。另外,即使在室温并存在抗氧化剂的情况下,DHA 在暴露于氧时也是不稳定的。DHA 的氧化产生鱼腥味道和难闻的气味。

[0010] 目前仍然需要采用廉价高效的方法由藻类大规模地生产食品原料,特别是生产可口且营养丰富的食品原料。本发明可满足这些以及其它需求。

发明内容

[0011] 在第一方面,本发明提供制备适合用作食品原料的微藻生物质的方法。在这些方

法中,微藻在异养条件下发酵,因此没有得自其它微藻的食品原料所特有的绿色色素或者绿色色素的量大幅度减少。在一个实施例中,微藻没有任何色素,或者任何色素的量大幅度减少。在一方面,本发明的微藻品种是原壳小球藻 33-55 株(原壳小球藻 33-55),其根据布达佩斯条约于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209),专利保藏编号 PTA-10397。在另一方面,本发明的微藻品种是原壳小球藻 25-32 株(原壳小球藻 25-32),其于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209),专利保藏编号 PTA-10396。在一个实施例中,控制发酵条件以得到富含脂质的生物质。在另一实施例中,控制发酵条件以得到富含蛋白质的生物质。在所有实施例中,可以按廉价高效的方式大规模地(在 4500L 或更大的发酵罐中生产生物质)实施所述方法。

[0012] 在第二方面,本发明提供适合掺入人类食品原料的微藻生物质。在一个实施例中,此微藻生物质是直接由本发明的生物质制备方法得到的浓缩生物质。在另一实施例中,此生物质的形式是由干燥(例如滚筒干燥)这种生物质制剂得到的干片。在这后一种实施例中,可以在干燥步骤之前向生物质中添加抗氧化剂,用以延长微藻生物质以及任何含这种生物质的食品制品的保质期。

[0013] 在第三方面,本发明提供将微藻片的微藻生物质进一步加工成微藻匀浆的方法。在一个实施例中,在去离子水中将干微藻片再水化以制得悬浮液。然后用高压匀化器对此悬浮液进行微化,使平均粒度尺寸小于 10 μm ,制成微藻匀浆。

[0014] 在第四方面,本发明提供将微藻生物质加工成多功能食品成分的方法,所述食品成分的多功能性在于,它对食品提供保健油,并对食品(如烘烤食品)提供结构上的益处。在一个实施例中,所述加工涉及对生物质制剂进行气流干燥(例如,喷雾干燥或闪蒸干燥),从而形成含有大比例完整微藻细胞的藻粉末。在另一实施例中,首先微化生物质以在气流干燥前破坏细胞,从而形成只含小比例(或没有)完整藻细胞的藻碎粉;在一些实施例中,在干燥步骤前添加助流剂或分散剂。

[0015] 在第五方面,本发明涉及生产适合人食用的油或含油微生物质的方法。在一些实施例中,所述过程涉及从生物质中提取脂质(油)以形成藻油。在一个实施例中,所述方法包括提供微生物和在原料的存在下培养微生物,所述原料非得自适合人食用的食品组合,其中微生物将至少一些部分的原料转化成甘油三酯油。在一些情况下,甘油三酯油包含至少 50% 的 18:1 脂质。

[0016] 在第六方面,本发明提供掺有藻粉末、藻碎粉和/或藻油的食物。在一个实施例中,所述食品是烘烤食品、调味品、沙司或蛋黄酱,相对于采用常规食谱制成的同样的食品来说,其中的所有或部分蛋或黄油已被富含藻油的藻碎粉取代。在另一实施例中,所述食品是含有富含藻油的藻碎粉的粉状蛋制品。在另一实施例中,所述食品是含有富含藻油的藻碎粉的液态蛋制品。在另一实施例中,所述食品是含有藻蛋白、纤维和油的液态奶制品。在另一实施例中,所述食品是肉制品,相对于以前可供的肉制品来说,其中的一部分或所有(肉类替代品)的肉已被富含蛋白质的藻碎粉、藻粉末或藻片代替。

[0017] 在第七方面,本发明通过提供含有藻纤维和可选的藻蛋白和/或藻油的藻类食品或食品成分来提供导致饱足感的方法。

[0018] 本发明的这些以及其它方面和实施例描述在附图(下面紧接着附图简述)和下面

的本发明的具体实施方式中,并且在下面的实例中给予例示。

附图说明

[0019] 图 1 以总脂质含量百分比显示选定微藻株的脂质谱。对应于每一株号的品种 / 株示于实例 1 的表 1。

[0020] 图 2 显示原壳小球藻生物质的氨基酸谱与全蛋白质的氨基酸谱的比较。

[0021] 图 3 显示有和没有藻碎粉的全蛋液在蒸汽保温桌上保持 60 分钟的感官评分。每 10 分钟对蛋的外观、质感和口感进行评价。

具体实施方式

[0022] 为方便读者,将本发明的具体实施方式分为若干段及若干分段。第 I 段提供用在本文中的各种术语的定义。第 II 段分 A-E 部分,描述制备微藻生物质的方法,包括合适的生物体 (A)、产生色素形成缺乏或大幅度减少的微藻株的方法 (B)、培养条件 (C)、浓度条件 (D) 和根据本发明生产的生物质的化学组成 (E)。第 III 段分 A-D 部分,描述将微藻生物质加工成本发明的藻片 (A)、藻粉末 (B)、藻碎粉 (C) 和藻油 (D) 的方法。第 IV 段描述本发明的食物和将微藻生物质与其它食品成分掺混的方法。

[0023] 可以按照 GMP 或同等规定实施本文中所述的所有过程。在美国,关于制造、包装或保存人的食品的 GMP 规定被编入法典 21 C.F.R. 110。据此为所有的目的将其中引用的这些条款以及附则以引用的方式全文并入。美国的 GMP 规定以及其它司法管辖区的同等规定适用于确定食品是否是掺假的 (食品是在不适合食品的条件下生产的),或者食品的制备、包装或保存是否是在不卫生的条件下进行的,乃至其可能已经被污染,或者可能会以别的方式对健康有害。GMP 规定可以包括遵守以下的管理规则:疾病控制;清洁和人员培训;建筑物和设施的维护和卫生操作;提供足够的卫生设施和膳宿供应;设备和用具的设计、制造、维护和清洁;提供适当的质量控制程序,以确保根据适当的卫生原则在食物制品的接收、检验、运输、隔离、制备、生产、包装和储存时采取所有合理的预防措施,从而防止接触任何污染源;以及在一定的条件下储存和运输成品食物,所述的条件可保护食品防止受到物理、化学污染或不良的微生物污染以及防止食品和容器的变质劣化。

[0024] I. 定义

[0025] 除下文中另有规定外,本文中使用的所有科技术语都具有本发明所属技术领域的人员通常理解的含义。本文中使用的许多术语的一般定义可见于如下参考文献: Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第二版, 1994 年); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker 编辑, 1988 年); The Glossary of Genetics, 第 5 版, R. Rieger 等 (编辑), Springer Verlag (1991 年); 以及 Hale 和 Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991 年)。

[0026] “无菌”指的是未被其它活生物体污染的生物体的培养物。

[0027] “烘烤食品”指的是通常见于面包房中通过使用烤箱制备的食物。烘烤食品包括但不限于布朗尼、甜点、馅饼、蛋糕和糕点。

[0028] “生物反应器”和“发酵罐”指的是通常使细胞在悬浮液中进行培养的封闭装置或部分封闭装置,如发酵槽或发酵容器。

[0029] “面包”指的是含有面粉、液体和膨松剂的食物。面包通常是通过在烤箱中烘烤制备的,但其它烹饪方法也是可以接受的。膨松剂的性质可以是化学的或有机体的。通常情况下,有机体膨松剂是酵母。在使用化学性质的膨松剂(如烤粉和/或小苏打)的情况下,这些食物制品被称为“速制面包”。

[0030] “纤维素物质”指的是纤维素消化的产物,特别是葡萄糖和木糖。纤维素消化通常会产生另外的化合物,如二糖、低聚糖、木质素、糠醛及其它化合物。纤维素物质的来源包括(例如)但不限于甘蔗渣、甜菜浆、玉米秸秆、木屑、锯末和柳枝稷。

[0031] “共培养”及其变化形式(如“共培育”和“共发酵”)指的是在培养条件下,两种或更多种类型的细胞存在于同一个生物反应器中。对于本发明来说,所述两种或更多种类型的细胞通常都是微生物、通常都是微藻,但在一些情况下可以包括一种非微藻细胞类型。在一些情况下,适合共培养的培养条件包括能促进两种或更多种细胞类型生长和/或繁殖的条件,在其它情况下,包括只有利于两种或更多种细胞中的一种或亚型的生长和/或增殖而对余者维持细胞生长的条件。

[0032] “辅因子”指的是酶实现其酶活性所需的底物以外的分子。

[0033] “常规食物制品”指的是拟供(例如)人食用的组合物,其没有藻类物质或其它藻类组分,而是包含通常与食物制品有关的成分,特别是植物油、动物脂肪和/或蛋类,连同其它可食用成分。常规的食物制品包括商店和饭店中出售的食物制品以及家庭中制作的食物制品。常规的食物制品通常是按常规的食谱制作的,所述的常规食谱指定包含来自非藻源的油或脂肪和/或蛋类连同其它可食用成分。

[0034] “熟食品”指的是已经(例如)在烤箱中加热一段时间的食品。

[0035] “乳脂状色拉调味品”指的是作为粘度高且流出速率缓慢的稳定分散体的色拉调味品。一般来说,乳脂状色拉调味品是不透明的。

[0036] “培育”、“培养”和“发酵”以及它们的变化形式指的是利用培养条件有意促进一种或多种细胞(通常是微藻)的生长和/或繁殖。拟定的条件排除微生物在自然状态下的生长和/或繁殖(没有直接的人干预)。

[0037] “细胞溶解”指的是细胞在低渗环境中的溶解。细胞溶解起因于水渗透或移动到细胞的内部达到过度水化状态,使得细胞不能承受内部水的渗透压并因此破裂。

[0038] “膳食纤维”指的是见于含细胞壁的植物及其它生物体(包括微藻)中的非淀粉类碳水化合物。膳食纤维可以是可溶性的(溶于水)或不溶性的(不能溶于水)。可溶性及不溶性纤维构成总膳食纤维。

[0039] “脱脂粗粉”指的是已经历油萃取加工的藻类物质,因此相对于油萃取之前而言含有较少的油。脱脂粗粉中的细胞主要是溶解了的。脱脂粗粉包括已经溶剂(己烷)萃取了的藻类物质。

[0040] “可消化的粗蛋白”是蛋白质中的可利用部分或在用胃酶消化后可以被转化成自由氮(氨基酸)的部分。使用胃酶(如胃蛋白酶)并消化样本,测量消化之后的游离氨基酸,由此完成可消化粗蛋白的离体测量。测量饲料/食品样本中的蛋白质含量并将样本供给动物,测量在动物粪便中收集到的氮量,由此完成可消化粗蛋白的体内测量。

[0041] “干重”和“细胞干重”指的是在相对缺水的条件下测定的重量。例如,提到微藻物质包含按干重计指定百分比的特定组分表示是基于生物质中基本上所有的水已被移除

之后的重量计算的百分比。

[0042] “可食用成分”指的是适合食用的任何物质或组合物。“可食用成分”包括但不限于谷物、水果、蔬菜、蛋白质、草本植物、香料、碳水化合物和脂肪。

[0043] “外源性提供的”指的是提供给细胞（包括提供给培养物中的细胞培养基）的分子。

[0044] “脂肪”指的是在平常的室内温度和压力下通常是固体的脂质或脂质混合物。“脂肪”包括但不限于猪油和黄油。

[0045] “纤维”指的是多糖形式的非淀粉类碳水化合物。纤维可以是水溶性的或水不溶性的。许多微藻产生可溶性及不溶性纤维两者，它们通常存在于细胞壁中。

[0046] “食物成品”和“成品食物成分”指的是准备包装、使用或消费的食品组合物。例如，“食物成品”可以是已经烹饪好的，或者构成“食物成品”的成分可能已经彼此混合或以其它方式彼此结合。“成品食物成分”通常与其它成分组合使用以形成食物制品。

[0047] “固定碳源”指的是以固体或液体形式存在于环境温度和压力下的含碳分子，通常为有机分子。

[0048] “食品”、“食品组合物”、“食物制品”及“食品原料”指的是拟为或预期供人类作为营养和 / 或热量源摄取的任何组合物。食品组合物主要由碳水化合物、脂肪、水和 / 或蛋白质组成，并且构成基本上全部的人每日热量摄入量。“食品组合物”的最小重量可以为典型片剂或胶囊重量的至少十倍（典型片剂 / 胶囊的重量在小于或等于 100mg 直到 1500mg 不等）。“食品组合物”不是封装或片剂形式的。

[0049] “甘油脂谱”指的是在具体的生物质或油样本中甘油脂的不同碳链长度及饱和水平的分布。例如，样本可以具有这样的甘油脂谱，其中甘油脂的大约 60% 是 C18:1, 20% 是 C18:0, 15% 是 C16:0, 且 5% 是 C14:0。当一般提到碳长度的时候（如“C:18”），这种提法可以包括任意的饱和量；例如，含 20% 脂质（为 C:18）的微藻生物质可以包含相等或不等量的 C18:0、C18:1、C18:2 等，它们的总和构成生物质的 20%。提到某种饱和类型的百分比（如至少 50% 的 18:1 甘油脂形式的单不饱和）是指甘油脂的脂肪族侧链为至少 50% 的 18:1，但并不一定意味着至少 50% 的甘油三酯是三油酸甘油酯（三个 18:1 链连接于单个甘油主链）；这种谱可以包括具有 18:1 与其它侧链的混合物的甘油脂，条件为全部侧链的至少 50% 是 18:1。

[0050] “良好生产规范”和“GMP”指的是根据 21 C.F.R. 110（关于人的食品）和 111（关于食用补品）给出的规定设立的条件，或者是在美国以外的地区制定的类似的监管制度。美国的法规由美国食品和药品管理局根据联邦食品、药品和化妆品法案颁布，用来规范供人食用的食物制品和食用补品的生产商、加工商和包装商。

[0051] “生长”指的是单个细胞的细胞尺寸、总细胞含量和 / 或细胞质量或重量的增大，包括由于固定碳源转化为细胞内油所致的细胞增重。

[0052] “匀浆”指的是已经被物理碎裂的生物质。均化是这样的流体力学过程，其涉及将颗粒再分成更小和更均匀的尺寸，形成可以经受进一步加工的分散体。均化用于处理若干食品和奶产品，用以改善稳定性、保质期、消化及味道。

[0053] “增加的脂质产率”指的是微生物培养物的脂质 / 油生产率的提高，其实现方式可以是例如，增加每升培养物中的细胞干重、增大含脂质的细胞的百分比和 / 或增加每单位

时间每升培养物体积中的脂质总量。

[0054] “原位”指的是“就地”或“在其原始位置”。例如，培养物可以含有分泌催化剂的第一微藻细胞类型和分泌底物的第二微生物细胞类型，其中第一和第二细胞类型产生在共培养中原位发生具体的化学反应而无需进行材料的进一步分离或处理所需的组分。

[0055] “脂质”指的是可溶于非极性溶剂（如醚和己烷）且相对或完全地不溶于水的任何类分子。脂质分子具有这些性质的原因是，它们主要是由本质上疏水的长烃尾部组成的。脂质的例子包括脂肪酸（饱和及不饱和的）；甘油酯或甘油脂（如甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯或中性脂肪和磷酸甘油酯或甘油磷脂）；和非甘油酯（鞘脂、生育酚、生育三烯酚、甾醇脂，包括胆固醇和类固醇激素，异戊烯醇脂，包括萜类化合物、脂肪醇、蜡和聚酮）。

[0056] “溶解产物”指的是含有溶解细胞内容物的溶液。

[0057] “溶解”指的是将微生物的质膜和可选的细胞壁破裂成足以释放至少一些细胞内的内容物，这往往是通过破坏其完整性的机械或渗透机制实现的。

[0058] “裂解”指的是将生物有机体的细胞膜和可选的细胞壁或细胞破坏成足以释放至少一些细胞内的内容物。

[0059] “微藻”指的是含有叶绿体的真核微生物有机体，并且其能够进行光合作用或不能进行光合作用。微藻包括不能代谢固定碳源作为能量的专性光能自养生物以及可以离开固定碳源单独存活的异养生物，包括不能进行光合作用的专性异养生物。微藻包括在细胞分裂之后不久与姐妹细胞分开的单细胞生物体（如衣藻）以及微生物（例如，团藻，其为两种不同细胞类型的简单多细胞光合微生物）。“微藻”还包括诸如小球藻、类小球藻（*Parachlorella*）和杜氏藻之类的细胞。

[0060] “微藻物质”、“藻类物质”和“生物质”指的是由微藻细胞的生长和 / 或繁殖产生的物质。生物质可以含有细胞和 / 或细胞内的内容物以及细胞外的物质。细胞外的物质包括但不限于由细胞分泌的化合物。

[0061] “微藻油”和“藻油”指的是由微藻细胞产生的任何脂质组分，包括三酰基甘油。

[0062] “微化的”指的是已经在高压下均化（或相当的处理）的生物质，因此至少 50% 的生物质在它们最长的尺寸上的粒度不大于 10 μm 。通常情况下，至少 50% 到 90% 或更多的这种颗粒的最长尺寸小于 5 μm 。在任何情况下，微化生物质的平均粒度小于完整微藻细胞的平均粒度。

[0063] “微生物”指的是任何微观的单细胞生物体。

[0064] “营养补品”指的是旨在通过提供特定的营养物质而不是提供大热量来补充饮食。营养补品可以含有以下成分中的任何一种或多种：维生素、矿物质、草本植物、氨基酸、必需的脂肪酸以及其它物质。营养补品通常是做成片剂或做成胶囊的。单个做成片剂或胶囊的营养补品的每日摄入量通常不大于 15 克。营养补品可以提供在能与食品组合物（如酸奶或“思慕雪”）混合的随时混合型香囊中，用以补充饮食，并且每日的摄入量通常不超过 25 克。

[0065] “油”指的是由生物体（包括微藻、其它植物和 / 或动物）产生的任何三酰基甘油酯。为了区别于“脂肪”，除另有说明外，“油”是指在普通的室内温度和压力下一般为液体的脂质。例如，“油”包括得自植物的植物油或种子油，包括但不限于得自以下物质的油：大豆、油菜籽、卡诺拉、棕榈、棕榈仁、椰子、玉米、橄榄、葵花、棉籽、萼距花、花生、亚麻荠、芥

菜籽、腰果、燕麦、羽扇豆、洋麻、金盏花、大麻、咖啡、亚麻籽、榛子、大戟、南瓜籽、芫荽、山茶花、芝麻、红花、稻、桐油树、可可、椰子干、罂粟、蓖麻籽、山核桃、希蒙德木、麻风树、澳洲坚果、巴西坚果和鳄梨以及它们的组合。

[0066] “渗透休克”指的是溶液中的细胞在渗透压突然降低之后破裂,可用于诱导将细胞中的细胞组分释放到溶液里。

[0067] “巴氏灭菌”指的是旨在减慢食物制品中的微生物生长的加热过程。通常情况下,巴氏灭菌在高温(但低于沸点)下短时间进行。如本文中所述,巴氏灭菌不仅可以减少食物制品中的不良微生物的数目,而且还能够灭活食物制品中存在的某些酶。

[0068] “多糖”和“聚糖”指的是由糖苷键将单糖连接在一起制成的任何碳水化合物。纤维素是构成某些植物细胞壁的多糖的例子。

[0069] “进出口”指的是生物反应器中允许物质(如气体、液体和细胞)流入或流出的开口;进出口通常与管道连接。

[0070] “主要是包封的”指的是所提到组分(例如藻油)的50%以上、通常为75%以上到90%被封隔在所提到的包装物(可以包括例如微藻细胞)中。

[0071] “主要是完整的细胞”和“主要是完整的生物质”指的是包含50%以上、通常是75%、90%和98%以上的完整细胞的细胞群。“完整的”在这里指的是包围细胞的细胞内组分的细胞膜和/或细胞壁的物理连续性没有以任何方式被破坏,以至于达到细胞的细胞内组分将释放到超过培养物中的细胞膜的渗透率的程度。

[0072] “主要是溶解的”指的是这样的细胞群,其中50%以上、通常75%以上到90%的细胞已经被破坏,使得细胞的细胞内组分不再完全地被包围在细胞膜以内。

[0073] “增殖”指的是生长和繁殖两者的组合。

[0074] “繁殖”指的是细胞数目通过有丝分裂或其它细胞分裂的增加。

[0075] “近似分析”指的是分析食品原料的脂肪、氮/蛋白质、粗纤维(纤维素和木质素为主要组分)、水分和灰分。可以通过从100中减去近似分析的已知值总数来计算(碳水化合物之差)可溶性碳水化合物(全部的膳食纤维和游离糖)。

[0076] “声处理”指的是通过声波能量破坏生物材料(如细胞)。

[0077] “糠醛的品种”指的是2-呋喃甲醛及其保持同样的基本结构特征的衍生物。

[0078] “秸秆”指的是农作物在已经收获粮食之后剩下的干的茎和叶。

[0079] “适合人食用”指的是组合物可作为饮食摄入供人食用而没有不健康的影响,并且可以因在胃肠道中吸收消化的物质而提供重要的热量摄入。

[0080] “非熟食品”指的是没有经受加热的组合物,但可能包含一种或多种先前经受过加热的组分。

[0081] 关于体积比的“V/V”或“v/v”指的是组合物中的一种物质的体积与组合物的体积之比。例如,提到包含5% v/v 微藻油的组合物指的是组合物体积的5%由微藻油组成(例如,体积为100mm³的这种组合物含5mm³的微藻油),组合物的剩余体积(例如,本例中为95mm³)由其它成分组成。

[0082] 关于重量比的“W/W”或“w/w”指的是组合物中的一种物质的重量与组合物的重量之比。例如,提到包含5% w/w 微藻生物质的组合物指的是组合物重量的5%由微藻生物质组成(例如,重量为100mg的这种组合物含5mg 微藻生物质),组合物的剩余重量(例

如,本例中为 95mg) 由其它成分组成。

[0083] II. 制备微藻生物质的方法

[0084] 本发明提供适合人食用的藻类生物质、将这种藻类生物质与可食用成分结合的方法和含有这种藻类生物质的食品组合物,所述藻类生物质富含营养物质,包括脂质和 / 或蛋白质组分。本发明部分地源于这样的发现,即可以把藻类生物质制成具有高含油量和 / 或具有优异的功能,并且将所得到的生物质掺入食物制品里面,其中生物质的油和 / 或蛋白质含量可以完全或部分地替代常规食物制品中存在的油类和 / 或脂肪和 / 或蛋白质。藻油可主要地包含单饱和油,与往往见于常规食物制品中的饱和、氢化(反式脂肪)和多不饱和的脂肪相比,其对健康是有益的。藻油还可用作不含反式脂肪的健康稳定烹饪用油。其余的藻类生物质可以将油包封,至少直到食物制品熟了为止,由此延长油的保质期。在细胞保持完整的非熟食品中,生物质以及见于油中的天然抗氧化剂还可以保护油不被氧化,否则就会产生不愉快的气味、味道和质感。生物质还提供除了油和 / 或蛋白质以外的若干有益的微量营养物质,如藻源膳食纤维(可溶性和不溶性碳水化合物)、磷脂、糖蛋白、植物甾醇、生育酚、生育三烯酚和硒。

[0085] 本段首先评述适合用于本发明方法的微藻类型(A部分)、产生色素形成缺乏或大幅度减少的微藻株的方法(B部分),然后是用于繁殖生物质的培养条件(C部分),然后是用于制备进一步加工用的生物质的浓缩步骤(D部分),以根据本发明方法制成的生物质的化学组成描述来结束(E部分)。

[0086] A. 用在本发明方法中的微藻

[0087] 根据本发明的方法可以使用多种能产生合适的油和 / 或脂质和 / 或蛋白质的微藻品种,但能天然地产生出高含量的合适的油和 / 或脂质和 / 或蛋白质的微藻是优选的。影响选择用于本发明的微藻的考虑因素除了产生用于生产食物制品的合适油类、脂质或蛋白质外,还包括:(1) 以细胞重量的百分比表示的高脂质(或蛋白质)含量;(2) 易于生长;(3) 易于繁殖;(4) 易于进行生物质加工;(5) 甘油脂谱;和(6) 没有藻毒素(下面的实例 5 显示干微藻生物质及萃取自生物质的油或脂质没有藻毒素)。

[0088] 在一些实施例中,在食品加工(例如,烹饪)期间必须破坏微藻的细胞壁,用以释放活性组分或用于消化,并且在这些实施例中,具有容易在动物(例如人或其它单胃动物)的胃肠道中消化的细胞壁的微藻株是优选的。特别是如果藻类生物质要用于生食物制品。对于在细胞壁中具有高纤维素 / 半纤维素含量的微藻株来说,可消化性一般来说是降低的。可以采用标准的胃蛋白酶可消化性试验评价可消化性。

[0089] 在具体的实施例中,微藻包含按干重计为至少 10% 或更多油的细胞。在其它实施例中,微藻含按干重计至少 25-35% 或更多的油。一般来说,在这些实施例中,微藻中的油含量越多,生物质就越有营养,因此可以培养成按干重计含至少 40%、至少 50%、75% 或更多油的微藻是特别优选的。用于本发明方法中的优选微藻可异养生长(在没有光的情况下依靠糖)或者是专性异养生物。在食品和 / 或营养食品中,并非所有类型的脂质都是可取的,因为它们可能有不良的味道或难闻的气味,以及表现出稳定性差,或者提供的口感差,并且这些考虑因素也会影响用于本发明方法中的微藻的选择。

[0090] 小球藻属中的微藻通常适用于本发明的方法。小球藻是单细胞绿藻属的,属于绿藻门。小球藻细胞的形状通常是球形,直径约 2 到 10 μm , 并且没有鞭毛。一些品种的小球藻

天然为异养的。在优选的实施例中,用于本发明方法中的微藻是原壳小球藻、椭圆小球藻、极微小球藻、*Chlorella zofnienesi*、*Chlorella luteoviridis*、凯斯勒小球藻、*Chlorella sorokiniana*、*Chlorella fusca* var. *vacuolata* 小球藻属、*Chlorella* cf. *minutissima* 或浮水小球藻。小球藻(特别是原壳小球藻)是用于本发明方法中的优选微生物,因为其具有高脂质成分。用于本发明方法中的特别优选的原壳小球藻品种包括下面实例中例示的那些。

[0091] 适合用于本发明方法中的其它小球藻品种包括选自以下的品种: *anitrata*、*Antarctica*、*aureoviridis*、假丝酵母、*capsulate*、*desiccata*、*ellipsoidea*(包括 CCAP 211/42 株)、*emersonii*、*fusca*(包括变种 *vacuolata*)、*glucotropha*、*infusum*(包括变种 *actophila* 和变种 *auxenophila*)、*kessleri*(包括任何 UTEX 株 397、2229、398)、匍扇藻(包括 SAG 37.88 株)、*luteoviridis*(包括 SAG 2203 株以及变种 *aureoviridis* 和 *lutescens*)、*miniata*、cf. *minutissima*、*minutissima*(包括 UTEX 株 2341)、*mutabilis*、*nocturna*、*ovalis*、*parva*、*photophila*、*pringsheimii*、*protothecoides*(包括任何 UTEX 株 1806、411、264、256、255、250、249、31、29、25 或 CCAP 211/8D 或 CCAP 211/17 和变种 *acidicola*)、*regularis*(包括变种 *minima* 和 *umbricata*)、*reisigii*(包括 CCP 11/8 株)、*saccharophila*、(包括 CCAP 211/31、CCAP 211/32 株和变种 *ellipsoidea*)、*salina*、*simplex*、*sorokiniana*(包括 SAG 211.40B 株)、*sp.*(包括 UTEX 株 2068 和 CCAP 211/92)、*sphaerica*、*stigmatophora*、*trebouxii*、*vanniellii*、*vulgaris*(包括 CCAP 211/11K、CCAP 211/80 株以及 *f. tertia* 和变种 *autotrophica*、*viridis*、*vulgaris*、*vulgaris f. tertia*、*vulgaris f. viridis*)、*xanthella* 和 *zofingensis*。

[0092] 用于本发明的小球藻的品种(以及其它微藻属的品种)可以通过将它们基因组的某些目标区与本文中确定的品种的相同区进行比较而确定;优选的品种是与本文中确定的品种具有一致性或表现出很高水平的同源性的品种。例如,可以通过这样的方式实现具体的小球藻品种或株的确认,用引物对细胞核和/或叶绿体 DNA 进行扩增和定序,采用的方法利用基因组的适当区,例如采用 Wu 等在“Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences”(Bot. Bull. Acad. Sin. 42:115-121(2001))中所述的方法。本领域技术人员可以采用已经确立好的系统发生分析方法,如核糖体内转录间隔子(ITS1 和 ITS2 rDNA)、23S rRNA、18S rRNA 及其它保守的基因组区的扩增和定序,不仅能确定小球藻的品种,还能确定适合用于本文公开的方法的其它产生油和脂质的微藻的品种。关于藻类的确定和分类方法的例子,参见 Genetics, 170(4):1601-10(2005) 和 RNA, 11(4):361-4(2005)。

[0093] 因此,基因组 DNA 比较可用来确定适用于本发明的微藻品种。保守基因组 DNA(例如但不限于编码 23S rRNA 的 DNA)的区可由微藻品种进行扩增,所述微藻品种例如可以在分类学上与用在本发明中的优选微藻相关,并与那些优选品种的相应区进行比较。选择表现出高水平相似性的品种用于本发明的方法中。在下面给出小球藻属内的品种之间的这种 DNA 序列比较的示例性例子。在一些情况下,优选用于本发明的微藻具有的编码 23S rRNA 的基因组 DNA 序列与 SEQ ID NO 1-23 和 26-27 中所列出的序列中的至少之一有至少 65% 的核苷酸一致性。在其它情况下,优选用于本发明的微藻具有的编码 23S rRNA 的基因组 DNA 序列与 SEQ ID NO 1-23 和 26-27 中所列出的序列中的至少一个或多个有至少 75%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的核苷酸一致性。在与其它成分结合以配制食品组合物之前,食品组合物和/或藻类生物质的基因分型也是用来确定藻类生物质是否来自单个以上微藻株的可靠方法。

[0094] 关于确定核苷酸或氨基酸一致性百分比的序列比较,通常以一个序列作为参考序列,将测试序列与之进行比较。在应用序列比较算法时,把测试序列和参考序列输入计算机当中,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列一致性百分比。用于比较的最优序列比对可以通过例如下面的方式进行:Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (Adv. Appl. Math. 2 : 482(1981));Needleman 和 Wunsch 的同源比对算法 (J. Mol. Biol. 48 :443(1970));Pearson 和 Lipman 的搜索相似性方法 (Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 85 :2444(1988));这些算法的计算机化执行(威斯康星州遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI);或目视检查(一般参见 Ausubel 等, 见上)。适于确定序列一致性和序列相似性百分比的另一例算法是 BLAST 算法,其描述在 Altschul 等的 J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990) 中。用于执行 BLAST 分析的软件可通过 National Center for Biotechnology Information(网址 www.ncbi.nlm.nih.gov) 公开获得。

[0095] 除了小球藻之外,其它微藻属也可用在本发明的方法中。在优选的实施例中,微藻的品种选自 *Parachlorella kessleri*、*Parachlorella beijerinckii*、*Neochloris oleabundans*、*Bracteococcus*, 包括 *B. grandis*、*B. cinnabarinus* 和 *B. aerius*、*Bracteococcus* sp. 或 *Scenedesmus rebescens*。微藻品种的其它非限制性例子包括以下品种和属中的品种:*Achnanthes orientalis*; *Agmenellum*; *Amphiprora hyaline*; 双眉藻,包括 *A. coffeiformis*, 包括 *A. c. lineata*、*A. c. punctata*、*A. c. taylori*、*A. c. tenuis*、*A. c. delicatissima*、*A. c. delicatissima capitata*; 鱼腥藻; 纤维藻,包括 *A. falcatus*; *Boekelovia hooglandii*; *Borodinella*; 布朗葡萄藻,包括 *B. sudeticus*; *Bracteococcus*, 包括 *B. aerius*、*B. grandis*、*B. cinnabarinus*、*B. minor* 和 *B. medionucleatus*; 鞭藻; 角毛藻,包括 *C. gracilis*、*C. muelleri* 和 *C. muelleri subsalsum*; 绿球藻,包括 *C. infusionum*; 绿梭藻; 蓝隐藻; 金球藻; 球钙板藻; 寇氏隐甲藻; 隐藻; 小环藻,包括 *C. cryptica* 和 *C. meneghiniana*; 杜氏藻,包括 *D. bardawil*、*D. bioculata*、*D. granulate*、*D. maritime*、*D. minuta*、*D. parva*、*D. peircei*、*D. primolecta*、*D. salina*、*D. terricola*、*D. tertiolecta* 和 *D. viridis*; 独球藻,包括 *E. viridis*; *Ellipsoidon*; 眼虫藻; 披刺藻; 脆杆藻,包括 *F. crotonensis*; 粘球藻; 丽丝藻; 膜胞藻; 等鞭金藻,包括 *I. aff. galbana* 和 *I. galbana*; 鳞孔藻; 微芒藻(包括 UTEX LB 2614); 单针藻,包括 *M. minutum*; 单针藻; 微球藻; 拟微绿球藻,包括 *N. salina*; 舟形藻,包括 *N. acceptata*、*N. biskanterae*、*N. pseudotenelloides*、*N. pelliculosa* 和 *N. saprophila*; *Neochloris oleabundans*; 肾鞭藻; 肾片藻; 普通菱形藻; 菱形藻,包括 *N. alexandrina*、*N. communis*、*N. dissipata*、*N. frustulum*、*N. hantzschiana*、*N. inconspicua*、*N. intermedia*、*N. microcephala*、*N. pusilla*、*N. pusilla elliptica*、*N. pusilla monoensis* 和 *N. quadrangular*; 棕鞭藻; 卵囊藻,包括 *O. parva* 和 *O. pusilla*; 颤藻,包括 *O. limnetica* 和 *O. subbrevis*; *Parachlorella*, 包括 *P. beijerinckii*(包括 SAG 2046 株) 和 *P. kessleri*(包括任何 SAG 株 11.80、14.82、21.11H9); *Pascheria*, 包括

P. acidophila; 巴夫藻; 噬菌体; 席藻; 扁藻; 颗石藻, 包括 *P. carterae* 和 *P. dentate*; 无绿藻, 包括 *P. stagnora* (包括 UTEX 327)、*P. portoricensis* 和 *P. moriformis* (包括 UTEX 株 1441、1435、1436、1437、1439); *Pseudochlorella aquatica*; 塔胞藻; 桑葚藻; 混浊红球菌; *Sarcinoid chrysophyte*; 栅列藻, 包括 *S. armatus* 和 *S. rubescens*; 裂殖壶菌; 水绵; 纯顶螺旋藻; 裂丝藻; 聚球藻; 四角藻; 四片藻, 包括 *T. suecica*; 威氏海链藻; 和 *Viridiella fridericana*。

[0096] B. 产生色素形成缺乏或大幅度减少的微藻株的方法

[0097] 微藻 (如小球藻) 能够光合生长或者异养生长。当在碳源为固定碳源且没有光的异养条件下生长时, 通常为绿色的微藻具有黄颜色, 绿色素形成缺乏或大幅度减少。绿色素形成减少 (或缺乏) 的微藻可有利地作为食品成分。绿色素形成减少 (或缺乏) 的微藻的一个优点是, 微藻的叶绿素味道减少。绿色素形成减少 (或缺乏) 的微藻的另一优点是, 作为食品成分向食品原料中添加的微藻不会产生绿颜色, 而绿颜色不会对消费者产生吸引力。在异养条件下生长的微藻的绿色素形成的减少是暂时的。当换回到光养生长时, 能够光养和异养生长的微藻将恢复绿色素形成。此外, 即使绿色素减少, 异养生长的微藻也是黄颜色的, 这对于消费者期望食品原料为白颜色或浅颜色的一些食品应用来说可能是不合适的。因此, 有利的是产生能够异养生长 (因此绿色素形成减少或缺乏) 并且黄色素形成也减少 (因此对于食品应用来说是中性色) 的微藻株。

[0098] 产生色素形成缺乏或大幅度减少的微藻株的一种方法是通过诱变, 然后筛选所需的表型。几种诱变方法是已知的, 并且是在本领域中实施的。例如, Urano 等 (Urano 等, *J Bioscience Bioengineering* (2000) v. 90 (5) : pp. 567-569) 描述了利用 UV 照射产生的椭圆小球藻的黄色和白色突变体。Kamiya (Kamiya, *Plant Cell Physiol.* (1989) v. 30 (4) : 513-521) 描述了普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 11h (M125) 的无色株。

[0099] 除了通过 UV 照射诱变外, 为了产生色素形成减少 (或缺乏) 的微藻, 也可以采用化学诱变。已证实诸如甲烷磺酸乙酯 (EMS) 或 N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍 (NTG) 之类的化学诱变剂对包括酵母、真菌、分枝杆菌和微藻在内的多种微生物是有效的化学诱变剂。也可以进行多轮诱变, 其中使微藻接触诱变剂 (UV 或化学诱变剂或兼而有之), 然后筛选所需的色素形成减少的表型。然后在平板上划线培养出具有所需表型的集落并再分离, 以确保从一代到下一代的突变是稳定的, 并且集落是纯的而不是混合群体。

[0100] 在具体的实例中, 结合 UV 诱变与化学诱变, 使用原壳小球藻产生色素形成缺乏或减少的株。用 NTG 使原壳小球藻经受一轮化学诱变并筛选颜色突变体的集落。然后使没有表现出颜色突变的集落经受一轮 UV 照射, 并再次筛选颜色突变体。在一个实施例中, 分离出色素形成缺乏的原壳小球藻株, 其为原壳小球藻 33-55, 根据布达佩斯条约于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), 专利保藏编号 PTA-10397。在另一实施例中, 分离出色素形成减少的原壳小球藻株, 其为原壳小球藻 25-32, 根据布达佩斯条约于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), 专利保藏编号 PTA-10396。

[0101] C. 微藻的培养基和培养条件

[0102] 根据本发明的方法在液体培养基中培养微藻以繁殖生物物质。在本发明的方法中,

在没有光的情况下在含固定碳和 / 或固定氮源的培养基中生长微藻品种。这种生长被称为异养生长。例如对于一些微藻品种来说,在氮有限的条件下长时间(如 10 至 15 天或更长)地异养生长导致在细胞中积累高含量的脂质。

[0103] 微藻培养基通常含有的组分例如有固定碳源(下文讨论)、固定氮源(如蛋白质、豆粕、酵母提取物、玉米浆、氨(纯的或盐形式的)、硝酸根或硝酸盐)、微量元素(例如,在各自的形式例如为 ZnCl_2 、 H_3BO_3 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 中的锌、硼、钴、铜、锰和钼)、用于保持 pH 值的缓冲液和磷酸盐(磷源;可使用其它磷酸盐)。其它组分包括盐类,如氯化钠,特别是对于海水微藻来说。

[0104] 在具体的实例中,适合培养原壳小球藻的培养基包括蛋白胨培养基。此培养基适合无菌培养物,1L 体积的该培养基(pH 值~6.8)可以通过向 1 升 Bristol 培养基中添加 1g 蛋白胨来制备。Bristol 培养基在水溶液中包含 2.94mM 的 NaNO_3 、0.17mM 的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.3mM 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.43mM, 1.29mM 的 KH_2PO_4 和 1.43mM 的 NaCl 。对于 1.5% 的琼脂培养基来说,可以向 1L 溶液中添加 15g 琼脂。覆盖溶液并进行压蒸,然后在冷藏温度下储存才能使用。将原壳小球藻生长和繁殖成具有按干重的百分比计高含量油的其它方法已有描述(参见例如 Miao 和 Wu, J. Biotechnology, 2004, 11:85-93, 以及 Miao 和 Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846(说明获得 55% 油细胞干重的发酵方法))。通常延长发酵的时间,同时在氮限量的条件下提供过量的碳源,由此可以产生高油藻。

[0105] 固体和液体生长培养基通常有许多获取的来源,适合许多微生物株的特定培养基的制备说明可见于例如网上 <http://www.utex.org/>(由德克萨斯大学奥斯汀分校维护的网站,用于其藻类培养物保藏(UTEX))。例如,各种淡水培养基包括 1/2、1/3、1/5、1X、2/3、2X CHEV 硅藻培养基;1:1DYIII/PEA+Gr+;Ag 硅藻培养基;Allen 培养基;BG11-1 培养基;Bold 1NV 和 3N 培养基;葡萄藻培养基;Bristol 培养基;Chu' s 培养基;CR1、CR1-S 和 CR1+ 硅藻培养基;温泉红藻培养基;蓝藻培养基;带藻培养基;DYIII 培养基;眼虫藻培养基;HEPES 培养基;J 培养基;麦芽培养基;MES 培养基;改性 Bold 3N 培养基;改性 COMBO 培养基;N/20 培养基;棕鞭藻培养基;P49 培养基;素衣藻培养基;蛋白胨培养基;雪生藻培养基;土壤浸出液培养基;土壤水:GR-、GR-/NH₄、GR+、GBARR+/NH₄、PEA、泥炭和 VT 培养基;螺旋藻培养基;Tap 培养基;共球藻培养基;团藻科培养基;团藻科-3N 培养基;团藻培养基;团藻粉末葡萄糖培养基;Waris 培养基;和 Waris+ 土壤浸出液培养基。各种盐水培养基包括:1%、5%和 1X F/2 培养基;1/2、1X 和 2X Erdschreiber' s 培养基;1/2、1/3、1/4、1/5、1X、5/3 和 2X 土壤+海水培养基;1/4ERD;2/3 富集海水培养基;20% Allen+80% ERD;人工海水培养基;BG11-1+ 36% NaCl 培养基;BG11-1+1% NaCl 培养基;Bold 1NV: Erdschreiber(1:1)和(4:1);Bristol-NaCl 培养基;绒枝藻海水培养基;1/2 和 1X 富集海水培养基,包括 ES/10、ES/2 和 ES/4;F/2+NH₄;LDM 培养基;改性 1X 和 2X CHEV;改性 2X CHEV+ 土壤;改性人工海水培养基;单细胞红藻培养基;和 SS 硅藻培养基。

[0106] 本发明方法所用的其它合适的培养基可以通过查阅上面确定的 URL 而很容易地予以确定,或者咨询保持微生物培养物的其它组织,比如 SAG、CCAP 或 CCALA. SAG 指的是哥廷根大学的藻类培养物保藏中心学(德国哥廷根),CCAP 指的是由苏格兰海洋科学协会(英国苏格兰)管理的藻类和原生动物培养物保藏中心,CCALA 指的是植物研究所(捷克共和国的 Třeboň)的藻类实验室培养物保藏中心。

[0107] 适用于根据本发明方法的微生物可见于整个世界的不同位置和环境。由于它们与其它品种的分离,以及它们由此产生的进化分歧,由此可能难以或者不可能预测任何具体微生物品种最佳地生长和产生油和 / 或脂质和 / 或蛋白质的具体生长培养基,但本领域技术人员鉴于本文中公开的内容,通过进行例行的试验便可以很容易地找到适当的培养基。在一些情况下,某些微生物株可能无法生长于特定的生长介质,因为存在着一些抑制性组分,或者缺少特定的微生物株所需的一些基本的营养需求。下面提供培养各种微藻品种以积累按细胞干重的百分比计高含量脂质的示例性方法的例子。

[0108] 固定碳源是培养基的关键组分。对本发明来说,合适的固定碳源包括例如葡萄糖、果糖、蔗糖、半乳糖、木糖、甘露糖鼠李糖、阿拉伯糖、N- 乙酰氨基葡萄糖、甘油、弗罗里多昔、葡萄糖醛酸和 / 或乙酸酯。根据本发明用于培养微藻的其它碳源包括混合物,如甘油与葡萄糖的混合物、葡萄糖与木糖的混合物、果糖与葡萄糖的混合物和蔗糖与解聚甜菜浆的混合物。适合用于培养微藻的其它碳源包括黑液、玉米淀粉、解聚纤维素物质(得自例如玉米秸秆、甜菜浆和柳枝稷)、乳糖、乳清、糖蜜、马铃薯、稻、高粱、蔗糖、甜菜、甘蔗和小麦。一种或多种碳源的供给浓度可以为至少约 50mM、至少约 100mM、至少约 500mM、至少约 5mM、至少约 50mM 和至少约 500mM。

[0109] 因此,在各种实施例中,用在生长培养基中的固定碳能量源包括甘油和 / 或 5- 和 / 或 6- 碳糖,如葡萄糖、果糖和 / 或木糖,它们可得自蔗糖和 / 或纤维素物质,包括解聚纤维素物质。多品种的小球藻和品种内的多株可在蔗糖、解聚纤维素物质和甘油的存在下生长,分别如美国专利申请公开 No. 20090035842、No. 20090011480、No. 20090148918 中所述,也参见 PCT 专利申请公开 No. 2008/151149,它们每个以引用的方式并入本文。

[0110] 因此,在本发明的一个实施例中,使用解聚纤维素生物物质为原料培养微生物。与诸如玉米淀粉或来自甘蔗或甜菜的蔗糖之类的其它原料相反,纤维素生物物质(解聚的或别的类型的)不适合人食用,并且有可能以较低的成本加以利用,这使得其对本发明来说是特别有利的。微藻可以在解聚纤维素物质上增殖。纤维素物质通常包括 40-60% 干重的纤维素;20-40% 干重的半纤维素;和 10-30% 干重的木质素。合适的纤维素物质包括草本和木本能源作物以及农作物的残留物,即,未随初级食品或纤维产品从田间取下的植物部分,主要是茎和叶。例子包括:农业废物,如甘蔗渣、稻壳、玉米纤维(包括茎、叶、荚和棒子)、麦秸、稻草、甜菜浆、柑橘浆、柑橘皮;林业废物,如来自木材加工的硬木和软木疏伐材以及硬木和软木残渣。废木材,如锯木厂废料(木屑、锯末)和制浆厂废料;城市废物,如城市固体废物中的纸片、城市废木材和城市绿地废料,如城市剪草;和木建筑废料。另外的纤维素包括专用的纤维素作物,如柳枝稷、杂交杨木和芒秆、纤维秆和纤维高粱。由此类物质产生的五碳糖包括木糖。实例 20 描述了在异养条件下使用来自玉米秸秆和甜菜浆的纤维素衍生糖成功培养的原壳小球藻。

[0111] 一些微生物能够处理纤维素物质并直接利用纤维素物质作为碳源。然而,纤维素物质通常需要经过处理以增大可及的表面积,或者用于使纤维素首先被分解,准备作为碳源供微生物利用。用于酶解的纤维素物质的制备或预处理方式是本领域中熟知的。所述方法分为两大类:(1) 使纤维素物质分解成更小的颗粒,以便增大可及的表面积;和(2) 化学处理纤维素物质以形成可用于酶解的底物。

[0112] 增大可及表面积的方法包括蒸汽爆破,其涉及用高温蒸汽来分解纤维素物质。这

一过程要求高温,因此纤维素物质中的一些糖可能会有损失,从而减少了可供酶解的碳源(参见例如,Chahal, D. S. 等, *Proceedings of the 2nd World Congress of Chemical Engineering*(1981);和 Kaar 等, *Biomass and Bioenergy*(1998) 14(3):277-87)。氨爆破可允许纤维素物质在较低温度下发生爆破,但实施起来成本较高,并且氨有可能干扰后续的酶解过程(参见例如, Dale, B. E. 等, *Biotechnology and Bioengineering*(1982);12:31-43)。另一种爆破技术涉及使用超临界二氧化碳爆破,以便将纤维素物质分解成较小的碎片(参见例如, Zheng 等, *Biotechnology Letters*(1995);17(8):845-850)。

[0113] 对纤维素物质进行化学处理以形成可用于酶解的底物的方法也是本领域中已知的。美国专利 No. 7, 413, 882 描述了使用基因改造的微生物,所述基因改造的微生物分泌 β -葡萄糖苷酶到发酵液当中,并用发酵液处理纤维素物质以增强纤维素物质水解成葡萄糖。还可以用强酸和强碱处理纤维素物质以助于后续的酶解。美国专利 No. 3, 617, 431 描述了利用碱性消化分解纤维素物质。

[0114] 小球藻可以在含木糖与葡萄糖组合的培养基(如解聚纤维素物质)上增殖,并且意料不到的是,当在葡萄糖与木糖的组合上进行培养时,一些品种甚至表现出比单独在葡萄糖上或者单独在木糖上培养时更高的生产率。因此,某些微藻可以利用倒是非食用的原料(如纤维素物质(或经预处理的纤维素物质)或甘油)作为碳源并生产食用油。This 这使得能够将非食用的纤维素和甘油(通常不属于人类的食物链,这与来自甘蔗和甜菜的玉米葡萄糖和蔗糖相反)转化成高营养的食用油(作为人的日常饮食的一部分,可以提供营养物质和热量)。因此,本发明提供将非食用原料转化成高营养的食用油、食物制品和食品组合物的方法。

[0115] 与表达分泌型蔗糖转化酶的生物体共培养的或在含蔗糖转化酶的培养基中培养的或表达外源性蔗糖转化酶基因(其中分泌转化酶或者生物体还表达蔗糖转运蛋白)的微藻可以在来自甘蔗或其它蔗糖源的废糖蜜上增殖。使用这种低价值、含蔗糖的废产品可显著地节约食用油的生产成本。因此,本文中所述的在蔗糖原料上培养微藻以及配制食品组合物和营养补品的方法提供了将低营养的蔗糖转化成高营养油(油酸、DHA、ARA 等)和含这种油的生物质的方式。

[0116] 如上面提到的专利公开中所详述,许多不同的小球藻品种和株不仅在纯化的试剂级甘油上、而且在来自生物柴油酯交换的酸化及非酸化甘油副产品上增殖得非常好。意料不到的是,一些小球藻株在甘油的存在下进行的细胞分裂比在葡萄糖的存在下进行的细胞分裂更快。两阶段的生长过程(其中首先以甘油供给细胞,以迅速增大细胞密度,然后供给葡萄糖以积累脂质)可提高产生脂质的效率。

[0117] 另一种提高脂质作为细胞干重的百分比的方法涉及使用乙酸酯作为原料用于微藻。乙酸酯直接供给到引发脂肪酸合成(即,乙酰基-CoA)的代谢点;因此在培养物中提供乙酸酯可增加脂肪酸的生产量。通常,在足量乙酸酯的存在下培养微生物,以提高微生物脂质和/或脂肪酸的产率(具体地说,相对于在没有乙酸酯情况下的产率)。供给的乙酸酯是适用于本文中提供的产生微藻生物质方法的组分,所述微藻生物质具有占细胞干重的高比例的脂质。

[0118] 在另一实施例中,通过在一种或多种脂质途径酶(例如,脂肪酸合成酶)的辅因子的存在下培养产生脂质的微藻来提高脂质产率。通常,辅因子的浓度足以将微生物脂质

(例如,脂肪酸)的产率提高到超过在没有辅因子情况下的微生物脂质产率。在具体的实施例中,通过在培养物中包括分泌辅因子的微生物或者通过向培养基中添加辅因子来对培养物提供辅因子。作为另外的选择,可以改造微藻以表达编码参与辅因子合成的蛋白质的外源性基因。在某些实施例中,合适的辅因子包括任何脂质途径酶所需的维生素,例如生物素或泛酸盐。

[0119] 与低脂质生物质相比,微藻中的高脂质生物质包含在食物制品中是有利的物质,因为这样能够添加较少的微藻生物质以将相同量的脂质掺合到食品组合物当中。这样做是有利的,因为与低脂质生物质相比,将高脂质微藻中的健康油加入到食物制品中可以不改变其它属性,如质感和味道。通过本发明方法提供的富脂质生物质通常具有按细胞干重计至少 25% 的脂质。可以调节处理条件以提高细胞中脂质的重量百分比。例如在某些实施例中,在限制浓度的一种或多种营养物质(例如氮、磷或硫)的存在下培养微藻,同时提供过量的固定碳源(如葡萄糖)。氮限制往往将微生物脂质产率提高到超过在提供过量氮的培养物中的微生物脂质产率。在具体的实施例中,脂质产率提高至少约 10%、50%、100%、200% 或 500%。可以在限制量的营养物质的存在下培养微生物,培养时间为完整培养期的一部分或整个培养期。在一些实施例中,营养物质浓度在限制浓度与非限制浓度之间循环至少两次。

[0120] 在稳定的生长状态下,细胞积累油但不进行细胞分裂。在本发明的一个实施例中,通过对细胞连续提供初始生长培养基的所有组分(除固定氮源外)来保持生长状态。通过对细胞供给原先对细胞提供的所有营养物质(除了固定氮源)来培养微藻细胞,如通过对细胞进行长时间的供给,这样导致按细胞干重计较高的脂质百分比。

[0121] 在其它实施例中,通过在所有固定氮已经耗尽达很长的时间(如至少一个或两个星期)之后对细胞供给固定碳源产生高脂质生物质。在一些实施例中,使细胞在固定碳源的存在和没有固定氮源的情况下积累油超过 20 天。采用本文中描述的条件或本领域中已知的别的条件生长的微藻可以包含按干重计至少约 20% 的脂质,通常包含按干重计 35%、45%、55%、65% 并且甚至达 75% 或更多的脂质。因此通过将细胞保持在异养生长状态(其中它们消耗碳并积累油,但不进行细胞分裂)下可提高微生物脂质生产中的脂质在细胞干重中的百分比。

[0122] 来自藻类中的高蛋白生物质是用于包含在食物制品中的另一种有利的物质。本发明的方法还可以提供具有占其细胞干重至少 30% 的蛋白质的生物质。生长可以调节条件以提高细胞中蛋白质的重量百分比。在优选的实施例中,在富氮环境中且固定碳能量(如葡萄糖)或任何上述讨论到的其它碳源过量的情况下培养微藻。氮过量的条件往往将微生物的蛋白质产率提高到超过在不提供过量氮条件下培养的微生物的蛋白质产率。为了使蛋白质的生产量最高,优选在过量氮的存在下培养微生物达完整的培养期。合适的微藻氮源可来自有机氮源和/或无机氮源。

[0123] 早在 20 世纪便已经在微生物培养物中使用有机氮源。有机氮源(如玉米浆)的使用在由霉菌生产青霉素中很普遍。研究人员发现,在培养基中包含玉米浆可增强微生物的生长,并导致产品(如青霉素)产率的提高。对玉米浆的分析确定的是,它是一种富氮源,并且也富含维生素(如 B- 复合维生素)、核黄素泛酸、烟酸、肌醇和营养矿物质(如钙、铁、镁、磷和钾)(Ligget 和 Koffler, Bacteriological Reviews(1948);12(4):297-311)。有

机氮源（如玉米浆）已经用在酵母、细菌、真菌及其它微生物的发酵培养基中。有机氮源的非限制性例子有酵母提取物、蛋白胨、玉米浆和玉米浆粉。优选的无机氮源的非限制性例子包括（例如）但不限于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4OH 。在一个实施例中，用于实施本发明的培养基只含有无机氮源。在另一实施例中，用于实施本发明的培养基只含有有机氮源。在又一实施例中，用于实施本发明的培养基含有有机氮源和无机氮源的混合物。

[0124] 在本发明的方法中，使用生物反应器或发酵罐对各生理周期阶段的微藻细胞进行培养。作为例子，将产生脂质的微藻细胞的接种体引入培养基；在细胞开始繁殖之前有滞后期（滞后阶段）。滞后期之后，繁殖速率稳定地增大，进入对数期或指数期。指数期后面又是繁殖的放缓，这是由于营养物质（如氮）减少，有毒物质增多，并且还有群体感应机制。此放缓过后，繁殖停止，细胞进入稳定期或达到稳定生长状态，这取决于提供给细胞的具体环境。为了得到富蛋白的生物物质，通常在指数期期间或者在指数期结束之后不久收获培养物。为了得到富脂质的生物物质，通常最好就在指数期结束之后收获培养物，通过使氮或另外的关键营养物质（除碳以外）耗尽，迫使细胞将过量存在的碳源转化成脂质，由此可以提早终止指数期。可以变换培养条件参数以优化总的产油量、产生的脂质品种的组合和 / 或特定油的产量。

[0125] 生物反应器用在异养生长和繁殖方法中可提供许多优点。可以理解的是，当在本文中所述的异养生长和繁殖方法中使用固定碳源时，在光合生长方法中使细胞能够利用光的措施是不必要的。为产生用于食品的生物物质，优选在液体（作为例子，如在悬浮培养液）中使微藻大量地发酵。诸如钢发酵罐（在本发明的各实施例中使用 5000 升、10,000 升、40,000 升及更大体积的钢发酵罐）之类的生物反应器可以适应很大的培养物体积。生物反应器通常也能够控制培养条件（如温度、pH 值、氧分压及二氧化碳含量）。例如，生物反应器通常可（例如）配置连接管道的进出口，以使气态组分（像氧或氮）能够通过培养液鼓泡。

[0126] 可以将生物反应器配置成在微藻繁殖和数目增加的整个时间段上使培养基流过生物反应器。例如在一些实施例中，可以在接种之后细胞达到所需密度之前将培养基注入生物反应器。在其它情况下，接种培养物之后，在注入培养物开始时使生物反应器充满培养基，并且不注入更多的培养基。换句话说，在水性培养基中将微藻生物物质培养一段时间，在此期间微藻繁殖并且数目增多；然而，在整个所述的时间段上，大量的水性培养基不流过生物反应器。因此在一些实施例中，在接种之后，水性培养基不流过生物反应器。

[0127] 可以使用备有诸如旋转刀和叶片、摇动装置、搅拌棒、加压气体注入装置之类的设备的生物反应器使微藻培养物混合。混合可以是连续的或者是间歇式的。例如在一些实施例中，不保持进气口和培养基入口的湍流状态以繁殖微藻，直到已经实现所需的所述微藻数目的增加。

[0128] 如上简述，生物反应器通常备有各种进出口，所述进出口（例如）能够变换微藻的培养物的含气量。为了说明这一点，生物反应器的部分体积可以是气体而不是液体，并且生物反应器的进气口能够将气体抽吸到生物反应器里面。可以被有利地抽吸到生物反应器里面的气体包括空气、空气 / CO_2 混合物、惰性气体（如氩气）及其它气体。通常把生物反应器配置成使用户能够控制气体进入生物反应器的速率。如上所述，可以提高进入生物反应器的的气体流量以增强培养物的混合。

[0129] 提高气体流量也会影响培养物的浊度。通过在水性培养基的水平面以下设置进气口,这样使进入生物反应器的气体鼓泡到培养物的表面,由此可以实现湍流。一个或多个出气口使气体能够逸出,由此防止生物反应器中的压力积聚。优选出气口通往“单向”阀,所述“单向”阀防止污染性微生物进入生物反应器。

[0130] 本文中所述的生物反应器、培养条件以及异养生长和繁殖方法的具体实例可按任意合适的方式结合,从而提高微生物生长的效率和/或蛋白质产量。

[0131] D. 发酵后的微藻浓缩

[0132] 根据如上所述的方法形成的微藻培养物产生在发酵培养基中的微藻生物质。为制备用作食品组合物的生物质,对生物质进行浓缩,或者从发酵培养基中收获生物质。在从发酵培养基中收获微藻生物质之时,生物质主要包含悬浮在水性培养基中的完整细胞。为了浓缩生物质而进行脱水步骤。脱水或者浓缩是指生物质与发酵液或其它液体介质的分离,因此是固液分离。因此在脱水期间,培养基被从生物质中移除(例如,通过经由保持生物质的过滤器排出发酵液),或者以别的方式从培养基中移除生物质。常见的脱水方法包括离心、过滤和使用机械压力。这些方法可单独使用,或以任意组合的方式使用。

[0133] 离心涉及利用离心力分离混合物。在离心过程中,混合物的密度较大的组分远离离心轴迁移,而混合物的低密度组分朝着所述轴迁移。通过增加有效引力(即,提高离心速度),密度较大的物质(如固体)与低密度物质(如液体)分离,因此会根据密度而析出。生物质和肉汤或其它水溶液的离心形成包含微藻细胞的浓缩膏。离心不会移除大量的细胞内的水。实际上在离心之后,生物质中仍然可能有相当量的表面水分或游离水分(例如,70%以上),因此不认为离心是干燥步骤。

[0134] 也可以采用过滤脱水。适合本发明的一个过滤的例子是切向流过滤(TFF),也称交叉流过滤。切向流过滤是使用膜系统和流动力使固体与液体分离的分离技术。关于合适的示例性过滤方法可参见 Geresh, Carb. Polym. 50 ;183-189(2002),其描述了使用 MaxCell A/G Technologies 的 0.45 μ m 中空纤维过滤器。还可参见(例如)与 100kD、300kD、1000kD(目录号 P2C01MC01)、0.1 μ m(目录号 P2VPPV01)、0.22 μ m(目录号 P2GVPPV01)和 0.45 μ m 膜(目录号 P2HVMPV01)使用的 Millipore **Pellicon**[®] 设备。优选截留物不会以显著的量通过过滤器,并且截留物中的产物优选不粘附于过滤材料。也可以使用中空纤维过滤系统进行 TFF。孔径至少约 0.1 微米的过滤器是合适的,例如孔径为约 0.12、0.14、0.16、0.18、0.2、0.22、0.45 或至少约 0.65 微米。TFF 的优选孔径允许发酵液中的溶解物和碎片流过,但不允许微生物细胞流过。

[0135] 直接对生物质施加以分离发酵液与微生物质的机械压力也可影响脱水,所述机械压力足以使生物质脱水,但不导致主要性的细胞溶解。可使用带式压滤机施加机械压力以使微生物质脱水。带式压滤机是对浆料(例如,直接取自发酵罐或生物反应器的微生物质)施加机械压力的脱水设备,所述浆料经由直径减小的辊的盘管通过两个拉紧带之间。带式压滤机实际上可分为三个区:重力区,其中靠重力通过多孔带排出自由排水/液体;楔形区,其中制备用于压力施加的固体;和压力区,其中对重力排出的固体施加可调节的压力。

[0136] 浓缩后,可如下文所述处理微藻生物质,以制成真空包装的糕点、藻片、藻匀浆、藻粉末、藻碎粉或藻油。

[0137] E. 微藻生物质的化学组成

[0138] 通过本文中所述的培养方法产生的微藻生物质包含微藻油和 / 或蛋白质以及在发酵过程中由微生物产生或由微生物从培养基中混入的其它成分。

[0139] 已经采用不同的培养方法产生了具有按干重计高比例的油 / 脂质累积的微藻生物质, 包括采用本领域中已知的方法。具有高比例累积油 / 脂质的微藻生物质对本发明是有用的。采用高铁 (Fe) 浓度在自养条件下生长的静置培养物中按细胞干重 (DCW) 计具有多达 56.6% 脂质的普通小球藻已有描述 (Li 等, *Bioresource Technology* 99(11): 4717-22(2008))。在氮饥饿条件下在光生物反应器中生长的按 DCW 计分别具有 60% 脂质和具有 39.8% 脂质的微绿球藻和角毛藻培养物也已有描述 (Rodolfi 等, *Biotechnology & Bioengineering*(2008))。当向光生长且处于低氮条件时具有按 DCW 计大约 30% 脂质的缺刻缘绿藻 (*Parietochloris incise*) 培养物已有描述 (Solovchenko 等, *Journal of Applied Phycology* 20:245-251(2008))。当在氮饥饿的某些异养条件下生长时, 原壳小球藻可以产生按 DCW 计多达 55% 的脂质 (Miao 和 Wu, *Bioresource Technology* 97: 841-846(2006))。已经描述了其它小球藻品种 (包括浮水小球藻、*Chlorella sorokiniana* 和极微小球藻) 当在低氮培养基条件下在搅拌槽生物反应器中生长时已累积有按 DCW 计多达 63% 的油 (Illman 等, *Enzyme and Microbial Technology* 27:631-635(2000))。按 DCW 计比例还要高的脂质已有报导, 包括在增加 NaCl 条件下生长的杜氏藻培养物中 70% 的脂质 (Takagi 等, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(3):223-226(2006)) 和在丛粒藻中 75% 的脂质 (Banerjee 等, *Critical Reviews in Biotechnology* 22(3): 245-279(2002))。

[0140] 异养生长得到相对低含量的叶绿素 (与诸如敞开的池塘或封闭的光生物反应器系统之类的光养系统相比)。叶绿素含量的减少通常会改善微藻的感官品质, 因此允许向食物制品里面掺合更多的藻类生物质 (或由此制备的油)。见于异养生长微藻 (例如小球藻) 中的叶绿素含量的减少也减弱了生物质中的绿颜色 (与向光生长的微藻相比)。因此, 叶绿素含量的减少避免了通常与含向光生长的微藻的食物制品相关的不良绿颜色, 并允许向食物制品里掺合藻类生物质或提高掺合藻类生物质的量。在至少一个实施例中, 食物制品含有叶绿素含量减少的异养生长的微藻 (与向光生长的微藻相比)。

[0141] 按本文中所述的培养方法产生并适用于本发明的富含油的微藻生物质包含按 DCW 计至少 10% 的微藻油。在一些实施例中, 微藻生物质包含按 DCW 计至少 15%、25%、50%、75% 或至少 90% 的微藻油。

[0142] 本文中所述的生物质 (或生物质的提取物) 的微藻油可以包含具有一种或多种不同脂肪酸酯侧链的甘油酯。甘油酯由与一个、两个或三个脂肪酸分子酯化的甘油分子组成, 所述脂肪酸分子可以具有不同的长度, 并且可以具有不同的饱和度。特定的藻油共混物可以在单个藻类品种内进行制备, 或者可以将来自两个或更多个微藻品种的生物质 (或藻油) 混合在一起。

[0143] 因此, 也可以通过组合来自至少两个不同微藻品种的生物质 (或油) 来变换油的组成, 即甘油酯的脂肪酸组分的性质和比例。在一些实施例中, 不同微藻品种的至少两个具有不同的甘油酯谱。不同的微藻品种可以一起或单独地培养, 如本文中所述, 优选在异养条件下培养, 从而产生相应的油。不同的微藻品种可以在细胞的甘油酯中含有不同比例的不同脂肪酸组分。

[0144] 在一些实施例中,微藻油主要由单不饱和油组成。在一些情况下,藻油是按重量计至少 20% 的单不饱和油。在各实施例中,藻油是按重量或按体积计至少 25%、50%、75% 或更多的单不饱和油。在一些实施例中,单不饱和油是 18:1、16:1、14:1 或 12:1。在一些实施例中,微藻油包含按重量或按体积计至少 10%、20%、25% 或 50% 或更多的酯化油酸或酯化 α -亚麻酸。在至少一个实施例中,藻油包含按重量或按体积计不到 10%、不到 5%、不到 3%、不到 2% 或不到 1% 的酯化二十二碳六烯酸或基本上不含酯化二十二碳六烯酸 (DHA (22:6))。关于生产高 DHA 含量的微藻 (如寇氏隐甲藻) 的例子,可参见美国专利 7,252,979、6,812,009 和 6,372,460。

[0145] 已经采用了不同的培养方法产生高蛋白微藻生物质。具有高比例蛋白质含量的微藻生物质适用于本发明。例如,各微藻品种的蛋白质含量已有报导 (参见 Becker, *Biotechnology Advances* (2007) 25:207-210, 表 1)。已经报导了控制四鞭片藻 (*Tetraselmis suecica*) 的半连续光合自养培养物中的更新率可影响每个细胞的蛋白质含量,最高为大约 22.8% 的蛋白质 (Fabregas 等, *Marine Biotechnology* (2001) 3:256-263)。

[0146] 按本文中所述的培养方法产生并适用于本发明涉及高蛋白的实施例的微藻生物质通常包含按细胞干重计至少 30% 的蛋白质。在一些实施例中,微藻生物质包含按细胞干重计至少 40%、50%、75% 或更多的蛋白质。在一些实施例中,微藻生物质包含按细胞干重计 30-75% 的蛋白质或按细胞干重计 40-60% 的蛋白质。在一些实施例中,微藻生物质中的蛋白质包含至少 40% 的可消化粗蛋白。在其它实施例中,微藻生物质中的蛋白质包含至少 50%、60%、70%、80% 或至少 90% 的可消化粗蛋白。在一些实施例中,微藻生物质中的蛋白质包含 40-90% 的可消化粗蛋白、50-80% 的可消化粗蛋白或 60-75% 的可消化粗蛋白。

[0147] 微藻生物质 (和由此提取的油) 还可以包含由微藻产生的或从培养基中掺合到生物质里面的其它组分。这些其它组分可以以不同的量存在,这取决于所采用的培养条件和微藻的品种 (以及如果适用的话,用于从生物质中收集微藻油的提取方法)。其它组分可包括但不限于磷脂 (例如藻类卵磷脂)、碳水化合物、可溶性及不溶性纤维、糖蛋白、植物甾醇 (例如, β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、麦角甾醇和菜籽甾醇)、生育酚、生育三烯酚、类胡萝卜素 (例如 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素和番茄红素)、叶黄素 (例如,黄体素、玉米黄质、 α -隐黄质和 β -隐黄质)、蛋白质、多糖 (例如,阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、6-甲基半乳糖和葡萄糖) 以及各种有机或无机化合物 (例如硒)。

[0148] 在一些情况下,生物质包含至少 10ppm 的硒。在一些情况下,生物质包含至少 25% w/w 的藻多糖。在一些情况下,生物质包含至少 15% w/w 的藻糖蛋白。在一些情况下,生物质包含 0-115mcg/g 的总类胡萝卜素。在一些情况下,生物质包含至少 0.5% 的藻磷脂。在一些情况下,得自藻类生物质的油含有至少 0.10mg/g 的生育三烯酚。在一些情况下,得自藻类生物质的油含有 0.125mg/g 到 0.35mg/g 的总生育三烯酚。在一些情况下,得自藻类生物质的油含有至少 5.0mg/100g 的总生育酚。在一些情况下,得自藻类生物质的油含有 5.0mg/100g 到 10mg/100g 的生育酚。原壳小球藻中的生育三烯酚和生育酚组合物的详细说明包括在下面的实例中。

[0149] 在一些情况下,微藻生物质包含至少 10% 的可溶性纤维。在其它实施例中,微藻生物质包含至少 20% 到 25% 的可溶性纤维。在一些实施例中,微藻生物质包含至少 30% 的不溶性纤维。在其它实施例中,微藻生物质包含至少 50% 到至少 70% 的不溶性纤维。总膳

食纤维是可溶性纤维与不溶性纤维的总和。在一些实施例中，微藻生物质包含至少 40% 的总膳食纤维。在其它实施例中，微藻生物质包含至少 50%、55%、60%、75%、80%、90% 到 95% 的总膳食纤维。

[0150] III. 将微藻生物质加工成成品食物成分

[0151] 根据本发明方法生产的浓缩微藻生物质本身为成品食物成分，可用在食品原料中而不用进一步改性，或者只进行最低限度的改性。例如，可以对糕点进行真空包装或冷冻。作为另外的选择，可以通过冻干法干燥生物质，这是一种“冷冻干燥”过程，其中生物质在应用了真空的冷冻干燥室中冷冻。对冷冻干燥室应用真空导致生物质中的水升华（一次干燥）和解吸（二次干燥）。然而，本发明提供多种得自微藻的成品食物成分，它们具有由可应用于浓缩微藻生物质的本发明的加工方法产生的增强性质。

[0152] 对主要是完整的或匀浆形式的微藻生物质进行干燥有利于对本文中所述的方法和组合物中的生物质进行进一步加工或使用。干燥是指从主要是完整的生物质中除去游离或表面的水分 / 水，或者从匀质化（例如，通过微化）生物质的浆料中除去表面水。根据藻类生物质是否是干燥过的，以及如果是干燥过的话，根据干燥方法的情况，可以对食物制品赋予不同的质感和滋味。对由本文中所述培养的微藻产生的生物质进行干燥能除去水，而所述水可能是食物成品或食品成分中的不可取的组分。在一些情况下，干燥生物质可有助于使微藻油的提取过程更有效。

[0153] 在一个实施例中，将浓缩的微藻生物质滚筒干燥成薄片形式以产生藻片，如本段的 A 部分中所述。在另一实施例中，对浓缩的微藻类生物质进行喷雾干燥或快速干燥（即，经受气流干燥过程）以形成含主要是完整细胞的粉粒，从而产生藻粉末，如本段的 B 部分中所述。在另一实施例中，对浓缩的微藻生物质进行微化（匀质化）以形成主要是溶解细胞的匀浆，其然后经喷雾干燥或快速干燥产生藻碎粉，如本段的 C 部分中所述。在另一实施例中，从浓缩的微藻生物质中提取油以形成藻油，如本段的 D 部分中所述。

[0154] A. 藻片

[0155] 由浓缩的微藻生物质制备本发明的藻片，将所述浓缩的微藻生物质作为膜施加到辊、受热滚筒的表面上。然后用刀或刀片刮下干固体，得到小的薄片。美国专利 No. 6, 607, 900 描述了使用转鼓式干燥机在不用事先进行离心（浓缩）步骤的情况下干燥微藻生物质，这种过程可以用在本发明的方法中。

[0156] 因为生物质在干燥处理期间可能接触到高热量，所以可能有利的是在干燥之前向生物质中添加抗氧化剂。添加抗氧化剂不仅能在干燥期间保护生物质，而且还能延长储存的干燥微藻生物质的保质期。在优选的实施例中，在后续加工（如干燥或均化）之前向微藻生物质中添加抗氧化剂。在下面要详细地讨论适合使用的抗氧化剂。

[0157] 另外，如果在生产脱水微藻生物质与后续加工步骤之间有相当长的时间，则可能有利的是在干燥之前对生物质进行巴氏灭菌。如果在产生生物质与干燥生物质之间有相当长的时间，则可以形成脂肪酶中的游离脂肪酸。生物质的巴氏灭菌使这些脂肪酶失活，并防止在所得到的干燥生物质产品中形成“肥皂的”味道。因此在一个实施例中，本发明提供经巴氏杀菌的微藻生物质。在另一实施例中，经巴氏杀菌的微藻生物质是藻片。

[0158] B. 藻粉末

[0159] 使用气流干燥器或喷雾干燥器（参见例如美国专利 No. 6, 372, 460），由浓缩的微

藻生物质制备本发明的藻粉末。在喷雾干燥器中,液体悬浮液中的物质以细滴分散体的形式喷射到热空气流当中。夹带的物质迅速干燥并形成干粉粒。在一些情况下,也可以使用脉冲燃烧干燥器以在最终的干燥物质中实现粉状质感。在其它情况下,采用喷雾干燥继之以使用流化床干燥器的组合以达到干燥微生物物质的最佳条件(参见例如美国专利 No. 6, 255, 505)。作为替代方案,气流干燥器也可用于藻粉末的生产。气流干燥器将要干燥的物质拉入或拖入热空气流。在物质被拖入热空气流中的时候,水分被迅速地除去。然后使干物质与湿空气分离,然后将湿空气再循环供进一步干燥用。

[0160] C. 藻碎粉

[0161] 由已经机械溶解和匀质化并经喷雾干燥或快速干燥(或使用别的气流干燥系统干燥)的浓缩微藻生物质制备本发明的藻碎粉。生产藻碎粉要求溶解细胞以释放它们的油,并且微化细胞壁和细胞内的组分或使其粒度减小到平均尺寸不超过 $10\mu\text{m}$ 。乳化所得到的油、水和微化颗粒,使得在干燥之前油不与分散体分离。例如,可以使用压力破碎器将含有细胞的浆料抽吸通过扼流孔板阀以溶解细胞。施加高压(高达 1500 巴),接下来通过出口喷嘴瞬间膨胀。通过三种不同的机制完成细胞破碎:冲击阀、在孔口的高液体剪切和经放电后的突然压降,导致细胞的爆裂。所述方法释放细胞内的分子。可以使用 Niro(Niro Soavi GEA) 匀化器(或任何其它的高压匀化器)将细胞处理成主要是 0.2 到 5 微米长度的微粒。在高压(大约 1000 巴)下处理藻类生物质通常溶解超过 90% 的细胞,并且将粒度减小到小于 5 微米。

[0162] 作为另外的选择,可以使用球磨机。在球磨机中,细胞在悬浮液中被小的磨粒(如珠)搅动。细胞基于剪切力、珠之间的磨削和与珠的碰撞而破裂。珠使细胞破裂以释放细胞内容物。在一个实施例中,使用 Dyno-mill ECM Ultra(CB Mills) 球磨机破碎藻类生物质并形成稳定的乳液。也可以通过剪切力破裂细胞,如借助于共混(作为例子,如用高速搅拌机或 Waring 搅拌机)、法式压滤壶或甚至离心(如果细胞壁薄弱的话)以破裂细胞。包括球尺寸和刀片细节的合适的球磨机描述在美国专利 No. 5, 330, 913 中。

[0163] 均化的直接产品是尺寸比悬浮在油和水中的原始细胞小的微粒的浆料。所述微粒代表细胞碎屑。由细胞释放油和水。更多的水可来自于均化之前含有细胞的水性培养基。微粒的形式优选为微化的匀浆。如果搁置的话,一些较小的微粒可以聚结。然而,可以通过用微晶稳定剂(如微晶纤维素)引晶来保存小微粒的均匀分散体。

[0164] 为了形成藻碎粉,对浆料进行喷雾干燥或快速干燥,除去水并留下含有细胞碎屑的干粉和油。虽然粉末的含油量可以为干粉末的至少 10 重量%、25 重量%或 50 重量%,但粉末也可以具有干燥而不是油腻的感觉和外观(例如,没有明显的油),摇动时也可以自由流动。也可以添加各种助流剂(包括二氧化硅衍生的产品)。干燥后粉末的水含量或水分含量通常小于 10 重量%、5 重量%、3 重量%或 1 重量%。也可使用其它干燥器(如气流干燥器或脉冲燃烧干燥器)来产生藻碎粉。

[0165] 藻碎粉的含油量可根据藻类生物质的油百分比而有所变化。可以由不同含油量的藻类生物质产生藻碎粉。在某些实施例中,由相同含油量的藻类生物质产生藻碎粉。在其它实施例中,由不同含油量的藻类生物质产生藻碎粉。在后一种情况下,可以合并不同含油量的藻类生物质,然后进行均化步骤。在其它实施例中,首先产生不同含油量的藻碎粉,然后以不同的比例共混到一起,以便获得含有最终所需含油量的藻碎粉产品。在又一实施例

中,可以把不同脂质谱的藻类生物质合并在一起,然后匀质化以产生藻碎粉。在另一实施例中,首先产生不同脂质谱的藻碎粉,然后以不同的比例共混到一起,以便获得含有最终所需脂质谱的藻碎粉产品。

[0166] 本发明的藻碎粉适用于广泛的食物制备。由于含油量、纤维含量和微化颗粒的原因,藻碎粉是多功能的食品成分。藻碎粉可用于烘烤食品、速制面包、酵母面团产品、蛋制品、调味品、沙司、营养饮料、藻奶、意大利面和不含面筋的产品。更多用藻碎粉配制这些以及其它食物制品的细节描述在下面的实例中。

[0167] 藻碎粉可用在烘烤食品中代替常规脂肪源(例如,油、黄油或人造黄油)以及蛋类。烘烤食品和不含面筋的产品具有上好的水分含量和屑粒状结构,所述屑粒状结构与由黄油和蛋类制成的常规烘烤食品没有什么区别。由于上好的水分含量的原因,这些烘烤食品与不用藻碎粉生产的常规烘烤食品相比具有更长的保存期限,并且能更久地保持它们原有的质感。

[0168] 藻碎粉还可以充当用在思慕雪、沙司或调味品中的脂肪增量剂。藻碎粉组成的独特性在于其能够传递比得上具有较高脂肪含量的食物制品的感观品质及口感。用藻碎粉制成的调味品、沙司和饮料具有接近于常规的较高脂肪食谱的流变性和不透明度,虽然这些食物制品含有约一半的所述脂肪/油含量。藻碎粉也是上好的乳化剂,适用于需要厚度、不透明度和粘度的食品制备(如制备沙司、调味品和汤)。另外见于本文中所述的本发明藻碎粉中的脂质谱不含有反式脂肪,并且与黄油或人造黄油(或其它动物脂肪)相比,具有较高含量的健康性不饱和脂肪。因此用藻碎粉制成的产品可以具有较低的脂肪含量(具有较健康的脂肪),但不舍弃使用常规脂肪源按常规食谱制成的相同食物制品的口感和感官品质。

[0169] 也可以把藻碎粉添加到通常用在饮食服务环境的招待中的粉状或液态蛋类中。藻碎粉的加入改善了粉状或液态蛋类的外观、质感和口感,并且还可以延长外观、质感和口感改善的时间,即使将制好的蛋保持在蒸汽保温桌上也行。具体的配方和感官评定结果在下面的实例中描述。

[0170] D. 藻油

[0171] 在一方面,本发明涉及通过在 GMP 条件下从藻类生物质中收获藻油来制备藻油的方法,所述藻类生物质包含按干重计至少 15% 的油,其中的藻油超过 50% 是 18:1 脂质。在一些情况下,藻类生物质包括至少两个不同微藻品种的混合物。在一些情况下,至少两个不同的微藻品种是分开培养的。在至少一个实施例中,至少两个不同的微藻品种具有不同的甘油酯谱。在一些情况下,藻类生物质得自异养生长的藻类。在一些情况下,所有或至少两个不同的微藻品种含按干重计至少 15% 的油。

[0172] 在一方面,本发明涉及制作食品组合物的方法,包括将得自藻细胞的藻油与一种或多种其它可食用成分合并以形成食品组合物,所述藻细胞含有按干重计至少 10% 或至少 15% 的油。在一些情况下,所述方法还包括在 GMP 条件下制备藻油。

[0173] 藻油可以与用于食物制品(除了别的应用之外)的溶解生物质分离。油萃取后剩下的藻类生物质被称为脱脂粗粉。按干重或体积计,脱脂粗粉含有的油比微藻在提取前所含有的油少。通常提取 50-90% 的油,使得脱脂粗粉在提取前含有(例如)10-50% 的油含量。然而,生物质在蛋白质及上面讨论的其它成分的含量方面仍然具有高营养价值。因此,脱脂粗粉可用于动物喂养或人类食品应用中。

[0174] 在所述方法的一些实施例中,藻油至少 50% w/w 是油酸,并且含有不到 5% 的 DHA。在所述方法的一些实施例中,藻油至少 50% w/w 是油酸,并且含有不到 0.5% 的 DHA。在所述方法的一些实施例中,藻油至少 50% w/w 是油酸,并且含有不到 5% 的碳链长度超过 18 的甘油酯。在一些情况下,产生藻油的藻细胞包括来自至少两个不同微藻品种的细胞的混合物。在一些情况下,至少两个不同的微藻品种是分开培养的。在至少一个实施例中,至少两个不同的微藻品种具有不同的甘油酯谱。在一些情况下,藻细胞是在异养条件下培养的。在一些情况下,所有或至少两个不同的微藻品种含有按干重计至少 10% 或至少 15% 的油。

[0175] 在一方面,本发明涉及在 GMP 条件下制备的含至少 50% 单不饱和油并且含不到 1% DHA 的藻油。在一些情况下,单不饱和油是 18:1 脂质。在一些情况下,把藻油包裹在用于递送单位剂量油的胶囊中。在一些情况下,藻油得自至少两个不同微藻品种的混合物。在一些情况下,至少两个不同的微藻品种是分开培养的,在至少一个实施例中,至少两个不同的微藻品种具有不同的甘油酯谱。在一些情况下,藻油得自在异养条件下培养的藻细胞。

[0176] 在一方面,本发明涉及包含超过 60% 的 18:1 和至少 0.20mg/g 生育三烯酚的油。

[0177] 在一方面,本发明涉及包含超过 60% 的 18:1 酯和至少 0.20mg/g 生育三烯酚的脂肪酸烷基酯组合物。

[0178] 通过提取由清洗过的浓缩微藻生物质制备本发明的藻油。生物质中的细胞在提取之前溶解。任选地,还可以在溶解(细胞破裂)之前干燥(烘干、冻干等)微生物物质。作为另外的选择,当发酵完成时,可以不用将细胞与部分或全部的发酵液分离而将其溶解。例如,当细胞被溶解时,细胞与细胞外液体之比可以为不到 1 : 1v : v 细胞。

[0179] 可以溶解含脂质的微藻以产生溶解产物。如本文中详述,可以通过任何方便的手段完成溶解微生物(也称为细胞溶解)的步骤,包括热诱导溶解、加碱、加酸、使用酶(如蛋白酶)和多糖降解酶(如淀粉酶)、利用超声、基于机械压力的溶解和利用渗透休克溶解。每种溶解微生物的这些方法可以按单一的方法或者同时或顺序地组合使用。可以通过显微镜分析观察到细胞破裂的程度。采用一种或多种上述的方法通常观察到超过 70% 的细胞破裂。优选的是,细胞破裂超过 80%,更优选超过 90%,最优选为约 100%。

[0180] 可以通过提取的方式收集根据本发明由微藻产生的脂质和油。在一些情况下,可以使用有机溶剂或油实施提取,或者可以采用无溶剂提取程序。

[0181] 对于微藻油的有机溶剂提取,优选的有机溶剂是己烷。通常情况下,将有机溶剂直接添加到溶解产物中,不用事先分离出溶解产物组分。在一个实施例中,使通过一种或多种上述方法产生的溶解产物与有机溶剂接触足够的一段时间,使得脂质组分与有机溶剂形成溶液。在一些情况下,然后可进一步精制溶液以收集具体所需的脂质组分。然后可以过滤混合物并通过(例如)旋转蒸发除去己烷。己烷提取方法是本领域中熟知的。参见 Frenz 等, *Enzyme Microb. Technol.*, 11 : 717 (1989)。

[0182] Miao 和 Wu 描述了从原壳小球藻的培养物中收集微藻脂质的方案,其中通过离心收获细胞,用蒸馏水洗涤并进行冷冻干燥。在研钵中粉碎所得到的细胞粉末,然后用正己烷提取。Miao 和 Wu, *Biosource Technology* 97 : 841-846 (2006)。

[0183] 在一些情况下,可以采用液化(参见例如 Sawayama 等, *Biomass and Bioenergy* 17 : 33-39 (1999) 和 Inoue 等, *Biomass Bioenergy* 6 (4) : 269-274 (1993)); 油液化(参见例如 Minowa 等, *Fuel* 74 (12) : 1735-1738 (1995)); 或超临界 CO₂ 提取(参见例如 Mendes 等,

Inorganica Chimica Acta 356 :328-334 (2003)) 的方式提取微藻油。

[0184] 油提取包括不用事先分离溶解产物组分而直接向溶解产物中添加油。添加油后,溶解产物自行或由于离心等原因分离进入不同的层。所述层按密度减小的顺序可包括:重固体粒、水相、乳液相和油相。乳液相是脂质和水相的乳液。根据相对于溶解产物添加的油的百分比(w/w 或 v/v)、离心力(如果有的话)、水性培养基的体积以及其它因素,可以存在乳液相和油相任一者或两者。用油对细胞溶解产物或乳液相进行足够一段时间的培育或处理,使得由微生物产生的脂质溶解在油中形成不均匀混合物。

[0185] 在各实施例中,用于提取过程的油选自大豆、油菜籽、卡诺拉、棕榈、棕榈仁、椰子、玉米、废植物油、乌柏、橄榄、向日葵、棉籽、鸡脂、牛脂、猪脂、微藻、大型藻、萼距花、亚麻、花生、精选白脂膏(猪油)、亚麻荠芥末腰果、燕麦、羽扇豆、洋麻、金盏花、大麻、咖啡、亚麻籽、榛实、大戟、南瓜籽、胡荽、山茶花、芝麻、红花、稻米、桐油树、可可、椰干、罂粟、蓖麻子豆、山核桃、荷荷巴、麻风树、澳洲坚果、巴西坚果和鳄梨得到的油。向溶解产物中添加的油量通常超过与油合并的溶解产物的 5% (按 v/v 和 / 或 w/w 计量)。因此,所述油的优选 v/v 或 w/w 超过细胞溶解产物的 5%、10%、20%、25%、50%、70%、90% 或者为细胞溶解产物的至少 95%。

[0186] 也可以通过无溶剂提取程序从溶解产物中提取脂质,通过冷却溶解产物,基本上不用使用任何有机溶剂。也可以采用声处理,特别是如果温度在室温与 65°C 之间的话。这种溶解产物经离心或沉降可以分层,其中一层是水:脂质层。其它层可以包括固体粒、水层和脂质层。可以通过冻融或以别的方式冷却乳液而从乳液层中提取脂质。在这种方法中,不需要添加任何有机溶剂或油。如果添加任何溶剂或油的话,它可以少于溶解产物的 5% v/v 或 w/w。

[0187] IV. 将微藻生物质或由其得到的物质与其它食品成分合并

[0188] 在一方面,本发明涉及包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种其它可食用成分的食品组合物,其中藻类生物质包含按干重计至少 10% 的油,任选其中至少 90% 的油是甘油酯。在一些实施例中,藻类生物质含有按干重计至少 25%、40%、50% 或 60% 的油。在一些情况下,藻类生物质含有按干重计 10-90%、25-75%、40-75% 或 50-70% 的油,任选其中至少 90% 的油是甘油酯。在至少一个实施例中,至少 50 重量% 的油是单不饱和甘油酯油。在一些情况下,至少 50 重量% 的油是甘油酯形式的 18:1 脂质。在一些情况下,不到 5 重量% 的油是二十二碳六烯酸(DHA) (22:6)。在至少一个实施例中,不到 1 重量% 的油是 DHA。具有低水平多元不饱和脂肪酸(PUFA) 的藻脂质含量是优选的,以确保生物质的化学稳定性。在优选的实施例中,藻类生物质在异养条件下生长,并且绿色素形成减少。在其它实施例中,微藻是色素形成缺乏或减少的颜色突变体。

[0189] 在另一方面,本发明涉及包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种其它可食用成分的食品组合物,其中藻类生物质包含按干重计至少 30% 的蛋白质、按干重计至少 40% 的蛋白质、按干重计至少 45% 的蛋白质、按干重计至少 50% 的蛋白质、按干重计至少 55% 的蛋白质、按干重计至少 60% 的蛋白质或按干重计至少 75% 的蛋白质。在一些情况下,藻类生物质含有按干重计 30-75% 或 40-60% 的蛋白质。在一些实施例中,至少 40% 的粗蛋白是可消化的、至少 50% 的粗蛋白是可消化的、至少 60% 的粗蛋白是可消化的、至少 70% 的粗蛋白是可消化的、至少 80% 的粗蛋白是可消化的或至少 90% 的粗蛋白是可消化

的。在一些情况下,藻类生物质在异养条件下生长。在至少一个实施例中,藻类生物质在氮充满条件下生长。在其它实施例中,微藻是色素形成缺乏或减少的颜色突变体。

[0190] 在一些情况下,藻类生物质包含主要是完整的细胞。在一些实施例中,食品组合物包含油,所述油主要或完全地包裹在生物质的细胞内。在一些情况下,食品组合物包含主要是完整的微藻细胞。在一些情况下,藻油主要是包裹在生物质的细胞中。在其它情况下,生物质包含主要是溶解的细胞(例如,匀浆)。如上所述,这种匀浆可提供为浆料、薄片、粉末或碎粉。

[0191] 在食品组合物的一些实施例中,藻类生物质还包含至少 10ppm 的硒。在一些情况下,生物质还包含至少 15% w/w 的藻多糖。在一些情况下,生物质还包含至少 5% w/w 的藻糖蛋白。在一些情况下,生物质包含 0 到 115mcg/g 的总类胡萝卜素。在一些情况下,生物质包含至少 0.5% w/w 的藻磷脂。在所有情况下,如刚刚提到的那样,这些组分是真正的细胞组分而不是细胞外组分。

[0192] 在一些情况下,食品组合物的藻类生物质含有具备抗氧化剂性质的组分。强抗氧化剂性质可归因于藻类生物质中存在的多种抗氧化剂,包括但不限于类胡萝卜素、必需的矿物质(如锌、铜、镁、钙和锰)。藻类生物质还显示出含有其它抗氧化剂,如生育三烯酚和生育酚。这些维生素 E 系列的成员是重要的抗氧化剂,并具有其它有益于健康的好处,如针对中风引起的损伤的保护作用、逆转动脉阻塞、抑制乳腺癌和前列腺癌细胞的生长、降低胆固醇水平、减少 II 型糖尿病的危险和针对青光眼损伤的保护作用。生育三烯酚和生育酚的天然来源可见于由棕榈、向日葵、玉米、大豆产生的油和橄榄油,然而本文中提供的组合物的生育三烯酚水平显著高于迄今已知的物质。

[0193] 在一些情况下,本发明的食品组合物含有藻油,所述藻油包含至少 5mg/100g、至少 7mg/100g 或至少 8mg/100g 的总生育酚。在一些情况下,本发明的食品组合物含有藻油,所述藻油包含至少 0.15mg/g、至少 0.20mg/g 或至少 0.25mg/g 的总生育三烯酚。

[0194] 在上述组合物和/或方法的具体实施例中,微藻可以产生类胡萝卜素。在一些实施例中,由微藻产生的类胡萝卜素可以与由微藻产生的脂质或油共同提取(即,油或脂质将含有类胡萝卜素)。在一些实施例中,由微藻产生的类胡萝卜素是叶黄素。在一些实施例中,由微藻产生的类胡萝卜素是胡萝卜素。在一些实施例中,由微藻产生的类胡萝卜素是胡萝卜素和叶黄素的混合物。在各实施例中,由微藻产生的类胡萝卜素包含至少一种选自虾青素、黄体素、玉米黄质、 α -胡萝卜素、反式 β -胡萝卜素、顺式 β -胡萝卜素、番茄红素以及它们的任意组合的类胡萝卜素。来自原壳小球藻的油的类胡萝卜素谱的非限制性例子包括在下面的实例中。

[0195] 在食品组合物的一些实施例中,藻类生物质得自在良好生产规范(GMP)条件下培养和干燥的藻类。在一些情况下,将藻类生物质与一种或多种其它可食用成分合并,所述一种或多种其它可食用成分包括但不限于谷物、水果、蔬菜、蛋白质、脂质、草本植物和/或香料成分。在一些情况下,食品组合物是色拉调味品、蛋制品、烘烤食品、面包、食品条、意大利面、沙司、汤饮、饮料、冷冻甜点、黄油或果酱。在具体的实施例中,食品组合物不是丸或粉末。在一些情况下,根据本发明的食品组合物重量为至少 50g 或至少 100g。

[0196] 可以将生物质与一种或多种其它可食用成分合并以制备食物制品。生物质可来自单一藻源(例如,株)或多种来源(例如,不同株)的藻类生物质。生物质也可以来自单一

的藻品种,但具有不同的组成谱。例如,生产商可以将油含量高的微藻与蛋白质含量高的微藻共混,达到所需的确切的油和蛋白质含量。可以由食品生产商实施组合以制作成品供零售或食品招待之用。做为另外的选择,生产商可以将藻类生物质作为产品销售,消费者可以(例如)通过修改常规的食谱将藻类生物质掺入到食物制品中。无论哪一种情况,藻类生物质通常都用来替代在许多常规食物制品中使用的所有或一部分油、脂肪、蛋类等。

[0197] 在一方面,本发明涉及包含至少 0.1% w/w 的藻类生物质和一种或多种其它可食用成分的食品组合物,其中藻类生物质的配制方式是,将含有按干重计至少 40%蛋白质的藻类生物质与含有按干重计 40%脂质的藻类生物质共混,得到按干重计所需百分比的蛋白质与脂质的共混物。在一些实施例中,生物质来自相同的藻类株。做为另外的选择,将含有按干重计至少 40%脂质(含有的脂质的不到 1%为 DHA)的藻类生物质与含有按干重计至少 20%脂质(含有的脂质的至少 5%为 DHA)的藻类生物质共混,得到总共含有按干重计至少 10%脂质和 1% DHA 的干生物质的共混物。

[0198] 在一方面,本发明涉及在 GMP 条件下制备藻类生物质的方法,方式是通过干燥藻类培养物,得到包含按干重计至少 15%油的藻类生物质,其中藻油超过单不饱和脂质的 50%。

[0199] 在一方面,本发明涉及在 GMP 条件下制成的含有按干重计至少 15%油的藻类生物质,其中藻油超过 18:1 脂质的 50%。在一方面,本发明涉及在 GMP 条件下制成的含有按干重计至少 40%油的藻类生物质。在一方面,本发明涉及在 GMP 条件下制成的含有按干重计至少 55%油的藻类生物质。在一些情况下,将藻类生物质作为片剂包裹,用于递送单位剂量的生物质。在一些情况下,将藻类生物质包裹成带有标签或以别的方式产生标签,所述标签提供将藻类生物质与其它可食用成分合并的说明。

[0200] 在一方面,本发明涉及将如上所述的微藻生物质和/或由其得到的物质与如下所述的至少一种其它成品食物成分合并以形成食品组合物或食品原料的方法。在各实施例中,由本发明方法形成的食品组合物包括蛋制品(粉状或液态)、意大利面制品、调味产品、蛋黄酱制品、蛋糕制品、面包制品、能量棒、奶制品、果汁制品、果酱或思慕雪。在一些情况下,食品组合物不是丸或粉末。在各实施例中,食品组合物重量为至少 10g、至少 25g、至少 50g、至少 100g、至少 250g 或至少 500g 或更重。在一些实施例中,通过微藻生物质和/或由其得到的产品的组合形成的食品组合物是非熟食品。在其它情况下,食品组合物是熟食品。

[0201] 在其它情况下,食品组合物是熟食品。在一些情况下,不算归于藻类生物质的油,食品组合物含有不到 25 重量%的油或脂肪。当氢化植物油时,得到饱和甘油三酯形式的脂肪(TAG 或反式脂肪),如制作果酱(如人造黄油)时的做法。包含在藻类生物质中的脂肪中没有任何反式脂肪。在一些情况下,不算归于生物质的油,食品组合物含有不到 10 重量%的油或脂肪。在至少一个实施例中,食品组合物不含油或脂肪,归于生物质的油除外。在一些情况下,食品组合物不含除了归于生物质的油以外的油。在一些情况下,食品组合物不含蛋或蛋制品。

[0202] 在一方面,本发明涉及制作食品组合物的方法,其中用含有至少 10 重量%油的藻类生物质完全或部分地替代常规食物制品中的脂肪或油。在一个实施例中,该方法包括用生物质中藻油的比例和常规食物制品中的油或脂肪的量来确定用于替代的藻类生物质的量,将藻类生物质与至少一种其它可食用成分和不到包含在常规食物制品中的量的油或脂

肪合并,从而形成食品组合物。在一些情况下,与至少一种其它成分合并的藻类生物质的量是常规食物制品中的油和 / 或脂肪质量或体积的 1-4 倍。

[0203] 在一些实施例中,上述方法还包括提供用于含有至少一种其它可食用成分与油或脂肪合并的常规食物制品的食谱,并将 1-4 倍质量或体积的藻类生物质与达常规食物制品中的脂肪或油的质量或体积的至少一种其它可食用成分合并。在一些情况下,该方法还包括在 GMP 条件下制备藻类生物质。

[0204] 在一些情况下,由微藻生物质和 / 或由其得到的产品的组合形成的食品组合物包含至少 0.1%、至少 0.5%、至少 1%、至少 5%、至少 10%、至少 25%或至少 50% w/w 或 v/v 的微藻生物质或微藻油。在一些实施例中,如本文中所述形成的食品组合物包含至少 2%、至少 5%、至少 10%、至少 25%、至少 50%、至少 75%、至少 90%或至少 95% w/w 的微藻生物质或由其得到的产品。在一些情况下食品组合物包含按重量或按体积计为 5-50%、10-40%或 15-35%的藻类生物质或由其得到的产品。

[0205] 如上所述,微藻生物质可以替代不然的话按常规要包括在食物制品中的其它组分。在一些实施例中,食品组合物含有按重量计不到 50%、不到 40%或不到 30%的油或脂肪,不算归于生物质或来自微藻源的微藻油。在一些情况下,食品组合物含有按重量计不到 25%、不到 20%、不到 15%、不到 10%或不到 5%的油或脂肪,不算归于生物质或来自微藻源的微藻油。在至少一个实施例中,除了归于生物质或来自微藻源的微藻油以外,食品组合物不含油或脂肪。在一些情况下,食品组合物不含蛋、黄油或其它脂肪 / 油或至少一种通常会包括在类似的常规食物制品中的其它成分。一些食物制品不含乳制品(例如,黄油、奶油和 / 或干酪)。

[0206] 用于制备食品组合物的藻类生物质的量取决于在常规食物制品中要替换的非藻油、脂肪、蛋类等量的量以及藻类生物质中油的百分比。因此,在至少一个实施例中,本发明的方法包括由生物质中油的比例和在常规食物制品中通常与至少一种其它可食用成分合并的油和 / 或脂肪的比例来确定要与至少一种其它可食用成分合并的藻类生物质的量。例如,如果藻类生物质 50% w/w 是微藻油,并且期望完全替换常规食谱中的油或脂肪,那么可以(例如)按 2 : 1 的比例替换油。该比例可以按质量计,但出于实用性的目的,往往更容易使用量杯或量匙测量体积,并且替换可以按体积计。在一般情况下,按藻类生物质的 $(100/100-X)$ 体积或质量来替换要被替换的油或脂肪的体积或质量,其中 X 是生物质中微藻油的百分比。一般来说,在常规食谱中要被替换的油和脂肪可以全被藻类生物质替换,但全替换不是必要的,可以保留任意所需比例的油和 / 或脂肪,根据味道和营养的需要替换剩余的部分。因为藻类生物质含有起乳化剂功能的蛋白质和磷脂,所以可以用藻类生物质全部或部分地替换诸如蛋之类的食料。如果用生物质全部替换蛋,则有时可取或必要的是用额外的乳化剂和 / 或额外的水或其它液体来提高食品组合物中的乳化性能,用以补偿原本该由蛋提供的那些组分的损失。因为蛋不全是脂肪,所以用于替换蛋的生物质的量可以比用于替换纯油或脂肪的生物质的量少。蛋平均重约 58g,包含约 11.2%的脂肪。因此,包含 50%微藻油的约 13g 藻类生物质可以用来全部替换蛋的总脂肪部分。在食物制品中替换所有或部分的蛋类另外具有降低胆固醇的好处。

[0207] 为了简便起见,也可以根据用生物质的质量或体积替换的油、脂肪和 / 或蛋类的质量或体积提供替代比例。在一些方法中,用 5-150%、25-100%或 25-75%的质量或体积

的油、脂肪和 / 或蛋类替换常规食谱中的油、脂肪和 / 或蛋类的质量或体积。替换比例取决于诸如食物制品、食物制品的所需营养谱、食物制品的整个质感和外观以及生物物质的含油量之类的因素。

[0208] 在熟食品中,百分比(即,重量或体积)的确定可以在烹饪之前或之后进行。在烹饪过程中,由于液体的损失,藻类生物物质的百分比可能会增加。因为一些藻类生物物质细胞可以在烹饪过程中溶解,所以可能很难直接在熟食品中测量藻类生物物质的含量。然而,该含量可以由进入生产品当中的生物物质的质量或体积作为成品重量或体积的百分比(基于生物物质干固体)而间接地予以确定,以及通过分析藻类生物物质所特有的组分(如基因组序列)或由藻类生物物质单独递送的化合物(如某些类胡萝卜素)的方法予以确定。

[0209] 在一些情况下,可取的是以超过与常规食物制品中存在的油、脂肪、蛋类等成比例量的量合并藻类生物物质与至少一种其它可食用成分。例如,可以用1倍、2倍、3倍、4倍或更多倍藻类生物物质的量替换常规食物制品中的油和 / 或脂肪的质量或体积。本发明方法的一些实施例提供用于含有至少一种其它可食用成分与油或脂肪合并的常规食物制品的食谱,并将1-4倍质量或体积的藻类生物物质与达常规食物制品中的脂肪或油的质量或体积的至少一种其它可食用成分合并。

[0210] 将藻类生物物质(主要是完整的或匀质化的或微化的)和 / 或藻油与至少一种其它可食用成分合并以形成食物制品。在一些食物制品中,藻类生物物质和 / 或藻油与1-20、2-10或4-8的其它可食用成分合并。可食用成分可选自所有的主要食品类,包括但不限于水果、蔬菜、豆类、肉类、鱼类、谷物(例如,小麦、稻、燕麦、玉米粉、大麦)、草本植物、香料、水、果汁、酒和醋。在一些食品组合物中,出现至少2、3、4或5个食品类别以及藻类生物物质或藻油。

[0211] 油、脂肪、蛋类等也可以并入食品组合物,但正如上面已经讨论过,与常规的食物制品相比,它们通常以减少的量存在,例如不到油、脂肪或蛋类质量或体积的50%、25%或10%。一些本发明的食物制品不含除了由藻类生物物质所提供的油和 / 或藻油以外的油。一些食物制品不含除了由藻类生物物质提供的油以外的油。一些食物制品不含除了由藻类生物物质或藻油提供的脂肪以外的脂肪。一些食物制品不含除了由藻类生物物质提供的脂肪以外的脂肪。一些食物制品不含除了由藻类生物物质或藻油提供的油和脂肪以外的油和脂肪。一些食物制品不含除了由藻类生物物质提供的油和脂肪以外的油和脂肪。一些食物制品不含蛋类。在一些实施例中,可以通过培养条件或株的选择中包含特定的脂肪酸组分或含量来定制由微藻产生的油。

[0212] 在一些情况下,用于制作食品组合物的藻类生物物质包括至少两个不同微藻品种的混合物。在一些情况下,至少两个不同的微藻品种是分开培养的。在至少一个实施例中,至少两个不同的微藻品种具有不同的甘油酯谱。在一些情况下,上述方法还包括在异养条件下培养藻类并由所述藻类制备生物物质。在一些情况下,至少两个不同的微藻品种全都含有按干重计至少10%或至少15%的油。在一些情况下,食品组合物含有相同品种的生物物质的两个不同制剂的共混物,其中一个制剂含有按干重计至少30%的油,第二制剂含有按干重计不到15%的油。在一些情况下,食品组合物含有相同品种的生物物质的两个不同制剂的共混物,其中一个制剂含有按干重计至少50%的油,第二制剂含有按干重计不到15%的油,并且进一步地,其中所述品种是原壳小球藻。

[0213] 同使用藻类生物物质作为在别的常规食品中的油、脂肪或蛋类代替物一样,藻类生

物质可用于补充食品（如思慕雪）中通常不含有的油。油与主要是碳水化合物的产品的组合可具有与油相关的好处，并且由油与碳水化合物的组合，通过降低碳水化合物的血糖指数而得到好处。在生物物质中包裹油的措施有利于保护油不受氧化，并且还可以改善思慕雪的味道和质感。

[0214] 可以按与对生物物质本身相同的方式使用从藻类生物物质中提取的油，也就是说，作为常规食谱中的油、脂肪、蛋类等的代替物。所述油可用于在约 1 : 1 重量 / 重量或体积 / 体积的基础上替换常规的油和 / 或脂肪。所述油可用于替换蛋类，方式是每颗蛋用约 1 匙藻油进行替换，藻油任选与额外的水和 / 或乳化剂组合（平均 58g 蛋有约 11.2% 的脂肪，藻油的密度为约 0.915g/ml，匙具有的体积约 5ml = 1.2 匙藻油 / 蛋）。还可以将所述油掺合到调味品、沙司、汤、人造黄油、奶精、起酥油等里面。所述油特别适用于其中需要将油与其它食品成分组合以得到所需味道、质感和 / 或外观的食物制品。按重量或体积计，油在食物制品中的含量可以为至少 5%、10%、25%、40% 或 50%。

[0215] 在至少一个实施例中，从藻类生物物质中提取的油还可以被食品生产商、饭店和 / 或消费者用作烹饪油。In 在这种情况下，藻油可以替换常规的烹饪油，如红花油、卡诺拉油、橄榄油、葡萄籽油、玉米油、葵花油、椰子油、棕榈油或任何其它常规使用的烹饪油。得自藻类生物物质的油与其它类型的油一样，可以经受进一步的精制以提高其对烹饪的适应性（例如，提高发烟点）。可以用苛性碱中和油以除去游离的脂肪酸。游离的脂肪酸形成可除去的皂料。可以通过用化学品（如炭黑和漂白土）漂白去掉油的颜色。漂白土和化学品可以经由过滤与油分离。还可以通过用蒸汽处理使油脱臭。

[0216] 主要是完整的生物物质、匀质化或微化的生物物质（作为浆料、薄片、粉末或碎粉）和纯化的藻油都能与其它食品成分合并以形成食物制品。全部都是具有有利的营养谱（相对高的单不饱和含量）的油源。主要是完整的匀质化且微化的生物物质还提供高质量的蛋白质（平衡的氨基酸组成）、碳水化合物、纤维和如上所述的其它营养物质。可以按绝对素食者或素食者的形式制作掺合任何这些产品的食品。使用微藻生物物质（主要是完整的或匀质化的（或微化的）或兼而有之）作为蛋白质源的另一个优点是，它是非来自主要过敏源（如大豆、蛋类或乳品）的绝对素食者 / 素食者的蛋白质源。

[0217] 根据本发明可以与藻类生物物质和 / 或藻油合并的其它可食用成分包括但不限于谷物、水果、植物、蛋白质、肉类、草本植物、香料、碳水化合物和脂肪。与藻类生物物质和 / 或藻油合并以形成食物组合物的其它可食用成分取决于要生产的食物制品以及所需的食物制品的味道、质感及其它性质。

[0218] 虽然一般来说，任何这些藻油源都可用于任意的食物制品中，但优选的藻油源部分取决于是否所述油主要用于营养或热量的目的而不是用于食品的质感、外观或味道的目的，或者是否打算以油与其它食品成分的组合提供所需的食品味道、质感或外观，以及或者代替改善其营养或热量谱。

[0219] 可以根据需要通过常规程序烹饪食物制品，根据烹饪时间和温度情况，烹饪过程能分解一些细胞壁，释放出油，使得它与混合物中的其它成分合并。然而，往往至少有一些藻细胞幸免于烹饪而保持完整。作为另外的选择，可以不用烹饪而消费食物制品。在这种情况下，藻壁保持完整，保护油不被氧化。

[0220] 如果提供的形式是细胞主要为完整的，或者作为匀浆粉末提供，则藻类生物物质不

同于油、脂肪或蛋类之处在于,它可以提供为干燥的成分,有助于与其它干燥的成分(如碎粉)混合。在一个实施例中,藻类生物质提供为含有按干重计 25%至 40%油的干燥匀浆。生物质匀浆还可以提供为浆料。混合干燥成分(和生物质匀浆浆料,如果使用的话)之后可以添加液体(如水)。在一些食物制品中,所需的液体量略高于常规的食物制品,这是由于生物质的非油组分的原因,和/或因为不能由其它成分(如蛋类)提供水。然而,可以如在常规烹饪中的那样很容易地确定水的量。

[0221] 在一方面,本发明涉及包含至少 0.5% w/w 的藻类生物质(含有按干重计至少 10%的藻油)和至少一种其它可食用成分的食品成分组合物,其中通过向液体中添加食品成分组合物可以将食品成分转化成重构的食物制品。在一个实施例中,所述液体是水。

[0222] 匀质化或微化的高油生物质在液体和/或乳化食物制品(油包水和水包油乳液)中是特别有利的,如在沙司、汤、饮品、色拉调味品、黄油、果酱等中,其中由生物质提供的油与其它液体形成乳液。受益于流变性能改进的产品(如调味品、沙司和果酱)描述在下面的实例中。与使用常规油的常规产品的情况相比,使用匀质化的生物质可以在较低含油量(按全部产品的重量或体积计)的情况下形成具有所需质感(例如,口感)、味道和外观(例如,不透明度)的乳液,因此其可以用作脂肪增量剂。这样适用于低热值(即,膳食)产品。纯化的藻油对这种液体和/或乳化产品来说也是有利的。匀质化或微化的高油生物质和纯化的藻油两者都能与烘烤食品中的其它可食用成分良好地合并,与用常规的油、脂肪和/或蛋类制成的别的类似产品相比获得了类似或更好的味道、外观和质感,但具有改善的营养谱(例如,较高的单饱和油含量,和/或较高的蛋白质含量或品质,和/或较高的纤维和/或其它营养物质的含量)。

[0223] 主要是完整的生物质特别适用于其中希望改变或提高食品的营养谱的情况(例如,较高的含油量、不同的油含量(例如,更多的单不饱和油)、较高的蛋白质含量、较高的含热量、较高的其它营养物质的含量)。这种食品可适用于(例如)运动员或患有排泄紊乱的患者。主要是完整的生物质可用作膨胀剂。膨胀剂可用于(例如)增加更昂贵食品(例如,肉类辅助剂等)的量,或者用在模拟或仿制食品中(如素食者的肉类代替物)。模拟或仿制食品不同于天然食品之处在于,风味和体积通常是由不同的来源提供的。例如,可以把天然食品(如肉类)的风味赋予到保持风味的膨胀剂里面。主要是完整的生物质可以在这种食品中用作膨胀剂。主要是完整的生物质也特别适用于干食品,如意大利面,因为它具有良好的水结合性质,并且因此可促进这种食品的再水化。主要是完整的生物质也适用于(例如)在烘烤食品中作为防腐剂。主要是完整的生物质可以改善保水性,并因此延长保质期。

[0224] 已经破裂或微化的藻类生物质也可以改善保水性并因此延长保质期。提高保湿性在不含面筋的产品(如不含面筋的烘烤食品)中是特别可取的。使用破裂的藻类生物质配制不含面筋的甜点的详细说明以及后续的保质期研究描述在下面的实例中。

[0225] 在一些情况下,藻类生物质可用在蛋制剂中。在一些实施例中,添加到常规干粉蛋制剂中以形成乳脂状的炒蛋的藻类生物质(例如,藻碎粉)与不用藻类生物质制备的干粉状蛋相比具有更多的水分和更好的质感。在其它实施例中,把藻类生物质添加到整体液蛋中,以便改善所制备并然后保持在蒸汽保温桌上的蛋的总体质感和湿度。上述制剂的具体实例描述在下面的实例中。

[0226] 可以把藻类生物质（主要是完整的和 / 或匀质化的或微化的）和 / 或藻油掺合到几乎任何食品组合物里面。一些例子包括烘烤食品（如蛋糕）、布朗尼、鸡蛋糕、面包（包括奶油蛋卷）、甜点（包括糖饼干）、饼干和馅饼。其它例子包括往往以干形式提供的产品，如意大利面或粉状调味品、干奶精、碎肉和肉类代替物。由于主要是完整的生物质的水结合能力的原因，将主要是完整的生物质掺合到这种产品里面作为结合剂和 / 或膨胀剂可以改善水合并提高产率。由于粉状蛋制成的再水合食品（如炒蛋）也可具有改善的质感和营养谱。其它例子包括液体食物制品，如沙司、汤、调味品（即食）、奶精、奶饮料、果汁饮料、思慕雪、奶精。其它液体食物制品包括充当粗粉代替物或藻奶的营养饮料。其它食物制品包括黄油或干酪等，包括起酥油、人造黄油 / 果酱、坚果仁酱和干酪产品（如纳乔沙司）。其它食物制品包括能量棒、巧克力甜点 - 卵磷脂代替物、粗粉代替棒、格兰诺拉麦片型产品。另一食物制品类型是面糊和包衣。通过提供包围食品的油层，主要是完整的生物质或匀浆排斥烹饪介质中的另外的油，防止其渗入食品。因此，食品可以保持高含量单不饱和油包衣的好处而不吸收不太可取的油（例如，反式脂肪、饱和脂肪和烹饪油的副产品）。由于较少吸收烹饪油及其副产品的原因，生物质包衣也可以提供对食品可取的质感（例如，发嘎吱嘎吱声）和新鲜的滋味。

[0227] 在生食品中，生物质中的大多数藻细胞保持完整。这有利于保护藻油不被氧化，这样可以使保质期长，并且使得与其它成分的不利相互作用最小化。根据食物制品的性质，由细胞赋予的保护作用可减少或避免冷冻、真空包装等的要求。保持细胞完整还可防止油与消费者嘴之间的直接接触，这样减少了不可取的油腻感或脂肪感。在使用较多的油作为营养补品的食物制品中，这样可有利于改善产品的感官特性。因此，主要是完整的生物质适用于这种产品。然而，在用油赋予所需口感的非熟食品（如色拉调味品）中（例如，与诸如醋之类的水溶液形成的乳液），使用纯化的藻油或微化的生物质是优选的。在熟食品中，原来完整生物质的一些藻细胞可能会溶解，但其它藻细胞可保持完整。溶解细胞与完整细胞的比例取决于烹饪过程的温度和持续时间。在为了味道、质感和 / 或外观而希望油以均匀的方式与其它成分分散的熟食品（例如，烘烤食品）中，使用微化的生物质或纯化的藻油是优选的。在使用藻类生物质提供油和 / 或蛋白质及其它营养物质的熟食品中，主要的目的是为了它们的营养或热值而不是质感。

[0228] 相对于不用藻类生物质制作的别的类似常规产品来说，藻类生物质也可适用于提高食物制品（例如，粗粉代替饮料或思慕雪）的饱足指数。饱足指数用于衡量相同热量数的不同食品满足食欲的程度。这种指数的测量方式可以是，供给被测试的食品，此后按固定的时间间隔测量对其它食品的食欲。此后对其它食品的食欲越小，饱足指数就越高。饱足指数值的表达标度可以是这样的，其中将白面包的值定为 100。具有较高饱足指数的食品适用于节食。虽然不依赖于对机制的理解，但据信藻类生物质通过提高给定热量的食品的蛋白质和 / 或纤维含量而提高食品的饱足指数。

[0229] 也可以把藻类生物质（主要是完整的和匀质化或微化的）和 / 或藻油制成营养补品或食用补品。例如，可以把藻油包裹到可消化的胶囊里面，方式类似于鱼油。可以把这种胶囊包装在瓶中并日服（例如，每天 1-4 粒或片）。胶囊可以含有单位剂量的藻类生物质或藻油。同样，任选可以将生物质与药物或其它辅料压缩成片剂。所述片剂可以包装在（例如）瓶或泡罩包裹中，并按例如每天 1-4 片的剂量日服。在一些情况下，片剂或其它剂型包

含单位剂量的生物质或藻油。胶囊和片剂产品及其它补品的生产优选在适合于营养补品的 GMP 条件下进行,如编在 21 C. F. R. 111 中的法典或由外国司法管辖区制定的类似规章。可以将藻类生物质与其它粉末混合并放入香囊中作为即混合型物质(例如,与水、果汁、奶或其它液体混合)。也可以把藻类生物质混合到诸如酸奶酪之类的产品里面。

[0230] 虽然可以把藻类生物质和 / 或藻油掺合到营养补品里面,但上述讨论到的功能性食物制品与丸、胶囊或粉末形式的典型营养补品有区别。无论在重量方面还是提供的热量方面来说,这种食物制品的份量通常都比营养补品大得多。例如,当包装或一次食用时,食物制品往往具有 100g 以上的重量,和 / 或提供至少 100 卡热量。通常食物制品含有至少一种成分,蛋白质、碳水化合物或液体,并且往往含有两三种这样的其它成分。食物制品中的蛋白质或碳水化合物通常提供食物制品热量的至少 30%、50% 或 60%。

[0231] 正如以上的讨论,可以由生产商制作藻类生物质并出售给消费者(如饭店或个人),用于商业招待环境或家庭中。这种藻类生物质优选在食物制品的良好生产规范(GMP)条件下生产和包装。通常在气密容器(如密封袋)中干态包装主要是完整形式或如粉末那样匀质化或微化形式的藻类生物质。浆状的匀质化或微化生物质可以被方便地包装在管(还有其它容器)中。任选地,可以在真空状态下包装藻类生物质以延长保质期。包好的藻类生物质不需要冷冻。包好的藻类生物质可以包括使用说明书,包括关于用多少藻类生物质替换常规食谱中给定量的油、脂肪或蛋类的说明,正如以上的讨论。为简单起见,说明书可以规定油或脂肪按生物质质量或体积的 2 : 1 比例替换,蛋替换的比例为每颗蛋用 11g 生物质或 1 匙藻油。正如以上的讨论,其它比例也是可行的,例如,采用生物质的质量或体积对常规食谱中的油和 / 或脂肪和 / 或蛋类的质量或体积的比例为 10-175%。打开密封包装后,说明书可指导用户将藻类生物质保持在气密容器(如可广泛商购的气密容器,例如 Glad) 中,任选进行冷冻。

[0232] 也可以按与其它干燥成分(例如,糖、碎粉、干果)合并的形式包装藻类生物质(主要是完整或匀质化或微化的粉末)以及进行分份包装,以确保最终产品的均匀性。然后可以由消费者或饮食服务公司将混合物转变成食物制品,方式是简单地添加液体(如水或奶)并任选进行混合和 / 或在不用添加油或脂肪的情况下进行烹饪。在一些情况下,添加液体以重构干燥的藻类生物质组合物。烹饪可任选用微波炉、对流烤箱、常规烤箱或炉灶上进行。这种混合物可用于制作蛋糕、面包、煎饼、华夫饼干、饮料、沙司等。这种混合物具有方便消费者以及保质期长且无需冷冻的优点。这种混合物通常包装在带有说明书的密封容器中,用于添加液体以将混合物转变成食物制品。

[0233] 同样也优选在食品的 GMP 条件下生产和包装用作食品成分的藻油。通常将藻油包装在瓶或其它容器中,方式类似于常规用油。容器可以包括带有说明书的附着标签,说明书有使用油代替食物制品中的常规油、脂肪或蛋类以及作为烹饪油的说明。当包装在密封容器中的时候,油具有长保质期(至少一年)而基本上不变质。打开后,主要由单不饱和油组成的藻油对氧化不是十分敏感。然而,如果保持冷态和 / 或避开阳光直射(例如在封闭处所内,如食橱内),未使用部分的油可以保持更长的时间且氧化更少。随油包括的说明书可以含有这种优选储存的资料。

[0234] 任选地,藻类生物质和 / 或藻油可以含有食品中许可的防腐剂 / 抗氧化剂以最大限度地延长保质期,所述防腐剂 / 抗氧化剂包括但不限于类胡萝卜素(例如,虾青素、黄体

素、玉米黄质、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素和番茄红素)、磷脂(例如,N-酰基磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和溶血磷脂酰胆碱)、生育酚(例如, α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚)、生育三烯酚(例如, α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚和 δ -生育三烯酚)、丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲酸醚、多酚、迷迭香酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸、抗坏血酸钠、山梨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯、乙酰丙酸、茴香酸、乙酸、柠檬酸和生物类黄酮。

[0235] 一般来说,将主要是完整的生物质、匀质化或微化的生物质(浆料、薄片、粉末或碎屑)或藻油掺合到人体营养食品里面也适合作为供非人类的动物的食物制品。

[0236] 生物质给这种食品提供高质量的油或蛋白质或这两者。藻油的含量优选为至少10重量%或20重量%,如藻蛋白的含量一样。从主要是完整的生物质中获取至少一些藻油和/或蛋白质在有的时候对供高速度动物(如赛狗或马)的食品是有利的。主要是完整的生物质也适合用作防腐剂。将藻类生物质或油与其它成分合并通常见于动物食品(例如,肉类、肉精、脂肪酸、蔬菜、水果、淀粉、维生素、矿物质、抗氧化剂、益生素)以及它们的任意组合。这类食品也适用于宠物,特别是具有活泼生活方式的宠物。与常规的动物食品一样,可以提供适合指定动物的咬口尺寸的食品颗粒。

[0237] 脱脂粗粉适合作为动物饲料供给耕畜,例如反刍动物、家禽、猪和养殖水产。脱脂粗粉是制备供食用或其它用途的纯化藻油的副产品。所得粗粉虽然含油量减少了,但仍然含有高质量的蛋白质、碳水化合物、纤维、灰分和适于动物喂养的其它营养物质。因为细胞主要是溶解的,所以这种动物很容易消化脱脂粗粉。在动物饲料中,任选可以将脱脂粗粉与其它成分(如谷物)合并。因为脱脂粗粉具有粉末稠度,所以可以使用挤压机或扩张器将其压成市售的丸粒。

[0238] 提供以下的实例以说明但不限制请求保护的发明。

[0239] V. 实例

[0240] 实例 1

[0241] 培养微藻以获得高含油量

[0242] 在摇瓶中培养微藻株,目标是获得按细胞干重计20%以上的油。所用的烧瓶中的培养基如下: K_2HPO_4 :4.2g/L, NaH_2PO_4 :3.1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.24g/L,一水合柠檬酸:0.25g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$:0.025g/L,酵母提取物:2g/L和2%的葡萄糖。在室温下使冻存细胞解冻,向4.5ml培养基中加入500ul细胞,在6孔板上于28℃生长7天,同时搅拌(200rpm)。通过在预先称重的埃彭道夫管中以14,000rpm离心1ml培养物5分钟来确定细胞干重。弃去培养上清液,所得细胞团块用1ml去离子水冲洗。再次离心培养物,弃去上清液,把细胞团块置于-80℃至冻结。然后冷冻干燥样品24小时并计算细胞干重。为确定培养物中的总脂质,取出3ml培养物并使用Ankom系统(Ankom Inc.,Macedon,NY)按厂家的方案进行分析。用Amkom XT10提取器按厂家方案对样品进行溶剂提取。总脂质确定为酸水解的干燥样品与经溶剂提取的干燥样品之间的质量差。按细胞干重计的油百分比的测量结果示于表1。

[0243] 表 1. 按细胞干重计的油百分比

[0244]

品种	株	% 油	图1 株 #
原壳小球藻	UTEX 250	34.24	1

[0245]

原壳小球藻	UTEX 25	40.00	2
原壳小球藻	CCAP 211/8D	47.56	3
凯斯勒小球藻	UTEX 397	39.42	4
凯斯勒小球藻	UTEX 2229	54.07	5
凯斯勒小球藻	UTEX 398	41.67	6
Parachlorella kessleri	SAG 11.80	37.78	7
Parachlorella kessleri	SAG 14.82	50.70	8
Parachlorella kessleri	SAG 21.11 H9	37.92	9
圆形原囊菌	UTEX 327	13.14	10
Prototheca moriformis	UTEX 1441	18.02	11
Prototheca moriformis	UTEX 1435	27.17	12
极微小球藻	UTEX 2341	31.39	13
小球藻属	UTEX 2068	45.32	14
小球藻属	CCAP 211/92	46.51	15
Chlorella sorokiniana	SAG 211.40B	46.67	16
Parachlorella beijerinckii	SAG 2046	30.98	17
Chlorella luteoviridis	SAG 2203	37.88	18
普通小球藻	CCAP 211/11K	35.85	19

[0246]

Chlorella reisiglii	CCAP 11/8	31.17	20
椭圆小球藻	CCAP 211/42	32.93	21
Chlorella saccharophila	CCAP 211/31	34.84	22
Chlorella saccharophila	CCAP 211/32	30.51	23

[0247] 实例 2

[0248] 用三种不同的培养基制剂进行三次发酵过程,目标是产生具有高含油量的藻类生物质。第一制剂(培养基 1)基于 Wu 等所述的培养基(1994Science in China,第 37 卷,第 3 期,第 326-335 页),每升的组成如下: KH_2PO_4 , 0.7g; K_2HPO_4 , 0.3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3mg; 盐酸硫胺素, 10 μg ; 葡萄糖, 20g; 甘氨酸, 0.1g; H_3BO_3 , 2.9mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.8mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 μg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 80 μg ; and $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22.9mg。第二培养基(培养基 2)得自实例 1 中的烧瓶培养基,每升的组成如下: K_2HPO_4 , 4.2g; NaH_2PO_4 , 3.1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24g; 一水合柠檬酸, 0.25g; 脱水氯化钙, 25mg; 葡萄糖, 20g; 酵母提取物, 2g。第三培养基(培养基 3)是混合培养基,每升的组成如下: K_2HPO_4 , 4.2g; NaH_2PO_4 , 3.1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24g; 一水合柠檬酸, 0.25g; 脱水氯化钙, 25mg; 葡萄糖, 20g; 酵母提取物, 2g; H_3BO_3 , 2.9mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.8mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 μg ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 80 μg ; 和 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22.9mg。制备所有这三种培养基并在实验室规模的发酵罐容器中于 121℃ 高压灭菌 30 分钟。高压灭菌后随冷却向每个容器中加入无菌葡萄糖。

[0249] 用于每一发酵罐的接种体是原壳小球藻(UTEX 250),其制备按两个烧瓶阶段进行,采用接种的发酵罐的培养基和温度条件。每个发酵罐用 10% (v/v) 的对数中期培养物进行接种。三个实验室规模的发酵罐在实验持续时间内保持在 28℃。还在 23℃ 的温度下评价培养基 1 中的微藻细胞生长。对于所有的发酵罐评价, pH 值保持在 6.6-6.8, 以 500rpm 搅拌, 空气流量为 1vvm。对发酵培养物进行 11 天培养。通过 750nm 的光密度和细胞干重测量生物质累积。

[0250] 按标准的气相色谱方法,利用直接酯交换确定脂质/油浓度。简单地说,把具有生物质的发酵液样品涂抹在吸墨纸上面,转移到离心管中并在 65-70℃ 真空烘箱中干燥 1 小时。当干燥样品时,向管中加入在甲醇中的 5% H_2SO_4 计 2ml。然后在 65-70℃ 加热块上加热所述管,同时间歇地进行涡旋和声处理。然后加入 2ml 庚烷并用力摇动管。加入 2Ml 的 6% K_2CO_3 并用力摇动管进行混合,然后以 800rpm 离心 2 分钟。然后把上清液转移到含 Na_2SO_4 干燥剂的 GC 小瓶中,利用标准的气相色谱方法进行试验。油/脂质百分比是基于细胞干重。使用培养基 1 在 23℃ 生长的细胞的细胞干重为 9.4g/L; 使用培养基 1 在 28℃ 生长的细胞的细胞干重为 1.0g/L, 使用培养基 2 在 28℃ 生长的细胞的细胞干重为 21.2g/L; 使用培养基 3 在 28℃ 生长的细胞的细胞干重为 21.5g/L。使用培养基 1 在 23℃ 生长的细胞的脂质/

油浓度为 3g/L ;使用培养基 1 在 28℃ 生长的细胞的脂质 / 油浓度为 0.4g/L ;使用培养基 2 在 28℃ 生长的细胞的脂质 / 油浓度为 18g/L ;使用培养基 3 在 28℃ 生长的细胞的脂质 / 油浓度为 19g/L。使用培养基 1 在 23℃ 生长的细胞的油百分比 (基于细胞干重) 为 32% ;使用培养基 1 在 28℃ 生长的细胞的油百分比 (基于细胞干重) 为 40% ;使用培养基 2 在 28℃ 生长的细胞的油百分比 (基于细胞干重) 为 85% ;使用培养基 3 在 28℃ 生长的细胞的油百分比 (基于细胞干重) 为 88%。使用三种不同的培养基制剂在 28℃ 产生的藻类生物物质的脂质谱 (面积% , 内标归一化之后) 归纳于下表 2。

[0251] 表 2. 在不同培养基条件下生长的原壳小球藻的脂质谱

[0252]

	培养基1 28℃ (面积%)	培养基2 28℃ (面积%)	培养基3 28℃ (面积%)
C14: 0	1.40	0.85	0.72
C16: 0	8.71	7.75	7.43
C16: 1	--	0.18	0.17
C17: 0	--	0.16	0.15

[0253]

C17: 1	--	0.15	0.15
C18: 0	3.77	3.66	4.25
C18: 1	73.39	72.72	73.83
C18: 2	11.23	12.82	11.41
C18: 3 α	1.50	0.90	1.02
C20: 0	--	0.33	0.37
C20: 1	--	0.10	0.39
C20: 1	--	0.25	--
C22: 0	--	0.13	0.11

[0254] 实例 3

[0255] 制备用于食物制品的生物物质

[0256] 如实例 1-2 的任一者中所述,通过培养微藻产生微藻生物物质。从发酵罐、烧瓶或其它生物反应器中收获微藻生物物质。

[0257] 遵守 GMP 程序。无论是谁,如果通过医学检查或通过监控观察证明患有或疑似患有疾病、开放性病变 (包括疖、疮或感染的伤口) 或者具有任何其它异常的微生物污染源,

而食品、食品接触面或食品包装材料通过这种微生物污染源明显有可能被污染,那么他将被禁止进行预计可导致这种污染的任何操作,直到这种状况得到纠正。指示人员要向他们的主管人员报告这类健康状况。所有与微藻生物质、生物质接触面和生物质包装材料直接接触的工作人员在上班的时候要在保护微藻生物质防止污染所需的程度上遵守卫生习惯。保持清洁的方法包括但不限于:(1) 穿着适合以能够保护生物质、生物质接触面或生物质包装材料防止污染的方式操作的外衣。(2) 保持适当的个人清洁。(3) 在开始工作之前、每次离开工作台之后以及在当手有可能弄脏或污染的任何其它时间,在适当的洗手设施中彻底地洗手(如有必要进行保护以防止不良微生物的污染,则还要消毒)。(4) 取下有可能落入生物质、设备或容器中的所有不牢固的首饰及其它物品,并取下在用手操作生物质期间不能充分消毒的手饰。如果无法取下这类手饰,则可以用某种材料覆盖手饰,所述材料能保持完整、清洁及卫生的条件,并且能有效地保护生物质、生物质接触面或生物质包装材料这样的物品不被污染。(5) 保持手套(如果它们用于把手生物质的话)处于完整、清洁和卫生状态。手套应是不渗透性材料的。(6) 在适当情况下,以有效的方式戴上发网、头巾、帽子、胡须套或其它有效的束发用品。(7) 把衣服或其它个人物品存放在能接触到生物质或洗涤器具的地方以外的地方。(8) 把以下行为限制在除了有可能接触到生物质或洗涤设备或器具的地方以外的地方:吃生物质、嚼口香糖、喝饮料或吸烟。(9) 采取任何其它必要的预防措施以保护生物质、生物质接触面或生物质包装材料不被微生物或外来物质(包括但不限于汗水、毛发、化妆品、烟草、化学品和施加到皮肤上的药品)污染。可任选对微藻生物质进行细胞破裂程序以产生溶解产物和/或任选进行干燥以形成微藻生物质组合物。

[0258] 实例 4

[0259] 培养原壳小球藻以产生高油藻片

[0260] 采用实例 2 和 3 中所述的过程,用 5,000L 发酵槽生产原壳小球藻(UTEX250)生物质。在整个试验期间监测葡萄糖(玉米糖浆)浓度。当葡萄糖浓度低的时候,向发酵槽中加入更多的葡萄糖。所有的氮耗尽后,细胞开始积累脂质。在整个试验期间,取生物质样品以监测脂质含量,当生物质达到所需的脂质含量(按细胞干重计超过 40%脂质)时停止试验。在这种情况下,当生物质达到按细胞干重计含大约 50%脂质时进行收获。

[0261] 为将微藻生物质加工成藻片,采用离心将收获的原壳小球藻生物质与培养基分离,并采用标准的方法在大约 150–170℃的滚筒干燥器上进行干燥。包装所得到的滚筒干燥的原壳小球藻生物质(具有按细胞干重计大约 50%的脂质,高脂质)并储存供作为藻片使用。

[0262] 实例 5

[0263] 在干原壳小球藻生物质中没有藻类毒素

[0264] 采用实例 4 中所述的方法生长和制备原壳小球藻(UTEX 250)生物质样品。采用液相色谱-质谱分析/质谱分析法(LC-MS/MS)分析干生物质中是否存在污染的藻和蓝绿藻毒素。这些分析涵盖了文献中公布的和国际食品条例中提到的所有藻类。结果表明,所述生物质样品不含任何可检测量的任何被测试的藻或蓝绿藻毒素。结果归纳于表 3。

[0265] 表 3. 藻和蓝绿藻毒素的 LC-MS/MS 分析结果

[0266]

毒素种类	毒素	结果	检测限 (LC/MS)
记忆缺失性贝毒 (ASP) 毒素	软骨藻酸	无法检出	1 $\mu\text{g/g}$
腹泻性贝毒 (DSP) 毒素	冈田软海绵酸 和鳍藻毒素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
	扇贝毒素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
	虾夷扇贝毒素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
	原多甲藻酸	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
	环亚胺毒素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
麻痹性贝毒 (PSP) 毒素	蛤蚌毒素	无法检出	(HPLC/FD) 0.3 $\mu\text{g/g}$
	新蛤蚌毒素	无法检出	(HPLC/FD) 0.3 $\mu\text{g/g}$
	石房蛤毒素	无法检出	(HPLC/FD)) 0.3 $\mu\text{g/g}$
	膝沟藻毒素	无法检出	(HPLC/FD) 0.3 $\mu\text{g/g}$
神经性贝毒 (NSP) 毒素	双鞭甲藻神经 毒素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
蓝绿藻毒素	微囊藻毒素 MC-RR、MC-LR、 MC-YR、MC-LA、 MC-LW和MC-LF	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$
	节球藻素	无法检出	0.1 $\mu\text{g/g}$

[0267]

	变性毒素-a	无法检出	0.5 $\mu\text{g/g}$
	柱孢藻毒素	无法检出	0.2 $\mu\text{g/g}$
	β -甲氨基-L-丙氨酸	无法检出	2.5 $\mu\text{g/g}$

[0268] 实例 6

[0269] 原壳小球藻生物物质中的纤维含量

[0270] 根据 AOAC International 的法定方法 (AOAC 方法 991.43), 对采用实例 4 和实例 17 中所述的方法生长和制备的干原壳小球藻 (UTEX 250) 生物物质的样品进行近似分析。对两个样品进行总脂肪含量 (脂质 / 油) 的酸水解, 高脂质藻类生物物质的脂肪含量为大约 50%, 高蛋白藻类生物物质的脂肪含量为大约 15%。高脂质和高蛋白藻类生物物质两者的粗纤维含量均为 2%。高脂质和高蛋白藻类生物物质两者的水分 (按重量分析确定的) 均为 5%。通过灼烧坩埚并分析无机灰分来确定灰分含量, 高脂质藻类生物物质为 2%, 高蛋白生物物质为 4%。按由灼烧每一生物物质释放的氮量确定粗蛋白, 高脂质生物物质为 5%, 高蛋白生物物质为 50%。取脂肪、粗纤维、水分、灰分和粗蛋白的上述已知值, 从 100 中减去其总和, 由差值计算碳水化合物含量。高脂质生物物质的碳水化合物计算含量为 36%, 高蛋白生物物质的碳水化合物含量为 24%。

[0271] 进一步分析两个藻类生物物质的碳水化合物含量显示, 样品中有大约 4-8% (w/w) 的游离糖 (主要是蔗糖)。测试多批次的含高脂质的藻类生物物质的游离糖 (检测果糖、葡萄糖、蔗糖麦芽糖和乳糖), 蔗糖量在 2.83% -5.77%; 麦芽糖量从检测不到至 0.6%; 葡萄糖量从检测不到至 0.6%。其它糖 (即果糖、麦芽糖和乳糖) 在任何批次的检测中均未发现。还测试多批次的含高蛋白的藻类生物物质的游离糖, 在任何批次中只检测到了 6.93% 至 7.95% 的蔗糖。

[0272] 根据 AOAC International 的法定方法 (AOAC 方法 991.43) 分析两个藻类生物物质的总膳食纤维含量 (藻类生物物质的碳水化合物部分内)。高脂质生物物质含有 19.58% 的可溶性纤维和 9.86% 的不溶性纤维, 总膳食纤维是 29.44%。高蛋白生物物质含 10.31% 的可溶性纤维和 4.28% 的不溶性纤维, 总膳食纤维是 14.59%。

[0273] 实例 7

[0274] 藻类生物物质的氨基酸谱

[0275] 根据 AOAC International 的法定方法分析采用实例 4 中所述方法生长和制备、按细胞干重计具有大约 50% 脂质的干原壳小球藻 (UTEX 250) 生物物质样品的氨基酸含量 (色氨酸分析: AOAC 方法 988.15; 蛋氨酸和胱氨酸分析: AOAC 方法 985.28; 其它氨基酸: AOAC 方法 994.12)。将干藻类生物物质的氨基酸谱 (以总蛋白质的百分比表示) 与干全蛋的氨基酸谱 (谱来自全蛋的产品规格表, Protein Factory Inc., New Jersey) 进行比较, 结果表明, 两种来源具有类似的蛋白质营养值。原壳小球藻样品的相对氨基酸谱 (相对于总蛋白) 的结果显示, 生物物质含有蛋氨酸 (2.25%)、半胱氨酸 (1.69%)、赖氨酸 (4.87%)、苯丙氨酸 (4.31%)、亮氨酸 (8.43%)、异亮氨酸 (3.93%)、苏氨酸 (5.62%)、缬氨酸 (6.37%)、

组氨酸 (2.06%)、精氨酸 (6.74%)、甘氨酸 (5.99%)、天门冬氨酸 (9.55%)、丝氨酸 (6.18%)、谷氨酸 (12.73%)、脯氨酸 (4.49%)、羟脯氨酸 (1.69%)、丙氨酸 (10.11%)、酪氨酸 (1.87%) 和色氨酸 (1.12%)。藻类物质与全蛋氨基酸谱的比较示于图 2。

[0276] 实例 8

[0277] 原壳小球藻 UTEX 250 生物质的类胡萝卜素、磷脂、生育三烯酚和生育酚组合物

[0278] 采用正相 HPLC、AOCS 方法 Ce 8-89 分析用实例 4 中所述的方法生产的藻类生物质的样品的生育三烯酚和生育酚含量。使用己烷或另外的非极性溶剂提取生物质含有生育三烯酚和生育酚的部分。完全的生育三烯酚和生育酚组成结果归纳于表 4。

[0279] 表 4. 藻类物质中的生育三烯酚和生育酚含量

[0280]

原壳小球藻 UTEX 250 的生育三烯酚和生育酚组成

[0281]

生育酚	
α -生育酚	6.29 mg/100g
δ -生育酚	0.47 mg/100g
γ -生育酚	0.54 mg/100g
总生育酚	7.3 mg/100g
生育三烯酚	
α -生育三烯酚	0.13 mg/g
β -生育三烯酚	0
γ -生育三烯酚	0.09 mg/g
δ -生育三烯酚	0
总生育三烯酚	0.22 mg/g

[0282] 分离生物质含类胡萝卜素的部分并采用 HPLC 方法分析类胡萝卜素。在铝研钵中混合冷冻干燥的藻类物质 (采用实例 3 中所述的方法生产的) 与碳化硅, 用研钵和杵研磨四次, 每次 1 分钟, 由此制备含类胡萝卜素的部分。然后用四氢呋喃 (THF) 冲洗研磨的生物质和硅的混合物并收集上清液。重复提取生物质, 直到上清液为无色, 汇集所有提取物的上清液, 并采用标准的 HPLC 方法分析类胡萝卜素含量。还采用上述方法分析使用滚筒干燥器干燥的藻类生物质的类胡萝卜素含量。

[0283] 冻干的藻类生物质的类胡萝卜素含量为: 总黄体素 (66.9-68.9mcg/g; 顺式-黄体素 12.4-12.7mcg/g, 反式-黄体素 54.5-56.2mcg/g); 反式-玉米黄质 (31.427-33.451mcg/g); 顺式-玉米黄质 (1.201-1.315mcg/g); t- α -隐黄质 (3.092-3.773mcg/g); t- β -隐黄质 (1.061-1.354mcg/g); 15-顺式- β -胡萝卜素 (0.625-0.0675mcg/g); 13-顺式- β -胡

胡萝卜素 (0.0269-0.0376mcg/g) ;t- α -胡萝卜素 (0.269-0.0376mcg/g) ;c- α -胡萝卜素 (0.043-0.010mcg/g) ;t- β -胡萝卜素 (0.664-0.741mcg/g) ;和 9-顺式- β -胡萝卜素 α -胡萝卜素 (0.241-0.263mcg/g)。记录的总类胡萝卜素为 105.819mcg/g 至 110.815mcg/g。

[0284] 滚筒干燥的藻类生物质的类胡萝卜素含量明显较低:总黄体素 (0.709mcg/g:反式-黄体素为 0.091mcg/g,顺式-黄体素为 0.618mcg/g);反式-玉米黄质 (0.252mcg/g);顺式-玉米黄质 (0.037mcg/g); α -隐黄质 (0.010mcg/g); β -隐黄质 (0.010mcg/g) 和 t- β -胡萝卜素 (0.008mcg/g)。记录的总类胡萝卜素为 1.03mcg/g。这些数据表明,干燥藻类生物质的方法可显著地影响类胡萝卜素含量。

[0285] 还对藻类生物质进行磷脂分析。采用 Folch 提取方法(氯仿、甲醇和水混合物)提取含磷脂的部分,采用 AOCS 法定方法 Ja 7b-91 分析油样品, HPLC 确定水解的卵磷脂 (International Lecithin and Phospholipid Society 1999), HPLC 分析磷脂,光散射检测 (International Lecithin and Phospholipid Society 1995) 方法分析磷脂含量。按 w/w 百分比的总磷脂为 1.18%。藻油的磷脂谱为磷脂酰胆碱 (62.7%)、磷脂酰乙醇胺 (24.5%)、溶血磷脂酰胆碱 (1.7%) 和磷脂酰肌醇 (11%)。还进行使用己烷从藻类生物质中提取含磷脂部分的类似分析。按 w/w 百分比的总磷脂为 0.5%。磷脂谱为磷脂酰乙醇胺 (44%)、磷脂酰胆碱 (42%) 和磷脂酰肌醇 (14%)。

[0286] 实例 9

[0287] 含藻片(高油)的食物制品

[0288] Cardio/Metabolic 健康棒

[0289] 心/代谢健康棒的成分组成是:快速燕麦 (30.725%)、脆米 (9.855%)、细粒糖(蔗糖) (14.590%)、浅棕色糖 (6.080%)、盐 (0.550%)、卡诺拉油 (10.940%)、玉米糖浆 42DE (7.700%)、蜂蜜 (3.650%)、水 (7.700%)、卵磷脂 (0.180%)、小苏打 (0.180%)、干藻类生物质(原壳小球藻 UTEX 250, 48% 脂质) (1.540%)、corowise 植物甾醇 (1.060%)、菊粉(可溶性纤维) (4.280%) 和车前草(不溶性纤维) (0.970%)。

[0290] 说明书:(1) 在 325 华氏度对流预热烘箱。(2) 首先称出 5 种成分于碗中。(3) 在 Hobart 混合器中混合水、卵磷脂与小苏打。(4) 把蜂蜜、玉米糖浆和卡诺拉油混合在一起;微波加热 30-40 秒。用刮勺手动混合,把混合物倒入 Hobart 混合器。(5) 添加所需的标准食品调味剂。(6) 向 Hobart 混合器里面加入干营养食品(藻类生物质、植物甾醇、纤维)。(7) 加入剩下的干成分。(8) 成形并在 325 华氏度烘烤 20-25 分钟,使用对流。Cardio Daily Shot(含完整高油藻类生物质的液体食品)

[0291] 橙色调味的 cardio shot 的成分组成为:蒸馏水 (869.858g)、苯甲酸钠 (0.100g)、Ticaloid 5415 粉 (1.000g)、脱水蔗汁糖 (88.500g)、干藻类生物质 (40% 以上的油) (16.930g)、Fibersol-2 ADM (47.000g)、corowise ES-200 植物甾醇 (18.300g)、粒状柠檬酸 (1.312g)、橙提取物 (WONF, Flavor884.0062U) (1.000g)。合并所述成分并共混调匀。

[0292] 瘦身思慕雪(含完整高油藻类生物质的液体食品)

[0293] 基于水果的思慕雪的成分组成为:蒸馏水 (815.365g)、稳定剂 (4.5g)、苹果汁浓缩物 (58g)、橙汁浓缩物 (46.376g)、柠檬汁浓缩物 (1.913g)、芒果泥浓缩物、香蕉泥 (40.656g)、西番莲果汁浓缩物 (8.4g)、抗坏血酸 (0.320g)、藻片 (46.41g)、橙味调料提取

物 (1g)、菠萝味调料 (0.4g) 和芒果味调料 (0.16g)。合并所述成分并共混调匀。

[0294] Cardio/Metabolic 片 (包裹 / 片剂形式的完整高油藻类生物质)

[0295] 代谢健康片的成分组成为:原壳小球藻干微藻生物质 (UTEX 250,按细胞干重计 40%以上的脂质) (1000mg/片)、Betatene β -胡萝卜素 (杜氏藻属的 β -胡萝卜素 20%) (15mg/片)、作为抗坏血酸的维生素 C (100mg/片) 和 Bioperine (胡椒生物利用率增强剂) (2.5mg/片)。

[0296] 藻快餐切片

[0297] 藻快餐切片的成分组成为:原色白面粉 (1杯)、土豆粉 (1/2杯)、藻类生物质 (按细胞干重计 40%以上的脂质) (3汤匙)、盐 (3/4茶匙,按口味调节)、大麦面粉 (2汤匙)、水 (1/3-1杯) 和调味料 (例如) (例如,小茴香、咖喱、牧场调味品) (按口味)。

[0298] 制备程序:混合干成分,向干成分中加入 1/3 杯水。加入额外的水 (最多总共 1 杯) 以形成面团。把面团揉成均匀的产品,然后在室温下放 30 分钟。切放置的面团并形成薄片,在 275° F 烘烤 20-30 分钟或烘烤到酥脆。

[0299] 藻葡萄干甜点

[0300] 藻葡萄干甜点的成分组成为:黄油或人造黄油 (1/2杯,常规食谱要求 3/4杯)、大麦片或燕麦片 (13/4杯)、肉豆蔻 (1/4茶匙)、水或奶 (2-3汤匙)、红糖 (1杯)、盐 (1/2茶匙)、烤粉 (1/2茶匙)、香草 (1茶匙)、肉桂 (1茶匙)、葡萄干 (任选预浸在白兰地或橙汁中) (3/4杯) 和干藻类生物质 (30%以上油) (1/3杯)。这一食谱制成约 2 打甜点。

[0301] 常规食谱要求 2 个蛋和 3/4 杯黄油或人造黄油。借助于干藻类生物质,通过用含油的藻类生物质替换而排除使用 1/4 黄油或人造黄油以及蛋。

[0302] 制备程序:把黄油和糖打成乳脂状。打到相当松软为止。加入香草。合并面粉和大麦片及藻。合并黄油混合物与面粉-薄片混合物。加入葡萄干。用茶匙滴淌并稍微压扁。在 375 华氏度烤约 9-10 分钟。

[0303] 藻大麦意大利面

[0304] 大麦意大利面与藻的成分组成为:大麦粉 (3/4)、具有按细胞干重计至少 20% 脂质的干藻类生物质 (2汤匙)、大蛋 (1个) 和盐 (1/2茶匙)。

[0305] 制备程序:在碗中放面粉并加入藻和盐。搅在一起。中间加蛋 (制成井形) 并逐步拌入面粉。如果难以拌入,加 1 汤匙水在周围喷洒。当所有面粉已掺入时开始揉面团,使之更均匀。这一过程应在 5-8 分钟内完成。当面团均匀时,把它分成两个小球,在外面擦橄榄油。覆盖并放置约 30 分钟。压扁面团,然后用擀面杖卷到厚度约八分之一英寸 (对于像意大利宽面样的意大利面)。把意大利面切成细条。放入沸咸水当中。煮约 8-10 分钟。可以用少量碎帕尔马干酪和一些裂胡椒放在意大利面顶部上进膳。

[0306] 意大利面

[0307] 本实例将按常规食谱制成的意大利面与用全细胞高脂质生物质 (具有按细胞干重计 48%脂质的原壳小球藻 (株)) 替换常规食谱中的蛋进行比较。

[0308] 表 5. 对照的传统意大利面食谱

	组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
[0309]	全蛋(打散)	1	55.67	24.97%	1.87%
	盐, 食用	½ 茶匙	3.74	1.68%	0.00%
	面粉, 通用	1杯	133.18	59.74%	0.00%
	水	1-2 汤匙	30.35	13.61%	0.00%
产量: 3			222.94	100.00%	1.87%

[0310] 表 6. 全细胞藻类生物质藻类生物质替换全蛋的食谱

	组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
[0311]	全细胞生物质		7.55	3.16%	1.52%
	盐, 食用	½ 茶匙	3.61	1.51%	0.00%
	面粉, 通用	1杯	146.28	61.25%	0.00%
	水		81.37	34.07%	0.00%
产量: 3			238.81	100.00%	1.52%

[0312] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0313] 1. 在厨宝碗中用面团钩合并面粉和盐。

[0314] 2. 轻轻打蛋。低速(速度 #2) 加入略微打散的蛋, 直到形成硬面团。

[0315] 3. 如果需要, 加 1-2 汤匙水搅拌。

[0316] 4. 混合 3-4 分钟, 如果面团太粘, 加点额外的面粉。

[0317] 5. 把面团分成可压片的若干份。压片前放置面团 1 小时。

[0318] 6. 使用意大利面压片机将面团压成所需的厚度。

[0319] 7. 把意大利面切成条。

[0320] 8. 炉上放壶水煮。

[0321] 9. 煮意大利面, 用油 / 黄油颠以防止粘连, 配以沙司。

[0322] 全细胞生物质意大利面具有类似于常规食谱的质感和外观。没有突出的藻味是显而易见的。全细胞藻类生物质提高了干意大利面的产量, 很可能是由于水结合功能的原因。这些观察与全细胞藻类生物质可以在干食品或加工食品中充当良好膨胀剂的想法一致。

[0323] 藻奶

[0324] 藻奶含约 8% 的固体, 其组成有 4% 的健心脂质、2.5% 富含必需氨基酸的蛋白质、1.5% 的碳水化合物和 0.5% 的纤维, 并用维生素 A 和 D 强化。藻奶非常有益于健康; 它是素食主义的, 可以用来代替牛奶和豆奶。与牛奶不同的是, 它的饱和脂肪非常低, 不像豆浆, 脂肪主要是单不饱和的 (50% 以上的 C18:1)。藻奶味道温和; 不像豆奶“有腥味”。可添加调料, 如

[0325] 草莓或树莓。

[0326] 藻奶的成分组成为含约 40% 脂质的干全藻细胞 (8%)、维生素 D (200 单位) 维生素 A (200 单位)、黄原胶 (0.2%) 和水 (到 100%)。温水, 分散黄原胶。然后在温黄原胶

溶液中分散干全藻细胞并添加维生素。然后用高压匀化器对溶液匀质化并进行巴氏灭菌。下面是使用藻碎粉的另外的制剂。

[0327] 实例 10

[0328] 藻匀浆（高脂质）的生产

[0329] 将采用实例 4 中所述的方法和条件生长的含高脂质的原壳小球藻加工成高脂质藻匀浆。为将微藻生物质加工成藻匀浆，首先将收获的原壳小球藻生物质加工成藻片（参见实例 4）。然后将干藻片以大约 40% 的固体浓度在去离子水中再水化。然后用在 1000-1200 巴的压力级下操作的高压匀化器（GEA 型 NS1001）微化所得到的藻片悬浮液，直到生物质的平均粒度不到 10 μm 。使用之前将所得到的藻匀浆包装好并储存。

[0330] 实例 11

[0331] 功能性食品制品：用在食品中作为脂肪代替物的高脂质藻片和藻匀浆

[0332] 以下实例描述使用高脂质（40 重量%以上）藻片或藻匀浆作为常规及低脂肪食谱中的脂肪代替物。采用实例 4 中所述的方法制备高脂质藻片。采用实例 8 中所述的方法制备高脂质藻匀浆。

[0333] 巧克力布朗尼

[0334] 本实例将采用常规食谱、低脂肪对照食谱制成的巧克力布朗尼与用高脂质藻片（具有按细胞干重计 48% 脂质的原壳小球藻（UTEX 250 株））替换常规食谱中的一些脂肪进行比较。

[0335] 表 7. 对照的常规巧克力布朗尼的食谱

	组分	食谱量度	重量 (g)	百分比	% 脂肪, 湿重
	黄油	1 棒, 1/41b	114.00	19.05 %	15.24 %
	可可粉	1/4 杯	48.00	8.02 %	0.80 %
	全蛋	3	156.00	26.07 %	1.96 %
[0336]	糖, 粒状	1 杯	140.92	23.55 %	0.00 %
	面粉, 通用	1 杯	130.40	21.79 %	0.00 %
	烤粉	1 茶匙	3.97	0.66 %	0.00 %
	香草提取物	1 茶匙	5.07	0.85 %	0.00 %
	产量: 1 盘		598.36	100.00 %	18.00 %

[0337] 表 8. 低脂肪对照例的食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
黄油		0.00	0.00%	0.00%
可可粉	1/4杯	48.00	10.25%	1.03%
水		139.80	29.86%	0.00%
全蛋	0.00	0.00	0.00%	0.00%
糖, 粒状	1杯	140.92	30.10%	0.00%
面粉, 通用	1杯	130.40	27.85%	0.00%
烤粉	1 茶匙	3.97	0.85%	0.00%
香草提取物	1 茶匙	5.07	1.08%	0.00%
产量: 1盘		468.16	100.00%	1.03%

[0339] 表 9. 全藻类生物质布朗尼替换黄油及蛋的食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
全细胞生物质		73.00g	12.59%	6.5%
可可粉	1/4杯	24.00	4.14%	
水	3	148.00	25.52%	
糖, 粒状	1杯	183.00	31.55%	
面粉, 通用	1杯	133.00	22.93%	
烤粉	1 茶匙	4.00	0.69%	
山核桃, 切碎	1杯	0.00	0.00%	
香草提取物	1 茶匙	15.00	2.59%	
产量: 1盘		580.00	100.00%	6.5%

[0342] 在每种情况下,烹饪程序为:

[0343] 1. 预热烘箱到 350° F。在 8x8 烘盘上涂脂和放面粉。

[0344] 2. 在小平底锅中融化黄油与可可粉。搁置冷却。

[0345] 3. 在附有叶片的厨宝碗中打蛋到起泡。逐步加糖。

[0346] 4. 向蛋混合物中加室温 /s1 温黄油 / 可可粉混合物。

[0347] 5. 将面粉与烤粉混合在一起。慢慢加 1/2 混合物到面糊中。

[0348] 6. 面粉的剩余部分中加山核桃。加混合物到面糊中。低速混合 (速度 #2),直到充分共混。加香草提取物并混合。

[0349] 7. 把面糊摊入盘中。烤 20-25 分钟。

[0350] 8. 如果需要的话,冷却布朗尼和冰。

[0351] 与用藻片作出的布朗尼或常规的布朗尼相比,低脂肪的对照布朗尼 (省掉黄油和

蛋类)不具有同样的屑粒状结构。藻片布朗尼具有好看可见的屑粒状结构,但比全脂肪布朗尼稍微更致密和更粘些。总的说来,与常规的布朗尼相比,用藻片作出的布朗尼的脂肪含量减少了约 64%。

[0352] 鸡蛋糕

[0353] 本实例比较由常规食谱、低脂肪食谱、高脂质藻匀浆 (HL-AH) 代替常规食谱中的蛋类和黄油以及高脂质藻片代替常规食谱中的蛋类制成的鸡蛋糕。藻匀浆和藻片两者均来自原壳小球藻 (UTEX 250 株),具有按细胞干重计 48%的脂质。

[0354] 表 10. 常规鸡蛋糕食谱

[0355]	组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
	黄油	1杯	222.20	11.38%	9.11%
	糖,粒状	2 ½杯	476.16	24.40%	0.00%
	蛋,全	3	148.26	7.60%	0.57%
	香草提取物	1 ½ 茶匙	6.50	0.33%	0.00%
[0356]	酪乳 1%MF	2 ½杯	575.00	29.46%	0.29%
	面粉,通用	3 ¾杯	502.96	25.77%	0.00%
	烤粉	2 ¼ 茶匙	8.35	0.43%	0.00%
	小苏打	2 ½ 茶匙	12.44	0.64%	0.00%
	产量: 2盘		1951.87	100.00%	9.97%

[0357] 表 11. 低脂肪阴性对照的食谱

[0358]	组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
	黄油	0.00	0.00	0.00%	0.00%
	糖,粒状	2 ½杯	475.00	30.36%	0.00%
	蛋,全	0.00	0.00	0.00%	0.00%
	香草提取物	1 ½ 茶匙	6.50	0.42%	0.00%
	酪乳 1%MF	2 ½杯	575.00	36.75%	0.37%
	面粉,通用	3 ¾杯	487.69	31.17%	0.00%
	烤粉	2 ¼ 茶匙	8.52	0.54%	0.00%
	小苏打	2 ½ 茶匙	11.90	0.76%	0.00%
	产量: 2盘		1564.61	100.00%	0.37%

[0359] 表 12. 微化高脂质藻类生物质替换蛋和黄油的食谱

[0360]

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
黄油	0.00	0.00	0.00	0.00
糖, 粒状	2 ½杯	457.00	22.98 %	
微化HL-AH	100.00	5.03 %	2.41 %	
水(来自蛋、黄油)+ 添加的香草提取物	1 ½ 茶匙	20.00	1.01 %	
酪乳	2 ½杯	575.00	28.92 %	
[0361] 面粉, 通用	3 ¾杯	505.00	25.40 %	
烤粉	2 ¼ 茶匙	9.80	0.49 %	
小苏打	2 ½ 茶匙	13.30	0.67 %	
		1988.57	100.00 %	2.41 %

[0362] 表 13. 高脂质藻片替换蛋的食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
黄油	1 杯	227.00	11.69 %	9.35 %
糖, 粒状	2 ½杯	457.00	23.53 %	
藻片s		22.50	1.16 %	0.56 %
水 (来自蛋)		112.50	5.79 %	
[0363] 香草提取物	1 ½ 茶匙	20.00	1.03 %	
酪乳	2 ½杯	575.00	29.61 %	
面粉, 通用	3 ¾杯	505.00	26.00 %	
烤粉	2 ¼ 茶匙	9.80	0.50 %	
小苏打	2 ½ 茶匙	13.30	0.68 %	
产量: 2盘		1942.10	100.00 %	9.91 %

[0364] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0365] 1. 预热烘箱到 350° F。在两个 9x13 盘上涂脂和放面粉。

[0366] 2. 一起筛面粉、烤粉和小苏打。搁置。

[0367] 3. 在厨宝碗中, 把黄油和糖一起打成乳脂状直到发亮。一次打 1 枚蛋。

[0368] 4. 加香草提取物。

[0369] 5. 交替地向面糊中加入面粉混合物与酪乳。混合到刚好结合。

[0370] 6. 把面糊倒入备好的盘中。

[0371] 7. 烤蛋糕 35-40 分钟,或者烤到出来的牙签干净为止。

[0372] 8. 冷却。

[0373] 用高脂质藻片(作为蛋的替代物)制成的鸡蛋糕非常致密,几乎没有屑粒状结构。然而,与非常致密和干的低脂肪阴性对照物相比,用高脂质藻片制成的鸡蛋糕发湿。用高脂质藻匀浆(HL-AH)(替换全脂肪蛋糕中所有的黄油和蛋)制成的蛋糕在质感上非常湿滑,并且具有类似于常规食谱蛋糕的很好的屑粒状结构。品尝时,用 HL-AH 制成的蛋糕没有常规蛋糕中所存在的黄油味。总的说来,HL-AH 是常规鸡蛋糕食谱中的黄油和蛋的良好替换物。具有 HL-AH 的蛋糕比常规鸡蛋糕含有的脂肪少约 75%,但生产的蛋糕具有良好的屑粒状结构、质感和湿性。

[0374] Biscuits

[0375] 本实例比较按常规食谱、高脂质藻片替换常规食谱中的蛋类和起酥油以及高脂质藻匀浆(HL-AH)替换常规食谱中的蛋类和起酥油制成的饼干。藻片和藻匀浆生物质两者均来自原壳小球藻(UTEX 250 株),具有按细胞干重计 48%的脂质。

[0376] 表 14. 常规的饼干食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
面粉, 通用	2杯	277.73	44.59%	0.00%
烤粉	4茶匙	20.28	3.26%	0.00%
糖, 粒状	3 茶匙	12.61	2.02%	0.00%
[0377] 盐, 食用	½ 茶匙	3.40	0.55%	0.00%
起酥油(Crisco)	½杯	82.04	13.17%	13.17%
蛋, 全	1	53.15	8.53%	0.64%
奶, 2%	2/3杯	173.68	27.88%	0.56%
产量: 12		622.89	100.00%	14.37%

[0378] 表 15. 高脂质藻片代替蛋和起酥油的食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪,湿重
面粉, 通用	2杯	275.00	46.08%	
烤粉	4茶匙	17.20	2.88%	
[0379] 糖, 粒状	3 茶匙	11.28	1.89%	
盐, 食用	½ 茶匙	3.30	0.55%	
藻片		50.00	8.38%	4.02%
水		56.00	9.38%	
奶, 2%	2/3杯	184.00	30.83%	0.62%
[0380] 产量: 12		596.78	100.00%	4.64%

[0381] 表 16. 使用高脂质藻匀浆 (HL-AH) 的饼干食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
面粉, 通用	2杯	137.50	46.08 %	
烤粉	4茶匙	8.60	2.88 %	
糖, 粒状	3 茶匙	5.65	1.89 %	
[0382] 盐, 食用	½ 茶匙	1.65	0.55 %	
HL-AH		25.00	8.38 %	4.02 %
水		28.00	9.38 %	
奶, 2 %	2/3杯	92.00	30.83 %	0.62 %
产量: 12		298.40	100.00 %	4.64 %

[0383] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0384] 1. 预热烘箱到 450° F。

[0385] 2. 在厨宝碗中, 合并面粉、烤粉、糖和盐。

[0386] 3. 向混合物中加入起酥油, 直到形成粗屑粒。(速度 #2)。

[0387] 4. 打蛋与奶。给干成分加水分并混合, 刚好到干成分变湿为止。

[0388] 5. 混合到形成面团(速度 #2, 15 秒)。

[0389] 6. 滚至 3/4" 厚(或片, 如果需要的话)。用撒了面粉的饼干切刀切。

[0390] 7. 放在稍微涂油脂的烤盘上。烤 8-10 分钟或者烤到金黄色。

[0391] 8. 趁热食用。

[0392] 在质感和外观方面, 用 HL-AH 制成的样品似乎类似于全脂肪对照样品。总的说来, HL-AH 饼干最接近常规食谱的饼干, 产生的饼干脂肪少 65%, 但仍然保持了常规食谱饼干的质感和发面。

[0393] 乳脂状色拉调味品

[0394] 本实例比较使用常规食谱(具有 40%脂肪的对照物)、低脂肪食谱(具有 20%脂肪的对照物)和具有高脂质藻匀浆 (HL-AH)(具有 ~ 20 重量%的脂肪)的食谱的蛋黄酱/色拉调味品, 所述高脂质藻匀浆来自原壳小球藻 (UTEX 250 株), 具有按细胞干重计 48%的脂质。

[0395] 表 17. 40%脂肪对照物的食谱

[0396]

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
油, 卡诺拉		200.00	40.00 %	40.00 %
蛋黄液		15.00	3.00 %	3.00 %
醋, 蒸馏的, 60 谷物		200.00	40.00 %	0.00 %
盐, 食用		0.00	0.00 %	0.00 %
水		85.00	17.00 %	0.00 %
		500.00	100.00 %	43.00 %

[0397] 表 18. 20%脂肪对照物的食谱

[0398]

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
油, 卡诺拉		100.00	20.00 %	20.00 %
蛋黄液		14.78	2.96 %	2.96 %
醋, 蒸馏的, 60 谷物		200.00	40.00 %	0.00 %
盐, 食用		0.00	0.00 %	0.00 %
水		185.22	37.04 %	0.00 %
		500.00	100.00 %	22.96 %

[0399] 表 19. HL-AH 乳脂状色拉调味品的食谱

组分	食谱量度	重量(g)	百分比	%脂肪, 湿重
HL-AH		200.00	40.00 %	19.0
水		180.00	36.00 %	
醋(5%酸)		120.00	24.00 %	
盐, 食用		0.00	0.00 %	
		500.00	100.00 %	19.0 %

[0401] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0402] 1. 使用食品加工机合并蛋黄、酸、水和盐。

[0403] 2. 缓慢注油, 直到形成难破乳的乳液。

[0404] 3. 如果乳液太难破乳, 添加一些额外的水。

[0405] 4. 向下刮边并再修整 10 秒钟以并入任何油滴。

[0406] 20%脂肪对照物调味品(用卡诺拉油制成)不具有任何粘性, 并且未能形成乳液。表面起泡沫, 并且在将调味品静置之后形成油滴。用 HL-AH 制成的调味品具有藻类生物物质味、良好的不透明性和粘性以及滑腻口感。总的说来, 与 20%和 40%脂肪的调味品相比, HL-AH 对调味品赋予了更好的不透明性和粘性。HL-AH 起到重要的乳化剂作用, 并

且以一半的脂肪含量产生具有 40%脂肪调味品的性能且具有适当口感的调味品。用微化 HL-AH(19%脂肪含量)在荷兰沙司食谱(常规食谱对照物为 80%脂肪)中得到了类似的结果。用 HL-AH 生产的荷兰沙司平滑且味道丰富,具有滑腻的口感和良好的粘性。沙司的颜色比全脂肪对照物稍微有些暗黄。总的来说,由具有微化 HL-AH 的荷兰沙司生产的产品比得上全脂肪对照物,而脂肪少 75%。

[0407] 模型巧克力饮料

[0408] 本实例比较用常规食谱、用高脂质藻匀浆(HL-AH)替换常规食谱中的奶和油以及用高脂质藻片生物质替换常规食谱中的奶和油制成的模型巧克力营养饮料。藻片生物质和 HL-AH 两者均来自原壳小球藻(UTEX 250 株),具有按细胞干重计 48%的脂质。

[0409] 表 20. 常规巧克力饮料对照物的食谱

	组分	重量(g)	1000.00g	百分比	%脂肪
	水	278.60 g	835.81g	83.581 %	
	无脂奶粉	17.88 g	53.64 g	5.364 %	
	碱化可可粉	11.38 g	34.14 g	3.414 %	0.376 %
[0410]	大豆分离蛋白	8.12 g	24.36 g	2.436 %	
	麦芽糖糊精	5.00 g	15.00 g	1.500 %	
	调味剂, Choc	1.62 g	4.86 g	0.486 %	
	卵磷脂	1.14 g	1 g	0.1 %	
	胶质共混物	0.81 g	2.43 g	0.243 %	
	磷酸二钠	0.32 g	0.96 g	0.096 %	
	三氯蔗糖	0.13 g	0.39 g	0.039 %	
[0411]	卡诺拉油	8.33 g	24.99 g	2.499 %	2.499 %
		333.33 g	1000.00 g	100.000 %	2.875 %

[0412] 表 21. 使用 HL-AH 替换奶和油的巧克力饮料的食谱

组分	重量 (g)	1000.00g	百分比	% 脂肪
水	278.60 g	857.23 g	85.723 %	
HL-AH	17.88 g	55.02g	5.502 %	2.641 %
碱化可可粉	11.38 g	35.02 g	3.502 %	0.385 %
大豆分离蛋白	8.12 g	24.98 g	2.498 %	
麦芽糖糊精	5.00 g	15.38 g	1.538 %	
调味剂, Choc	1.62 g	4.98 g	0.498 %	
卵磷脂	1.14 g	1 g	0.1 %	
胶质共混物	0.81 g	2.49 g	0.249 %	
磷酸二钠	0.32 g	0.98 g	0.098 %	
三氯蔗糖	0.13 g	0.40g	0.040 %	
	325.00 g	1000.00 g	100.000 %	3.026 %

[0414] 表 22. 使用藻片生物质替换奶和油的巧克力饮料的食谱

组分	重量 (g)	1000.00g	百分比	% 脂肪
水	278.60 g	857.23g	85.723 %	
藻片 (48 % 脂质)	17.88 g	55.02g	5.502 %	2.641 %
碱化可可粉	11.38 g	35.02 g	3.502 %	0.385 %
大豆分离蛋白	8.12 g	24.98 g	2.498 %	
麦芽糖糊精	5.00 g	15.38 g	1.538 %	
调味剂, Choc	1.62 g	4.98 g	0.498 %	
胶质共混物	0.81 g	2.49 g	0.249 %	
磷酸二钠	0.32 g	0.98 g	0.098 %	
三氯蔗糖	0.13 g	0.40 g	0.040 %	
	325.00 g	1000.00 g	100.000 %	3.026 %

[0417] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0418] 1) 共混干成分。

[0419] 2) 给壶加水分 (除了调味剂)。

[0420] 3) 在干成分中搅拌。

[0421] 4) 用棍搅拌器修整 1 分钟。

[0422] 5) 在炉顶上加热到 200° F。

[0423] 6) 在 2500/500psi 下匀质化。

[0424] 7) 冷却到 < 40° F 并冷冻。

[0425] 含 HL-AH 的巧克力饮料具有比含藻片的巧克力饮料更稠、更多样的外观, 并且外观上更接近常规的巧克力饮料。总的来说, 微化 HL-AH 样品更像常规巧克力饮料对照物, 赋予了良好的粘性, 并且不透明性略高于常规巧克力饮料对照物。

[0426] 实例 12

[0427] 藻粉末 (高脂质) 的生产

[0428] 把采用实例 4 中所述的发酵方法和条件生长的含高脂质的原壳小球藻加工成高脂质藻粉末。为把微藻生物质加工成藻粉末, 将收获的原壳小球藻生物质与培养基分离, 然后进行离心浓缩并根据标准方法使用喷雾干燥器进行干燥。包装所得到的藻粉末 (已喷雾干燥成粉末形式的全藻细胞) 并储存, 此后才可使用。

[0429] 实例 13

[0430] 藻碎粉 (高脂质) 的生产

[0431] 把采用实例 4 中所述的发酵方法和条件生长的含高脂质的原壳小球藻加工成高脂质藻碎粉。为把微藻生物质加工成藻碎粉, 将收获的原壳小球藻生物质与培养基离心分离。使用高压匀化器 ((GEA 型 NS1001) 操作压力级 1000-1200 巴) 微化所得到的含 40% 以上水分的浓缩生物质, 直到生物质的平均粒度不到 10 μ m。然后采用标准方法对藻匀浆进行喷雾干燥。包装所得到的藻碎粉 (已喷雾干燥成粉末形式的微化藻细胞) 并储存, 此后才可使用。

[0432] 实例 14

[0433] 含藻碎粉 (高油) 的食物制品

[0434] 以下实例描述使用高脂质 (至少 20 重量%、通常 25-60 重量%的脂质) 藻碎粉作为常规食谱中的脂肪替换物。另外的实例也显示了藻碎粉在用于预制食品 (如炒蛋粉) 时提高保水性和改善质感的独特功能。采用实例 13 中所述的方法制备用于下面实例中的高脂质藻碎粉。

[0435] 巧克力布朗尼

[0436] 为了评价使用高脂质藻碎粉的功能和味道谱差异, 将用常规食谱制成的巧克力布朗尼与用藻碎粉制成的布朗尼和常规的脂肪减少的布朗尼进行比较。使用高脂质 (按干重计大约 53% 的脂质) 藻碎粉代替黄油和蛋类。

[0437] 表 23. 常规的布朗尼食谱

	组分	重量(g)	650.00g	百分比	%脂肪
[0438]	黄油, 不加盐	170.00	135.75	20.88	16.71
	可可粉	50.00	39.93	6.14	0.61
	全蛋	200.00	159.71	24.57	1.84
	糖, 粒状	250.00	199.63	30.71	0.00
	面粉, 通用	130.00	103.81	15.97	0.00
	烤粉	4.00	3.19	0.49	0.00
	盐	3.00	2.40	0.37	0.00
	香草提取物	7.00	5.59	0.86	0.00
		814.00	650.00	100.00%	19.16%

[0439] 表 24. 脂肪减少的布朗尼食谱

	组分	重量(g)	650.00g	百分比	%脂肪
[0440]	黄油, 不加盐	60.00	57.44	8.84	7.07
	可可粉	50.00	47.86	7.36	0.74
	全蛋	100.00	95.73	14.73	1.10
	糖, 粒状	225.00	215.39	33.14	0.00
	水	50.00	47.86	7.36	0.00
	玉米糖浆	50.00	47.86	7.36	0.00
[0441]	面粉, 通用	130.00	124.45	19.15	0.00
	烤粉	4.00	3.83	0.59	0.00
	盐	3.00	2.87	0.44	0.00
	香草提取物	7.00	6.70	1.03	0.00
		679.00	650.00	100.00%	8.91%

[0442] 表 25. 藻碎粉布朗尼食谱

	组分	重量(g)	600.00g	百分比	%脂肪
[0443]	藻碎粉	195.00	206.72	34.45	7.30
	可可粉	48.00	50.88	8.48	0.85
	水	41.00	43.46	7.24	0.00
	糖, 粒状	140.92	149.39	24.90	0.00
	面粉, 通用	130.40	138.24	23.04	0.00
	烤粉	4.00	4.24	0.71	0.00
	盐	1.67	1.77	0.30	0.00
	香草提取物	5.00	5.30	0.88	0.00
		565.99	600.00	100.00 %	8.15 %

[0444] 在每种情况下, 烘烤程序是:

[0445] 1. 预热烘箱到 350° F。在 8" x 8" 烤盘上涂脂和放面粉。

[0446] 2. 在小平底锅中融化黄油与可可粉。搁置冷却。

[0447] 3. 把蛋与香草打在一起, 直到稍微起泡沫。逐步加糖和其余的湿成分。

[0448] 4. 加黄油 / 可可粉混合物至蛋混合物。合并其余的干成分并缓慢加至湿混合物, 直到共混。

[0449] 5. 把面糊摊入盘里面并烘烤 20-25 分钟, 或者烘烤到定型。

[0450] 对于具有藻碎粉的布朗尼, 合并干成分, 然后向干成分中加入藻碎粉。然后缓慢地把湿成分 (水和香草) 共混到干成分里面。把面糊摊入盘里面并烘烤 27-28 分钟。

[0451] 由常规的脂肪减少的食谱生产的布朗尼具有干质感, 比起布朗尼质感来说更像是蛋糕。用藻碎粉制成的布朗尼 (具有与脂肪减少的食谱的布朗尼类似的脂肪百分比, 为大约 8% 的脂肪) 非常湿并具有布朗尼质感, 但与常规的布朗尼食谱 (大约 19% 的脂肪) 相比具有更易碎的屑粒状结构。当与描述在实例 11 中的用藻片制成的布朗尼相比时, 用藻碎粉制成的布朗尼不那么致密, 具有更软的屑粒状结构。总的来说, 藻碎粉是烘烤食品食谱中黄油和蛋类的有效替换物, 生产的产品在质感、味道和外观上类似于常规食谱的产品。藻碎粉显示出在使用藻片时所没有的独特功能 (例如, 更细的屑粒状结构, 不那么胶粘, 质感轻)。

[0452] 蛋黄酱

[0453] 为了评价藻碎粉的乳化能力, 将用藻碎粉制成的蛋黄酱与用常规食谱制成的蛋黄酱和脂肪减少的蛋黄酱进行比较, 所述用藻碎粉制成的蛋黄酱已经在水 (40% w/v) 中重构, 并且在低压 (100-200 巴) 下匀质化以产生浆料。藻碎粉浆料用具有按干重计大约 53% 脂质的高脂质藻碎粉制成, 并且完全替换常规食谱中的油和蛋黄。

[0454] 表 26. 常规的蛋黄酱食谱

	组分	重量(g)	1000.00g	百分比	%脂肪
	油, 大豆的	344.00	573.33	57.33	57.33
	蛋黄液	60.00	100.00	10.00	2.65
	醋, 蒸馏的	47.50	79.17	7.92	0.00
[0455]	糖, 粒状	12.00	20.00	2.00	0.00
	盐	11.00	18.33	1.83	0.00
	浓缩柠檬汁	1.25	2.08	0.21	0.00
	黄原胶	1.20	2.00	0.20	0.00
	大蒜粉	0.50	0.83	0.08	0.00
	洋葱粉	0.75	1.25	0.13	0.00
[0456]	水	121.80	203.00	20.30	0.00
		600.00	1000.00	100.00 %	59.98 %

[0457] 表 27. 常规的脂肪减少的蛋黄酱食谱

	组分	重量(g)	1000.00g	百分比	%脂肪
	油, 大豆的	152.00	253.33	25.33	25.33
	蛋黄液	15.00	25.00	2.50	0.66
	醋, 蒸馏的	47.50	79.07	7.91	0.00
	速食淀粉	15.00	24.97	2.50	0.00
	糖, 粒状	15.50	25.80	2.58	0.00
	盐	11.00	18.31	1.83	0.00
[0458]	浓缩柠檬汁	1.25	2.08	0.21	0.00
	磷酸	5.70	9.49	0.95	0.00
	黄原胶	1.80	3.00	0.30	0.00
	大蒜粉	0.50	0.83	0.08	0.00
	洋葱粉	0.75	1.25	0.13	0.00
	水	333.00	555.00	55.50	0.00
		600.00	1000.00	100.00 %	26.00 %

[0459] 表 28. 用藻碎粉浆料制成的蛋黄酱的食谱

	组分	重量 (g)	1000.00g	百分比	% 脂肪
	藻碎粉, 浆料	344.00	499.38	49.94	26.47
	蛋黄液	0.00	0.00	0.00	0.00
	醋, 蒸馏的	47.50	79.07	7.91	0.00
[0460]	速食淀粉	15.00	24.97	2.50	0.00
	糖, 粒状	15.50	25.80	2.58	0.00
	盐	11.00	18.31	1.83	0.00
	浓缩柠檬汁	1.25	2.08	0.21	0.00
	磷酸	5.70	9.49	0.95	0.00
	黄原胶	1.80	3.00	0.30	0.00
	大蒜粉	1.50	2.50	0.25	0.00
[0461]	洋葱粉	1.50	2.50	0.25	0.00
	水	200.00	332.92	33.29	0.00
		600.75	1000.00	100.00%	26.47%

[0462] 在每种情况下, 程序是:

[0463] 1. 使用食品加工机合并酸、水和干成分。

[0464] 2. 加入蛋黄并缓慢注入油或藻碎粉浆料。应该形成难破乳的乳液。如果乳液太难破乳, 添加额外的水, 直到乳液达到所需的稠度。

[0465] 3. 向下刮边并再修整 10 秒钟以并入任何油 / 浆料滴。

[0466] 用藻碎粉浆料制成的蛋黄酱的粘度在常规蛋黄酱的粘度与脂肪减少的蛋黄酱的粘度之间。藻碎粉浆料蛋黄酱的口感比得上常规的蛋黄酱 (但含不到 50% 的总脂肪)。为了结合更多的水和拉紧产品使之更加“可摊开”, 在脂肪减少的蛋黄酱和藻碎粉浆料蛋黄酱两者中均需要速食淀粉。总的来说, 使用藻碎粉浆料替换常规蛋黄酱食谱中的所有脂肪源 (例如, 油和蛋黄) 产生的蛋黄酱具有良好的粘度和口感, 与常规的蛋黄酱没什么区别。藻碎粉浆料起到有效的乳化剂作用, 成功地取代了见于常规蛋黄酱中的油和蛋黄的官能团。

[0467] 在另外的应用中, 使用高脂质藻碎粉浆料制作脂肪蜂蜜芥末蘸沙司 / 调味品。向如上所述制备的蛋黄酱 (略有改动以达到蘸沙司 / 调味品的适当稠度) 中添加蜂蜜、芥末、白醋、柠檬汁调味剂和海盐。在食品加工机中合并所有的成分并混合到均匀平稳。最终产品含大约 14 重量% 的藻碎粉, 具有大约 8% 的总脂肪。含藻碎粉的蜂蜜芥末蘸沙司 / 调味品具有比得上常规 (全脂肪) 蜂蜜芥末蘸沙司的滑腻口感。

[0468] 日本豆酱色拉调味品

[0469] 为了评价藻碎粉在乳脂状色拉调味品中的应用, 采用常规食谱和含高脂质藻碎粉的食谱制备日本豆酱色拉调味品, 所述高脂质藻碎粉重构为浆料 (40% 固体), 是采用前面的蛋黄酱配方中所述的方法产生的。

[0470] 表 29. 常规日本豆酱色拉调味品的食谱

	组分	重量 (g)	百分比 (按重量计)
	油相:		
[0471]	卡诺拉油	294.00	98.00
	芝麻油	6.00	2.00
		300.00	100%
[0472]	水相:		
	醋、米酒	143.50	20.50
	日本豆酱膏, 红	166.25	23.70
	糖, 粒状	78.75	11.250
	大蒜粉	3.5	0.50
	芥末粉	5.25	0.75
[0473]	姜粉	5.25	0.75
	黄原胶	1.50	0.214
	山梨酸钾	0.88	0.125
	EDTA二钠钙	0.18	0.025
	水	294.95	42.136
		700.00	100.00%

[0474] 表 30. 用藻碎粉浆料制成的日本豆酱色拉调味品的食谱

	组分	重量 (g)	百分比 (按重量计)
	油相:		
[0475]	卡诺拉油	94.0	94.00
	芝麻油	6.00	6.00
		100.00	100%
[0476]	水相:		
	藻碎粉, 浆料	125.00	13.889
[0477]	醋、米酒	80.00	8.889
	醋, 蒸馏的	60.00	6.667

	日本豆酱膏, 红	225.00	25.00
	糖, 粒状	85.00	9.444
	大蒜粉	3.5	0.389
	芥末粉	5.25	0.583
	姜粉	5.25	0.583
[0478]	黄原胶	2.70	0.300
	山梨酸钾	0.88	0.097
	EDTA二钠钙	0.18	0.019
	二氧化钛	4.20	0.467
	水	300.00	33.344
		900.00	100.00 %

[0479] 在每种情况下,将干成分共混在一起搁置。将水、醋和酸共混在一起并搁置。分别地量出日本豆酱膏。对于常规的食谱,将油类合并在一起并搁置。对于含藻碎粉的食谱,分别地称出藻碎粉浆料、油和二氧化钛并合并。然后用高剪切搅拌器共混水 / 醋混合物。然后在用高剪切搅拌器共混水 / 醋和干成分的同时缓慢注入油类混合物。然后将调味品加热到 190° F 达 2 分钟,然后使调味品贯穿最紧密设置的胶体磨。然后瓶装调味品成品并冷冻,之后才可使用。

[0480] 豆酱色拉调味品含大约 30% 的脂肪,而用藻碎粉浆料制成的日本豆酱色拉调味品含大约 12.65% 的脂肪。总的来说,用藻碎粉浆料制成的日本豆酱调味品含有的脂肪不到用常规食谱制成的日本豆酱调味品所含有的脂肪的一半,而且还保持了滑腻的口感和不透明性。

[0481] 比萨面团 / 面包条

[0482] 采用常规的比萨面团 / 面包条食谱和含 5 重量%或 10 重量%藻碎粉的比萨面团 / 面包条食谱测试藻碎粉在酵母面团应用中起作用的能力。含藻碎粉的比萨面团 / 面包条用高脂质藻碎粉浆料(40%固体)制成,后者采用前面的蛋黄酱配方中所述的方法生产。

[0483] 在每种情况下,将 7.3 克酵母与 9.3 克通用面粉合并,并与 58 克温水混合。将酵母混合物在室温下静置至少 10 分钟。在含藻碎粉浆料的样品中,在混合器中使浆料与 167 克水混合,并与 217 克通用面粉和 4.9 克盐合并。在常规食谱中,在混合器中只将水与面粉和盐合并。合并之后,向面团中加入酵母混合物,另外加 90 克通用面粉。然后用手揉面团,根据需要,如果面团太湿,另外再添加面粉。盖上面团并使之在温暖的位置发 1 小时。发面之后,将面团分份,或者是转出作为比萨面团,或者是成形为面包条。然后在 450° F 烘箱中烘烤面团 8-12 分钟或烘烤到熟了为止。

[0484] 常规食谱的比萨面团和面包条按常规具有外皮,不易嚼碎。与常规食谱的比萨面团相比,含 5%藻碎粉浆料的比萨面团具有更像饼干一样的质感,并且更松脆。含 10%藻碎粉浆料的比萨面团比含 5%藻碎粉浆料的比萨面团更松脆。在用藻碎粉浆料制成的面包条

中,与常规食谱的面包条相比,有5%藻的面包条具有湿性的耐嚼芯。含10%藻碎粉浆料的面包条比5%藻的面包条还要湿。两个含藻碎粉的面包条的烘烤时间都加长。同样,含藻碎粉浆料的面包条中存在的藻调味剂很少,不干扰整体的味道。总的来说,与常规食谱的面包条相比,藻碎粉浆料提高了比萨面团的松脆性,并得到更像饼干一样的质感,并且增加了面包条的湿性。在另外的应用中,在玉米粉圆饼食谱中使用高脂质藻碎粉浆料(40%固体)并与由常规食谱制成的玉米粉圆饼比较,类似于比萨面团的结果,含藻碎粉浆料的玉米粉圆饼在质感上比常规食谱的玉米粉圆饼更像饼干,且更容易发嘎吱嘎吱声。

[0485] 软烘烤巧克力片甜点

[0486] 使用常规的软烘烤巧克力片甜点食谱、脂肪减少的软烘烤巧克力片甜点食谱和用高脂质藻碎粉浆料(采用与前面蛋黄酱配方中所述相同的方法生产的)制成的巧克力片甜点测试藻碎粉在甜点应用中起作用的能力。在常规甜点食谱和脂肪减少的甜点食谱两者中,藻碎粉浆料也都替换了所有的黄油和蛋类。

[0487] 表 31. 常规软烘烤巧克力片甜点的食谱

[0488]	组分		重量(g)	百分比	%脂肪
	面粉, 通用	2杯	284.00	24.88	0.00
	小苏打	½ 茶匙	2.50	0.22	0.00
	烤粉	¼ 茶匙	1.23	0.11	0.00
	盐	½ 茶匙	3.35	0.29	0.00
	淡红糖	1杯	239.00	20.94	0.00
[0489]	不加盐的黄油, 软化的	1 ½棒	170.25	14.92	11.93
	玉米糖浆	¼杯	82.00	7.18	0.00
	蛋, 全	2	100.00	8.76	0.66
	香草提取物	1 茶匙	4.00	0.35	0.00
	半甜巧克力片	1 ½杯	255.00	22.34	6.37
			1141.33	100.00%	18.96%

[0490] 表 32. 脂肪减少的软烘烤巧克力片甜点的食谱

	组分		重量(g)	百分比	%脂肪
	面粉, 通用	2 ½杯	355.00	33.58	0.00
	小苏打	½ 茶匙	2.50	0.24	0.00
	烤粉	¼ 茶匙	1.23	0.12	0.00
	盐	½ 茶匙	3.35	0.32	0.00
	淡红糖	1杯	239.00	22.61	0.00
[0491]	不加盐的黄油, 软化的	½棒	40.00	3.78	3.03
	玉米糖浆	¼杯	82.00	7.76	0.00
	蛋, 全	1	50.00	4.73	0.35
	蛋, 白	1	25.00	2.37	0.00
	香草提取物	1 茶匙	4.00	0.38	0.00
	半甜巧克力片	1 ½杯	255.00	24.12	6.88
			1057.08	100.00 %	10.26 %

[0492] 表 33. 具有藻碎粉浆料的软烘烤巧克力片甜点的食谱

	组分		重量(g)	百分比	%脂肪
[0493]	面粉, 通用	2 ½杯	355.00	31.08	0.00
	小苏打	½ 茶匙	2.50	0.22	0.00
	烤粉	¼ 茶匙	1.23	0.11	0.00
	盐	½ 茶匙	3.35	0.29	0.00
	淡红糖	1杯	239.00	20.93	0.00
[0494]	藻碎粉浆料		200.00	17.51	3.71
	玉米糖浆	¼杯	82.00	7.18	0.00
	香草提取物	1 茶匙	4.00	0.35	0.00
	半甜巧克力片	1 ½杯	255.00	22.33	6.36
			1142.08	100.00 %	10.08 %

[0495] 在每种情况下, 程序为:

[0496] 1. 预热烘箱到 350° F。在碗中合并面粉、小苏打、烤粉和盐。搁置。

[0497] 2. 用糖和玉米糖浆把黄油 / 藻碎粉浆料打成乳脂状直到平稳为止。打入蛋 (如果有的话) 和香草。

[0498] 3. 逐步加入干成分并混合, 直到刚好形成面团。拌入巧克力片。

[0499] 4. 取几汤匙面团; 使之落在甜点烤板上或卷成球放在甜点烤板上。

[0500] 5. 烘烤 16-18 分钟或烘烤到金黄色,在整个烘烤中途转动甜点烤板。

[0501] 常规食谱甜点在烘烤期间摊开良好,并且从烘箱中出来时松软。在脂肪减少的甜点中,第一批面团摊不开,以后的批次也这样,面团在烘烤之前被压平。脂肪减少的甜点从烘箱中出来时是软的,经冷却形成致密的甜点。脂肪减少的甜点还具有前期玉米糖浆的明显滋味。藻碎粉甜点在烘烤期间具有类似于常规食谱甜点的摊开性,并且质感好于脂肪减少的甜点。环境温度下经三天后,藻碎粉甜点比常规食谱甜点和脂肪减少的甜点都更湿。总的来说,藻类生物质浆料可有效替换甜点应用中的黄油和蛋类。在功能上,藻类生物质浆料延长了甜点的保质期,这在于在环境温度下经三天后,甜点保持了更多的水分。

[0502] 不含面筋的燕麦粉葡萄干甜点的保质期研究

[0503] 上面的巧克力片甜点实验中产生保质期的延长,故使用高脂质藻碎粉(按干重计大约 53%的脂质)制成不含面筋的燕麦粉葡萄干甜点,高脂质藻碎粉采用实例 13 中所述的方法生产。烘烤甜点,然后在环境温度下保持七天。烘烤并冷却后立即对甜点进行感官测试和水活度测试。另外的感官测试和水活度测试在第 1、3 和 7 天进行。在每次测试当天,把一块甜点切成小块,使葡萄干和燕麦均匀分布在样品中。每一甜点在水活度检测中至少要两个样品,用以确保测量的准确性。根据厂家的方案使用 Aqua Lab,3TE 型号系列(Decagon Devices, Inc)仪器测试水活度(A_w)。简单地说,水活度测量的是水蒸气压,后者定量产品中可得到的非化学结合水; A_w 值越高,产品就越湿。在此甜点应用中,较高的 A_w 值与较长的保质期关联。 A_w 达 0.65 的水平是所需的目标。

[0504] 表 34. 用藻碎粉浆料制成的不含面筋的燕麦粉葡萄干甜点的食谱

	组分	重量(g)	1000.00g	百分比
	不含面筋的面粉	225.00	174.69	17.47
	糙米面粉	25.00	19.41	1.94
	小苏打	4.00	3.11	0.31
	烤粉	2.00	1.55	0.16
	盐	3.50	2.72	0.27
	肉桂粉	1.30	1.01	0.10
	豆蔻粉	1.20	0.93	0.09
[0505]	黄原胶	2.50	1.94	0.19
	水, 过滤的	215.00	166.93	16.69
	藻碎粉	110.00	85.40	8.54
	淡红糖	270.00	209.63	20.96
	糖, 粒状	45.00	34.94	3.49
	香草提取物	8.50	6.60	0.66
	葡萄干	125.00	97.05	9.70
	燕麦片	250.00	194.10	19.41
[0506]		600.75	1000.00	100.00%

[0507] 程序是：

[0508] 1. 预热烘箱到 375° F。

[0509] 2. 把除了燕麦和藻碎粉以外的干成分共混在一起。在 1/4 水中使燕麦水化。在 3/4 水中使藻碎粉水化, 并使用手持混合器进行充分共混。使燕麦和藻碎粉水化 10 分钟。

[0510] 3. 向干成分中加入水化的藻碎粉, 充分混合。加入香草并充分混合, 直到共混并平稳为止。

[0511] 4. 加燕麦和葡萄干并混合到刚好均匀。

[0512] 5. 在甜点烤板上对甜点分份, 每个轻轻下压。

[0513] 6. 在烘箱中烘烤甜点 20 分钟, 整个烘烤中途转动甜点烤板。

[0514] 感官和水活度测试结果归纳于下表 5。用于感官测试的样品评价采用 10 分制: 1-2 = 不能接受; 3-4 = 差; 5-6 = 尚可; 7-8 = 好; 9-10 = 优。总的来说, 当在环境温度下保持七天时, 用藻碎粉制备的甜点保持了良好的水分含量, 味道和质感变质很少。

[0515] 表 35. 在环境温度下燕麦粉葡萄干甜点的感官评分和水活度结果。

[0516]

	感官评分	感官注释	Aw	其它
初始	8	内湿，质感松脆，燕麦粉葡萄干滋味良好，藻类生物质的特色很少。甜点结构生长出光亮的表面颜色。	0.7 76	Aw高于所需的目标值0.65。
第1天	7.5	湿，软，外部不松脆，略微耐嚼，不如初始结实，奶油香味略少，但滋味仍然很好，藻类生	0.7 17	Aw保持高于目标值0.65。

[0517]

		物质特色很少。		
第3天	7	非常湿且耐嚼；仍具有典型的燕麦粉葡萄干滋味，藻类生物质特色很少。不松脆。	0.7 35	Aw保持高于目标值0.65。
第7天	7.5	略微更干，没有“新鲜出炉松脆”感；甜点内部略微更干；更耐嚼，糖果燕麦粉滋味，水分在整个产品当中平均；产品还是很不错的。	0.7 19	Aw保持高于目标值0.65。

[0518] 炒蛋（来自蛋粉）

[0519] 在重构蛋粉应用中测试藻碎粉保水和改善质感的能力。使用常规食谱制备蛋粉，用不同含量（5%、10%和 20%）的高脂质藻碎粉替换相应百分比（w/w）的蛋粉。下面配方中使用的藻碎粉采用实例 13 中所述的方法制备，并含有按干重计大约 53%的脂质。

[0520] 表 36. 来自蛋粉的炒蛋的常规食谱

	组分	重量(g)	200.00g	百分比	%脂肪
[0521]	蛋粉，全	25.00	49.83	24.91	9.77
	盐	0.25	0.50	0.25	0.00
	黑胡椒，磨碎的	0.10	0.20	0.10	0.00
	水	75.00	149.48	74.74	0.00
		100.35	200.00	100.00 %	9.77 %

[0522] 表 37. 来自具有 5%藻碎粉的蛋粉的炒蛋食谱

	组分	重量(g)	200.00g	百分比	%脂肪
[0523]	蛋粉，全	23.75	47.33	23.67	9.28
	藻碎粉	1.25	2.49	1.25	0.66
	盐	0.25	0.50	0.25	0.00
	黑胡椒，磨碎的	0.10	0.20	0.10	0.00
[0524]	水	75.00	149.48	74.74	0.00
		100.35	200.00	100.00 %	9.94 %

[0525] 表 38. 来自具有 10%藻碎粉的蛋粉的炒蛋食谱

	组分	重量(g)	200.00g	百分比	%脂肪
[0526]	蛋粉，全	22.50	44.84	22.42	8.79
	藻碎粉	2.50	4.98	2.49	1.32
	盐	0.25	0.50	0.25	0.00
	黑胡椒，磨碎的	0.10	0.20	0.10	0.00
[0527]	水	75.00	149.48	74.74	0.00
		100.35	200.00	100.00 %	10.11 %

[0527] 表 39. 来自具有 20%藻碎粉的蛋粉的炒蛋食谱

	组分	重量(g)	200.00g	百分比	%脂肪
	蛋粉, 全	20.00	39.86	19.93	7.81
	藻碎粉	5.00	9.97	4.98	2.64
[0528]	盐	0.25	0.50	0.25	0.00
	黑胡椒, 磨碎的	0.10	0.20	0.10	0.00
	水	75.00	149.48	74.74	0.00
		100.35	200.00	100.00%	10.45%

[0529] 在所有情况下, 蛋的制备如下:

[0530] 1. 混合藻碎粉(如果有的话)与蛋粉。混合蛋与水。搅拌到平稳。如果需要的话, 使用手持搅拌器修整任何团块。

[0531] 2. 在预热的不沾锅中倒入蛋混合物。

[0532] 3. 煮蛋混合物到定型, 依照要求调味。

[0533] 所有制剂颜色相似, 常规食谱的蛋与含藻碎粉的蛋之间没有显著色差。常规食谱的蛋干, 过度通气, 质地松软, 并且失去滑腻的口感。用5%藻类生物质制备的蛋比常规食谱的蛋更湿, 并且质感更结实。口感比常规食谱蛋更滑腻。用10%藻碎粉制备的蛋比常规食谱蛋还要湿, 并且具有由鲜鸡蛋制备的炒蛋的质感和口感。用20%藻碎粉制备的蛋太湿, 有未熟透的松软蛋的质感。总的来说, 与常规制备的蛋粉相比, 掺杂藻碎粉改善了所制备的蛋粉的口感、质感和水分。掺杂5%和10%时, 藻碎粉在蛋中应用良好, 没有显著增加脂肪含量。掺杂20%时, 藻碎粉给予了太多的水分, 使制备的蛋粉的质感不合格。

[0534] 蛋粉保持测试

[0535] 因为藻碎粉能增加显著的水分和改善蛋粉的质感, 所以为了评价将煮好的蛋保持在蒸汽保温桌上时的性能如何, 进行如下的保持测试。把用常规食谱制成的炒蛋在置于炉顶蒸煮之前水化10-15分钟, 所述常规食谱采用蛋粉、5%藻碎粉和10%藻碎粉(都采用如上所述的方法制成)。煮好后, 把样品立即转移到蒸汽保温桌上, 在那里将它们盖30分钟, 温度在160-200°F。每10分钟制出新鲜样品与保持样品比较。样品评价采用10分制: 1-2 = 不能接受; 3-4 = 差; 5-6 = 尚可; 7-8 = 好; 9-10 = 优。测试结果归纳于下表40。

[0536] 表40. 蛋粉保持测试的感官结果

[0537]

变量	保持时间			
	初始	10 分钟	20 分钟	30 分钟
常规食谱	6: 弹性的质感且有韧性; 但像蛋	5: 稍微更干/更韧, 但仍可接受。	4: 更干、更韧; 耐嚼的质感	3: 颜色更加亮黄; 有韧性和弹性; 不可接受
5 % 藻碎粉	8: 湿, 软	7: 比初始 5 % 藻碎粉的样品稍微更	6: 比初始 5 % 藻碎粉的样品干, 但仍比常	5: 颜色不那么黄, 稍显暗淡的底色; 30 分钟后

[0538]

		韧, 但仍可接受	规食谱的初始样品湿	干且韧, 但仍比常规食谱好 (没有硬边)
10 % 藻碎粉	7: 稍微太湿/潮; 软	8: 湿, 软, 不韧	7: 稍韧, 但内部仍湿; 比初始的常规食谱样品湿, 但比初始的 10 % 藻碎粉的样品干	6. 5: 比初始样品干且比初始样品稍韧, 但 30 分钟后仍比常规样品和 5 % 藻碎粉的样品湿; 没有干边, 内部仍湿

[0539] 打蛋器®

[0540] 使用打蛋器®测试藻碎粉改善炒蛋白的质感和口感的能力。用小不沾煎锅炒 100 克打蛋器®大约 1-2 分钟, 直到蛋定型。不使用黄油或调味品。样品具有 10 % w/w 替换的高脂质藻碎粉浆料 (采用如上在蛋黄酱应用中所述的方法制备, 藻碎粉含按干重计大约 53 % 的脂质)。具有藻碎粉的打蛋器®的制备方式与对照例相同。

[0541] 对照样品具有更水样的稠度, 更像水一样在口中溶解, 质感相对很少或没有质感。含 10 % 藻碎粉浆料的样品做出的更像用鲜蛋制成的炒蛋。10 % 藻碎粉浆料的样品还具有更多的炒蛋质感, 并且具有充分的口感, 类似于用鲜蛋制成的炒蛋的口感。总的来说, 添加藻碎粉浆料非常成功地改善了炒蛋白的质感和口感, 使蛋白尝起来更像用鲜全蛋制成的炒蛋。

[0542] 全蛋液

[0543] 在保持研究中测试藻碎粉改善使用全蛋液的炒蛋的质感和水分的能力并采用感官评定。根据厂家指导制备全蛋液作为对照,并与用 10%藻碎粉浆料(2.5%的藻碎粉与 7.5%的水)制备的全蛋液比较。把对照物和 10%藻碎粉的蛋都做成炒蛋,在蒸汽保温桌上保持共 60 分钟。取每个炒蛋制品的样品并在感官评定中每 10 分钟进行测试。感官评定按 1 至 9 分制判断炒蛋制品的整体外观、水分含量、质感和口感,1 为不能接受,3 为适度不能接受,5 为尚可,7 为可接受,9 为优。

[0544] 总的来说,添加 10%藻碎粉浆料(2.5%藻碎粉固体)改善了所制蛋的质感、水分含量和口感。在蒸汽保温桌上过 60 分钟后,与对照的炒蛋相比,具有 10%藻碎粉浆料的炒蛋制品仍可接受(感官评分为 5),对照的则在不能接受到适度不能接受(感官评分为 2.7)的范围内。所有时间点的结果归纳于图 3。

[0545] 具有蛋粉的薄烤饼

[0546] 见于零售店的薄烤饼/华夫饼干含有全蛋粉成分。如上面蛋粉配方中所示,添加高脂质藻碎粉改善了所制蛋制品的质感和口感。测试高脂质藻碎粉改善用即混型薄烤饼混合料制成的薄烤饼的质感和口感的能力。

[0547] 表 41. 对照薄烤饼的食谱

[0548]	组分	重量(g)	百分比
	全蛋粉	10.1	4.6
	固体非脂肪奶	10.9	5
	通用小麦粉	65.5	29.8
	卡诺拉油	7.3	3.3
	烤粉	3.6	1.6
	盐	0.9	0.41
	糖	1.8	0.82
	水	120	54.5
	总计	220.1	

[0549] 表 42. 含高脂质藻碎粉的薄烤饼的食谱

[0550]	组分	重量(g)	百分比
	全蛋粉	5.05	2.3
	藻碎粉	5.05	2.3
	固体非脂肪奶	10.9	5
	通用小麦粉	65.5	29.8

[0551]	卡诺拉油	7.3	3.3
	烤粉	3.6	1.6
	盐	0.9	0.41
	糖	1.8	0.82
	水	120	54.5
	总计	220.1	

[0552] 在两种情况下,使用水来再水化蛋粉、藻碎粉和固体非脂肪奶。然后加入其余的成分并搅拌到面糊平稳。把面糊倒入未涂脂的热不粘锅里面薄烤饼大小的各部分中。做薄烤饼,直到顶部气泡破裂,然后翻过去,直到做熟。

[0553] 两种面糊外观相似,做两种薄烤饼都花费了大约同量的时间。含藻碎粉的薄烤饼比对照的薄烤饼在质感上更轻、更滑腻和更蓬松且弹性更小。总的来说,用藻碎粉替换 50 重量%的粉状全蛋产生出质感更好的薄烤饼,且具有更好的口感。

[0554] 藻奶 / 冷冻甜点

[0555] 藻奶的另外配方使用了高脂质藻碎粉。所述藻奶含有如下成分(按重量计): 88.4%的水、6.0%的面粉、3.0%的乳清蛋白浓缩物、1.7%的糖、0.6%的香草提取物、0.2%的盐和 0.1%的稳定剂。合并各成分并使用手持式匀化器在低压下匀质化。食用前冷冻所得到的藻奶。口感比得上全奶,且具有良好的不透明性。所用的藻碎粉含有约 50%的脂质,因此所得到的藻奶含约 3%的脂肪。当与香草味豆奶(Silk)相比时,藻奶具有类似的口感和不透明性,而没有豆奶的豆腥味。

[0556] 然后合并藻奶与另外的糖和香草提取物,并在搅拌器中混合 2-4 分钟直到均匀。把混合物放入预冷的冰淇淋制造机(Cuisinart)中 1-2 小时,直至达到所需的稠度。制备用 220 克 2%的奶和 1 个蛋黄半对半共 325 克制成的常规食谱冰淇淋作为比较。常规食谱冰淇淋具有的稠度比得上软食冰淇淋,是味道丰富、质感平滑的冰淇淋。虽然由藻奶制成的冰淇淋缺乏常规食谱冰淇淋的整体绵密感和口感,但稠度和口感比得上味道丰富的奶冻。总的来说,在冷冻甜点应用中使用藻奶是奏效的:产生的冷冻甜点藻奶是常规冰淇淋的低脂肪替代物。

[0557] 实例 15

[0558] 藻油

[0559] 从生物质中溶剂提取油

[0560] 从微藻生物质中提取藻油,所述微藻生物质的制备如实例 1-4 中所述,采用本文中公开的方法干燥生物质,采用本文中公开的方法破裂生物质,使破裂的生物质与有机溶剂(例如己烷)接触足够的时间段,使得油与己烷形成溶液。然后过滤溶液并通过旋转蒸发除去己烷以收集提取的油。从生物质中无溶剂提取油

[0561] 从微藻生物质中提取藻油,所述微藻生物质如实例 1-4 中所述制备,干燥生物质,在油菜籽压榨机中物理破裂生物质,其中藻油从生物质中析出。然后收集如此从破裂的生物质中分离出来的油。

[0562] 藻类品种中的脂质链的多样

[0563] 采用 HPLC 分析来自实例 1 中生长的株的亚型的脂质样品的脂质谱。结果示于图 1。

[0564] 实例 16

[0565] 含藻油的营养食品和食物制品

[0566] 藻油胶囊 (已经 (a) 通过溶剂提取或 (b) 通过非溶剂提取的方式从藻类中提取的胶囊包封油)

[0567] 全面保护系统 - 提供天然产生的生育三烯酚、生育酚、类胡萝卜素、 Ω -3 和甾醇的藻油。其提供基于植物的非动物性替代物替代鱼油的使用。

[0568] 表 43. 示例性营养食品组合物的成分

[0569]

藻油健心胶囊 (软胶囊)		
成分 (商品名)	描述	每颗软胶囊的量 (mg)
DHA-S 油	藻油 DHA 35 %	100
	--- DHA	35
Phycosterols™ - 健心超级食品共混物		

[0570]

	压榨藻油 (来自表 12 中所列的小球藻品种)	100
	- Ω 9 (作为油酸)	70
	- Ω 6 (作为亚油酸和亚麻酸)	17
	黄体素	0.0075
植物甾醇	植物甾醇酯	400
辅酶 Q10	辅酶 Q10	15
维生素 E, 油 USP BASF	D- α 生育酚	10
Bioperine	胡椒生物利用率增强剂	2.5
辅料: 蜂蜡、卵磷脂和纯化水		

[0571] 藻油（已经通过溶剂提取或者通过非溶剂提取的方式从藻类中提取的油）

[0572] 表 44. 示例性营养食品组合物的成分

[0573]

藻油（软胶囊）		
成分	描述	每颗软胶囊的量 (mg)
原壳小球藻 (UTEX 250) 油	压榨藻油	400
	- Ω 9（作为油酸）	280
	- Ω 6（作为亚油酸和亚麻酸）	68
乙酸维生素，油 USP BASF	乙酸 D- α 生育酚	10
辅料：蜂蜡、卵磷脂、纯化水		

[0574] 含藻油的布朗尼和香草蛋糕

[0575] 在烘烤食品应用中使用从按实例 4 中所述的发酵方法生长的原壳小球藻 (UTEX 250) 中提取的油。使用 1/3 杯油制作鸡蛋糕 (Moist Deluxe, Duncan Hines) 和布朗尼 (Chocolate Chunk, Pillsbury), 所述油是根据厂家建议的指示从原壳小球藻中提取的。鸡蛋糕和布朗尼两者的结果与采用植物油和相同的箱混合制作的鸡蛋糕和布朗尼没有什么区别。

[0576] 实例 17

[0577] 高蛋白藻类生物物质的生产

[0578] 具有高蛋白含量的微藻的异养培养

[0579] 在富氮条件下生长异氧产生的原壳小球藻 (UTEX 250), 所述条件是通过以下一种或多种物质提供的: 酵母提取物 (有机氮源)、 NH_4OH 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 补充实例 2-4 中所述的培养基。除了培养基外, 发酵条件与实例 2 中所述的条件相同。大约 3-5 天的指数增长后, 当其达到所需的培养物密度时收获高蛋白藻类生物物质。高蛋白藻类生物物质可以应用任何上述的加工方法 (实例 4 中的藻片, 实例 10 中的藻匀浆, 实例 12 中的藻粉末, 以及实例 13 中的藻碎粉)。

[0580] 微藻生物物质的近似分析

[0581] 采用实例 4 中所述的方法把高蛋白生物物质加工成藻片。对于生物物质、高脂质 (实例 4) 和高蛋白都分析水分、脂肪、纤维、灰分、粗蛋白和蛋白质消化率, 采用根据 ACOC International 的法定方法。结果归纳于下表 45。

[0582] 表 45. 具有高蛋白质含量的微藻的近似分析

[0583]

分析	ACOC 方法 #	高脂质 重量 %	高蛋白质 重量 %
水分	930.15	5 %	5 %
脂肪	954.02	50 %	15 %
灰分	942.05	2 %	4 %
粗蛋白	990.03	5 %	50 %
胃蛋白酶可消化的蛋白	971.09	ND	37.5 % (69.7 % 的粗蛋

[0584]

质			白是可消化的)
纤维 (原)	991.43	2 %	2 %

[0585] ND = 未做

[0586] 差算总碳水化合物:100%减去近似分析中的已知百分比。按重量计的高脂质生物质的总碳水化合物为大约 36%，按重量计高蛋白生物质的总碳水化合物为大约 24%。

[0587] 上面的粗纤维代表生物质样品中的纤维素和木质素（其它组分外的）的量。采用根据 AOAC International 的法定方法 (AOAC 方法 991.43)，对生物质进行可溶性纤维及不溶性纤维（合起来就是总膳食纤维）两者的测量，这两者属于生物质的碳水化合物组分。对于高脂质生物质，可溶性纤维为 19.58%，不溶性纤维为 9.86%（总膳食纤维为 29.44%）。对于高蛋白生物质，可溶性纤维为 10.31%，不溶性纤维为 4.28%（总膳食纤维为 14.59%）。

[0588] 藻类生物质中的蛋白质消化率

[0589] 采用离体消化率试验 (0.2%胃蛋白酶消化率试验，AOAC 方法 971.09)，对多批次的高蛋白及高脂质生物质（采用实例 4 中所述的方法生产）分析消化率。对于高脂质生物质，总粗蛋白质百分比范围在 5.4%至 10.3%，其中总的可消化蛋白质的百分比范围在 46.4%至 58.6%。对于高蛋白生物质，总粗蛋白质百分比范围在 40.8%至 53.3%，其中总的可消化蛋白质的百分比范围在 71.6%至 85.3%。还对己烷提取的生物粗粉 (biomeal)（藻油己烷提取后的高脂质藻类生物质）进行同样的消化率试验。测试的所有批次中，总粗蛋白百分比为大约 11-12%，其中总的可消化蛋白质百分比范围在 76.72%至 80.2%。

[0590] 当与全豆大豆粉（总粗蛋白质百分比为约 40.9%，总的可消化蛋白质为 95.35%）相比时，高蛋白藻类生物质的总的可消化蛋白质百分比略少于全豆大豆粉。对已加工使藻细胞主要都溶解的高蛋白藻类生物质进行另外的试验。这些试验的结果是，总的可消化蛋白质百分比可比得上全豆大豆粉（大约 95%的总的可消化蛋白质）。总的来说，高蛋白质生物质的总粗蛋白质百分比和总的可消化蛋白质百分比含量比得上全豆大豆粉。

[0591] 己烷提取的生物粗粉的消化率试验结果表明，生物粗粉作为动物饲料的添加剂是可行的。生物粗粉兼有剩余蛋白质和油，并且总的可消化蛋白质百分比含量为大约 80%。

[0592] 实例 18

[0593] 含高蛋白藻类生物质的食物制品

[0594] 使用高蛋白藻类生物质（藻片和藻匀浆）的食品组合物

[0595] 用上面实例 17 中所述的方法生产下面食谱中所用的高蛋白藻类生物质。用在下面食谱中的藻类生物质来自原壳小球藻 UTEX 250, 其含按重量计大约 51% 的蛋白质, 下称高蛋白藻类生物质, 指为藻片或藻匀浆。

[0596] 素食汉堡小馅饼

[0597] 本实例比较按常规食谱制成的素食汉堡小馅饼, 其中用高蛋白藻类生物质（藻片或藻匀浆 (AH)）替换素食蛋白源（质感大豆蛋白 (TSP)、小麦面筋和 / 或大豆蛋白分离物 (SPI)）。

[0598] 表 46. Conventional 素食汉堡小馅饼 recipe.

[0599]

组分	重量 (g)	%	% 纤维	% 蛋白质	% 脂肪
水	62.0	62.0	0	0	0
TSP (Arcon T U272)	11.0	11.0	2.09	7.59	0.22
TSP (Arcon T U218)	10.0	10.0	1.9	6.90	0.20
卡诺拉油	4.0	4.0	0	0	4.0
SPI	5.5	5.5	0	4.95	0.22
小麦面筋	3.0	3.0	0	2.46	0.03
天然素食汉堡调味剂	2.0	2.0	0	0	0
Sensirome 极端植物	1.0	1.0	0	0	0
甲基纤维素	1.0	1.0	0.09	0	0
盐	0.5	0.5	0	0	0
总计	100 克	100	4.08	21.90	4.67

[0600] 表 47. 用高蛋白藻片替换大豆蛋白分离物 (SPI)、甲基纤维素和小麦面筋制成的素食汉堡小馅饼食谱

[0601]

组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水	54.28	58.82	0	0	0
TSP (Arcon T U272)	11.0	11.92	2.26	8.22	0.24
TSP (Arcon T U218)	10.0	10.84	2.06	7.48	0.22
卡诺拉油	4.0	4.33	0	0	4.33
SPI	0	0	0	0	0
高蛋白藻片	9.5	10.29	4.12	5.18	0.51
小麦面筋	0	0	0	0	0
天然素食汉堡调味剂	2.0	2.17	0	0	0
Sensirome 极端植物	1.0	1.08	0	0	0
甲基纤维素	0	0	0	0	0
盐	0.5	0.54	0	0	0
总计	92.28	100	8.44	20.88	5.30

[0602] 表 48. 用高蛋白藻片替换质感大豆蛋白浓缩物 (TSP) 和大豆蛋白分离物制成的素食汉堡小馅饼食谱

[0603]

组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水	57.5	49.57	0	0	0
TSP (Arcon T U272)	0	0	0	0	0
TSP (Arcon T U218)	0	0	0	0	0
卡诺拉油	4.0	3.45	0	0	3.45
大豆蛋白分离物	0	0	0	0	0
高蛋白藻片	47.0	40.52	16.21	20.38	2.03
小麦面筋	3.0	2.59	0	2.12	0.03
天然素食汉堡调味剂	2.0	1.72	0	0	0
Sensirome 极端植物	1.0	0.86	0	0	0
甲基纤维素	1.0	0.86	0.08	0	0
盐	0.50	0.43	0	0	0
总计	116.0	100	16.29	22.50	5.50

[0604]

[0605] 表 49. 用高蛋白藻匀浆 (AH) 替换大豆蛋白分离物 (SPI)、甲基纤维素和小麦面筋

制成的素食汉堡小馅饼食谱。

[0606]

组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水	62.0	62.0	0	0	0
TSP (Arcon T U272)	11.0	11.0	2.09	7.59	0.22
TSP (Arcon T U218)	10.0	10.0	1.90	6.90	0.20
卡诺拉油	4.0	4.0	0	0	4.0
SPI	0	0	0	0	0
高蛋白质 AH	9.5	9.5	3.80	4.78	0.48
小麦面筋	0	0	0	0	0
天然素食汉堡调味剂	2.0	2.0	0	0	0
Sensirome 极端植物	1.0	1.	0	0	0
甲基纤维素	0	0	0	0	0
盐	0.5	0.5	0	0	0
总计	100	100	7.79	19.27	4.90

[0607] 表 50. 用高蛋白藻匀浆替换质感大豆蛋白质浓缩物 (TSP) 和大豆蛋白分离物制成的素食汉堡小馅饼食谱

[0608]

组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水	52.570	47.33	0	0	0
TSP (Arcon T U272)	0	0	0	0	0
TSP (Arcon T U218)	0	0	0	0	0
卡诺拉油	4.0	3.60	0	0	3.60
大豆蛋白分离物	0	0	0	0	0
高蛋白质 AH	47.0	42.32	16.93	21.28	2.12
小麦面筋	3.0	2.7	0	2.12	0.03
天然素食汉堡调味剂	2.0	1.8	0	0	0

	Sensirome 极端植物	1.0	0.90	0	0	0
[0609]	甲基纤维素	1.0	0.90	0.08	0	0
	盐	0.50	0.43	0	0	0
	总计	111.07	100	17.01	23.50	5.74

[0610] 在每种情况下,烹饪程序为:

[0611] 1. 将两种质感大豆蛋白(如适用)称在一起。

[0612] 2. 在立式混合碗中加第一部分水(TSP 重量的 2.5-3 倍,混合 10 分钟)。

[0613] 3. 称取大豆蛋白浓缩物、甲基纤维素、小麦面筋和藻类生物质并干混在一起。

[0614] 4. 加干成分至立式混合器中。加剩余的水并混合 5-10 分钟。

[0615] 5. 称取盐和调味剂。称取油。添加至混合器中并混合 5 分钟。

[0616] 6. 使用模子形成小馅饼(每个小馅饼 65-75g),盖上并冷冻。

[0617] 在藻类生物质(藻片和藻匀浆)替换 TSP 的样品中,小馅饼粘得很,作的时候相对来说是没有结构的。添加其它的粘结料(如燕麦、燕麦麸和糙米面粉)生产的小馅饼在做的时候质感结实。由藻片替换大豆蛋白分离物的食谱生产的小馅饼比对照物软,更粘稠,质感更差。含有替换大豆蛋白分离物的藻匀浆的小馅饼比得上对照物的结实程度和质感。总的来说,用藻匀浆替换大豆蛋白分离物制成的素食汉堡小馅饼是测试和生产的小馅饼食谱中最成功的,比得上素食对照的小馅饼,但具有几乎两倍多的膳食纤维。

[0618] 蛋白质棒

[0619] 以下实例比较常规的蛋白质棒,其中用高蛋白藻类生物质(藻片或藻匀浆(AH))替换常规的蛋白源(大豆蛋白分离物(SPI)和奶蛋白浓缩物(MPC))。

[0620] 表 51. 常规的蛋白质棒食谱

	组分	重量(g)	%	% 纤维	% 蛋白质	% 脂肪
[0621]	玉米糖浆 63/43	53.0	53.7	0	0	0
	糙米面粉	8.3	8.41	3.15	0	0
	大豆蛋白分离物	9.35	9.47	0	8.24	0
	奶蛋白浓缩物	9.35	9.47	0	7.67	0.14
	可可粉, 碱化的	8.0	8.11	2.59	1.824	0.89
	非脂肪奶粉	7.0	7.09	0	2.483	0
[0622]	巧克力调味剂	0.5	0.51	0	0	0
	香草调味剂	0.4	0.41	0	0	0
	甘油(99.5% USP)	2.3	2.33	0	0	0
	维生素共混物	0.49	0.5	0	0	0
	总计	98.69	100	5.75	20.22	1.03

[0623] 表 52. 用高蛋白藻片替换 SPI 和 MPC 制成的蛋白质棒的食谱

	组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
	玉米糖浆 63/43	49.7	52.21	0	0	0
	高蛋白藻片	34.0	35.72	14.29	17.97	1.79
	可可粉, 碱化的	8.0	8.40	2.69	1.89	0.92
[0624]	巧克力调味剂	0.47	0.49	0	0	0
	香草调味剂	0.375	0.39	0	0	0
	甘油 (99.5 % USP)	2.16	2.27	0	0	0
	维生素共混物	0.49	0.51	0	0	0
	总计	95.20	100	16.98	19.86	2.71

[0625] 表 53. 用高蛋白藻匀浆 (AH) 替换 SPI 和 MPC 制成的蛋白质棒的食谱

[0626]

	组分	重量(g)	%	%纤维	%蛋白质	%脂肪
	玉米糖浆 63/43	48.0	51.4	0	0	0
	高蛋白质 AH	34.0	36.41	14.56	18.31	1.82
	可可粉, 碱化的	8.0	8.57	2.741	1.928	0.942
	巧克力调味剂	0.47	0.48	0	0	0
	香草调味剂	0.36	0.39	0	0	0
	甘油 (99.5 % USP)	2.080	2.23	0	0	0
	维生素共混物	0.49	0.52	0	0	0
[0627]	总计	93.38	100	17.31	20.24	2.76

[0628] 在每种情况下, 烹饪程序为:

[0629] 1. 共混所有糖浆成分。

[0630] 2. 在炉顶上加热到 190° F 并在盖盖子的情况下露出孔 10 分钟, 偶而搅拌。

[0631] 3. 不使加热 10 分钟。冷却到约 140° F。

[0632] 4. 与干成分合并。

[0633] 5. 分成多份切片, 搁置过夜。

[0634] 6. 切成棒, 根据需要涂上复合包衣并包装。

[0635] 合在一起所需的玉米糖浆量最少。与常规的蛋白质棒相比, 用高蛋白藻匀浆制成的蛋白质棒是结果更好的组合物: 对于类似量的蛋白质和脂肪来说, 其含有约三倍多的膳食纤维。

[0636] 巧克力营养饮料 (粗粉代替物)

[0637] 以下实例比较常规的巧克力风味营养饮料, 其中用高蛋白藻片或高蛋白藻匀浆 (AH) 制成的巧克力营养饮料替换常规的蛋白源 (大豆蛋白分离物 (SPI) 和奶蛋白浓缩物

(MPC))。

[0638] 表 54. 常规巧克力营养饮料的食谱

[0639]

组分	重量 (g)	%	糖	% 纤维	% 蛋白质	% 脂肪
水 (过滤的)	908.0	72.99	0	0	0	0
糖 (粒状)	95.0	7.637	7.64	0	0	0
玉米糖浆	70.0	5.627	1.24	0	0	0
麦芽糖糊精	60.0	4.823	0	0	0	0
奶蛋白分离物	44.0	3.53	0	0	2.86	0
卡诺拉油	29.0	2.33	0	0	0	2.33
可可粉	15.0	1.206	0	0.39	0.27	0.13
大豆蛋白分离物	11.5	0.924	0	0	0.8	0.04
磷酸二钠	2.0	0.161	0	0	0	0
[0640]						
卵磷脂	1.7	0.137	0	0	0	0
稳定剂共混物	2.0	0.161	0	0	0	0
调味剂, 香草	2.0	0.161	0	0	0	0
调味剂, 巧克力	2.0	0.161	0	0	0	0
维生素共混物	1.8	0.145	0	0	0	0
总计	1244	100	8.88	0.39	3.93	2.5

[0641] 表 55. 用藻片替换 SPI、麦芽糖糊精和奶蛋白分离物制成的巧克力营养饮料的食谱

[0642]

组分	重量(g)	%	糖	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水 (过滤的)	910.0	74.959	0	0	0	0
糖 (粒状)	92.5	7.619	7.62	0	0	0
玉米糖浆	70.0	5.766	1.27	0	0	0
高蛋白藻片	87.0	7.166	0	2.87	3.6	0
卡诺拉油	28.0	2.306	0	0	0	2.31
可可粉	15.0	1.236	0	0.4	0.28	0.14
磷酸二钠	2.0	0.165	0	0	0	0
卵磷脂	1.7	0.14	0	0	0	0
稳定剂共混物	2.0	0.165	0	0	0	0
调味剂, 香草	2.0	0.165	0	0	0	0
调味剂, 巧克力	2.0	0.165	0	0	0	0
维生素共混物	1.8	0.148	0	0	0	0
总计	1214	100	8.89	3.27	3.88	2.45

[0643] 表 56. 用高蛋白藻匀浆 (AH) 替换 SPI、麦芽糖糊精和奶蛋白分离物制成的巧克力营养饮料的食谱

[0644]

组分	重量(g)	%	糖	%纤维	%蛋白质	%脂肪
水 (过滤的)	910.0	74.959	0	0	0	0
糖 (粒状)	92.5	7.619	7.62	0	0	0
玉米糖浆	70.0	5.766	1.27	0	0	0

[0645]

高蛋白质 AH	87.0	7.166	0	2.87	3.6	0
卡诺拉油	28.0	2.306	0	0	0	2.31
可可粉	15.0	1.236	0	0.4	0.28	0.14
磷酸二钠	2.0	0.165	0	0	0	0
卵磷脂	1.7	0.14	0	0	0	0
稳定剂共混物	2.0	0.165	0	0	0	0
调味剂, 香草	2.0	0.165	0	0	0	0
调味剂, 巧克力	2.0	0.165	0	0	0	0
维生素共混物	1.8	0.148	0	0	0	0
总计	1214	100	8.89	3.27	3.88	2.45

[0646] 与常规食谱的饮料相比, 高蛋白藻匀浆产生的营养饮料在体内更稠。高蛋白藻片产生的营养饮料比对照饮料稀。总的来说, 含有高蛋白藻匀浆的饮料在这种应用中较为成功, 产生具有高不透明性的稠营养饮料。用藻匀浆制成的营养饮料在糖、脂肪和蛋白质含量方面比得上常规饮料, 同时含有几乎十倍多的纤维。

[0647] 实例 19

[0648] 基因分型以鉴定其它适合用作食品的微藻株

[0649] 藻类的基因分型

[0650] 如下从藻类生物质中分离基因组 DNA。以 $14,000\times g$ 离心液体培养物中的细胞 (大约 200mg) 5 分钟。然后将细胞再悬浮在无菌蒸馏水中, 以 $14,000\times g$ 离心 5 分钟, 弃去上清液。将直径为 -2mm 的单个玻璃珠加入到生物质中, 将管在 -80°C 下放置至少 15 分钟。移除样品, 加入 $150\mu\text{l}$ 研磨缓冲液 (1% 肌氨酸, 0.25M 蔗糖, 50mM NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH8.0, RNA 酶 A 0.5ug/ μl)。通过短暂涡旋使丸粒再悬浮, 然后加入 $40\mu\text{l}$ 5M NaCl。将样品短暂涡旋, 然后加入 $66\mu\text{l}$ 5% CTAB (十六烷基三甲基溴化铵), 并最后一次短暂涡旋。接下来将样品在 65°C 温育 10 分钟, 之后将它们以 $14,000\times g$ 离心 10 分钟。将上清液转移至新管中, 用 $300\mu\text{l}$ 苯酚: 氯仿: 异戊醇 12: 12: 1 提取 1 次, 然后以 $14,000\times g$ 离心 5 分钟。将所得水相转移至含有 0.7 体积的异丙醇 ($-190\mu\text{l}$) 的新管中, 通过倒置混合, 在室温下温育 30 分钟或在 4°C 下温育过夜。通过以 $14,000\times g$ 离心 10 分钟而收集 DNA。然后用 70% 乙醇洗涤所得丸粒两次, 在 $50\mu\text{l}$ 10mM TrisCl, 1mM EDTA (pH 8.0) 中再悬浮。

[0651] 将如上所述制备的 $5\mu\text{l}$ 总藻 DNA 在 10mM Tris, pH8.0 中以 1: 50 稀释。如下设定 PCR 反应, 终体积为 $20\mu\text{l}$ 。将 $10\mu\text{l}$ 2 $\times$ iProof HF 主混合物 (BIO-RAD) 加入到 $0.4\mu\text{l}$ 引物 SZ02613 (10mM 储备浓度的 5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID NO:24)) 中。这一引物序列在 GenBank 登录号 L43357 中的位置是 567-588, 并且在高等植物和藻质体基因组中高度保守。然后加入 $0.4\mu\text{l}$ 引物 SZ02615 (10mM 储备浓度的 5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:25))。该引物序列与 Gen Bank 登录号 L43357 中的位置 1112-1093 互补, 并且在高等植物和藻质体基因组中高度保守。接着, 加入 $5\mu\text{l}$ 经

稀释的总 DNA 和 3.2 μ l dH₂O。如下运行 PCR 反应:98°C,45";98°C,8";53°C,12";72°C,20",进行 35 个循环,然后在 72°C 运行 1 分钟,保持在 25°C。为了纯化 PCR 产物,将 20 μ l 10mM Tris,pH 8.0 加入到每个反应物中,然后用 40 μ l 苯酚:氯仿:异戊醇 12:12:1 提取以 14,000 $\times$ g 涡旋和离心 5 分钟。对 S-400 柱 (GE Healthcare) 应用 PCR 反应,以 3,000 $\times$ g 离心 2 分钟。随后将经纯化的 PCR 产物 TOPO 克隆到 PCR8/GW/TOPO 中,选择阳性克隆用于 LB/Spec 板。使用 M13 正向和反向引物在两个方向上对经纯化的质粒 DNA 进行测序。使用图 12a-12i 中所示的 Geneious DNA 分析软件产生序列比对和无根树。来自株 1-23(实施例 13 中所指定的)的序列在所附的序列表中以 SEQ ID NOs:1-23 列出。

[0652] 对来自原壳小球藻的 8 个株的 23S rRNA 的基因组 DNA 分析

[0653] 将来自原壳小球藻的 8 个株 (UTEX 25、UTEX 249、UTEX 250、UTEX 256、UTEX 264、UTEX 411、CCAP 211/17 和 CCAP 211/8d) 的基因组 DNA 分离,根据上面实例 30 中所述的方法进行对 23S rRNA 的基因组 DNA 分析。除 UTEX25 之外,所测试的原壳小球藻的所有株的序列相同。结果归纳于图 13a-13c 的进化树中。所有 8 个株的序列在所附的序列表中以 SEQ ID NO:26 和 NO:27 列出。

[0654] 对商购的小球藻样品的基因分型分析

[0655] 采用实例 30 中所述的方法对如下 3 个商购的小球藻样品进行基因型分型:规则小球藻 (*Chlorella regularis*) (New Chapter,390mg/软胶囊), Whole Foods Broken Cell Wall *Chlorella* (全血,500mg/压制片) 和 NutriBiotic CGF *Chlorella* (NutriBiotic, 500mg/压制片)。将大约 200mg 的每种商购的小球藻样品再悬浮在无菌蒸馏水中以用于基因组 DNA 分离。

[0656] 将所得 PCR 产物分离并克隆到载体中,使用 M13 正向和反向引物测序。使用 BLAST 搜索将序列与已知序列相比较。

[0657] 23s rRNA DNA 序列的比较揭示了 3 种商购的小球藻样品中的 2 种具有匹配所存在的河口鞘丝藻 (*Lyngbya aestuarii*) 的 DNA 序列 (Whole Foods Broken Wall *Chlorella* 和 NutriBiotic CGF)。河口鞘丝藻是海洋品种蓝细菌。这些结果表明某些商购可得的小球藻含有其它污染微生物的品种,包括已知能产生毒素的属(例如鞘丝藻属)的生物体(参见例如 Teneva 等, *Environmental Toxicology*, 18(1)1, 第 9-20 页 (2003); Matthew 等, *J Nat Prod.*, 71(6): 第 1113-6 页 (2008); 和 Carmichael 等, *Appl Environ Microbiol.*, 63(8): 第 3104-3110 页 (1997)。

[0658] 实例 20

[0659] 适合用作食品的微藻生物质的颜色突变体

[0660] 产生颜色突变体的化学诱变

[0661] 根据实例 1 中所述的方法和条件生长原壳小球藻 (UTEX 250)。使用 N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍 (NTG) 对藻株进行化学诱变。对藻培养物应用诱变剂 (NTG),然后在 2.0% 葡萄糖琼脂板上通过数轮再分离进行选择。筛选颜色突变体集落。当异养生长时,原壳小球藻(野生型)显现出金色。在琼脂板上筛选产生颜色显现出白色的一株。这一颜色突变体被称为 33-55(根据布达佩斯条约于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), 专利保藏号为 PTA-10397)。还分离出另一个集落,经过三轮再分离确认这种突变是稳定的。这一突变体

颜色在琼脂板上显现为浅黄色,被称为 25-32(根据布达佩斯条约于 2009 年 10 月 13 日保藏在美国典型培养物保藏中心(10801University Boulevard,Manassas,VA 20110-2209),专利保藏号为 PTA-10396)。

[0662] 原壳小球藻 33-55 的脂质谱

[0663] 根据实例 1 中所述的方法和条件生长原壳小球藻 33-55 和亲本原壳小球藻 (UTEX 250)。确定两种株的脂质百分比(以细胞干重计):原壳小球藻 33-55 为 68%脂质,亲本株为 62%脂质。确定两种株的脂质谱,如下所示(表示为面积%):原壳小球藻 33-55, C14:0(0.81);C16:0(10.35);C16:1(0.20);C18:0(4.09);C18:1(72.16);C18:2(10.60);C18:3(0.10);及其它(1.69);亲本株, C14:0(0.77);C16:0(9.67);C16:1(0.22);C18:0(4.73);C18:1(71.45);C18:2(10.99);C18:3(0.14);及其它(2.05)。

[0664] 实例 21

[0665] 用于培养适合用作食品的微藻生物质的纤维素原料

[0666] 为了评价原壳小球藻 (UTEX 250) 是否能够利用非食品碳源,制备了用作原壳小球藻的异养培养的碳源的纤维素物质(爆裂玉米秸秆),所述原壳小球藻适合用在前面实例中所述的任何食品应用中。

[0667] 湿的爆裂玉米秸秆物质由美国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory)(Golden, CO)通过将玉米秸秆在 1.4%硫酸溶液中烧煮并使所得浆料脱水而制得。使用 Mettler Toledo 水分分析仪,确定湿玉米秸秆中的干固体为 24%。将 100g 湿样品再悬浮于去离子水中,使最终体积为 420ml,然后使用 10N NaOH 将 pH 调至 4.8。加入 Celluclast™(Novozymes)(纤维素酶)使最终浓度为 4%,将所得浆料在 50℃下摇动温育 72 小时。然后用 NaOH 将该物质的 pH 调节至 7.5(可忽略的体积变化),通过 0.22um 过滤器过滤灭菌,并贮存在 -20℃下。如下所述,保留样品以使用来自 Sigma 的基于己糖激酶的试剂盒来确定葡萄糖浓度。

[0668] 使用 Sigma 葡萄糖检测试剂 #G3293 确定葡萄糖浓度。将如上述处理的样品稀释成 400 倍,将 40 μl 加入到反应物中。玉米秸秆纤维素制品被确定含有大约 23g/L 的葡萄糖。

[0669] 在将纤维素酶处理并糖化成葡萄糖、木糖和其它单糖后,使用实例 1 所述的培养基评价上述制备的材料作为用于原壳小球藻 (UTEX 250) 生长的原料。对与纯葡萄糖混合的不同浓度的纤维素糖进行测试(0、12.5、25、50 和 100%纤维素糖)。在 28℃和摇动(300rpm)下、于暗处在不同浓度的纤维素糖上温育细胞。通过在 UV 分光光度计中于 750nm 测量吸光度来评价生长。在玉米秸秆物质上生长的原壳小球藻培养物用 Celluclast 制备,包括其中 100%可发酵糖是纤维素源性的培养基条件。还使用以 Accellerase 处理的甜菜浆作为纤维素原料进行类似实验。与用玉米秸秆物质获得的结构类似,所有原壳小球藻培养物能够利用纤维素源性糖作为糖源。

[0670] 为所有目的将于 2007 年 1 月 19 日提交的标题为“Nutraceutical Compositions from Microalgae and Related Methods of Production and Administration”的 PCT 专利申请 No. PCT/US2007/001319 全文并入。为所有目的将 2007 年 1 月 19 日提交的标题为“Microalgae-Derived Composition for Improving Health and Appearance of Skin”的 PCT 专利申请 No. PCT/US2007/001653 全文并入。为所有目的将于 2008 年 6 月 2 日提交的标

题为“Production of Oilin Microorganisms”的 PCT 专利申请 No. PCT/US2008/065563 全文并入。为所有目的将于 2008 年 4 月 8 日提交的标题为“Fractionation of Oil-Bearing Microbial Biomass”的美国临时专利申请 No. 61/043, 318 和于 2008 年 4 月 9 日提交的标题为“Direct Chemical Modification of Microbial Biomass”的美国临时专利申请 No. 61/043, 620 全文并入。

[0671] 不论先前是否明确并入, 本文所引用的所有参考文献(包括专利、专利申请和出版物)均通过引用的方式全文并入。本文中引用提到的出版物的目的是描述和公开可与本发明结合使用的试剂、方法和概念。本文决不解释为承认这些参考文献是与本文所述的发明有关的现有技术。

[0672] 尽管已经结合本发明的具体实施例对本发明进行了描述, 但是应理解能够对其进一步更变。本申请旨在涵盖大体上符合本发明原理的、包括虽然不属于本发明所公开内容范畴但属于本发明所属领域的公知技术或常用的技术手段并可以应用于上文中阐述过的必要特征中的任何变型、用途或变更。

[0001]

序列表

SEQ ID NO:1

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCCCAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:2

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAACGTGGCAAGGTTAAGGAAACGTATCC
GGAGCCGAAGCGAAAGCAAGTCTGAACAGGGCGATTAAAGTCATTTTTTCTAGACCC
GAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTGACACCAAGTGAAGG
TCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAATA
CCAGTCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGTTC
ATAAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACCA
AATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTTATGGGCCAGTGAGACGGTGGG
GGATAAGCTTCATCGTCGAGAGGGAAACAGCCCAGATCACTAGCTAAGGCCCCAAA
ATGATCGTTAAGTGACAAAGGAGGTGAGAATGCAGAAACAACCAGGAGGTTTGCTT
AGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:3

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCCCAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:4

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCCGGATGAGT

[0002]

TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:5

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC
CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA
TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:6

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC
CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA
TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:7

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC
CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA
TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:8

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC

[0003]

CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA
TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:9

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:10

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAAAATGGCATGGTTAAAGATATTTCTCT
GAAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTTACAAGCTATAGTCATTTTTTTTAGACCCGAAAC
CGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTGGTCAAATAACATGGAGGCCCGA
ACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAAT
CGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAACA
CAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTTGTGGGCTTCGAAAGTTGTACCTCAAAG
TGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAGC
TCCTTGGTCAAAAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGTTAAGGCCCAAAATGAAAAT
GATAGTGACTAAGGACGTGAGTATGTCAAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCA
GCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:11

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAAC
TCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTA
TAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGG
ATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGG
CGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTC
CCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGT
TTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAA
TGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGGAAACAG
CCCAGACCACAGTTAAGGCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAA
TGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAA
TAGCTCACTG

[0004]

SEQ ID NO:12

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAAC
TCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTAAA
TAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGG
ATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGG
CGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTC
CCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGT
TTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAA
TGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGAAACAG
CCCAGACCACCAGTTAAGGCCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAA
TGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAA
TAGCTCACTG

SEQ ID NO:13

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:14

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:15

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAACGTGGCAAGGTTAAGGACATGTATCC
GGAGCCGAAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCCTAAGTCATTTTTTCTAGACCC
GAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTGACACCAAGTGAAGG
TCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAATA
CCAGTCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGTTG

[0005]

ATAAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACCA
AATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTTATGAGCCAGTGAGACGGTGGG
GGATAAGCTTCATCGTCGAGAGGGAAACAGCCCAGATCACTAGCTAAGGCCCTAA
ATGATCGTTAAGTGACAAAGGAGGTGAGAATGCAGAAACAACCAGGAGGTTTGCTT
AGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:16

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTATAGGAAGTGGCAGGGTTAAGGAAGAATCTCC
GGAGCCCAAGCGAAAGCGAGTCTGAAAAGGGCGATTTGGTCACTTCTTATGGACCC
GAACCTGGATGATCTAATCATGGCCAAGTTGAAGCATGGGTAACTATGTCTGAGG
ACTGAACCCACCGATGTTGAAAAATCGGGGGATGAGCTGTGATTAGCGGTGAAATT
CCAATCGAATTCAGAGCTAGCTGGATCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGCG
ACGATGTCCTGTCTAAGGGTAGAGCGACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGT
CCAAGTCGTGGCAAACCTCCGAATATTAGGCAAAGGATTCCGTGAGCCAGTGAGACT
GTGGGGGATAAGCTTCATAGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCATCAGCTAAGGCC
CCTAAATGGCTGCTAAGTGGAAAAGGATGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTT
CGCTTAGAAGCAGCTATTCCTTGAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:17

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC
CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA
TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:18

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTATAGGGGGTGGCGTGGTTAAGGAAGTAATCCG
AAGCCAAAGCGAAAGCAAGTTTTCAATAGAGCGATTTTGTACCCCTTATGGACCCG
AACCCGGGTGATCTAACCTTGACCAGGATGAAGCTTGGGTAAACACCAAGTGAAGGT
CCGAATCATCGATCTTGAAAAATCGTGGGATGAGTTGGGGTTAGTTGGTTAAATGC
TAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGTGTTGAGGCGCAGCGATTAA
CGAAATATTTTGTACGGTTTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGC
GGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAAGCCTGTATACCGTTAGTCAGTGAGA
GTATAGGGGATAAGCTCTATACTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGG
CCCCAAAATGACAGCTAAGTGGCAAAGGAGGTGAAAGTGCAGAAACAACCAGGAG
GTTTCGCTTAGAAGCAGCAACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:19

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAGAAGTGGCTTGGTTAAGGATAACTATCC
GGAGCCAGAGCGAAAGCAAGTCTGAATAGGGCGCTTAAAGGTCACCTTTTCTAGAC
CCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTGGGTAAACACCACGTGAA
GGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAA

[0006]

TACCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGT
TTATGAGGCTGTCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACC
AAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGATATGCTATTTCATGAGCCAGTGAGACGGTG
GGGGATAAGCTTCATCGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCA
AAATGGTCGTTAAGTGGCAAAGGAGGTGAGAATGCTGAAACAACCAGGAGGTTTGC
TTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:20

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAAATTCCG
AAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTTAATATTTACAATT
TAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAACTT
GGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGT
TGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATG
CGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCG
GGCTGTGAAAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGT
AGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGACCA
CCAGCTAAGGCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAACAC
AACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACT
G

SEQ ID NO:21

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTATAGGGGGTGGCTTGGTTAAGGACTACAATCC
GAAGCCCAAGCGAAAGCAAGTTTGAAGTGTACACACATTGTGTGTCTAGAGCGATT
TTGTCACTCCTTATGGACCCGAACCCGGGTGATCTATTTCATGGCCAGGATGAAGCTT
GGGTAAACACCAAGTGAAGGTCCGAACCTCATCGATGTTGAAAAATCGTGGGATGAGT
TGTGAATAGGGGTGAAATGCCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAAT
GTGTTGAGGCGCAGCGATTACGATCTAAAGTACGGTTTAGGGGTAAAGCACTGTTT
CGGTGCGGGCTGTAAACGCGGTACCAAATCGTGGCAAACCTAAGAATACTAACTTG
TATGCCGTGAATCAGTGAGACTAAGAGGGGATAAGCTTCTTAGTCAAGAGGGGAAACA
GCCAGATCACCAGCTAAGGCCCAAAATGACAGCTAAGTGGCAAAGGAGGTGAG
AGTGCAGAAACAACCAGGAGGTTTGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGT
AATAGCTCACTG

SEQ ID NO:22

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTATAGGGGGTGGCTTGGTTAAGGACTACAATCC
GAAGCCCAAGCGAAAGCAAGTTTGAAGTGTACACACGTTGTGTGTCTAGAGCGATT
TTGTCACTCCTTATGGACCCGAACCCGGGTGATCTATTTCATGGCCAGGATGAAGCTT
GGGTAAACACCAAGTGAAGGTCCGAACCTCATCGATGTTGAAAAATCGTGGGATGAGT
TGTGAATAGGGGTGAAATGCCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAAT
GTGTTGAGGCGCAGCGATTACGATCTAAAGTACGGTTTAGGGGTAAAGCACTGTTT
CGGTGCGGGCTGTAAACGCGGTACCAAATCGTGGCAAACCTAAGAATACTAACTTG
TATGCCGTGAATCAGTGAGACTAAGAGGGGATAAGCTTCTTAGTCAAGAGGGGAAACA
GCCAGATCACCAGCTAAGGCCCAAAATGACAGCTAAGTGGCAAAGGAGGTGAG
AGTGCAGAAACAACCAGGAGGTTTGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGT
AATAGCTCACTG

[0007]

SEQ ID NO:23

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTATAGGGGGTGGCTTGGTTAAGGACTACAATCC
GAAGCCCAAGCGAAAGCAAGTTTGAAGTGTACACACATTGTGTGTCTAGAGCGATT
TTGTCACTCCTTATGGACCCGAACCCGGGTGATCTATTCATGGCCAGGATGAAGCTT
GGGTAACACCAAGTGAAGGTCCGAACCTCATCGATGTTGAAAAATCGTGGGATGAGT
TGTGAATAGGGGTGAAATGCCAATCGAACTCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAAT
GTGTTGAGGCGCAGCGATTACGATCTAAAGTACGGTTTAGGGGTAAAGCACTGTTT
CGGTGCGGGCTGTTAACGCGGTACCAAATCGTGGCAAACCTAAGAATACTAAACTTG
TATGCCGTGAATCAGTGAGACTAAGAGGGATAAGCTTCTTAGTCAAGAGGGGAAACA
GCCCAGATCACCAGCTAAGGCCCCAAAATGACAGCTAAGTGGCAAAGGAGGTGAG
AGTGCAGAAACAACCAGGAGGTTTGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGT
AATAGCTCACTG

SEQ ID NO:24

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC

SEQ ID NO:25

CAGTGAGCTATTACGCACTC

SEQ ID NO:26

UTEX 25

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAACGTGGCAAGGTTAAGGAAAC
GTATCCGGAGCCGAAGCGAAAGCAAGTCTGAACAGGGCGATTAAGTCATT
TTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCTTG
GGTGACACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGA
TGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACTCGGAGCTAGCTGGTT
CTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCGGTTTATAAGGCTGTCTAGGGGTAA
AAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGCGAAAGCGGTACCAAATCGTGGCAAAC
TCTGAATACTAGATATGCTATTTATGGGCCAGTGAGACGGTGGGGGATAA
GCTTCATCGTCGAGAGGGAAACAGCCCAGATCACTAGCTAAGGCCCCAAA
ATGATCGTTAAGTGACAAAGGAGGTGAGAATGCAGAAACAACCAGGAGGT
TTGCTTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO:27

UTEX 249, UTEX 250, UTEX 256, UTEX 264, UTEX 411, CCAP 211/17 和 CCAP 211/8d

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGTGGCGTGGTTAAGGAAAA
ATTCCGAAGCCTTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATCAAATATTTT
AATATTTACAATTTAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAA
CCATGACCAGGATGAAACTTGGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGAC
CGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGT
CGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAGT
ACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGCGGGCTGTGAAA
ACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGGTGTAGTA
GTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCCAGAC
CACCAGCTAAGGCCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAAT

[0008]

GCAAACACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTG
CGTAATAGCTCACTG

株 #	C-12-0	C-16-0	C-16-1	C-16-0	C-16-1	C-16-2	C-16-3	C-20-0	C-20-1
1	0.57	10.30	0.00	3.77	70.52	14.24	1.45	0.27	0
2	0.61	8.70	0.30	2.42	71.98	14.21	1.15	0.20	0.24
4	0.68	9.82	0	2.83	65.78	12.94	1.46	0	0
5	1.47	21.96	0	4.35	22.64	9.58	5.2	3.88	3.3
10	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
11	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
12	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

图 1

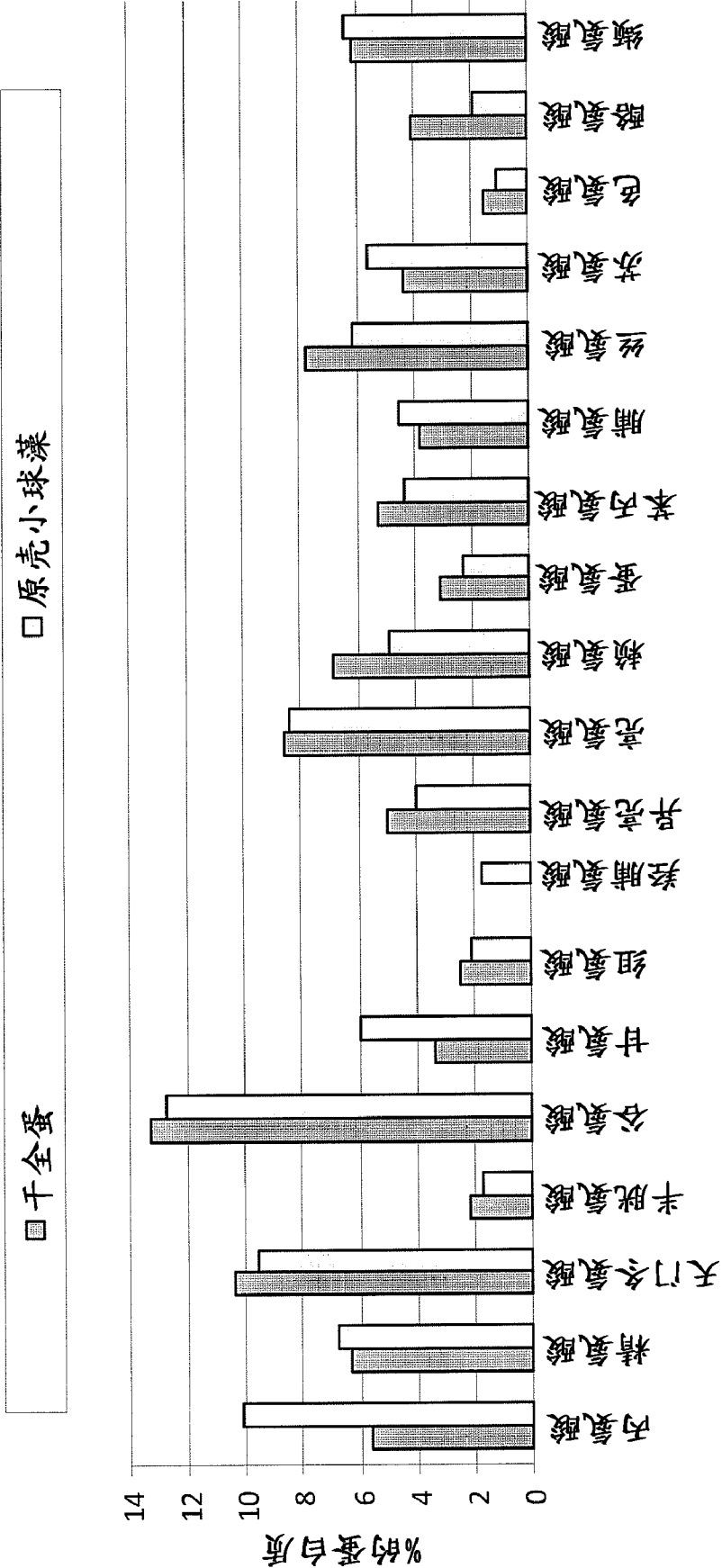


图 2

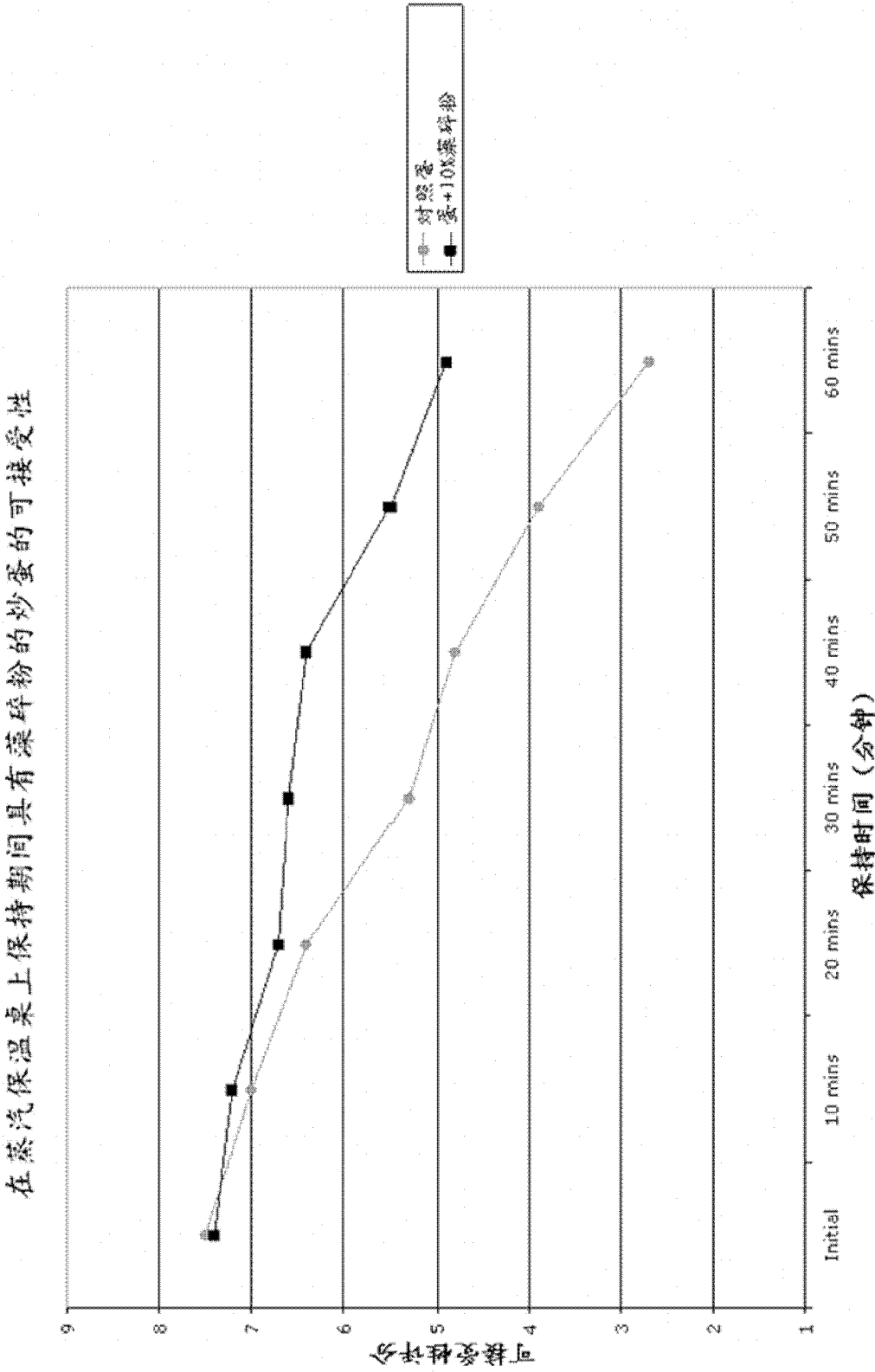


图 3