(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101802167 B
(45)授权公告日 2013.06.05

(21)申请号 200880020882.0
(22)申请日 2008.06.17
(30)优先权数据
1657/KOL/2007 2007.06.18 IN
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.12.18
(86)PCT申请的申请数据
PCT/IN2008/000394 2008.06.17
(87)PCT申请的公布数据
WO2008/155781 EN 2008.12.24
(73)专利权人 创新制造商业模块控股公司
地址 印度马哈拉施特拉邦
(72)发明人 巴布罗·康伯·纳格那斯
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 谢顺星
(51)Int.Cl.
*C12N 1/12*(2006.01)
(56)对比文件
MD 2386 B2,2004.02.29,
Usha Tripathi et al.Effect of culture conditions on growth of green alga-Haematococcus pluvialis and astaxanthin production.《ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM》.2002,第24卷(第3期),323-329.
Hanaa H abd EL-Baky et al.Spirulina species as a source of carotenoids and a tocopherol and its anticarcinoma factors.《Biotechnology》.2003,第2卷(第3期),222-240.
审查员 孙永福

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

金黄色藻类及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种培养富含类胡萝卜素的金黄色藻类的方法,其通过在培养期间改变培养基的碳氮比,并且定时向培养基中补入柠檬酸盐和醋酸盐化合物来促进类胡萝卜素的产生,并使蓝绿藻的颜色转变为金黄色。

CN 101802167 B

1. 一种培养富含类胡萝卜素的金黄色藻类 Spirulina platensis 的方法，包括以下步骤：

a. 在含 0.1-0.15g/L 碳源和 0.06-0.35g/L 氮源的培养基中培养藻 Spirulina platensis 5-7 天；

b. 完成步骤(a)后将培养基中的碳源浓度增加到 0.2-1.5g/L，其中碳源选自碳酸钠、碳酸氢钠或它们的组合，氮源浓度减少到 0.005-0.03g/L，其中氮源选自硝酸钠、硫酸铵或它们的组合；

再培养藻 Spirulina platensis 5-7 天；

c. 在步骤(b)中将高碳有机营养物定时补入培养基中，其中高碳有机营养物选自柠檬酸盐化合物、醋酸盐化合物或它们的组合；和

d. 步骤(c)后收集产生的藻 Spirulina platensis。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中柠檬酸盐化合物为 5mg/L-10mg/L 的柠檬酸铁。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中柠檬酸盐化合物为 5mg/L-10mg/L 的柠檬酸钠。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中醋酸盐化合物为 75mg/L-250mg/L 的醋酸钾。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中醋酸盐化合物为 75mg/L-250mg/L 的醋酸钠。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中培养基进一步包括磷酸氢二钾、硫酸钾、硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁、包括 Mn、Zn、Co、Cu、Mo 的盐的 A5 元素和氯化钠。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 6-36℃的温度下实施。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 1-100Klux 的光强度下实施。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 pH8.2-10.8 的条件下实施。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其中培养基的深度至少为 5cm。

11. 采用权利要求 1-10 任一项所述的方法产生的富含类胡萝卜素的金黄色藻类 Spirulina platensis，其中所述藻 Spirulina platensis 每 100gm 的干细胞物质含有至少 600mg 的混合性类胡萝卜素。

12. 如权利要求 11 所述的富含类胡萝卜素的金黄色藻类 Spirulina platensis，其中所述藻 Spirulina platensis 的每 100gm 干细胞物质中含有 600mg-1200mg 混合性类胡萝卜素。

13. 如权利要求 11 所述的富含类胡萝卜素的金黄色藻类 Spirulina platensis，其每 100gm 的干细胞物质还含有 40000-60000mg 碳水化合物。

14. 如权利要求 11 所述的富含类胡萝卜素的金黄色藻类 Spirulina platensis，其中金黄色藻类 Spirulina platensis 培养自蓝绿色藻类 Spirulina platensis。

15. 一种生产富含类胡萝卜素的藻类 Spirulina platensis 生物质的方法，包括以下步骤：

a. 在含 0.1-0.15g/L 碳源和 0.06-0.35g/L 氮源的培养基中培养藻 Spirulina platensis 5-7 天；

b. 完成步骤(a)后将培养基中的碳源浓度增加到 0.2-1.5g/L，其中碳源选自碳酸钠、碳酸氢钠或它们的组合，氮源浓度减少到 0.005-0.03g/L，其中氮源选自硝酸钠、硫酸铵或它们的组合；再培养藻 Spirulina platensis 5-7 天；

c. 在步骤(b)中将高碳有机营养物定时补入培养基中，其中高碳有机营养物选自柠檬

酸盐化合物、醋酸盐化合物或它们的组合；和

d. 步骤(c)后收集产生的藻类 Spirulina platensis 生物质。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中柠檬酸盐化合物为 5mg/L-10mg/L 的柠檬酸铁。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其中柠檬酸盐化合物为 5mg/L-10mg/L 的柠檬酸钠。

18. 如权利要求 15 所述的方法，其中醋酸盐化合物为 75mg/L-250mg/L 的醋酸钾。

19. 如权利要求 15 所述的方法，其中醋酸盐化合物为 75mg/L-250mg/L 的醋酸钠。

20. 如权利要求 15 所述的方法，其中培养基进一步包括磷酸氢二钾、硫酸钾、硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁、包括 Mn、Zn、Co、Cu、Mo 的盐的 A5 元素和氯化钠。

21. 如权利要求 15 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 6-36℃的温度下实施。

22. 如权利要求 15 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 1-100Klux 的光强度下实施。

23. 如权利要求 15 所述的方法，其中步骤(a)、(b)和(c)在 pH 8.2-10.8 的条件下实施。

24. 如权利要求 15 所述的方法，其中培养基的深度至少为 5cm。

25. 采用权利要求 15-24 任一项所述的方法生产的富含类胡萝卜素的藻类 Spirulina platensis 生物质。

26. 如权利要求 25 所述的富含类胡萝卜素的藻类 Spirulina platensis 生物质，其中所述藻类 Spirulina platensis 生物质每 100gm 干细胞物质含有 600mg-1200mg 混合性类胡萝卜素。

27. 如权利要求 26 所述的富含类胡萝卜素的藻类 Spirulina platensis 生物质，其每 100gm 的干细胞物质还含有 40000-60000mg 的碳水化合物。

28. 如权利要求 25 所述的富含类胡萝卜素的藻类 Spirulina platensis 生物质，其中富含胡萝卜素的 Spirulina platensis 培养自蓝绿色藻 Spirulina platensis。

# 金黄色藻类及其制备方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及富含类胡萝卜素的藻类和藻类生物质的制备。

## 背景技术

[0002] 藻类是简单的类似植物的活生物体。它们是单细胞或多细胞的活生物体。藻类是从自然界发现的，并被分为了不同的类别，其被发现具有多种颜色和形态。由于藻类具有较高的营养价值，加上食品来源的减少，人口不断增加以及农业用地的减少，藻类被认为是未来潜在的食品。除了包含营养成分之外，藻类，特别是微藻类还被视为具有治疗、化学预防性质和工业用途的有用添加剂、其他化合物和色素的主要来源。

[0003] 类胡萝卜素是具有下述一系列用途的这样一类色素，包括用于保健食品、化妆品、禽、畜、鱼和甲壳类的饲料添加剂、药学上的治疗及化学预防补充剂，其也在不同行业中被用作着色剂。营养食品的兴起也已加大了对混合性类胡萝卜素的需求，这主要是由于其具有业已得到证明的抗氧化和治疗特性。近期发现的这样或那样的健康益处进一步加深了类胡萝卜素的市场潜力。不远的将来，类胡萝卜素在世界范围内市场价值的增长预计会超过1000百万美元。消费者对天然产品的需求促进了从生物资源中获得类胡萝卜素，而不是通过容易导致毒性问题的合成途径获得。

[0004] 许多研究表明，天然混合的类胡萝卜素比单一的类胡萝卜素具有更好的协同效果，并能提供更好的抗氧化保护。这就使得人们更有兴趣获得天然混合的类胡萝卜素，而不是单一的类胡萝卜素部分。天然混合的类胡萝卜素可以从包括植物原料或微藻类的生物资源中获得。但是，植物中类胡萝卜素合成的生产率和百分比都相对较低，因此由 植物来生产类胡萝卜素更加昂贵。一些微藻，包括蓝绿藻，被发现含有类胡萝卜素，且人们越来越有兴趣去开发它们来生产天然混合的类胡萝卜素。

[0005] 螺旋藻(Spirulina)是属于分裂蓝藻菌(门)的一种基本形态的原核蓝绿微藻。螺旋藻属是光合的，呈丝状、棒状或螺旋形。其中最重要的属是极大螺旋藻(Spirulina maxima)、梭状螺旋藻(Spirulinafusiformis)、太平洋螺旋藻(Spirulina pacifica)、钝顶螺旋藻(Spirulinaplatensis)等。螺旋藻是具有多种生物活性和营养价值的天然生物活性和营养成分的重要来源。最近的研究还表明，螺旋藻的抗氧化和免疫刺激活性归因于其混合性类胡萝卜素和多糖部分。

[0006] 螺旋藻的化学组成包括每100gm中有55000-72000mg蛋白质，每100gm中有15000-25000mg碳水化合物，每100gm中有6000-8000mg脂肪(脂质)，以及每100gm中有350-650mg维生素，每100gm中有5000-7000mg矿物质，每100gm中有370mg类似天然混合的类胡萝卜素的色素，每100gm中有1000mg叶绿素a和每100gm中有14000mg藻青蛋白。据报道螺旋藻的天然混合性类胡萝卜素部分由β-胡萝卜素、玉米黄质(zeaxanthene)、海胆酮、β-隐黄质(beta-cryptoxanthene)、羟基海胆酮、以及其他类胡萝卜素组成。尽管由于其能最终应用于食品和饲料补充剂，营养产品和化妆品，因而在世界范围内对培育的螺旋藻的需求正不断增长，但是，其强烈的蓝-绿色和其他感官特性，如味道和风味都还不能

令人满意，这限制了它的主要商业应用。

[0007] 已经存在一些培养方案，提出的这些方案是为了生产传统可得的螺旋藻。

[0008] CN121883涉及蓝绿藻的生长和繁殖。其公开了一种在螺旋藻培养中调节并控制碳源和pH值的方法。将$NaHCO_3$或二氧化碳加入到培养基中以精确控制pH，从而促进蓝绿藻的生长和繁殖。

[0009] CN1254012涉及在含有$NaHCO_3$的无机化合物中培养新鲜的可食用螺旋藻，无机化合物的pH达到8-11，且水温达到25-40℃。

[0010] RO117388公开了一种钝顶螺旋藻(Spirulina platensis)的变种，其通过连续流体培养生成，培养基含有$NaHCO_3$、$NaNO_3$和其他无机营养物。

[0011] JP1037281公开了一种海洋蓝绿藻(marine blue-green algae)的培养方法，其步骤包括：以特定剂量向培养液中添加缩聚磷酸盐，离解出足够多的铁离子，和保持溶解状态以促进其生长。如上所述，加入$Na_2CO_3$，$NaHCO_3$，$NaH_2PO_4$和其他无机盐作为营养物。加入pH调节剂或缓冲液以获得期望的适于藻类生长的pH值。

[0012] AU2004322412公开了螺旋藻在pH为6.5和8.0下产生生物质的方法，其以海水基培养基计，有1.2至3.0％ w/v范围内的碳酸氢钠，0.1至0.3％ w/v范围内的含氮量，0.1至0.3％ w/v范围内的磷和0.1至0.3％ w/v范围内的钾。

[0013] 上述的专利文献仅仅披露了引入的营养物以及获得高生物质的螺旋藻的步骤。

[0014] 还有人尝试提出了一些方案来选择性增加一些营养成分，如铁，硒，锗(germanium)或其它。

[0015] CN1144844涉及用含铁甲硫氨酸制造富铁螺旋藻。

[0016] CN1092104公开了在二氧化锗和亚硒酸钠中培养螺旋藻来生产含有锗和硒的螺旋藻。

[0017] 然而，迄今为止仍然没有任何成功的尝试能培养出其中天然混合类胡萝卜素的含量被提高到非常高的螺旋藻或其他包括蓝绿藻的微藻。此外，人们也没有有花大力气专注于生产具有令人满意的可视外观和改善的感官品质的螺旋藻。

[0018] 因此，仍存在迫切的需求来培养具有更高天然混合类胡萝卜素含量、具有令人满意的可视外观和感官特性的微藻，包括螺旋藻和其他 蓝绿藻。

## 发明内容

[0019] 本发明的一个目的是提供一种培养富含类胡萝卜素和生物质的藻类的方法。

[0020] 本发明的另一个目的是提供富含类胡萝卜素和碳水化合物的藻类生物质。

[0021] 根据本发明中的一个实施方案，其提供了一种培养富含类胡萝卜素的金黄色藻类的方法，包括如下步骤：在含有低碳浓度和中氮浓度培养基中初始培养藻5至7天。随后提高碳浓度并降低氮浓度，再培养藻5至7天。在提高了碳源浓度之后，定时用高碳有机营养物补充培养基。之后收获培养物获得呈金黄色的富含类胡萝卜素的藻。

[0022] 培养使用的藻选自蓝绿藻中的任意种类。在培养过程中改变培养基中碳氮含量的比例，并定时用柠檬酸盐和醋酸盐化合物补充培养基，以提高类胡萝卜素产量并使蓝绿藻的颜色变为金黄色。

[0023] 本发明的另一个实施方案提供了一种富含类胡萝卜素的金黄色藻类，其是通过下

述步骤培养出的：在含有低碳高氮的培养基中初始培养所述藻 5 至 7 天。随后提高碳浓度并降低氮浓度，再培养藻 5 至 7 天。在提高了碳源浓度之后，定时用高碳有机营养物补充培养基。然后收获培养物，获得富含类胡萝卜素的金黄色藻类，其中所述藻类的类胡萝卜含量为每 100gm 的干细胞物质中含有至少 600mg。在本发明的另一个具体实施方案中，获得的藻在每 100gm 的干细胞物质中含有 600mg 至 1200mg。

[0024] 本发明的另一个具体实施方案提供了一种生产富含类胡萝卜素的藻类生物质的方法，包括的步骤有：在含有低碳浓度和中氮浓度的培养基中初始培养藻 5 至 7 天。随后提高碳浓度并降低氮浓度，再培养藻 5 至 7 天。在提高碳源浓度之后，定时用高碳有机营养物补充培养基。然后收获培养物，获得富含类胡萝卜素的藻类生物质。

[0025] 本发明的另一个具体实施方案提供了一种富含类胡萝卜素的藻类生物质，其是通过下述方法制得的：在含有低碳浓度和中氮浓度的培养基中初始培养藻 5 至 7 天。随后提高碳浓度并降低氮浓度，再培养藻 5 至 7 天。在提高碳源浓度之后，定时用高碳有机营养物补充培养基。然后收获培养物，获得富含类胡萝卜素的藻类生物质，其中所述生物质中的类胡萝卜素含量为每 100gm 的干细胞物质中含有至少 600mg。在本发明的另一个具体实施方案中，获得的藻类生物质在每 100gm 的干细胞物质中含有 600mg 至 1200mg。

[0026] 在本发明中，其中使用的术语“低碳中氮培养基”是指液态或半固态的营养培养基，其包括浓度为 0.1 至 0.15g/L 的碳源；以及浓度为 0.06 至 0.35g/L 的氮源和其他营养成分。

## 附图说明

[0027] 图 1 表示根据本发明的一个具体实施方案中的方法生产的金黄色藻类。

## 具体实施方式

[0028] 尽管在本文中已经描述了本发明的各种示例性的具体实施方案，但是不脱离本发明主旨和范围的各种实施方案的改良、改进及其组合以及修改和变形对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0029] 本发明的一个具体实施方案提供了一种培养富含类胡萝卜素的金黄色藻类的方法，其包括的步骤有：在含有 0.1 至 0.15g/L 的碳源和 0.06 至 0.35g/L 的氮源的培养基中培养藻类 5 至 7 天，或培养到藻长成淡黄色。这使得藻的生长达到期望水平。叶绿素和藻青蛋白的浓度降低。在低碳中氮培养基中初始培养藻之后，将培养基中的碳源浓度提高到 0.2 至 1.5g/L，同时将氮源浓度降低到 0.005 至 0.03g/L。然后再让藻培养物生长 5 至 7 天。在此期间，定时用柠檬酸盐或醋酸盐化合物或其组合形式的高碳有机营养物补充培养基，以增强类胡萝卜素的产生并增加生物质。在 12 至 15 天之后，收获藻培养物，获得藻类生物质形式的富含类胡萝卜素的金黄色藻类。

[0030] 本发明中的富含类胡萝卜素的金黄色藻类可以通过培养任何藻获得，只要其可以产生类胡萝卜素即可。优选，本发明中的富含类胡萝卜素的金黄色藻类是通过培养蓝绿藻，如颤藻、螺旋藻、念珠藻、席藻、水华束丝藻 (Aphinozemanon-flos-aquae) 和鱼腥藻而获得的。在一个具体的实施方案中，使用的藻选自螺旋藻属。在另一个具体实施方案中，使用的螺旋藻是钝顶螺旋藻。

[0031] 本发明的发明人发现，通过在培养过程中改变培养基中碳氮含量的比例，并用高碳有机化合物定时补充培养基，类胡萝卜素的产量提高了 2 至 3 倍。其还使叶绿素和藻青蛋白的水平降低，并使蓝绿藻的颜色变为金黄色。

[0032] 能够在本发明中使用来生产富含类胡萝卜素的藻的蓝绿藻在自然界中是微小的，属于蓝藻门。在优选的实施方案中，本发明中使用的微小的蓝绿藻可以选自属于但不限于：螺旋藻属（节选藻属）、颤藻属、念珠藻属、席藻属、水华束丝藻和鱼腥藻属的藻类。

[0033] 在一个具体实施方案中，按照本发明生产的富含类胡萝卜素的藻是螺旋藻。根据本发明培养的螺旋藻可以选自下述的螺旋藻种：钝顶螺旋藻、极大螺旋藻、梭状螺旋藻、太平洋螺旋藻、S. indica、S. massartii、方胞螺旋藻和盐泽螺旋藻。优选本发明中培养的富含类胡萝卜素的螺旋藻是钝顶螺旋藻。

[0034] 菌种是通过下述步骤获得的：从天然环境或贮藏处或种子银行机构获得期望的蓝绿藻菌种，并在适当的基础营养培养基上在最佳培养条件下培养所述的藻，获得用于本发明中的培养方法的期望的生物质。

[0035] 在一个具体的实施方案中，菌种由螺旋藻属的钝顶螺旋藻制得。所述藻的培养是在 250mL 培养容器中，pH 范围为约 8.60-10.60 下，在连续稀释 50％浓度的传统 Zarrouk′ s 培养基中生长，其中含或不含 1.5％ 琼脂，光强度为 02-10Klux 的光照和黑暗段各 12 小时，并且每隔 2 小时搅动一次来提高光合效率并加速藻的培养生长。

[0036] 菌种转入大规模生产蓝绿色藻的常规培养基中。分别调节培养基的碳和氮的浓度为 0.1-0.15g/L 和 0.06-0.35g/L，藻在其中生产 5-7 天，直至藻开始变成黄色，其对于大规模培养藻的专业人员来说是显而易见的，培养基可以在淡水或盐水中制备。

[0037] 5-7 天后，分别调节培养基中的碳和氮的浓度为 0.2-1.5g/L 和 0.005-0.03g/L，然后再培养藻 5-7 天。在这期间，采用高碳有机营养物定时补入培养基中，有机营养物质为柠檬酸盐或醋酸盐化合物或它们的组合，以提高藻细胞中生物质和类胡萝卜素的产量。

[0038] 在一个实施方案中，采用选自柠檬酸铁或柠檬酸钠的柠檬酸盐化合物来补入培养基。在另一个实施方案中，采用选自醋酸钾或醋酸钠的醋酸盐化合物来补入培养基。本发明中采用的柠檬酸盐和醋酸盐化合物的浓度如表 1 所示：

[0039] 表 1

[0040]

| 序号 | 盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 柠檬酸铁或柠檬酸钠 | 05-10 |
| 2 | 醋酸钾或醋酸钠 | 75-250 |

[0041] 本发明对于用来生产富含类胡萝卜素的藻的培养体系没有特殊的限制，只要培养体系可以支持藻的生长和光合效率即可。小型的培养体系包括试管，瓶子，烧瓶，大玻璃瓶，桶，盆，罐，各式生物反应器，或开放，或温室，或玻璃房子，水池的水道，生产范围从 50mL 到 1000L。大型的培养体系可以选自开放或密闭的圆筒形容器，罐，各式生物反应器，或开放，或温室，或玻璃房子，水池的水道。上述培养体系可以装备有通风、搅拌、照明和温控装置。

[0042] 培养基进一步含有营养成分，选自但不限于，磷酸氢二钾，硫酸 钾，硫酸镁，氯化钙，硫酸亚铁，如 Mn，Zn，Co，Cu，Mo 的 A5 元素，氯化钠等，本领域专业人员所熟知这些成分可能是藻类生长可能需要的。

[0043] 根据本发明一个优选的实施方案，表 2 示出了含低碳量和中氮量的培养基：

[0044] 表 2

[0045]

| 序号 | 盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 磷酸氢二钾 | 50-200 |
| 2 | 硝酸钠或 硫酸铵 | 175-350 60-120 |
| 3 | 硫酸钾 | 75-500 |
| 4 | 硫酸镁 | 200-350 |
| 5 | 氯化钙 | 20-50 |
| 6 | 硫酸亚铁 | 10-25 |
| 7 | 碳酸氢钠或 碳酸钠 | 100-150 |
| 8 | A5 元素 (Mn, Zn, Co, Cu, Mo) | 痕量 |
| 9 | 氯化钠 ( 粗 ) | 600-6000 |

[0046] 本发明的培养基可以采用淡水或海水或它们的组合来制备。

[0047] 根据本发明的一个实施方案，用于本发明的碳源选自碳酸钠或碳酸氢钠或它们的组合。

[0048] 根据本发明的另一个实施方案，用于本发明的氮源选自硝酸钠或硫酸铵。然而，其他可供蓝绿色藻生长的氮源也可用于本发明的目的。

[0049] 根据本发明的一个优选实施方案，表 3 示出了含高碳量和低氮量的培养基 :

[0050] 表 3

[0051]

| 序号 | 盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 磷酸氢二钾 | 50-200 |
| 2 | 硝酸钠或 硫酸铵 | 15-30 5-15 |
| 3 | 硫酸钾 | 75-500 |
| 4 | 硫酸镁 | 200-350 |
| 5 | 氯化钙 | 20-50 |
| 6 | 硫酸亚铁 | 10-25 |
| 7 | 碳酸氢钠或 碳酸钠 | 200-1500 |
| 8 | A5 元素 (Mn, Zn, Co, Cu, Mo) | 痕量 |
| 9 | 氯化钠 ( 粗 ) | 600-6000 |

[0052] 在整个培养过程中，藻培养的温度维持在 6-36 摄氏度的范围内。根据优选的实施方案，温度优选维持在 26-30 摄氏度的范围内。培养在约 1-100 千勒克斯的光照下进行，优选在 40-60 千勒克斯的范围内进行。培养的 pH 维持在 7.8-10.8 的范围内，优选通过通 $CO_2$ 维持在 9.2-9.6 的范围内。为了释放产生的氧气，促进最佳的营养吸收和在最佳光照下培养，在培养时人工或机械地以 5rpm 或以上搅拌，优选以 12-16rpm 搅拌。为了对藻类生物质的生长有积极的影响以获得更高产量的类胡萝卜素，保持培养体系的深度在 5cm 或以上，优选在 12-16cm。

[0053] 本方法可以以分批的方式进行，或以连续的方式进行，其是通过重复上述的培养方案，即在低碳中氮含量培养基中培养，续以添加高碳低氮含量的培养基，并且进一步定时补入柠檬酸盐和醋酸盐化合 物。

[0054] 富含类胡萝卜素的藻可以任意常规的方法收集，优选通过 100-150 目的尼龙筛或布收集。收集的富含类胡萝卜素的螺旋藻类生物质的 pH 在 9.6 到 10.8 之间。为了降低富含类胡萝卜素的藻的 pH，采用足够的水清洗生物质，优选采用酸性水来洗去附着的盐并使 pH 为中性或约为 7.0。

[0055] 根据最终用途，可以通过各种烘干湿生物质的方法将藻转化成干物质形式，如晒干、喷雾干燥、烘干、转鼓式干燥、热风干燥或冷冻干燥。

[0056] 由本发明得到的富含类胡萝卜素的藻或生物质，不论是湿物质形式还是干物质形式，都可以采用适当的不透光、气和水的包装材料优选在真空或氮气喷雾的条件下包装起来，其可以在约 4-28 摄氏度的条件下保存。

[0057] 根据本发明获得的藻每 100gm 干细胞物质含有至少 600mg 的混合性类胡萝卜素或更多。本发明的富含类胡萝卜素的藻除了增加了混合性类胡萝卜素的含量水平外，在碳水化合物含量方面也有显著的增加，每 100gm 的干细胞物质含 40000-60000mg。

[0058] 根据本发明的方法培养出的藻的混合性类胡萝卜素的含量水平是自然生长或常规培养的藻的 2-3 倍，是天然的混合性类胡萝卜素的有效来源。与自然生长或常规培养的蓝绿色藻的无吸引力的形态和感官特征相比较，藻的叶绿素和藻青蛋白的含量水平的减少改善了视觉上的形态和感官特征。因而，可以扩展其在食品和饲料添加剂，保健营养品，化妆品和其他工业产品方面的应用。尽管在本文中已经描述了本发明的各种示例性的实施方案，但是不脱离本发明主旨和范围的各种实施例的改良、改进及其组合以及修改和变形对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0059] 实施例

[0060] 实施例 1

[0061] 富含类胡萝卜素的金黄色钝顶螺旋藻：

[0062] 为了获得富含类胡萝卜素的钝顶螺旋藻，使用制备好的菌种。菌种的制备是在无菌条件下，将钝顶螺旋藻藻丝在含 0.75-1.5％琼脂、pH9.5 的 50％浓度的 Zarrouk′ s 的培养基中培养，培养时的光管理是 12:12 小时的黑暗和 2-10 千勒克斯光强的光照，培养温度是 28-32℃。这样获得的菌种进一步在 50％浓度的 Zarrouk′ s 培养基中生长，其初始 pH9-9.5，12 小时的光强 2-10Klux 的光照阶段和 12 小时的黑暗阶段，并且不断地搅拌以均匀混合培养基的营养成分，以便获得更好的光合效率和获得充分成长的菌种。

[0063] 上述的螺旋藻用做本发明的菌种。20L 的钝顶螺旋藻菌种在一个深 12-16cm 的 2×2 的水池中持续生长 5-7 天，其中含有如下所示成分的低碳中氮含量的培养基：

[0064]

| 序号 | 无机盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 磷酸二氢钾 | 50 |
| 2 | 硝酸钠 | 300 |
| 3 | 硫酸钾 | 75 |
| 4 | 硫酸镁 | 200 |
| 5 | 氯化钙 | 20 |
| 6 | 硫酸亚铁 | 10 |
| 7 | 碳酸氢钠 | 150 |
| 8 | A5 元素 (Mn、Zn、Co、Cu、Mo) | 痕量 |
| 9 | 氯化钠（粗） | 600 |

[0065] 低碳中氮培养基每隔约 2-3 天补入一次。生长允许的培养条件为温度 26-36℃，光强 10-80 千勒克斯，在照明期间每隔约 1-2 小时有 规律的搅拌。在所述 5-7 天的培养周期的最后，螺旋藻藻丝出现长的、半漂浮的可见的粘液分泌物，呈带有深黄色的暗褐绿色。

[0066] 接着增加碳和氮的浓度以使钝顶螺旋藻在含有以下成分的高炭低氮培养基中培养生长约 5-7 天：

[0067]

| 序号 | 盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 磷酸二氢钾 | 50 |
| 2 | 硝酸钠 | 15 |
| 3 | 硫酸钾 | 75 |
| 4 | 硫酸镁 | 200 |
| 5 | 氯化钙 | 20 |
| 6 | 硫酸亚铁 | 10 |
| 7 | 碳酸氢钠 | 1500 |
| 8 | A5 元素 (Mn, Zn, Co, Cu, Mo) | 痕量 |
| 9 | 氯化钠 ( 粗 ) | 600 |

[0068] 培养基的温度维持在 16-36 摄氏度。培养在 1-100Klux 光强下进行。在高碳低氮培养基中生长完成后，钝顶螺旋藻藻丝出现长的、几乎不漂浮的可见的粘液分泌物，并且为金黄色。

[0069] 上述螺旋藻培养进一步定时补入如下所示的柠檬酸盐和醋酸盐化合物 ：

[0070]

| 序号 | 盐 | mg/L |
|---|---|---|
| 1 | 柠檬酸铁 | 05 |
| 2 | 醋酸钠 | 150 |

[0071] 通入气泡形式的 5％含量水平的 $CO_2$ 气体来调节培养的 pH。温度维持在 16-36℃。光强为 10-80Klux。藻培养需要经常搅拌。螺旋藻藻丝出现长的，几乎不漂浮的粘液分泌物。藻培养物为深金黄色。

[0072] 获得的富含类胡萝卜素的金黄色螺旋藻的生物质约为 0.75g/L。螺旋藻每 100gm 干细胞物质含有 880mg 的天然混合性类胡萝卜素。

[0073] 富含类胡萝卜素的金黄色螺旋藻除增加了混合性类胡萝卜素的含量水平外，在碳水化合物含量方面也表现出显著的增加，每 100gm 干细胞物质含 43600mg。

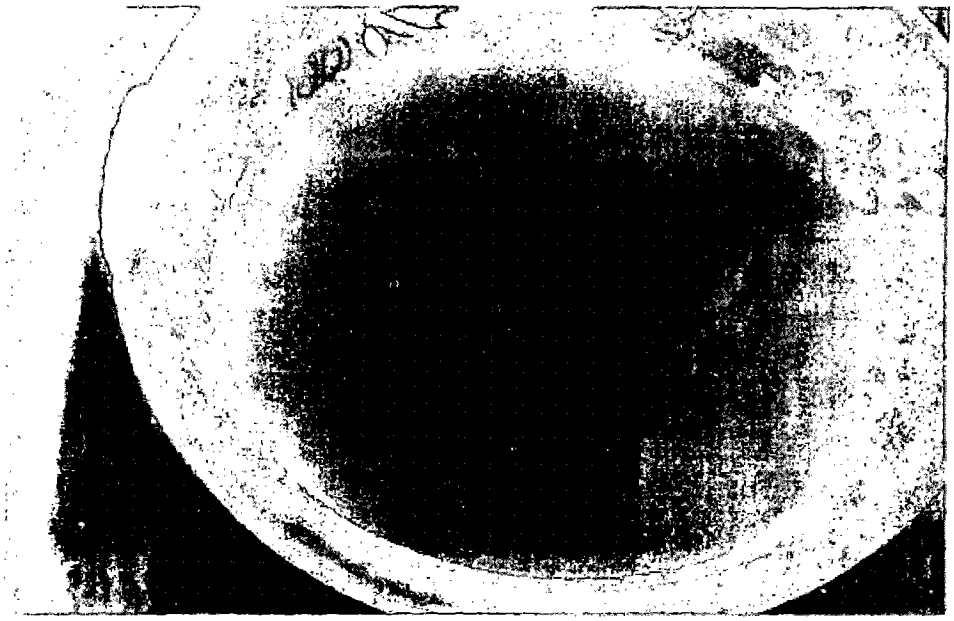

图 1