

1、一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，包括下列步骤：

A、配制培养基：

硝酸钾	0.4—0.7 g/L
磷酸氢二钾	0.08—0.12 g/L
硫酸镁	0.08—0.12 g/L
硫酸钙	0.04—0.06 g/L
三氯化铁	$2.38-2.50 \times 10^{-4}$ g/L
乙二胺四乙酸二钠	$1.85-3.7 \times 10^{-4}$ g/L
氯化锌	$3.7-5.0 \times 10^{-6}$ g/L
硼酸	$5.5-8.0 \times 10^{-5}$ g/L
氯化钴	$4.8-9.6 \times 10^{-6}$ g/L
硫酸铜	$6.4-8.5 \times 10^{-6}$ g/L
氯化锰	$3.8-7.6 \times 10^{-6}$ g/L
钼酸铵	$3.0-5.0 \times 10^{-5}$ g/L
维生素 B ₁₂	$1.0-3.0 \times 10^{-6}$ g/L
生物素	$1.0-3.0 \times 10^{-6}$ g/L

B、接种：

将红球藻绿色游动细胞接种到配置好的培养基中，使细胞密度达到 5×10^4 cells/ml；

C、培养：

培养过程光照采用自然光，利用机械搅拌使培养液保持均匀的流动，温度调控在 15-28℃ 范围内，在培养的前 6 天，通过向培养液中通二氧化碳，将培养液的 pH 值调节在 7-8.5；

D、诱导虾青素的积累：

从培养的第 7 天开始，控制通入二氧化碳的频率和数量将培养液的 pH 值调节在 8.5-10.0，在这一阶段内，红球藻游动细胞逐渐转化为孢子，虾青素积累；

E、采收红球藻：

培养进行到第 12 天，培养液中 95% 的细胞转化为孢子，孢子内充满了红色的虾青素，藻液呈深红色，即可采收，将藻液静置，红球藻孢子沉淀下来，收集上清液备用，孢子在低于 100℃ 的温度下干燥；

F、培养基的重新配制：

收集的上清液首先经过活性炭处理、过滤，得到澄清的液体，再向其中加入各种营养成分制成新的培养基，以备下一次培养使用；

G、培养基的循环使用。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/12

C12P 23/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02138827. X

[43] 公开日 2003 年 1 月 22 日

[11] 公开号 CN 1392244A

[22] 申请日 2002. 7. 26 [21] 申请号 02138827. X

[71] 申请人 中国科学院武汉植物研究所

地址 430074 湖北省武汉市武昌磨山

[72] 发明人 李夜光 张宝玉

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法,包括培养基配方、一步法生产工艺、培养基的循环使用和用二氧化碳调节培养液 pH 值诱导红球藻孢子的形成和虾青素积累的方法。雨生红球藻的营养细胞的生长、孢子转化和虾青素累积是在同一个光生物反应器、同一培养基中完成,通过调控培养液的 pH 值促进孢子转化和虾青素累积,培养周期为 12 - 15 天。培养基经过回收—处理—重新配制,可以循环使用至少 6 次。减少生产过程的废水排放,保护环境;本发明工艺简便,生产周期短,12 - 15 天内完成营养生长、孢子转化和虾青素积累,产量高,质量好。

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

2、根据权利要求1所述的一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，其特征是配制的培养基：

硝酸钾	0.5g/L
磷酸氢二钾	0.1 g/L
硫酸镁	0.1 g/L
硫酸钙	0.05 g/L
三氯化铁	2.43×10^{-4} g/L
乙二胺四乙酸二钠	1.88×10^{-4} g/L
氯化锌	4.1×10^{-6} g/L
硼酸	6.1×10^{-5} g/L
氯化钴	5.1×10^{-6} g/L
硫酸铜	6.6×10^{-6} g/L
氯化锰	4.1×10^{-6} g/L
钼酸铵	3.8×10^{-5} g/L
维生素 B ₁₂	2.0×10^{-6} g/L
生物素	2.5×10^{-6} g/L。

3、根据权利要求1所述的一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，其特征是培养基的重新配制：

硝酸钾	0.4g/L
磷酸氢二钾	0.08 g/L
硫酸镁	0.08g/L
硫酸钙	0.04g/L
三氯化铁	1.94×10^{-4} g/L
乙二胺四乙酸二钠	1.5×10^{-4} g/L
氯化锌	3.28×10^{-6} g/L
硼酸	4.88×10^{-5} g/L
氯化钴	4.08×10^{-6} g/L
硫酸铜	5.28×10^{-6} g/L
氯化锰	3.28×10^{-6} g/L
钼酸铵	3.04×10^{-5} g/L
维生素 B ₁₂	1.6×10^{-6} g/L
生物素	2.0×10^{-6} g/L。

4、根据权利要求1所述的一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，其特征是用活性炭处理回收的培养基，活性炭的用量为 0.2-1.0g/L，活性炭处理时间为 2-5 小时。

一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法

技术领域

本发明涉及一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，特别涉及一种用二氧化碳（CO₂）调节培养液 pH 值控制红球藻孢子的形成、虾青素积累和循环使用培养基的方法。

背景技术

虾青素（Astaxanthin）因具有优越的着色性能和极强的抗氧化性而备受国内外广大研究者的关注。目前虾青素最主要的用途是在水产养殖中用作色素，特别是在三文鱼和鳟鱼的养殖业中，其次是作为食品添加剂和保健品，在医药方面的应用也具有很大的潜力。据最新报道，2001 年三文鱼养殖产量已突破 100 万吨。另外，加拿大、智利和日本将成为太平洋三文鱼的主要生产国（Bjorndale T.1990）。目前有 95% 以上的虾青素是人工合成的，其售价约为 2000-2500 美元/公斤，每年市场消费量大约为 2 亿美元（R.Todd Lorenz et al.2000）。但人工合成的产物是类似于类胡萝卜素的成分（Mayne S.T. et al.1988; Storebakken T. et al. 1984），不能有效地被鱼类吸收利用。并且美国的食物和药品管理委员会（FDA）不允许人工合成的虾青素添加在三文鱼的饲料中（Sinnot R., 1988）。

目前虾青素的来源有 4 条途径：

(1) 化学合成 化学合成的虾青素产物主要是类似于类胡萝卜素的成分（Mayne S.T. et al.1988; Storebakken T. et al. 1984）。近年来，在鱼的饲料中使用人工合成色素受到越来越多的限制（Sinnot R., 1988）。

(2) 从甲壳类动物中提取： 甲壳类动物的甲壳中含有虾青素，但含量很低。并且这些甲壳中灰分几丁质的含量较高，限制了虾青素的提取和利用。

(3) 利用真菌生产： 真菌类如红发夫酵母菌（*Phaffia rhodozyma*）野生株系中含有 0.05% 的虾青素；某些突变株系的虾青素含量可达细胞干重的 0.218%（John A. B. et al.1997）。真菌中虾青素的含量普遍很低。利用酵母菌生产虾青素除产量低外，发酵成本高也是不利于大规模生产的原因。

(4) 利用微藻生产： 雨生红球藻（*Haematococcus pluvialis*）细胞中虾青素含量很高，一般达干重的 1.5-3.0%；根据最新报道虾青素含量可占生物量的 6-8% 左右（Tsavalos et al., 1992）。雨生红球藻细胞内天然虾青素的含量相对较高，而且与天然生长的三文鱼体内的类胡萝卜素结构完全相同（Goodwin T.W.1984; Steven D.M.1948; Fex D.L.1957; Khare A. et al 1973），因此，利用红球藻生产虾青素具有巨大的商业及经济价值。

目前国外大规模培养都采用二步法。所谓的二步法是红球藻的营养生长和虾

青素累积人为地分为两个阶段，这两个阶段分别在不同的光生物反应器中，不同的培养条件（包括培养基）下进行的，维持营养生长的条件和诱导虾青素累积的条件有很大的不同。二步法的优点是解决了红球藻细胞生长繁殖与孢子形成、积累虾青素所需条件不同的矛盾，其不足之处在于（1）工艺复杂；（2）诱导虾青素累积的措施会导致采收后的培养液不能重复使用，致使生产过程中大量排出废水，对水环境有污染作用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种培养雨生红球藻生产虾青素的方法，培养基配制合理，方法简便，生产周期短，培养基循环使用，解决了培养过程中废水排放的问题。

为了达到上述目的，本发明采用如下技术措施。

1. 配制培养基（MHM）

培养基配方如下：

硝酸钾（KNO ₃ ）	0.4—0.7 g/L
磷酸氢二钾（K ₂ HPO ₄ ）	0.08—0.12 g/L
硫酸镁（MgSO ₄ ·7H ₂ O）	0.08—0.12 g/L
硫酸钙（CaSO ₄ ·2H ₂ O）	0.04—0.06 g/L
三氯化铁（FeCl ₃ ·6H ₂ O）	2.38-2.50×10 ⁻⁴ g/L
乙二胺四乙酸二钠（EDTA·Na ₂ ）	1.85-3.7×10 ⁻⁴ g/L
氯化锌（ZnCl ₂ ）	3.7-5.0×10 ⁻⁶ g/L
硼酸（H ₃ BO ₃ ）	5.5-8.0×10 ⁻⁵ g/L
氯化钴（CoCl ₂ ·6H ₂ O）	4.8-9.6×10 ⁻⁶ g/L
硫酸铜（CuSO ₄ ·5H ₂ O）	6.4-8.5×10 ⁻⁶ g/L
氯化锰（MnCl ₂ ·4H ₂ O）	3.8-7.6×10 ⁻⁶ g/L
钼酸铵（(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O）	3.0-5.0×10 ⁻⁵ g/L
维生素 B ₁₂ （Vitamin B ₁₂ ）	1.0—3.0×10 ⁻⁶ g/L
生物素（Biotin）	1.0—3.0 ×10 ⁻⁶ g/L

2. 一步法培养

利用雨生红球藻生产虾青素，采用一步法。即雨生红球藻的营养细胞的生长、孢子转化和虾青素累积是在同一个光生物反应器、同一培养基中完成，通过调控培养液的 pH 值促进孢子转化和虾青素累积。培养周期均为 12-15 天，前 5-6 天是营养生长期，藻细胞持续进行细胞分裂，以指数形式增殖，达到最大密度。后 7-9 天为孢子转化与虾青素积累期。两个阶段自然连贯。红球藻在 12-15 天内完成营养生长、孢子转化和虾青素积累的全过程。

3. 循环使用培养基

3.1 回收培养基的处理

维生素 B ₁₂ (Vitamin B ₁₂)	2.0 × 10 ⁻⁶ g/L
生物素 (Biotin)	2.5 × 10 ⁻⁶ g/L

2. 接种:

将旺盛生长的红球藻绿色游动细胞接种到配制好的培养基中,使细胞密度达到 5 × 10⁴ cells/ml 左右;

3. 培养

培养过程光照采用自然光;利用机械搅拌使培养液保持均匀的流动;温度调控在 15-28℃ 范围内;在培养的前 6 天,通过向培养液中通二氧化碳 (CO₂),将培养液的 pH 值调节在 7-8.5 的范围内。在这一阶段内,红球藻细胞快速生长繁殖,生物量快速增长,藻液呈绿色。

4. 诱导虾青素的积累

从培养的第 7 天开始,控制通入二氧化碳 (CO₂) 的频率和数量将培养液的 pH 值调节在 8.5-10.0 的范围内。在这一阶段内,红球藻游动细胞逐渐转化为孢子,虾青素大量积累。藻液颜色由绿色变为黄绿色,进一步变为桔红色,再变为红色。

5. 采收红球藻

培养进行到第 12 天,培养液中 95% 的细胞转化为孢子,孢子内充满了红色的虾青素,藻液呈深红色,即可采收。将藻液静置,红球藻孢子很快沉淀下来,收集上清液备用,孢子在低于 100℃ 的温度下干燥。

6. 培养基的重新配制

收集的上清液加入 0.5g/L 活性炭处理 3 小时、过滤,得到澄清的液体 600 升,再向其中加入各种营养成分配制成新的培养基,以备下一次培养使用。加入的营养成份及其浓度如下

硝酸钾 (KNO ₃)	0.4g/L
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	0.08 g/L
硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.08g/L
硫酸钙 (CaSO ₄ · 2H ₂ O)	0.04g/L
三氯化铁 (FeCl ₃ · 6H ₂ O)	1.94 × 10 ⁻⁴ g/L
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA · Na ₂)	1.5 × 10 ⁻⁴ g/L
氯化锌 (ZnCl ₂)	3.28 × 10 ⁻⁶ g/L
硼酸 (H ₃ BO ₃)	4.88 × 10 ⁻⁵ g/L
氯化钴 (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	4.08 × 10 ⁻⁶ g/L
硫酸铜 (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	5.28 × 10 ⁻⁶ g/L
氯化锰 (MnCl ₂ · 4H ₂ O)	3.28 × 10 ⁻⁶ g/L
钼酸铵 ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O)	3.04 × 10 ⁻⁵ g/L
维生素 B ₁₂ (Vitamin B ₁₂)	1.6 × 10 ⁻⁶ g/L

回收上一次采收后的培养基，用活性炭处理回收的培养基，活性炭的用量为 0.2-1.0g/L，活性炭处理时间为 2-5 小时，过滤得到澄清的水液。活性炭处理和过滤的作用有 2 个：（1）吸附培养基中的有机物。（2）去除杂质，包括剩余的藻细胞、少量原生动物和菌类；

3.2 重新配制培养基

向过滤得到的澄清水液中加入培养基配方中的各种化学物质，每种用量为原配方的 80%，得到新的培养基，用于下一次培养。

4. 分阶段调控培养液的 pH 值

在培养的前期（5-6 天），将培养液的 pH 值调节在 7-8.5 的范围内，提供有利于细胞快速生长繁殖的条件，使红球藻的生物量快速增长。在培养的后期（7-9 天），将培养液的 pH 值提高到 8.5-10.0 的范围内，促进孢子的形成和虾青素积累。

本发明与现有技术相比，具有以下优点和效果：

1. 培养基重复使用，减少生产过程的废水排放，保护环境；
2. 工艺简便，整个培养过程在一个光生物反应器和一种培养基中完成；
3. 生产周期短，12-15 天内完成营养生长、孢子转化和虾青素积累的全过程。
4. 产量高，质量好，红球藻孢子产量大于 1 克（干重）/升，孢子中虾青素含量 2-3%（孢子产量和虾青素含量随不同的藻种（品系）变化）。
5. 用二氧化碳（CO₂）调节培养液 pH 值控制红球藻孢子的形成和虾青素积累，简单易行，经济高效。

具体实施方式

1. 配制培养基：

环形培养池中放入 20cm 水，体积为 600 升，向其中加入各种营养成分及其浓度如下：

硝酸钾（KNO ₃ ）	0.5g/L
磷酸氢二钾（K ₂ HPO ₄ ）	0.1 g/L
硫酸镁（MgSO ₄ ·7H ₂ O）	0.1 g/L
硫酸钙（CaSO ₄ ·2H ₂ O）	0.05 g/L
三氯化铁（FeCl ₃ ·6H ₂ O）	2.43×10 ⁻⁴ g/L
乙二胺四乙酸二钠（EDTA·Na ₂ ）	1.88 ×10 ⁻⁴ g/L
氯化锌（ZnCl ₂ ）	4.1×10 ⁻⁶ g/L
硼酸（H ₃ BO ₃ ）	6.1×10 ⁻⁵ g/L
氯化钴（CoCl ₂ ·6H ₂ O）	5.1×10 ⁻⁶ g/L
硫酸铜（CuSO ₄ ·5H ₂ O）	6.6×10 ⁻⁶ g/L
氯化锰（MnCl ₂ ·4H ₂ O）	4.1×10 ⁻⁶ g/L
钼酸铵（(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O）	3.8×10 ⁻⁵ g/L

生物素 (Biotin)

$2.0 \times 10^{-6} \text{g/L}$

7. 培养基的循环使用

配制好的培养基的使用方法与第一次的培养基相同。经过接种—培养—诱导虾青素的积累—采收—培养基回收—处理—重新配制，又成为新的培养基，如此循环，培养基至少可以循环使用 6 次。