

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 5 月 24 日 (24.05.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/065545 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 23/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/082261
- (22) 国际申请日: 2011 年 11 月 16 日 (16.11.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010545871.3 2010 年 11 月 16 日 (16.11.2010) CN
201010567920.3 2010 年 12 月 1 日 (01.12.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 **上海泽元海洋生物技术有限公司 (SHANGHAI ZEYUAN MARINE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国上海市嘉川路 245 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **李元广 (LI, Yuan-guang)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **范建华 (FAN, Jianhua)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **黄建科 (HUANG, Jianke)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **李淑兰 (LI, Shulan)** [CN/CN]; 中国上海市嘉川路 245 号, Shanghai 200237 (CN)。 **王伟良 (WANG, Weiliang)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **魏鸿刚 (WEI, Honggang)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130

号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **沈国敏 (SHEN, Guomin)** [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号 301 信箱, Shanghai 200237 (CN)。 **李际军 (LI, Jijun)** [CN/CN]; 中国上海市嘉川路 245 号, Shanghai 200237 (CN)。

(74) 代理人: **上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC)**; 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: MICROALGAE CULTURING METHOD FOR OIL AND LUTEIN RAPID ACCUMULATION

(54) 发明名称: 一种快速积累油脂和叶黄素的微藻培养方法

(57) Abstract: A microalgae culturing method, especially a method for rapidly accumulating intracellular oil and/or lutein and other intracellular material of microalgae is disclosed in present invention, which includes the steps of heterotrophic culture, dilution, photoinductive culture, collecting microalgae, and extracting oil and/or lutein, etc. Using present method can have full advantages to rapidly accumulate oil and/or lutein and other intracellular material from microalgae during photoinductive phase, and provide important technical means for solving the problems of the scarcity of raw materials in the scale preparation process of biofuels, and reducing production cost the lutein industrialization of microalgae and the coupling of microalgae energy development and high valuation of microalgae residue

(57) 摘要:

一种微藻培养方法, 尤其是快速积累微藻胞内油脂和/或叶黄素及其他胞内物质的方法, 该方法包括异养培养、稀释、光诱导培养、微藻采收以及油脂和/或叶黄素提取等步骤。采用该方法可充分发挥微藻在光诱导阶段油脂和/或叶黄素及其他胞内物质快速积累的优势, 为解决生物燃料规模化制备过程中由于原料不足、源于微藻的叶黄素产业化以及微藻能源开发和藻渣高值化利用耦合降低生产成本问题提供重要的技术手段。

WO 2012/065545 A1

说明书

一种快速积累油脂和叶黄素的微藻培养方法

技术领域

本发明属于生物能源领域和/或微藻生物技术领域，涉及一种微藻培养方法，尤其是快速积累微藻胞内生物活性物质，特别是油脂和叶黄素的方法。

背景技术

微藻能源发展前景广阔、优势独特已获国内外公认。迄今，世界各国在该领域的研发工作还停留在实验研究和中试论证的起步阶段（李元广、谭天伟、黄英明，微藻生物柴油产业化技术中的若干科学问题及其分析，中国基础科学，2009，5，64~70），但均遇到技术不成熟而导致成本高这一瓶颈，因而微藻能源在全球尚未实现规模化制备。

掌握能源微藻的高效培养模式是实现微藻能源规模化制备的基础。现有生长快的藻种一般油脂含量较低，而含油量高的藻种生长大多比较缓慢。这一矛盾是能源微藻高效培养模式开发的现实障碍。微藻培养包括自养、异养和混合营养三种模式（Yanna Liang, Nicolas Sarkany, Yi Cui. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology Letters, 2009, 31:1043~1049）。异养培养模式（Han Xu, Xiaoling Miao, Qingyu Wu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology, 2006, 126:499~507）存在“不能直接利用太阳能、不能固定 CO₂、能耗大”等问题，因而难以用于能源微藻的大规模培养。美国 1998 年的 ASP 计划工作总结报告指出：相对低成本的开放式光自养培养是最有前景的培养模式（Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program---Biodiesel from Algae. National Renewable Energy Laboratory, 1998）。但是，开放式光自养存在的“培养密度低、易被污染、水分蒸发、受环境因素影响大”等问题，也使其难以满足能源生产的规模需求。

针对开放式光自养培养存在的问题，人们试图采用封闭式光生物反应器进行微藻的光自养培养。封闭式光生物反应器包括管道式、平板式、柱式等（Ogbonna J C, Tanaka H. Industrial-size photobioreactors. Chemical technology, 1997, 27(7):43~49），虽然具有细胞密度高、生长快等优点，但由于成本高、放大技术不成熟等原因，目前尚未应用于微藻的大规模培养。

此外，近年来人们试图采用封闭式光生物反应器和开放池组合进行微藻的光自养培养：即先利用密闭式光生物反应器实现微藻的高密度培养，再利用开放池降低生产成本。

该模式基本具备“可利用太阳能、高密度、固定 CO₂、低成本、高效”的特征，但如何实现全过程的有效控制和系统工程优化，还有待深入研究。

学者公认能源微藻培养模式应具备“可利用太阳能、高密度、固定 CO₂、低成本、高效”的特征，为实现这一目标，研究者先后又探索推出了“混合营养”、“先自养，后异养”等培养模式：

(1) 混合营养模式：是指藻细胞利用光和有机物作为能源、再利用有机物和无机物作为碳源的培养方式 (Lee YK, Ding SY, Hoe CH, Low CS. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *Journal of applied phycology*, 1996, 8:163~169)。在微藻的混合营养培养过程中，微藻的光合自养和化能异养可以同时进行。该模式可以通过与富含碳、氮等有机物废水处理结合而降低生产成本，但其最大问题是大规模培养过程中容易滋生大量杂菌，难以实现微藻的高密度培养。

(2) “先自养，后异养”模式：是先利用密闭式光生物反应器自养以固定 CO₂，后进行异养培养 (Xiong W, Gao C, Yan D, et al. Double CO₂ fixation in photosynthesis - fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2010, 101:2287~2293)。该模式存在的最大问题是光诱导培养过程放大后无法做到无菌培养 (Scott SA, Davey MP, Dennis JS, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21:1-10)，由于微藻的异养培养要求藻种必须不带任何杂菌，因此该模式无法放大，不具有规模化应用价值。

叶黄素在医药和保健品、食品和饲料、化妆品及水产养殖行业等方面广泛的应用前景，使许多国内外研究机构和公司对于叶黄素的生物合成、分离提取、生理生化功能等进行研究。目前，叶黄素主要从万寿菊、金盏花等植物中提取获得，但是利用这些植物生产叶黄素存在着某些缺点。首先，叶黄素在这些植物中主要是酯化形式存在，因此从万寿菊、金盏花等植物中提取叶黄素时需要进行皂化处理，该步骤不但降低了效率和收率，同时残余的皂化剂容易污染叶黄素产品，给纯化过程增加了难度。其次，种植万寿菊、金盏花等植物需要大量的土地，这些植物的生长周期一般为 3~4 个月（相对于可快速生长的微藻而言，周期太长）。

相比较而言，利用微藻来生产叶黄素具有某些优势。首先叶黄素在微藻中主要是以游离的形式存在，因此在生产过程中不需要皂化步骤；其次，微藻的生长周期短、生产设备占地面积小，同时利用微藻生产叶黄素不受季节、气候及地域条件限制，产品质量和产量相对稳定；最后，微藻（如小球藻等）本身就是一种高价值的产品，含有大量的蛋白质、油脂、多糖等活性成分，可以分离提取这些物质，实现微藻细胞的综合利用。此外，微藻能源的产业化开发也迫切需要通过实现藻体的资源化利用。微藻提油后的非油脂组分中含有丰富的色素、蛋白质和多糖等生物活性物质，可被开发成为医药、食品及饲料添加剂等高附加值产品。通过对藻渣的高值化利用（如提取叶黄素），不仅可以实现

微藻细胞的综合利用，还能够提高微藻能源生产过程的综合经济效益和环保效益，降低微藻能源的生产成本。

至今，利用微藻产叶黄素的培养模式主要有光自养和异养两种。微藻光自养培养的缺点是微藻细胞生长速度慢、细胞密度及叶黄素产率低。目前光自养培养微藻的叶黄素最高体积产率为 Sanchez J F 等在 2L 圆柱式光生物反应器中培养 *Scenedesmus almeriensis* 所获得的 4.8mg/L/d (Sanchez J F, Fernandez-Sevilla J M, Acien F G., et al. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79:719~729)，叶黄素的最高面积产率为 Fernandez 等在 4000L 管道式反应器中培养 *Scenedesmus almeriensis* 所达到的 290mg/m²/d (Del Campo J A, Mercedes Garcia González, Guerrero M G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74:1163~1174)。

微藻异养培养的优点是微藻能够在生物反应器中进行高密度培养，细胞生长速率快，但存在细胞内叶黄素、叶绿素等色素和蛋白质含量低等缺点。异养培养能够获得高细胞密度和高细胞生长速度，从而使得叶黄素的产率相对于光自养培养有很大提高。

微藻除异养培养和光自养培养模式外，还有一种不常用的培养模式即混合营养培养。迄今，微藻培养产叶黄素的最高体积产率 (145mg/L/d) 和胞内叶黄素的最高含量 (7.6mg/g) 均是在连续光照的混合营养培养条件下获得的 (Martin, Lucia. Process for obtaining lutein from algae. EP180843A1, 2007)。但该培养模式只能在可蒸汽灭菌的封闭式光生物反应器中进行，且培养过程必须保证绝对的无菌，同时需要光源的合理配置，这在实际生产中无法实现。因此，利用混合营养模式培养微藻生产叶黄素不具有产业化价值。

由上述可见，无论是采用光自养培养模式还是异养培养模式，较低的胞内叶黄素含量和叶黄素产率，同时加上微藻大规模培养较高的成本，制约了应用微藻培养来生产叶黄素的产业化进程。因此，有必要探索新的微藻培养工艺或方法使叶黄素产率及含量大幅度提高，同时又使微藻大规模培养的成本大幅度下降，这样才能够满足利用微藻培养产叶黄素的产业化要求。

综合上述几种微藻培养模式的优缺点，本发明设计了一种“异养-稀释-光诱导串联培养”模式，该模式满足了“可利用太阳能、高密度、固定 CO₂、低成本、高效”的要求。以小球藻为例，其流程如下：首先利用生物反应器异养培养小球藻以获得高密度细胞，待培养液中有机碳源消耗完毕后，用不含有机碳源的培养基稀释藻液，经短时间内 (8~24h) 的光照诱导，使藻细胞内的油脂和/或叶黄素快速大量积累。该模式中的异养阶段是在摇瓶、机械搅拌式、气升式、鼓泡式等可异养培养的生物反应器中进行，目的是为了在短时间内获得较高密度的细胞；光诱导阶段可在任何可用于微藻光自养培养的

系统中进行，目的是通过光诱导作用提高胞内油脂和/或叶黄素的含量；异养阶段与光诱导阶段分开独立进行，异养阶段放出的藻液先用光诱导培养基进行稀释后再转入光诱导培养阶段。过程中需确保进入光诱导阶段的藻液中不含有机碳源，这样可避免光诱导阶段滋生过多的杂菌；而通过稀释作用可以确保光诱导阶段的藻细胞能获得充足的光照，实现胞内油脂和/或叶黄素含量的快速提高。该模式和上述其他模式相比，具有生产效率高、不存在因不同系统的组合而造成的异养培养过程染菌问题（光自养培养过程有杂菌并不影响生长）、所用培养系统的组合方式灵活和生产成本低等优点，可充分发挥小球藻在光诱导阶段油脂和/或叶黄素快速积累的优势，本发明为解决生物柴油规模化制备过程中的原料不足的瓶颈、源于微藻的叶黄素产业化以及微藻能源和藻渣高值化利用耦合降低生产成本等问题提供了重要的技术手段。

发明内容

本发明提供一种微藻培养方法，该方法包括微藻异养培养的步骤，和将异养培养所获得的微藻培养液稀释后进行光诱导培养的步骤。

本发明还提供一种快速积累微藻胞内油脂的方法，该方法包括微藻异养培养的步骤，将异养培养所获得的微藻培养液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及任选的藻细胞采收、油脂分离提取的步骤。

本发明还提供一种微藻油脂的生产方法，该方法包括微藻异养的步骤，将微藻的异养培养液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及藻细胞采收、油脂分离提取的步骤。该方法能够实现胞内油脂的快速积累，具有占地面积少、面积产率高、相对微藻光自养而言因细胞密度高而带来的采收成本低（光诱导时的细胞密度较高，一般为 2~5 g/L），因而大大提高了生产效率，降低了生产成本。

本发明还提供一种快速积累微藻胞内叶黄素的方法，该方法包括微藻的异养培养步骤，将所获得的微藻异养培养液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及任选的藻细胞采收、叶黄素分离提取的步骤。

本发明还提供一种源于微藻的叶黄素生产方法，该方法包括微藻异养的步骤，将微藻的异养培养液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及藻细胞采收、叶黄素分离提取的步骤。本发明的方法能够实现胞内叶黄素的快速积累，大大提高了生产效率，降低了生产成本，且提供了高品质的叶黄素。

在一个具体实施方式中，所述的微藻选自：绿藻门小球藻属中的蛋白核小球藻（*Chlorella pyrenoidosa*），普通小球藻（*Chlorella vulgaris*），椭圆小球藻（*Chlorella ellipsoidea*），*Chlorella emersonii*，*Chlorella sorokiniana*，*Chlorella saccharophila*，*Chlorella regularis*，*Chlorella minutissima*，*Chlorella protothecoides*，*Chlorella zofingiensis*，以及绿藻门中的 *Brachiomonas submarina*，*Chlamydomonas reinhardtii*，*Chlamydomonas*

acidophila, *Haematococcus phuvialis*, *Haematococcus lacustris*, *Scenedesmus obliquus*, *Spongiococcum exetriccium*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis tetrathele*, *Tetraselmis verrucosa*, *Micractinium pusillum*; 硅藻门的 *Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, *Nitzschia alba*, *Nitzschia fonticola*, *Navicula incerta*, *Navicula pelliculosa*; 蓝藻门的 *Anabaena variabilis*; 金藻门的 *Poterioochromonas malhamensis*; 甲藻门的 *Amphidinium carterae*, *Cryptothecodinium cohnii*; 裸藻门的 *Euglena gricilis*; 红藻门的 *Galdieria sulphuraria*。

在一个具体实施方式中, 所述微藻选自绿藻门小球藻属的藻类。尤其是, 所述微藻选自绿藻门小球藻属中的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*), 普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*), *Chlorella emersonii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella regularis*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella protothecoides* 和 *Chlorella zofingiensis*。

在一个具体实施方式中, 所述微藻选自蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*), 普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 和椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*)。

在一个具体实施方式中, 所述微藻异养的步骤包括: 在生物反应器中加入 pH 为 4.0~10.0 的培养基, 按工作体积的 0.1~30% 接入微藻藻种进行分批培养、补料分批培养、连续培养或半连续培养, 培养温度为 10~50℃, 控制 pH 小于 10.0, 控制溶氧在 1% 以上。

在另一具体实施方式中, 例如, 在生产叶黄素的实施例, 所述微藻异养培养的步骤可包括: 在生物反应器中加入 pH 为 4.0~10.0 (例如 4.0~9.0) 的培养基, 按工作体积的 0.1~30% 接入微藻藻种进行分批培养、补料分批培养、半连续培养或连续培养, 培养温度为 10~50℃ (例如 10~40℃), 控制 pH 小于 10.0 (例如, 小于 9.0), 控制溶氧在 1% 以上。

在一个具体实施方式中, 所述藻液稀释包括用培养基将异养获得的藻液稀释至细胞密度为 0.1~50 克/升, 所述培养基不含有机碳源, 其 pH 为 4.0~10.0。

在另一具体实施方式中, 例如, 在生产叶黄素的实施例, 所述藻液稀释可包括用培养基将异养获得的藻液稀释至细胞密度为 0.1~20 克/升, 所述培养基不含有机碳源, 其 pH 为 4.0~9.0。

在一个具体实施方式中, 所述光诱导培养包括将稀释后的藻液转入光诱导装置中进行光诱导, 连续光照或间歇光照, 培养温度为 5~50℃, 光照强度为 0.1~150klx, 光诱导培养周期为 1~150 小时。

在一个具体实施方式中, 异养培养基由氮源、有机碳源以及少量无机盐、微量元素和水组成; 光诱导培养基由氮源、无机盐和水组成。

在一个具体实施方式中, 所述异养步骤在摇瓶、机械搅拌式、气升式或鼓泡式可异养培养的生物反应器中进行, 所述光诱导培养步骤在摇瓶或选自敞开式的跑道池或圆池、

封闭式的平板式光生物反应器或管道式光生物反应器或柱式光生物反应器或薄膜立袋与吊袋光生物反应器等任何可用于微藻光自养培养的装置中进行，光照条件为自然光或人工光照射。

在一个具体实施方式中，例如，在产油脂的实施例，当小球藻为普通小球藻时，异养所使用的培养基基本上由以下成分组成： KNO_3 5~15 克/升、葡萄糖 10~60 克/升、 KH_2PO_4 0.3~0.9 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 克/升、 CaCl_2 0.05~0.3 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.05 克/升；微量元素 0.5~4ml，其中微量元素的组成为 H_3BO_3 5~15 克 / 升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0~10.0 克 / 升， $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克 / 升， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1.5 克/升， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升， $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.9 克/升；水。在一个具体实施方式中，当小球藻为蛋白核小球藻时，异养所使用的培养基基本上由以下成分组成：葡萄糖 10~60 克/升，尿素 2~8 克/升， KH_2PO_4 1~2 克/升， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~2 克/升， CaCl_2 0.05~0.1 克/升，柠檬酸三钠 0.1~2.0 克/升，Fe-EDTA 溶液 0.5~1 mL，A5 溶液 1~5mL；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20~30 克/升和 EDTA 20~40 克/升；A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.5~4.0 克/升， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.6 克/升， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5~10 克/升， Na_2MoO_4 0.01~0.05 克/升；水。

在另一具体实施方式中，例如在产叶黄素的实施例，当藻种为普通小球藻时，异养所使用的培养基基本上由以下成分组成： KNO_3 5~15 克/升、葡萄糖 10~60 克/升、 KH_2PO_4 0.3~0.9 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 克/升、 CaCl_2 0.05~0.3 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.05 克/升、微量元素 0.5~4ml 和水，其中微量元素的组成为 H_3BO_3 5~15 克/升、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0~10.0 克/升、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1.5 克/升、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升和 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.9 克/升。

在一个具体实施方式中，例如在产叶黄素的实施例，当小球藻为蛋白核小球藻时，异养所使用的培养基基本上由以下成分组成：葡萄糖 10~60 克/升、尿素 2~8 克/升、 KH_2PO_4 1~2 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~2 克/升、 CaCl_2 0.05~0.1 克/升、柠檬酸三钠 0.1~2.0 克/升、Fe-EDTA 溶液 0.5~1 mL、A5 溶液 1~5mL 和水；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20~30 克/升和 EDTA 20~40 克/升；A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.5~4.0 克/升、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.6 克/升、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5~10 克/升和 Na_2MoO_4 0.01~0.05 克/升。

在一个具体实施方式中，采用超临界 CO_2 萃取法、有机溶剂提取法或超声辅助溶剂提取法提取叶黄素。

在一个具体实施方式中，本发明的方法还包括：将提取叶黄素后的藻体与其他色素混合进行喷雾干燥制成藻粉，或对藻体中的生物活性物质进行分离提取。

在一个具体实施方式中，所述其他色素包括叶绿素。在一个具体实施方式中，所述

生物活性物质包括蛋白质、叶绿素、多糖、脂肪酸、小球藻生长因子等。

在一个具体的实施方式中，所述油脂分离提取方法采用有机溶剂提取法。

在另一具体实施例中，所述微藻培养方法还包括提取微藻油脂的步骤。

本申请还提供一种油脂生产方法，该方法包括异养培养微藻的步骤，将异养培养的微藻藻液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及藻细胞采收、油脂分离提取的步骤。

本申请的油脂生产方法中使用到的微藻、培养基以及培养条件等如本文上文以及下文具体实施方式部分所详述。

用本发明公开的异养-稀释-光诱导串联技术培养小球藻，首先在密闭式生物反应器中高密度异养培养小球藻，待培养液中有有机碳源消耗完毕后，用不含有机碳源的培养基稀释藻液，经短时间内（8~24h）的光照诱导，可使藻细胞内的油脂含量快速大量积累，油脂含量在短时间内（例如 8~24 小时）比异养阶段的藻细胞提高约一倍（异养阶段胞内油脂含量一般不超过 10%，经光诱导后可达 20~30%）。

附图简述

图 1 显示在 50L 生物反应器/3L 平板式光生物反应器串联系统中采用异养-稀释-光诱导串联培养蛋白核小球藻快速积累油脂的结果（同时测定了细胞内其他主要生化成分）。

图 2 显示 5T 发酵罐串联至户外 30L 平板和 60L 大盆连续培养普通小球藻光诱导阶段户外自然光强和自然温度的变化曲线。

图 3 显示 5T 发酵罐串联至户外 30L 平板培养普通小球藻快速积累油脂的过程曲线（同时测定了细胞内其他主要生化成分）。

图 4 显示 5T 发酵罐串联至户外 60L 大盆培养普通小球藻快速积累油脂的过程曲线（同时测定了细胞内其他主要生化成分）。

图 5 显示 5T 发酵罐串联至户外 20m² 跑道池和 3.14m² 圆池连续培养普通小球藻光诱导阶段户外自然光强和自然温度的变化曲线。

图 6 显示 5T 发酵罐串联至户外 20m² 跑道池培养普通小球藻快速积累油脂的过程曲线（同时测定了细胞内其他主要生化成分）。

图 7 显示 5T 发酵罐串联至户外 3.14m² 圆池培养普通小球藻快速积累油脂的过程曲线（同时测定了细胞内其他主要生化成分）。

图 8 显示 500mL 摇瓶/3L 圆柱式光反应器串联培养椭圆小球藻胞内主要生化成分的变化曲线。

图 9 和图 10 显示 5L 生物反应器/3L 平板式光生物反应器串联系统中采用异养-稀释-光诱导串联培养蛋白核小球藻生产叶黄素的过程。其中，图 9 显示蛋白核小球藻在 5L 生物反应器异养培养过程；图 10 显示蛋白核小球藻在 3L 平板式光生物反应器内光诱导培

养过程。

图 11 和图 12 显示 50L 生物反应器/10L 圆柱式光生物反应器串联系统中采用异养-稀释-光诱导串联培养蛋白核小球藻生产叶黄素的过程。其中，图 11 显示蛋白核小球藻在 50L 生物反应器异养培养过程；图 12 显示蛋白核小球藻在 10L 圆柱式光生物反应器内光诱导培养过程。

图 13 和图 15 显示 50L 生物反应器/30L 平板式光生物反应器串联系统中采用异养-稀释-光诱导串联培养普通小球藻生产叶黄素的过程。其中，图 13 显示普通小球藻在 50L 生物反应器中异养培养过程；图 15 显示普通小球藻在户外 30L 平板式光生物反应器内光诱导培养。

图 14 和图 16 显示 5L 生物反应器/3L 平板式生物光生物反应器串联系统中采用异养-稀释-光诱导串联培养椭圆小球藻生产叶黄素的过程。其中，图 14 显示椭圆小球藻在 5L 生物反应器异养培养过程；图 16 显示椭圆小球藻在 3L 平板式光生物反应器中光诱导过程。

具体实施方案

适用于本申请的微藻包括但不限于绿藻门小球藻属中的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*)，普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*)，椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*)，*Chlorella emersonii*，*Chlorella sorokiniana*，*Chlorella saccharophila*，*Chlorella regularis*，*Chlorella minutissima*，*Chlorella protothecoides*，*Chlorella zofingiensis*，以及绿藻门中的 *Brachiomonas submarina*，*Chlamydomonas reinhardtii*，*Chlamydomonas acidophila*，*Haematococcus pluvialis*，*Haematococcus lacustris*，*Scenedesmus obliquus*，*Sporogium exetrix*，*Tetraselmis suecica*，*Tetraselmis chuii*，*Tetraselmis tetrathele*，*Tetraselmis verrucosa*，*Micractinium pusillum*；硅藻门的 *Cylindrotheca fusiformis*，*Nitzschia laevis*，*Nitzschia alba*，*Nitzschia fonticola*，*Navicula incerta*，*Navicula pelliculosa*；蓝藻门的 *Anabaena variabilis*；金藻门的 *Potriochromonas malhamensis*；甲藻门的 *Amphidinium carterae*，*Cryptocodinium cohnii*；裸藻门的 *Euglena gracilis*；红藻门的 *Galdieria sulphuraria*。

在优选的实施方式中，本发明采用绿藻门小球藻属的藻类来生产油脂。在更优选的实施方式中，本发明采用蛋白核小球藻、普通小球藻或椭圆小球藻来生产油脂。在优选的实施方式中，本发明采用蛋白核小球藻、普通小球藻和椭圆小球藻来生产叶黄素。

1. 微藻在生物反应器中的高密度异养培养

此步骤的目的是为了快速获得大量藻细胞，以供光诱导阶段快速合成积累各种活性成分，尤其包括油脂、色素、蛋白质、多糖等。

可采用本领域熟知的各种培养基来进行微藻异养培养。通常，异养培养基含有氮源、有机碳源、少量无机盐、微量元素和水。适用于微藻培养的氮源、有机碳源、无机盐、微量元素等是本领域周知的。例如，作为氮源，可使用的有尿素或各种硝酸盐，如 KNO_3 等；作为有机碳源，可使用的有例如葡萄糖等。

这类培养基包括 HA-SK 培养基（中国专利 ZL 200610024004.9）、Endo 培养基（Ogbonna J.C., Masui. H., Tanaka.H. Sequential heterotrophic: autotrophic cultivation—an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. J. Appl. Phycol.1997, 9, 359~366）等。

本发明所用的 HA-SK 培养基是基本上由 KNO_3 、葡萄糖以及少量无机盐、微量元素和水组成。在所述技术方案中，所述微量元素宜选自 H_3BO_3 ， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 中的一种或多种或全部。

本文所用的术语“基本上由……组成”表示本发明的组合物中除了含有主要组分 KNO_3 、葡萄糖以及少量无机盐、微量元素和水外，还可包含一些对于组合物的基本特性或新的特性（即可维持微藻在较短的培养周期内细胞密度达到较高的水平，同时活性物质含量与常规异养培养相比有较大幅度提高）没有实质上影响的组分。本文所用的术语“由……组成”表示本发明的组合物由所指出的具体组分组成，没有其他组分，但是可以带有含量在通常范围内的杂质。

在该培养基中，培养基的各组分可在一定范围内变化而不会对微藻细胞密度和品质有很大的实质影响。因此，这些组分的用量不应受实施例的严格限制。如本领域技术人员所熟知的，培养基中还可加入少量无机盐，例如硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁和磷酸盐等，以及少量微量元素如 Mn、Zn、B、I、M、Cu、Co 等。

在本发明中，较佳的微量元素组分宜选自 H_3BO_3 ， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ， $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 中的一种或多种。无机盐和微量元素的用量可根据常规知识确定。

本发明所采用的 HA-SK 培养基基本上由以下成分组成： KNO_3 5~15 克/升、葡萄糖 10~60 克/升、 KH_2PO_4 0.3~0.9 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 克/升、 CaCl_2 0.05~0.3 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.05 克/升；微量元素 0.5~4ml，其中微量元素的组成为 H_3BO_3 5~15 克/升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0~10.0 克/升， $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1.5 克/升， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升， $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.9 克/升；水。

在一个较佳的实施方案中，本发明的 HA-SK 培养基组合物宜由以下成分组成： KNO_3 7 克/升、葡萄糖 40 克/升、 KH_2PO_4 0.6 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 克/升、 CaCl_2 0.2 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 克/升；微量元素 1.5mL，其中微量元素的组成为 H_3BO_3 11~12 克/升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5~9.5 克/升， $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4~1.5 克/升，

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.8~0.9 克/升, CuSO₄·5H₂O 1.5~1.6 克/升, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.45~0.55 克/升; 水 1000mL。

本发明所用的 Endo 培养基基本上由以下成分组成: 葡萄糖 10~60 克/升, 尿素 2~8 克/升, KH₂PO₄ 1~2 克/升, Na₂HPO₄·12H₂O 1.0~10.0 克/升, MgSO₄·7H₂O 1~2 克/升, CaCl₂ 0.05~0.1 克/升, 柠檬酸三钠 0.1~2.0 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.5~1 mL, A5 溶液 1~5mL; 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 FeSO₄·7H₂O 20~30 克/升和 EDTA 20~40 克/升; A5 溶液配方为 H₃BO₃ 2.5~4.0 克/升, MnCl₂·4H₂O 1.0~2.0 克/升, ZnSO₄·7H₂O 0.1~0.6 克/升, CuSO₄·5H₂O 5~10 克/升, Na₂MoO₄ 0.01~0.05 克/升; 水。

在一个较佳的实施方案中, 所述 Endo 培养基由以下成分组成: 葡萄糖 40 克/升, 尿素 6.0 克/升, KH₂PO₄ 1.5 克/升, Na₂HPO₄·12H₂O 5.0 克/升, MgSO₄·7H₂O 1.8 克/升, CaCl₂ 0.05 克/升, 柠檬酸三钠 0.4 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.8mL, A5 溶液 2.0mL, 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 FeSO₄·7H₂O 25 克/升和 EDTA 33.5 克/升, A5 溶液配方为 H₃BO₃ 2.86 克/升, MnCl₂·4H₂O 1.81 克/升, ZnSO₄·7H₂O 0.222 克/升, CuSO₄·5H₂O 0.07 克/升, Na₂MoO₄ 0.021 克/升; 水。

在根据上述配方配制培养基后, 可用常规手段如酸或碱将所述培养基的 pH 调为 4.0~9.0, 并在 115~120℃下高压灭菌 15~20 分钟。可采用分批培养、补料分批培养、半连续培养(带放)或连续培养等四种方式实施异养培养。

当进行异养培养时, 将相应配制好的培养基加入到生物反应器中, 补加水至工作体积, 通常装料系数为 0.6~0.8, 然后蒸汽灭菌(121℃, 维持约 20 分钟), 当温度降至 30~35℃时, 按工作体积的 1~15%接入微藻开始异养培养。

在异养培养一段时间后, 当培养基中葡萄糖被消耗完(通常为 27~45 小时)时需要补料, 补加碳源(如葡萄糖)、氮源(如, 培养普通小球藻的氮源为 KNO₃、培养蛋白核小球藻的氮源为尿素)和无机盐等营养盐, 补加的营养盐是经浓缩后的上述相应培养基, 促使微藻继续生长。可每隔 5~8 小时补料, 葡萄糖的补加浓度可为 15~25 克/升, 氮源溶液的补加浓度可为 2~5 克/升。当补加一定次数(一般为 4~7 次)的营养盐后, 微藻细胞密度达到最高时, 异养培养阶段结束。

无论采用何种培养方式, 在培养过程中, 须控制适合的培养条件使微藻正常生长。通常, 控制温度为 20~35℃, 例如 28~30℃, 溶氧不低于 5%的空气饱和浓度, pH 不高于 9.0。在优选的实施例, 溶氧不低于 10%的空气饱和浓度, pH 不高于 8.5。在其它优选的实施例中, 溶氧不低于 15%的空气饱和浓度, pH 不高于 8。

在培养过程中, pH 不宜过高或过低, 一般随着培养的进行, pH 会慢慢上升(对于普通小球藻此现象特别明显), pH 过高会对藻细胞生长产生不利影响, 所以应用酸(例如 10%的硫酸)进行调节, 使 pH 不高于 9.0, 较佳的 pH 应为 6.5~7.5。

通常, 当采用分批培养、补料分批培养时, 异养培养阶段结束时生物反应器中有机

碳源需完全消耗完。当采用半连续培养方式时，带放操作是在生物反应器中有机碳源完全消耗完时进行。无论采用何种异养培养方式，转入光诱导的藻液，在更佳方案中应使藻液中有机碳源例如葡萄糖含量为零或接近于零。

异养可以在摇瓶、机械搅拌式、气升式、鼓泡式等可异养培养的生物反应器中进行。

2. 高浓度藻液的稀释

此步骤的目的是为了使转入光诱导培养的小球藻高效地吸收光能，提高光能利用效率，同时降低藻细胞的死亡率。因为光强在藻液中呈“时、空、非线性”衰减，所以在高细胞密度下，反应器中藻细胞大部分处于暗区，几乎接受不到光照，这样藻细胞很容易死亡而且会影响光诱导的效率。

异养培养获得的高密度藻液应进行稀释操作，用水和不含有有机碳源的培养基对高密度的藻液进行稀释，使细胞密度维持在 0.1~10 克/升，调节 pH 至 5.0~8.0。在其它实施例中，稀释藻液，使细胞密度维持在 1~8 克/升。在优选的实施例中，使细胞密度维持在 1.0~5.0 克/升。在其它实施例中，使细胞密度维持在 2~5 克/升或者 2~4 克/升。稀释的藻液的 pH 可以调节为 5.5~7.5，例如 6.0~7.5 等。

可采用各种已知的稀释培养基来稀释藻液。通常，可使用光诱导培养基进行稀释。光诱导培养基通常含有氮源、无机盐和水，相对于异养培养基不含有有机碳源。在优选的实施方案中，所述培养基的氮源浓度为 0.1~10 克/升，例如 2~10 克/升、2~8 克/升，较佳为 0.3~6 克/升，更佳为 0.5~5 克/升。所述氮源可以与异养培养步骤中所用的氮源相同或不同。

在一个优选的具体方案中，异养培养获得的高密度藻细胞宜用氮源浓度为 0.1~10 克/升（例如 2~10 克/升）而不含有有机碳源的初始培养基（例如，培养普通小球藻时采用不含葡萄糖的 HA-SK 培养基，培养蛋白核小球藻时采用不含葡萄糖的 Endo 培养基）进行适当稀释。

稀释采用的培养基无需高压灭菌，配制好后调节 pH 至 5.0~8.0 即可使用。

在具体实施方式中，对普通小球藻，稀释培养基（光诱导培养基）由以下成分组成： KNO_3 0.1~5 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5~5.0 克/升、 CaCl_2 0.01~0.06 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.06 克/升、EDTA 0.020~0.052 克/升。

对蛋白核小球藻，稀释培养基（光诱导培养基）由以下成分组成：尿素 0.1~5.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5~5.0 克/升、 CaCl_2 0.01~0.06 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.06、EDTA 0.020~0.052 克/升、柠檬酸钠 0.02~0.5 克/升。

在其它实施方式中，对普通小球藻，稀释培养基（光诱导培养基）由以下成分组成： KNO_3 1~8 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5~1.0 克/升、 CaCl_2 0.01~0.06 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.06 克/升、EDTA 0.020~0.052 克/升；对蛋白核小球藻，稀释培养基（光诱导培养基）由以下

成分组成：尿素 0.1~2.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5~1.0 克/升、 CaCl_2 0.01~0.06 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.06、EDTA 0.020~0.052 克/升、柠檬酸钠 0.08~0.5 克/升。

3. 光诱导培养

该步骤的目的是让微藻接受光照，通过光诱导使藻细胞快速大量合成积累各种活性成分。

如上所述高密度微藻培养液经稀释后，将所得稀释液转入光诱导装置中进行光诱导培养。添加的光诱导培养基如上文所述，温度控制在 5~50℃，光照强度为 0.11~150klx，连续光照或间歇光照，光诱导培养周期为 1~150 小时，通气量为 0.1~2.0 vvm。其中所述的光生物反应器包括所有的封闭式光生物反应器（摇瓶、管道式、平板式、柱式、薄膜立袋与吊袋等）和所有的开放式光生物反应器（跑道池、圆池和鼓泡式大盆等）。

通常，培养温度可控制在 15~35℃ 的范围内，例如 18~35℃、20~35℃、20~30℃ 等。通常，光照强度为 1~70klx，例如，1~60、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10klx 等，可视具体生产情况而定。通常，通气量可控制为 0.15~2.0 vvm，例如，0.2~1.8、0.5~1.5、0.8~1.5、1.0~1.5 vvm 等。在其它实施方式中，培养温度控制在 10~50℃，光照强度为 1~10klx，通气量为 0.05~2.0 vvm。

在其它实施例中，光诱导培养周期为 8~100 小时，例如，根据实际的天气情况，光诱导培养周期可以为 8~90 小时、8~80 小时、8~60 小时、8~48 小时、8~24 小时不等；或者，光诱导培养周期可以为 12~72 小时、12~60 小时、12~48 小时、12~36 小时、12~24 小时不等或 24~60 小时、24~48 小时不等。

在本申请中，“光诱导培养周期”包括了整个光诱导培养过程，例如，户外培养时光诱导培养周期包括夜晚没有光照的时间。

在本申请中，“光照时间”指使用本申请所述光照强度对微藻实施光诱导培养的时间，即该时间不包括夜晚没有光照的时间。在一些实施例中，光诱导培养步骤的光照时间为 8~48 小时，例如 8~36 小时、8~24 小时、8~18 小时、8~12 小时、12~36 小时、12~24 小时不等，以及上述范围内的任意时长。

因此，本申请的光诱导培养步骤也包括光照时间为 8~48 小时范围内的光诱导培养步骤。可采用人工光照的方式进行光诱导培养，也可在户外利用自然光照的方式进行光诱导培养。

在光诱导过程中，当油脂含量达到最高值（不同微藻油脂含量达到的最大值不一样，可通过测定光诱导过程中胞内油脂含量曲线判断，小球藻一般为 20~30% 左右）时可结束光诱导培养，收获藻细胞进行后续的油脂的分离提取。在生产叶黄素时，当培养液中叶黄素浓度达到最高时，结束光诱导培养，收获藻细胞进行叶黄素的分离提取或直接采收藻细胞进行藻粉制备。

4. 藻细胞采收、油脂的提取及藻体综合利用

光诱导培养结束后, 对小球藻进行离心采收, 获得湿藻体。藻细胞的采收方法包括但不限于高速离心、絮凝, 气浮或过滤等技术; 藻细胞破壁方法包括但不限于藻体自溶、高压匀浆、酶水解、水相热解等湿法破壁方法。

胞内油脂的提取测定方法包括但不限于有机溶剂萃取法, 即: 将藻体于 80~105℃ 下干燥至恒重, 研磨藻粉后采用氯仿甲醇标准萃取溶剂从干藻粉中提取油脂, 萃取溶剂反复提取直至藻粉颜色变为白色, 旋转蒸发去除溶剂。

小球藻内叶黄素的提取可采用传统的有机溶剂提取法进行。首先将有机溶剂加入到藻泥中进行萃取, 然后进行搅拌离心获得上清液和藻体沉淀, 对上清液进行减压浓缩、搅拌加水、过滤获得叶黄素晶体。在一个较佳的方案中, 采用超临界 CO₂ 萃取技术对小球藻进行叶黄素的分离提取。在一个更佳的方案中, 将获得的小球藻液浓缩后直接喷雾干燥获得小球藻粉。由此获得的小球藻粉可用于开发成动物饲料、水产养殖用饵料、食品、食品添加剂、药品和营养品等。

本发明中, 可对培养所得的微藻进行综合利用, 提取其中的多不饱和脂肪酸、蛋白质、叶绿素、多糖等各种活性成分。活性成分的提取顺序并无特殊限制, 但通常要满足先提取的步骤不能导致后提取的成分损失这一前提。

上清液中的其他成分可逐步分离提取获得脂肪酸、叶绿素等, 或直接将上清液中的所有成分与藻体沉淀混合喷雾干燥获得小球藻粉。所得藻粉可用于开发成动物饲料、水产养殖用饵料、食品、食品添加剂、药品和营养品等。

本发明中, 可对培养所得的微藻进行综合利用, 提取其中的色素、蛋白质、多糖等各种活性成分。活性成分的提取顺序并无特殊限制, 但通常要满足先提取的步骤不能导致后提取的成分损失这一前提。

本文中涉及到藻细胞干重、油脂含量及胞内生化成分的测定方法如下:

藻细胞干重测定: 在微藻(如小球藻)培养过程中取培养液 V 毫升, 8000 rpm 离心 10 分钟, 将离心后的藻体用去离子水洗涤 3 次, 转移至称量瓶(W₁(克))中, 在 105℃ 烘箱中烘干至恒重 W₂(克)。藻体干重 C_x 可根据下式计算: $C_x(\text{克/升}) = (W_2 - W_1) / V / 1000$ 。

油脂测定: 取一定量各培养阶段烘干至恒重的藻细胞, 在研钵中研磨至粉末状, 称取适量藻粉(0.2~0.5 g)小心转移至离心管中, 加入适量萃取溶剂(氯仿:甲醇=2:1)于超声振荡器中超声振荡 30min, 8000rpm 离心 10min, 将上清转移至已知重量的干燥旋转蒸发瓶中, 重复上述步骤直至上清无色。合并上清后旋转蒸干, 称重并计算油脂含量。

油脂含量(%)按下式计算:

$$\text{油脂}(\%) = (W_2 - W_0) / W_1 \times 100$$

式中： W_1 ——为藻粉重量，g； W_0 ——为烘干至恒重的旋转蒸发瓶重量，g； W_2 ——为油脂萃取液蒸干后蒸发瓶的重量，g。

碳水化合物的测定：参照药典 2005 版，选择蒽酮-硫酸显色反应，采用无水葡萄糖作为对照品，用比色法在 625nm 处测定。

蛋白质含量测定：微藻（如小球藻）细胞中总蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法（宁正祥. 食品成分分析手册. 北京：中国轻工业出版社，1998, 76-78）。

叶绿体色素含量测定：微藻（如小球藻）叶绿体色素含量测定采用 Lichtenthaler 等对 Arnon 法进行了修正后的方法（Lichtenthaler HK, Wellburn AR. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 1983, 11:591~592）。

灰分测定：微藻（如小球藻）灰分采用 550℃灼烧至恒重测量，即国标 GB6438-86 法。

叶黄素测定：采用高效液相色谱法（HPLC），具体操作步骤见文献（Zheng Yun Wu, Chun Lei Shi et al. Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23:1233–1238）。

与现有的能源微藻培养积累油脂的方法相比，本发明的方法具有以下优点：可在短时间内获得高密度的微藻细胞，同时可在短时间内使微藻细胞内的油脂含量快速提高。本发明将微藻培养合成油脂分成藻细胞生长和油脂合成积累两个阶段，即异养培养和光诱导培养阶段。异养培养微藻的目的是为了快速获得大量的藻细胞，而光诱导培养的目的是为了诱导微藻细胞快速合成积累大量的油脂，采用异养-稀释-光诱导串联培养方式培养微藻提高了油脂的产率，一定程度上解决了能源微藻细胞生长和油脂合成不同时进行的矛盾，大大降低了成本，为解决生物燃料规模化制备过程中由于原料不足而导致的成本过高问题提供新的技术手段。

此外，本申请之前，本领域的普遍认识是只有通过光自养的模式才能够利用微藻来大规模生产油脂。然而，光自养培养与本发明的光诱导培养完全不同。光自养培养中，培养基不含有有机碳源，微藻利用大气中的 CO_2 、水、光、和少量无机营养盐进行光合自养，维持自身的生长，一般接种密度较低（0.1g/L 左右），生长慢（有时候为了促进生长，还需要在培养过程中人工通入 CO_2 ），培养周期长（一般要一周以上，户外光自养培养细胞密度难以达到较高水平），尤其在大规模培养的时候，为了提供大规模培养所需的接种藻液，种子扩培需要的时间很长（一般需要 1-2 个月），生产效率很低。而本申请的光诱导所用的培养基和光自养的培养基不一样，由于异养阶段藻液中含有丰富的无机盐和微量元素等营养成分，所以经过稀释后，所需的光诱导培养基比光自养培养基要简单很多，例如和文献上常见的微藻光自养培养基 BG-11 相比，稀释用的光诱导培

培养基中不需要添加磷酸盐、碳酸钠、柠檬酸铁铵以及微量元素，同时添加的硝酸盐用量也比光自养培养基用量要少很多。通过异养阶段的培养，可以在短时间内积累大量藻细胞，规模化培养时，通过稀释后，进入光诱导的藻细胞密度（以小球藻为例，密度范围在 2~5g/L 左右）比光自养培养方式的接种密度要高 20 倍以上，很好的解决了光自养培养方式接种密度低，种子扩培周期长等缺点，同时在较短时间的光照诱导周期内（一般 8~24 小时），藻细胞密度几乎维持不变（即它已经不再生长），胞内油脂含量却能够快速积累，含量成倍增长（由 10%增加到 20~30%左右），这样相对光自养而言，占地面积大大缩小，面积产率大幅提高，整个培养周期明显缩短，采收成本降低，生产效率大大提高。

同样地，迄今，微藻培养产叶黄素的最高体积产率（145mg/L/d）和胞内叶黄素的最高含量（7.6mg/g）均是在连续光照的混合营养培养条件下获得的（Martin, Lucia. Process for obtaining lutein from algae. EP180843A1, 2007）。但该培养模式只能在可蒸汽灭菌的封闭式光生物反应器中进行，且培养过程必须保证绝对的无菌，同时需要光源的合理配置，这在实际生产中无法实现。因此，利用混合营养模式培养微藻生产叶黄素不具有产业化价值。

本发明将微藻培养法生产叶黄素分成藻体生长和产物（叶黄素）积累两个阶段，即异养培养和光诱导培养。通过异养培养可在短时间内获得大量的可产叶黄素的微藻细胞，藻液稀释后转入光诱导培养，藻体内叶黄素含量迅速提升至初始的两倍甚至两倍以上。本发明具有如下优势：（1）光诱导的藻细胞密度很高（2~10g/L），是常规光自养培养藻细胞密度（约 0.2~1g/L）的 10 倍左右；（2）光诱导时间很短（约 1d~2d），而微藻光自养培养时间很长（约 7d~14d），因此，叶黄素的生产效率大为提高；（3）相对于微藻光自养培养，光诱导时较高的藻细胞密度使得光诱导所需的占地面积很小，同时高细胞密度使得采收成本大幅度降低；（4）异养培养几乎不受气候、天气的影响，光诱导培养可以在玻璃房内，自然光照或人工光照条件下进行，因而，采用本发明的方法可以实现叶黄素的连续生产；（5）对富含油脂和叶黄素的藻体进行分步提取，实现微藻能源和高附加值产品开发的耦合和藻体的资源化利用，可获得额外的产品和经济效益，降低了微藻能源的生产成本。

以下将通过实施例对本发明的有关内容作进一步的说明。除非另有所述，本发明采用的培养基中各组分含量均用克/升(g/L)表示。应理解，本申请中“含有”、“包含”也包括“由……组成”、“由……构成”的含义。

实施例 1

在 50L 生物反应器中加入下述异养培养基和自来水至 25L 后灭菌，当温度降至 30℃时按工作体积的 12%接入蛋白核小球藻，开始异养培养。

异养培养条件：温度为 30℃，初始转速为 150r/min，空气流量为 1vvm，pH 小于 8.0，培养过程中通过调节转速控制溶氧 15%以上。

将异养培养过程中葡萄糖耗完的高密度藻液稀释到 2.70g/L 左右，并加入下述光诱导培养基，转入 3L 平板式光反应器中进行光诱导培养，温度 30℃，光强 8000lx，空气流量为 1vvm。光诱导培养 12h，细胞密度从 2.70 g/L 降低到 2.65 g/L，油脂含量从 9.70% 上升至 19.70%（见图 1）。

异养培养基：葡萄糖 60.0 克，尿素 8.0 克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 克， KH_2PO_4 1.1 克， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.0 克， CaCl_2 0.02 克，柠檬酸三钠 1.8 克，Fe-EDTA 溶液 1.0ml 微量元素溶液 4.5ml，和水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升，微量元素溶液配方为 H_3BO_3 2.11 克/升， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.81 克/升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11 克/升， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.0 克/升， Na_2MoO_4 0.05 克/升。

光诱导培养基：尿素 0.5 克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 克，柠檬酸三钠 0.05 克， CaCl_2 0.01 克，Fe-EDTA 溶液 0.4ml，和水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升。

实施例 2

在 5 T 发酵罐中加入异养培养基和自来水至 2.5 T 后灭菌，当温度降至 30℃时，以 500 L 发酵罐作为种子罐培养的普通小球藻，培养过程中根据细胞生长情况、发酵液中溶氧水平来调节罐压、通气量和搅拌转速，维持培养液中充足的氧含量，确保藻细胞的快速生长。

将前期补料分批异养培养过程中葡萄糖耗完的高密度藻液经光诱导培养基稀释后，转至 30 L 平板式光反应器及 60 L 鼓泡式大盆中在户外进行光诱导培养。光诱导培养条件：自然温度，温度在 13~30℃，自然光照，光强在 0~36 klx（见图 2），空气流量为 1 vvm。光诱导培养 8 h 后，30L 平板式反应器中藻细胞密度从 1.60 g/L 降低到 1.46 g/L，油脂含量从 7.87% 上升至 13.27%，后进入夜晚，整个晚上藻细胞密度从 1.46 g/L 降低至 1.16 g/L，降幅较白天明显，油脂含量也有小幅下降，从 13.27% 下降至 12.93%，第二天白天经过 4h 的短暂光诱导后，藻细胞密度略有上升，从 1.16 g/L 上升至 1.18 g/L，同时油脂含量迅速上升，从 12.93% 升高至 18.58%（见图 3），图 4 为 60 L 鼓泡式大盆中光诱导情况，数据显示变化规律与 30 L 平板式光反应器的规律相类似。

将半连续异养培养结束后的高密度普通小球藻藻液，经光诱导培养基稀释后，转入 3 T 跑道池及 3.14m² 斜叶搅拌式圆池在户外进行光诱导培养。光诱导培养条件：较低自然温度，温度在 5~18℃，自然光照，光强在 0~34 klx（见图 5），空气流量为 1 vvm。因该批次 5 T 发酵罐半连续培养结束时间在傍晚，所以藻细胞转入光诱导后即进入夜晚，光诱导阶段共进行了 90 h，前 2 天天气晴好，但是气温较低，放入藻液的当晚，最低气

温只有 5℃，后面两天最高气温为 14℃，第三天开始天气转阴有小雨，气温开始小幅回升，第三天傍晚开始闷热潮湿，整个晚上伴有雷阵雨，第四天上午阴有小雨，午后雨停，结束培养并采收藻细胞。

由图 6、7 可以看出，一方面由于气温较低，不利于藻细胞的生长代谢；另一方面由于第三天开始陆续下雨，雨水稀释了藻液，造成了大池内细胞内浓度下降，所以整个光诱导过程藻细胞密度下降明显。

由于接种后的前 12 小时，正好是晚上，光合作用不能进行，所以色素和碳水化合物均大幅下降，油脂含量却显著升高，从 12%升至 18%左右，当晚户外温度较低，低温胁迫可能诱导藻细胞内油脂的合成积累，这也是藻细胞油脂代谢对外界环境变化的一种响应机制。后面两天温度都较低，最高气温不超过 14℃，藻细胞胞内成分没有明显变化，第三天开始，虽然有雨水，但是气温显著回升，并且闷热潮湿，从实验数据来看，这种户外实际气候情况反而有利于光诱导过程藻体品质的提升，但是上升速度比较缓慢。在整个 90h 的户外光诱导过程中，尽管出现低温、阴雨及雷雨天气，但通过延长光诱导时间，藻体的品质也能得到大幅提升，最终油脂含量均大幅提升至 20%左右。

其中，异养培养基为：葡萄糖 60.0 克，硝酸钾 10.0 克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 克， KH_2PO_4 0.3 克， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.8 克， CaCl_2 0.02 克，Fe-EDTA 溶液 1.0ml，微量元素溶液 3.5ml，水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升，微量元素溶液配方为 H_3BO_3 2.86 克/升， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.11 克/升， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.22 克/升， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.00 克/升， $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克/升， $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.9 克/升。

光诱导培养基为：硝酸钾 0.5 克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克， CaCl_2 0.03 克，Fe-EDTA 溶液 1.5ml，水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 8 克/升和 EDTA 10.4 克/升。

实施例 3：异养-稀释-光诱导串联培养过程中椭圆小球藻主要生化成分变化规律的研究

本实施例在 500mL 摇瓶/3L 圆柱式光生物反应器水平测定椭圆小球藻异养-稀释-光诱导串联培养过程中主要生化成分的变化。

采用与实施例 1 和 2 类似的方式以异养-稀释-光诱导串联培养技术培养椭圆小球藻，500mL 摇瓶，装液量 200mL，28℃，150rpm，待藻细胞密度达到 10g/L 以上且葡萄糖耗尽时，转入 3L 圆柱式光生物反应器进行光诱导培养，藻细胞密度约 2g/L，温度 30℃，光强 10Klx。异养和光诱导所采用的培养基和蛋白核小球藻的相应培养基一致。异养结束时藻细胞内油脂含量为 13.94%，转入光诱导后 12h，藻细胞油脂含量快速增加到 23.91%（见图 8）。

实施例 4

在 5L 生物反应器中加入下述异养培养基和水至 2.8L 后进行蒸汽灭菌，然后当温度降到 30℃时接入蛋白核小球藻，开始异养培养。异养培养条件：温度为 30±1℃，空气流量为 1vvm，pH 小于 8.0，控制溶氧 15%以上。

在接种后 53.9h 后第一次补料，之后每隔 5~8h 进行补料，共补加 4 次，培养至 88.40h 细胞干重达到 132.2g/L（见图 9），此时异养培养结束转入光诱导培养。

将异养培养结束后的高密度藻液稀释到 2.55g/L，并加入下述光诱导培养基，转入到 3L 平板式光生物反应器中进行光诱导培养。光诱导培养条件：温度维持在 28~33℃，空气流量为 1vvm，双侧光照，每侧光强为 15klx。光诱导培养 27h 后，细胞干重从 2.55g/L 降低到 1.82g/L，叶黄素从 1.57mg/gDcw 上升至 3.64mg/gDcw，光诱导 27h 时叶黄素的产率为 5.88mg/L/d；若光诱导 12h 时叶黄素的产率可达 12.1mg/L/d（为目前微藻光自养生产叶黄素最高产率 4.8mg/L/d 的 2.5 倍）（见图 10）。

异养及补料培养基为：葡萄糖 60.0 克，尿素 8.0 克，MgSO₄·7H₂O 2.0 克，KH₂PO₄ 1.1 克，Na₂HPO₄·12H₂O 9.0 克，CaCl₂ 0.02 克，柠檬酸三钠 1.8 克，Fe-EDTA 溶液 1.0ml，微量元素溶液 4.5ml，水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 FeSO₄·7H₂O 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升，微量元素溶液配方为 H₃BO₃ 2.11 克/升，MnCl₂·4H₂O 0.81 克/升，ZnSO₄·7H₂O 0.11 克/升，CuSO₄·5H₂O 10.0 克/升，Na₂MoO₄ 0.05 克/升。

光诱导培养基为：尿素 0.5 克，MgSO₄·7H₂O 1.0 克，柠檬酸三钠 0.05 克，CaCl₂ 0.01 克，Fe-EDTA 溶液 0.4ml，水 1000ml；其中 Fe-EDTA 溶液配方为 FeSO₄·7H₂O 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升。

实施例 5

在 50L 生物反应器中加入下述异养培养基和自来水至 25L 后在 121℃灭菌 20min，然后当温度降至 30℃左右时按工作体积的 10%接入蛋白核小球藻，开始异养培养。

异养培养条件：温度为 30℃，空气流量为 1vvm，pH 在 6.0~8.0，控制溶氧 15%以上。在培养过程中，当葡萄糖消耗完后，进行补加碳源，当尿素消耗完时，补加氮源。通过 6 次补加碳源，3 次补加氮源后在 98.89h 藻细胞密度达 130.5g/L（见图 11）。

将异养培养结束后的高密度藻液稀释到 2.01g/L，并加入光诱导培养基，转入到 10L 圆柱光生物反应器内进行光诱导。

光诱导培养条件：自然温度，温度在 30℃，光强在 3klx，空气流量为 1vvm。光诱导培养 30h 后，细胞干重从 2.01g/L 降低到 1.66g/L，叶黄素从 2.55mg/gDcw 上升至 3.47mg/gDcw，光诱导 30h，叶黄素产率为 4.61mg/L/d；若只光诱导 24h，叶黄素的产率达 5.73mg/L/d（见图 12）。培养基与实施例 4 的培养基一致。

实施例 6

在 50L 生物反应器中加入下述异养培养基和自来水至 25L 后在 121℃ 灭菌 20min, 然后当温度降至 30℃ 左右时按工作体积的 13% 接入普通小球藻, 开始异养培养。

异养培养条件: 温度为 30℃, 空气流量为 1vvm, pH 小于 9.0。在培养过程中, 当碳源消耗完后, 进行补加葡萄糖, 当氮源消耗完时, 补加硝酸钾。通过 5 次补加碳源和氮源, 58.20h 藻细胞密度最高达 54.5g/L (见图 13)。

将异养培养的高密度藻稀释到 3.2g/L 左右, 并加入光诱导培养基, 转入到 30L 平板式光生物反应器在户外进行光诱导培养。光诱导培养条件: 自然温度, 自然光照, 空气流量为 1.0vvm。光诱导 28h, 叶黄素从初始的 1.10mg/gDcw 上升至 1.82mg/gDcw; 光诱导 23h 时, 叶黄素含量为 1.67mg/gDcw, 叶黄素产率达 5.23mg/L/d (见图 15)。

异养和补料培养基为: 葡萄糖 60.0 克, 硝酸钾 10.0 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 克, KH_2PO_4 0.3 克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.8 克, CaCl_2 0.02 克, Fe-EDTA 溶液 1.0ml, 微量元素溶液 3.5ml, 水 1000ml; 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 克/升和 EDTA 1.4 克/升, 微量元素溶液配方为 H_3BO_3 2.86 克/升、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.11 克/升、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.22 克/升、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.00 克/升、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 克/升和 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.9 克/升。

光诱导培养基为: 硝酸钾 0.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克, CaCl_2 0.03 克, Fe-EDTA 溶液 1.5ml, 水 1000ml; 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 克/升和 EDTA 10.4 克/升。

实施例 7

在 5L 生物反应器中加入下述异养培养基和水至 2.8L 后进行蒸汽灭菌, 然后当温度降到 30℃ 时按工作体积的 8% 接入椭圆小球藻, 开始异养培养。异养培养条件: 温度为 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 空气流量为 1vvm, pH 小于 8.5, 控制溶氧 5% 以上。补料两次后在 66h, 藻细胞密度为 53.0g/L (见图 14), 此时异养培养结束转入光诱导培养。

将异养培养结束后的高密度藻液稀释到 4.0g/L, 并加入下述光诱导培养基, 转入到 3L 平板式光生物反应器中进行光诱导培养。光诱导培养条件: 温度维持在 28~33℃, 空气流量为 1.0vvm, 双侧光照, 每侧光强为 15klx。光诱导培养 48h 后, 细胞干重从 4.0g/L 降低到 2.8g/L, 叶黄素从 1.5mg/gDcw 上升至 3.6mg/gDcw, 叶黄素产率为 5.04mg/L/d; 光诱导 24h, 叶黄素产率可达 9.24mg/L/d (见图 16)。培养基与实施例 6 的培养基一致。

尽管上面已经描述了本发明的具体例子, 但是有一点对于本领域技术人员来说是明显的, 即在不脱离本发明的精神和范围的前提下可对本发明作各种变化和改动。因此, 所附权利要求覆盖了所有这些在本发明范围内的变动。

权 利 要 求 书

1. 一种微藻培养方法，其特征在于，该方法包括微藻异养培养的步骤，和将异养培养所获得的微藻培养液稀释后进行光诱导培养的步骤。

2. 一种快速积累微藻胞内油脂和/或叶黄素和/或其他胞内物质（如蛋白质、叶绿素等）的方法，其特征在于，该方法包括微藻的异养培养步骤，将异养培养的微藻藻液稀释后进行光诱导培养的步骤，以及任选的藻细胞采收、油脂和/或叶黄素和/或其他胞内物质分离提取的步骤。

3. 如权利要求 1 或 2 所述方法，其特征在于，所述的微藻选自：

绿藻门小球藻属中的蛋白核小球藻（*Chlorella pyrenoidosa*），普通小球藻（*Chlorella vulgaris*），椭圆小球藻（*Chlorella ellipsoidea*），*Chlorella emersonii*，*Chlorella sorokiniana*，*Chlorella saccharophila*，*Chlorella regularis*，*Chlorella minutissima*，*Chlorella protothecoides*，*Chlorella zofingiensis*，以及绿藻门中的 *Brachiomonas submarina*，*Chlamydomonas reinhardtii*，*Chlamydomonas acidophila*，*Haematococcus pluvialis*，*Haematococcus lacustris*，*Scenedesmus obliquus*，*Spongiococcum exetrickium*，*Tetraselmis suecica*，*Tetraselmis chuii*，*Tetraselmis tetrathele*，*Tetraselmis verrucosa*，*Micractinium pusillum*；

硅藻门的 *Cylindrotheca fusiformis*，*Nitzschia laevis*，*Nitzschia alba*，*Nitzschia fonticola*，*Navicula incerta*，*Navicula pelliculosa*；

蓝藻门的 *Anabaena variabilis*；

金藻门的 *Poterioochromonas malhamensis*；

甲藻门的 *Amphidinium carterae*，*Cryptothecodinium cohnii*；

裸藻门的 *Euglena gricilis*；和

红藻门的 *Galdieria sulphuraria*。

4. 如权利要求 1—3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述异养微藻的步骤包括在生物反应器中进行异养培养：在生物反应器中加入 pH 为 4.0~10.0 的培养基，按工作体积的 0.1~30% 接入微藻藻种进行分批培养、补料分批培养、半连续培养或连续培养，培养温度为 10~50℃，控制 pH 小于 10.0，控制溶氧在 1% 以上。

5. 如权利要求 1—4 中任一项所述的方法，其特征在于，所述藻液稀释包括用培养基将异养培养获得的藻液稀释至细胞密度为 0.1~50 克/升，所述培养基不含有机碳源，其 pH 为 4.0~10.0。

6. 如权利要求 1—5 中任一项所述的方法，其特征在于，所述光诱导培养包括将稀释后的藻液转入光诱导装置中进行光诱导，培养温度为 5~50℃，连续光照或间歇光照，

光照强度为 0.1~150klx, 光诱导培养周期为 1~150 小时。

7. 如权利要求 1—6 中任一项所述的方法, 其特征在于, 异养培养基由氮源、有机碳源以及少量无机盐、微量元素和水组成; 光诱导培养基由氮源、无机盐和水组成。

8. 如权利要求 1—7 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述异养步骤在摇瓶、机械搅拌式、气升式或鼓泡式可异养培养的生物反应器中进行, 所述光诱导培养步骤在摇瓶或选自敞开式的跑道池或圆池、封闭式的平板式光生物反应器或管道式光生物反应器或柱式光生物反应器或薄膜立袋与吊袋用于微藻光自养培养的装置中进行, 光源为自然光或各种人工光。

9. 如权利要求 1—8 中任一项所述的方法, 其特征在于, 当小球藻为普通小球藻时, 异养所使用的培养基基本上由以下成分组成: KNO_3 5~15 克/升、葡萄糖 10~60 克/升、 KH_2PO_4 0.3~0.9 克/升、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2~1.0 克/升、 CaCl_2 0.05~0.3 克/升、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01~0.05 克/升; 微量元素 0.5~4ml, 其中微量元素的组成为 H_3BO_3 5~15 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0~10.0 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5~1.5 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.9 克/升; 水。

10. 如权利要求 1—8 中任一项所述的方法, 其特征在于, 当小球藻为蛋白核小球藻时, 异养所使用的培养基基本上由以下成分组成: 葡萄糖 10~60 克/升, 尿素 2~8 克/升, KH_2PO_4 1~2 克/升, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0~10.0 克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~2 克/升, CaCl_2 0.05~0.1 克/升, 柠檬酸三钠 0.1~2.0 克/升, Fe-EDTA 溶液 0.5~1 mL, A5 溶液 1~5mL; 其中 Fe-EDTA 溶液配方为 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20~30 克/升和 EDTA 20~40 克/升; A5 溶液配方为 H_3BO_3 2.5~4.0 克/升, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0~2.0 克/升, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~0.6 克/升, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5~10 克/升, Na_2MoO_4 0.01~0.05 克/升; 水。

11. 一种油脂和/或叶黄素和/或其他胞内物质(如蛋白质、叶绿素等)生产方法, 其特征在于, 所述方法包括异养培养微藻的步骤, 将异养培养的微藻藻液稀释后进行光诱导培养的步骤, 以及藻细胞采收、油脂和/或叶黄素和/或其他胞内物质分离提取的步骤。

说明书附图

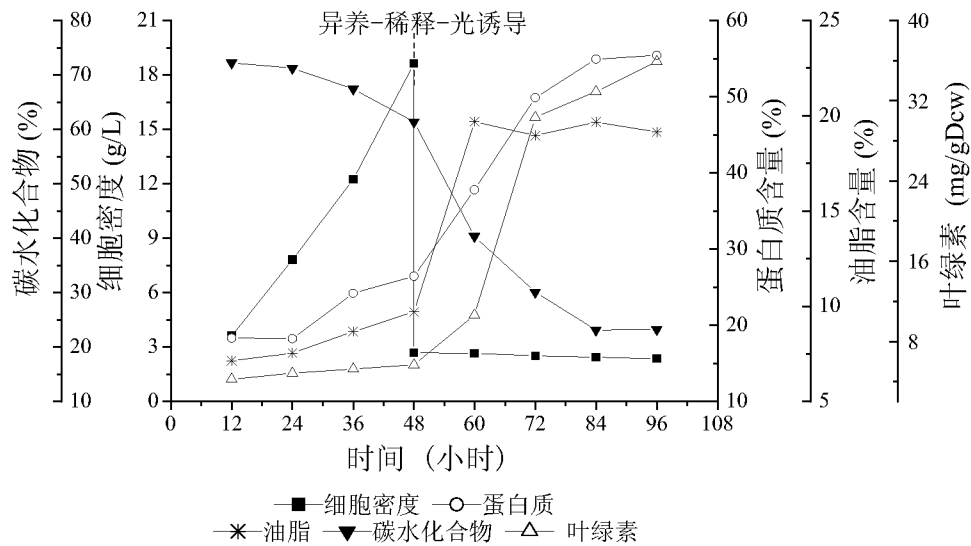


图 1

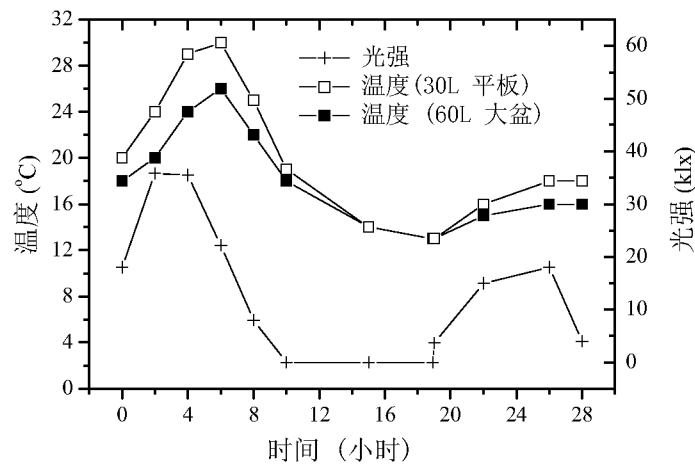


图 2

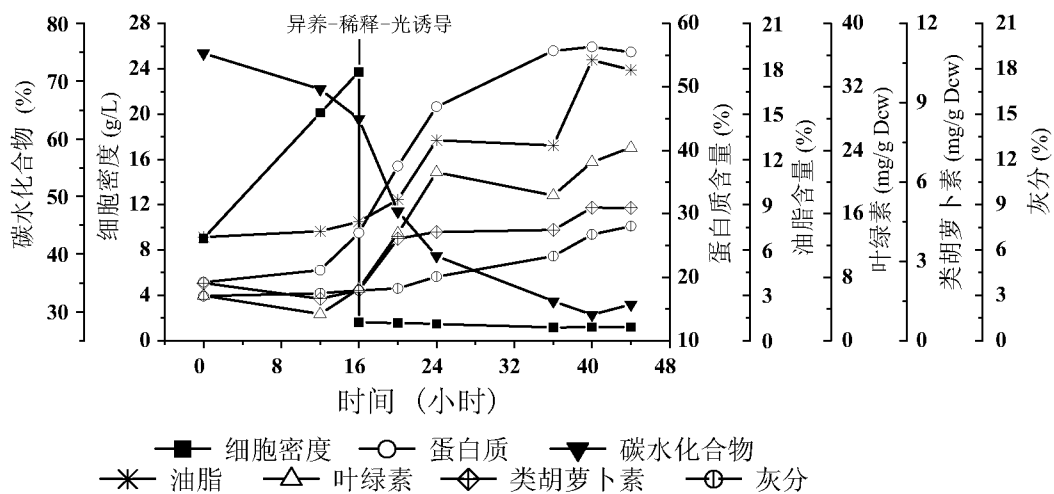
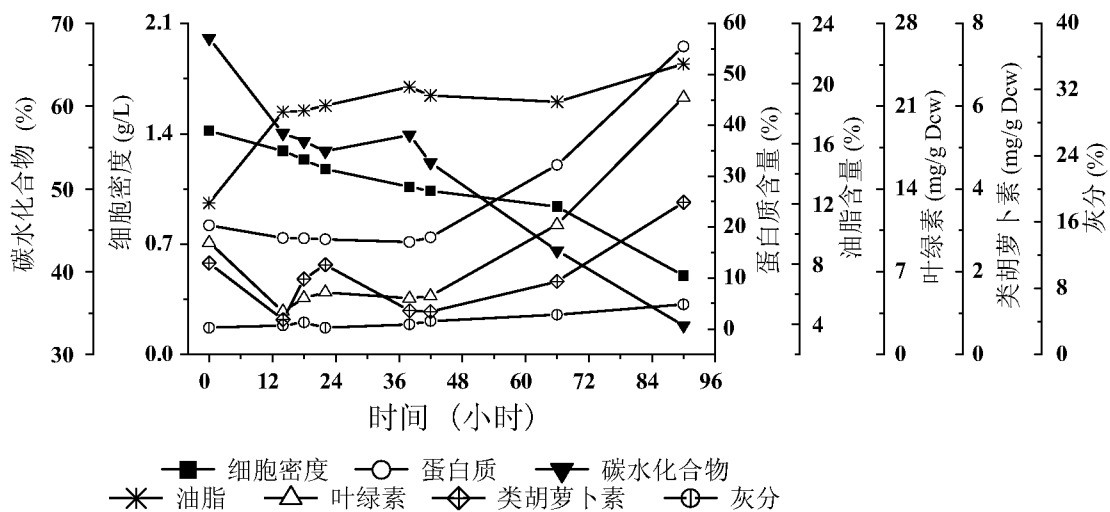
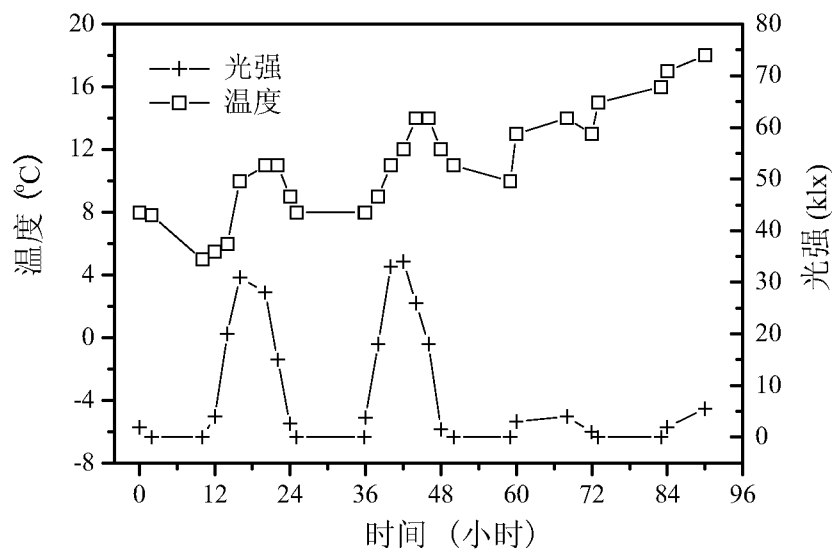
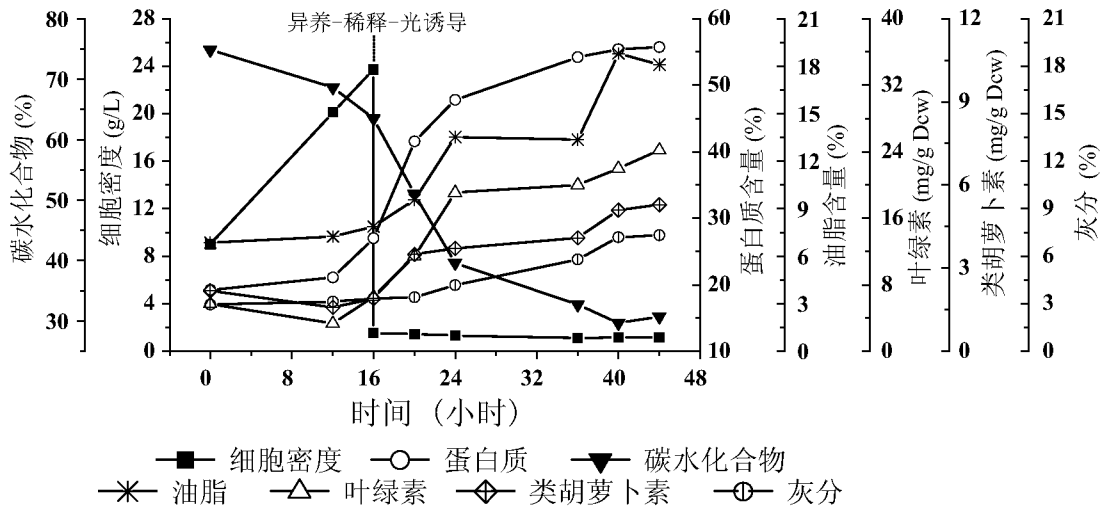


图 3



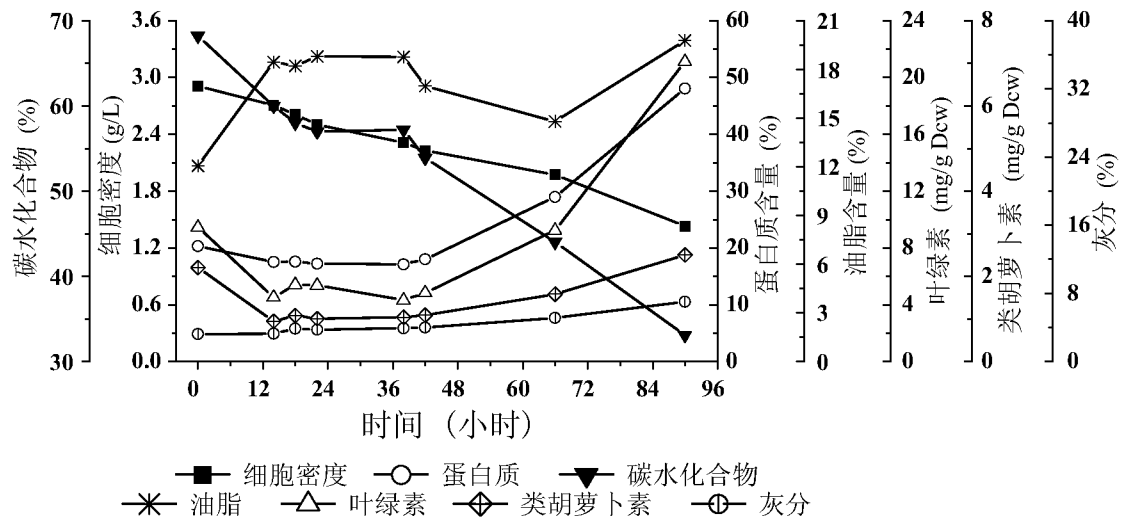


图 7

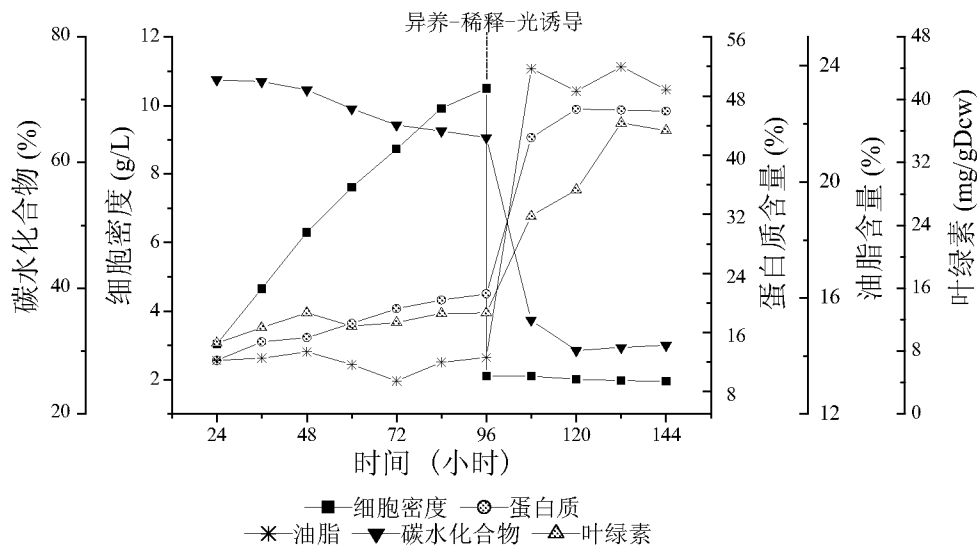


图 8

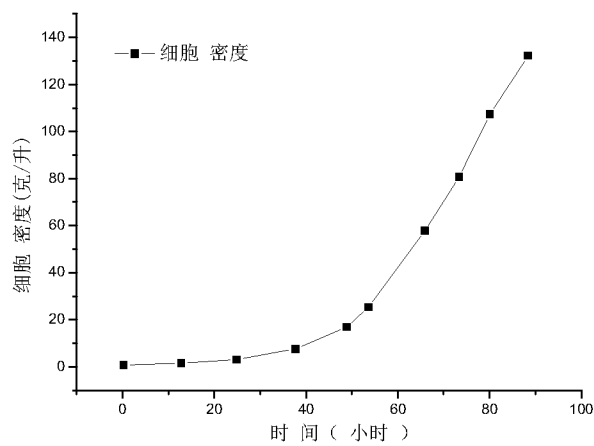


图 9

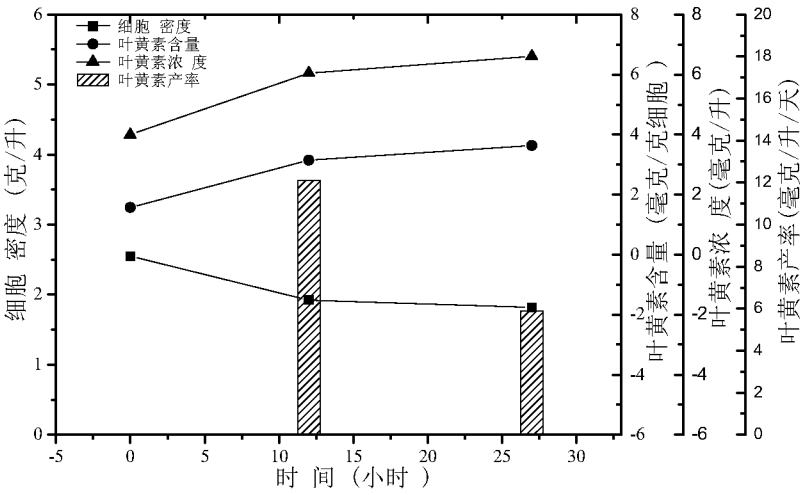


图 10

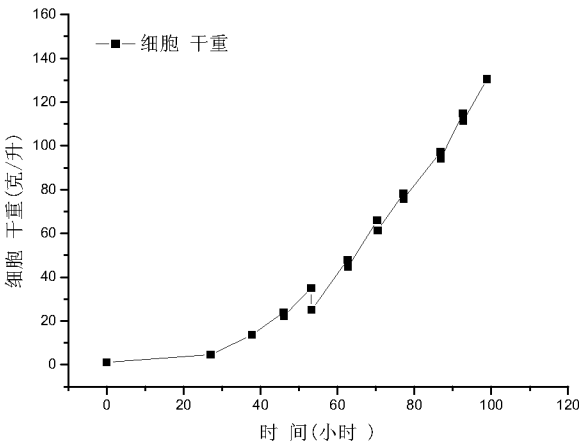


图 11

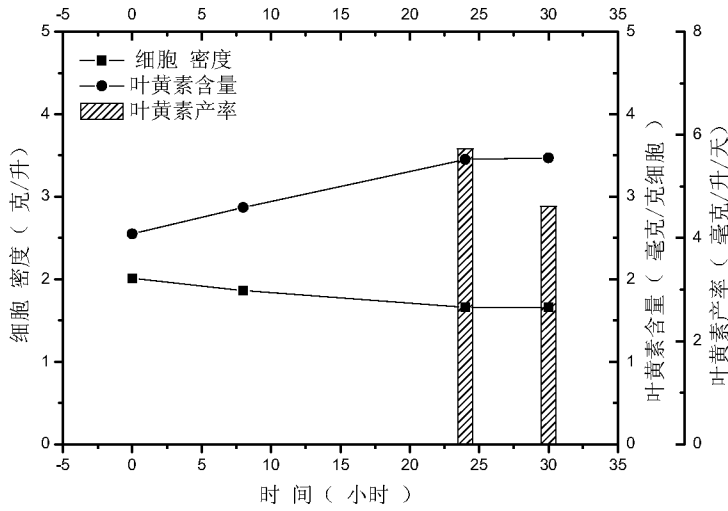


图 12

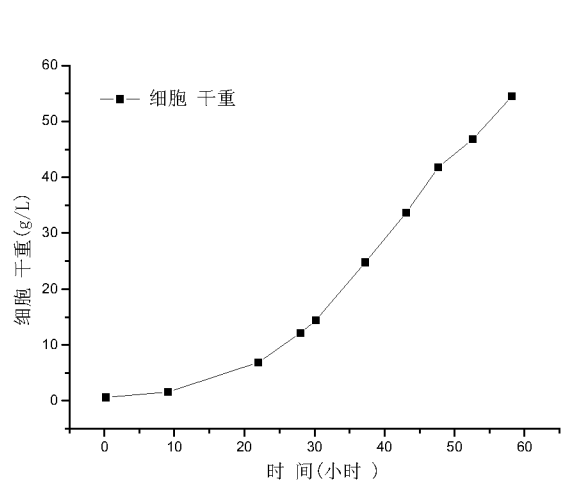


图 13

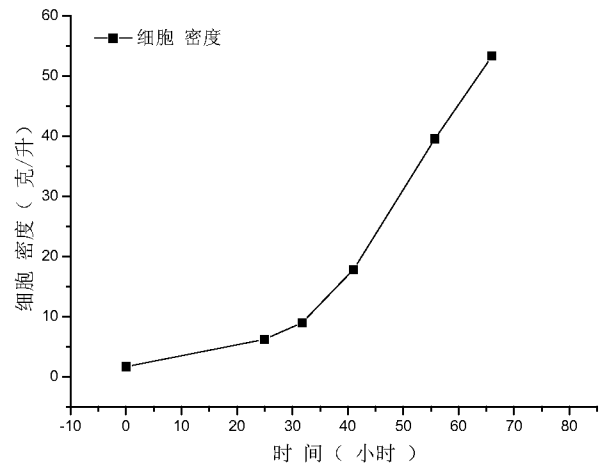


图 14

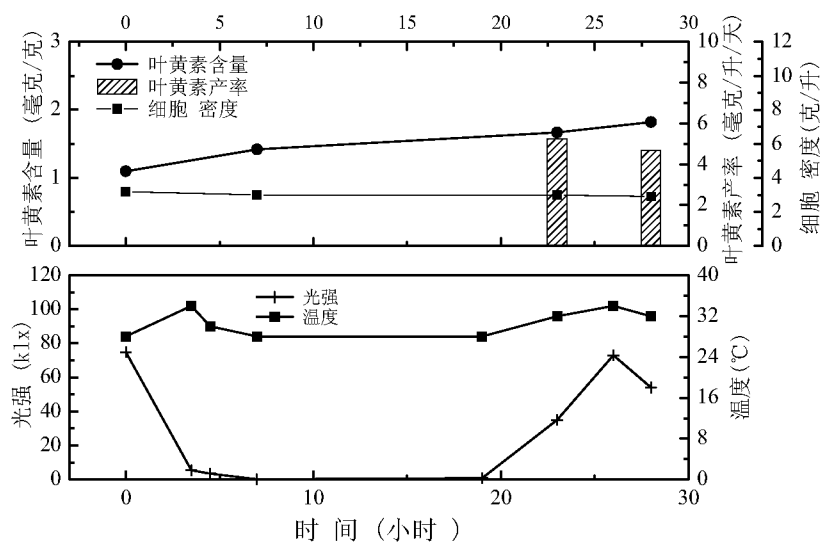


图 15

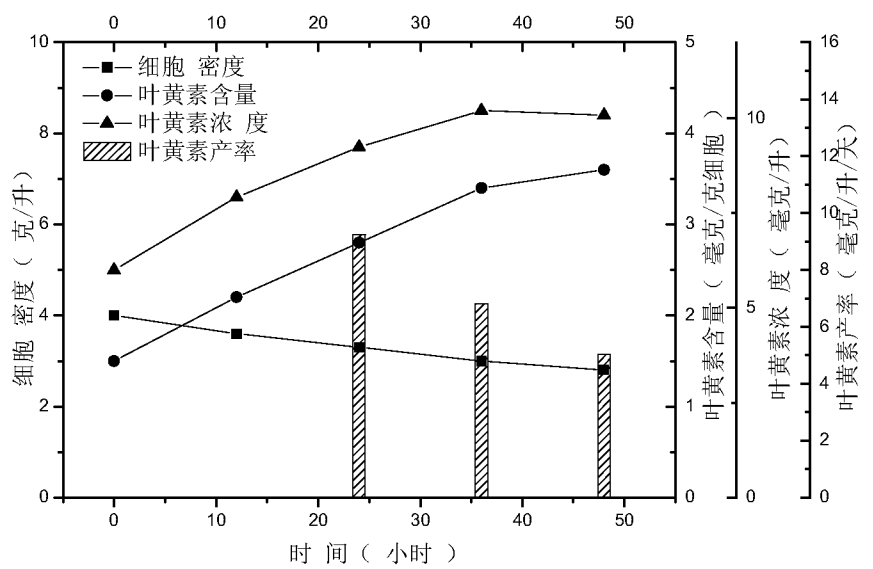


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/082261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, C12P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT;CNKI;WPI;EPODOC; algae, autotrophic/phototrophic, heterotrophic/allotrophic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN102154110A (UNIV EAST CHINA SCI&TECHNOLOGY et al.) 17 Aug. 2011 (17.08.2011) claims 1-10	1-11
PX	CN102021208A (UNIV EAST CHINA SCI&TECHNOLOGY et al.) 20 Apr. 2011 (20.04.2011) claims 1-10	1-11
PX	CN102094061A (UNIV EAST CHINA SCI&TECHNOLOGY et al.) 15 Jun. 2011 (15.06.2011) claims 1-10	1-11
PX	CN101921811A (ENERGY RES INST SHANDONG ACAD SCI et al.) 22 Dec. 2010 (22.12.2010) claims 1-6	1-11
X	WO2010/014797A2 (UNIV WASHINGTON STATE RES FOUND) 04 Feb. 2010 (04.02.2010) claims 10-22, description p. 1 paragraph 1, pp. 4-10, 18-20 and fig. 1	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 Feb. 2012(10.02.2012)	Date of mailing of the international search report 01. March 2012(01.03.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer CHENG Jinmei Telephone No. (86-10) 62085491

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/082261

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN102154110A	17.08.2011	NONE	
CN102021208A	20.04.2011	NONE	
CN102094061A	15.06.2011	NONE	
CN101921811A	22.12.2010	NONE	
WO2010/014797A2	04.02.2010	CN102089434A	08.06.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/082261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/64 (2006.01) i

C12N1/12 (2006.01) i

C12R1/89 (2006.01) i

C12P23/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N, C12P, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT;CNKI;WPI;EPODOC; 微藻, 异养, 自养, algae, autotrophic/phototrophic, heterotrophic/allotrophic

C. 相关文件

类 型*	类 型*	类 型*
PX	CN102154110A (华东理工大学等) 17.8 月 2011 (17.08.2011) 权利要求 1-10	1-11
PX	CN102021208A (华东理工大学等) 20.4 月 2011 (20.04.2011) 权利要求 1-10	1-11
PX	CN102094061A (华东理工大学等) 15.6 月 2011 (15.06.2011) 权利要求 1-10	1-11
PX	CN101921811A (山东省科学院能源研究所) 22.12 月 2010 (22.12.2010) 权利要求 1-6	1-11
X	WO2010/014797A2 (UNIV WASHINGTON STATE RES FOUND) 04.2 月 2010 (04.02.2010) 权利要求 10-22, 说明书第 1 页第 1 段、第 4-10 页、第 18-20 页, 图 1	1-11

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

10.2 月 2012(10.02.2012)

国际检索报告邮寄日期

01.3 月 2012 (01.03.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

程晋美

电话号码: (86-10) 62085491

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/082261

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102154110A	17. 08. 2011	无	
CN102021208A	20. 04. 2011	无	
CN102094061A	15. 06. 2011	无	
CN101921811A	22. 12. 2010	无	
WO2010/014797A2	04. 02. 2010	CN102089434A	08. 06. 2011

A. 主题的分类

C12P7/64 (2006.01) i

C12N1/12 (2006.01) i

C12R1/89 (2006.01) i

C12P23/00 (2006.01) i