

(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 3 月 8 日 (08.03.2012)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/028040 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/12 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/077113
- (22) 国际申请日: 2011 年 7 月 13 日 (13.07.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010531486.3 2010 年 11 月 3 日 (03.11.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 深圳市兆凯生物工程研发中心有限公司 (SHENZHEN SHI JAWKAI BIOENGINEERING R & D CENTER CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省深圳市龙岗区大鹏街道同富工业区海洋生物产业园 9 栋首层, Guangdong 518120 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王兆凯 (WANG, Zhaokai) [CN/CN]; 中国广东省深圳市龙岗区大鹏街道同富工业区海洋生物产业园 9 栋首层, Guangdong 518120 (CN)。
- (74) 代理人: 深圳市科吉华峰知识产权事务所 (SHENZHEN KINDWOLF INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国广东省深圳市南山区深南西路深南花园裙楼 A 区四层 402 室, Guangdong 518057 (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, RO, RS, RU, 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, 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))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则 48.2(h))。
- 根据申请人的请求, 在条约第 21 条(2)(a)所规定的期限届满之前进行。

(54) Title: METHOD FOR OPEN DIATOM CULTIVATION

(54) 发明名称: 一种开放式硅藻养殖方法

(57) Abstract: Provided is an open diatom cultivation method. The algae culture solution containing diatoms is first introduced to an open microalgae culture device. Then, carbon dioxide and nutrient salts are added to form a culture solution for diatom cultivation. After the algae culture solution containing diatoms is introduced to the open microalgae culture device, the pH value of the algae culture solution is controlled to be between 3.0 and 5.0 and maintained so for 30 to 120 minutes, and then the pH value is controlled to be between 8.0 and 8.7. The method enables industrial scale cultivation of diatoms at a low production cost, with a high cultivation density, and for a high production volume. The method also enables the long-term stable production of diatoms and solves the algae issues through natural selection of local diatoms without establishing an algae culture base.

(57) 摘要:

提供了一种开放式硅藻养殖方法, 首先将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置, 然后加入二氧化碳和营养盐以形成培养液进行硅藻养殖, 而且在将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置后控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0, 维持 30 至 120 分钟后, 将 pH 值控制到 8.0-8.7。该方法实现了硅藻的工业化大规模培养, 具有生产成本低, 养殖密度大和产量高等优点, 实现了硅藻的长期稳定生产, 解决了藻种问题, 通过自然筛选当地硅藻而无需建立藻种库。

WO 2012/028040 A1

一种开放式硅藻养殖方法

技术领域

本发明涉及微藻养殖技术，具体地涉及硅藻的养殖方法，更具体地涉及一种在开放式反应器中硅藻养殖方法。

背景技术

硅藻作为微藻的一种是鱼、贝、虾类特别是其幼体的主要饵料，它与其他植物一起，构成海洋的初级生产力。硅藻在生物分类上，属于硅藻门，根据壳的形状和花纹排列方式，硅藻门又分成二个纲：中心硅藻纲（Centriales）和羽纹硅藻纲（Pennatales）。中心硅藻纲包括圆筛藻目、根管藻目和盒形藻目。不同海域的海水中以及不同地区的淡水中，硅藻的具体纲目以及具体的属都不同，现有硅藻的培养一般是先根据需要筛选目标藻种，然后通过配制合适营养成分的培养液对目标硅藻藻种进行封闭式培养，如专利 CN200310120738.3 公开了一种硅藻培养液以及利用该培养液进行硅藻培养的方法。由于采用的是封闭式培养，其培养液中的各成分需要不断进行测定，然后定量地补充各成分，通过维持预定的成分含量才能实现硅藻的高密度、单一化培养，具有生产工艺复杂，成本高的缺点。

参考现有的微藻培养方式，一般可分为密闭式和开放式。开放式是指采用开放池培养装置进行微藻养殖，如跑道池、圆形浅池等培养装置，它具有技术简单、投资低廉等特点，目前，开放式的微藻养殖技术中，只有螺旋藻、小球藻和盐藻等少数几种在工业化生产中获得

了应用，而硅藻的开放式养殖尚未得到应用，通过现有的开放式微藻培养方式也很难培养出单一的硅藻，其原因是，在开放式的微藻培养水体中存在着各种微藻藻种，并且各种微藻藻种相互竞争生长，受杂藻污染和浮游动物摄食的影响，目标藻硅藻不能占到优势，在养殖环境中竞争力弱，致使养殖水体中目标藻细胞密度低，种类多变，无法形成工业化生产。

密闭式是指采用不同结构的密闭式的光生物反应器进行微藻养殖，如气升式、搅拌式、管式培养装置等，封闭式培养可用于生产高价值产物(如药物或保健品)或作为开放池培养的种子罐，其缺点是不能大规模生产。

发明内容

本发明为解决硅藻的规模化养殖，提供一种开放式硅藻养殖方法。

本发明实现发明目的采用的技术方案是，一种开放式硅藻养殖方法，采用开放式微藻培养装置，首先将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置，然后加入二氧化碳和营养盐以形成培养液进行硅藻养殖，其特征在于：在将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置后控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0，维持 30 至 120 分钟。

更好地，在将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置后控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0，维持 30 至 120 分钟后，将 pH 值控制到 8.0~8.7。

本发明中，所述控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0 是通过添加盐酸或

醋酸的方法控制 pH 值为 3.0-5.0。

本发明中，所述将 pH 值控制到 8.0~8.7 的方法是通过添加碳酸氢钠将 pH 值控制到 8.0~8.7。

本发明的有益效果是：

1、采用开放式微藻培养方式进行硅藻养殖，实现了硅藻的工业化大规模培养；

2、通过在硅藻培养初期控制培养液处于较低pH值的酸性环境，利用硅藻较强的耐酸性，在抑制其他藻种和浮游生物生长的同时保证硅藻的正常生长，进而使硅藻形成生长竞争优势，利用硅藻一旦形成生长竞争优势后会对其他藻种形成生长抑制的特点，维持硅藻的单藻种、高密度优势生长，具有生产成本低，养殖密度大和产量高等优点，实现了硅藻的长期稳定生产；

3、由于采用开放式微藻培养方式，可直接从天然海水或当地天然水中获取硅藻藻种，由于硅藻在不同地区和不同海域的藻种液中具体的目属都不同，因此通过本发明能培养出具有当地特点的不同目属的硅藻，解决了藻种问题，通过自然筛选当地硅藻而无需建立藻种库。

具体实施方式

一种开放式硅藻养殖方法，采用开放式微藻培养装置，开放式微藻培养装置一般包括反应器主体、气体吸收系统及藻体回收系统，首先将含有硅藻的藻种液接入到开放式微藻培养装置的反应器主体中，硅藻藻种液采用新鲜海水，此时，藻种液中含有各种杂藻藻种和浮游动物，由于生长的竞争关系，各种藻种会一并生长，本发明

为抑制杂藻的生长，保证目标藻种硅藻的优势生长，同时防止浮游生物对硅藻的摄食，在含有硅藻的藻种液接入反应器主体的初期即通过添加盐酸或醋酸的方法，控制藻种液的 pH 值为酸性，由于硅藻具有比普通藻种更强的耐酸性，在一定时间的较强酸性条件下，其他藻种和浮游生物都会被杀死，而硅藻则能存活下来。

本发明通过不断试验得到：当藻种液 pH 值为 4 左右，维持该 pH 值 30 分钟左右能很好地杀死杂藻藻种和浮游生物，同时保证目标藻种硅藻的正常存活，达到保持硅藻的优势生长。试验表明，当 pH 值小于 3.0 或酸性环境维持时间超过 120 分钟时，对硅藻也会产生抑制，当 pH 值大于 5.0 或酸性环境维持时间少于 30 分钟时，则不能有效地杀死其他藻种和浮游生物，起不到保证硅藻生长优势的作用。

本发明中，将藻种液 pH 值控制为 4 左右，维持该 pH 值 30-120 分钟的技术条件，之所以能取得很好的硅藻养殖效果，还在于，当硅藻在养殖初期的生长竞争中一旦取得优势藻地位，会进一步对其他藻种起到抑制作用，这一点克服了现有开放式微藻养殖技术当中普遍认为的各种藻种在相同营养环境下会相互竞争，一同生长，最后得不到单一藻种的技术偏见，对于硅藻养殖提出了一种全新的养殖思路。

由于硅藻在生长过程中会产生碱性代谢物，当停止加入盐酸或醋酸后，pH 值会一直升高至 9 以上，对于硅藻而言，较强的碱性环境会对生长不利，因此，需要控制 pH 值在硅藻最适宜的环境。本发

明通过添加碳酸氢钠，进而控制养殖水体的 pH 值维持在 8.0~8.7，试验表明此 pH 值范围内最利于硅藻生长，能取得最好的硅藻养殖效率。

最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本发明而并非限制本发明所描述的技术方案；因此尽管本说明书参照上述的各个实施例对本发明已进行了详细的说明，但是本领域的技术人员应当理解，仍然可以对本发明进行修改或等同替换；而一切不脱离本发明的精神和范围的技术方案及其改进，其均应涵盖在本发明的权利要求范围中。

权利要求书

1、一种开放式硅藻养殖方法，采用开放式微藻培养装置，首先将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置，然后加入二氧化碳和营养盐以形成培养液进行硅藻养殖，其特征在于：在将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置后控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0，维持 30 至 120 分钟。

2、根据权利要求 1 所述的一种开放式硅藻养殖方法，其特征在于，在将含有硅藻的藻种液接入所述开放式微藻培养装置后控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0，维持 30 至 120 分钟后，将 pH 值控制到 8.0~8.7。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种开放式硅藻养殖方法，其特征在于，所述控制藻种液 pH 值为 3.0-5.0 是通过添加盐酸或醋酸的方法控制 pH 值为 3.0-5.0。

4、根据权利要求 3 所述的一种开放式硅藻养殖方法，其特征在于，所述将 pH 值控制到 8.0~8.7 的方法是通过添加碳酸氢钠将 pH 值控制到 8.0~8.7。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077113**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, 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)

Data base: EPODOC, WPI, CNPAT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE

Searched words: open, culture, cultivation, pH, diatom, algae, open culture, HCl, HAC, NaHCO₃**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 101984043 A (WANG, Zhaokai), 09 March 2011 (09.03.2011), see claims 1-4	1-4
A	CN 1710060 A (XUZHOU NORMAL UNIVERSITY), 21 December 2005 (21.12.2005), see the whole document	1-4
A	CN 1710062 A (XUZHOU NORMAL UNIVERSITY), 21 December 2005 (21.12.2005), see the whole document	1-4
A	CN 1710061 A (XUZHOU NORMAL UNIVERSITY), 21 December 2005 (21.12.2005), see the whole document	1-4
A	CN 1504109 A (YAMAHA MOTOR CO., LTD. et al.), 16 June 2004 (16.06.2004)	1-4

☒ 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 October 2011 (10.10.2011)	Date of mailing of the international search report 20 October 2011 (20.10.2011)
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 WANG, Huimei Telephone No. (86-10) 62411090

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077113

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	See the whole document LI, Yajuan et al., "Influence of Nitrogen, Phosphorus, Iron and Silicon Nutrients on the Growth Rates of Benthic Diatoms", JOURNAL OF DALIAN FISHERIES UNIVERSITY, ISSN: 1000-9957, volume 13, number 4, pages 7-14, 31 December 1998 (31.12.1998), see the whole document	1-4
A	ZOU, Ning et al., "Effects of environmental and nutritional conditions on growth of marine benthic diatoms", JOURNAL OF AQUACULTURE, ISSN: 1004-2091, volume 26, number 5, p11-13, 01 September 2005 (01.09.2005), see the whole document	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/077113

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101984043 A	09.03.2011	None	
CN 1710062 A	21.12.2005	CN 100392061 C	04.06.2008
CN 1710060 A	21.12.2005	CN 100400642 C	09.07.2008
CN 1710061 A	21.12.2005	CN 100400643 C	09.07.2008
CN 1504109 A	16.06.2004	WO 2004048553 A1	10.06.2004
		JP 2004187675 A	08.07.2004
		KR 20040048334 A	09.06.2004
		AU 2003302458 A1	18.06.2004
		AU 2003302458 A8	18.06.2004
		JP 3990336 B2	10.10.2007
		KR 100589904 B	15.06.2006
		TW 294913 B	21.03.2008
		TW 200504208 A	01.02.2005
		CN 100500828 C	17.06.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077113

CONTINUATION OF BOX A:

IPC:

C12N 1/12 (2006.01) i

C12R 1/89 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/077113

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, 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))

数据库: EPODOC, WPI, CNPAT, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE

检索词: 硅藻, 藻, 开放, 培养, 养殖, pH, 盐酸, 醋酸, 碳酸氢钠, diatom, algae, open culture, HCl, HAc, NaHCO₃

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101984043A (王兆凯), 09.03 月 2011 (09.03.2011), 参见权利要求 1-4	1-4
A	CN1710060A (徐州师范大学), 21.12 月 2005 (21.12.2005), 参见全文	1-4
A	CN1710062A (徐州师范大学), 21.12 月 2005 (21.12.2005), 参见全文	1-4
A	CN1710061A (徐州师范大学), 21.12 月 2005 (21.12.2005), 参见全文	1-4
A	CN1504109A (雅马哈发动机株式会社等), 16.06 月 2004 (16.06.2004),	1-4

☒ 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
10.10 月 2011 (10.10.2011)

国际检索报告邮寄日期
20.10 月 2011 (20.10.2011)

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

王慧梅
电话号码: (86-10) **62411090**

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	参见全文 李雅娟等, “氮、磷、铁、硅营养盐对底栖硅藻生长速率的影响”, 大连水产学院学报, ISSN: 1000-9957, 第 13 卷, 第 4 期, p7-14, 31.12 月 1998 (31.12.1998), 参见全文	1-4
A	邹宁等, “培养条件对底栖硅藻生长的影响”, 水产养殖, ISSN: 1004-2091, 第 26 卷, 第 5 期, p11-13, 01.09 月 2005 (01.09.2005), 参见全文	1-4

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2011/077113

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101984043A	09.03.2011	无	
CN1710062A	21.12.2005	CN100392061C	04.06.2008
CN1710060A	21.12.2005	CN100400642C	09.07.2008
CN1710061A	21.12.2005	CN100400643C	09.07.2008
CN1504109A	16.06.2004	WO2004048553A1	10.06.2004
		JP2004187675A	08.07.2004
		KR20040048334A	09.06.2004
		AU2003302458A1	18.06.2004
		AU2003302458A8	18.06.2004
		JP3990336B2	10.10.2007
		KR100589904B	15.06.2006
		TW294913B	21.03.2008
		TW200504208A	01.02.2005
		CN100500828C	17.06.2009

A 栏的续页:

IPC:

C12N 1/12 (2006.01)i

C12R 1/89 (2006.01)n