

(21)申請案號：098146446

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 31 日

(51)Int. Cl. : C12N1/12 (2006.01)

(30)優先權：2009/01/13 美國 61/204,920

(71)申請人：阿法傑研發有限合夥公司 (加拿大) ALPHA-J RESEARCH LIMITED PARTNERSHIP
(CA)

加拿大

(72)發明人：麥可卡夫雷 威廉 MCCAFFREY, WILLIAM (US)；柏瑞 羅伯特 愛德華
BURRELL, ROBERT EDWARD (CA)；柏瑞 馬克 史帝芬 BURRELL, MARK
STEPHEN (CA)；寇特科 布雷特 KOTELKO, BRETT (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：6 共 57 頁

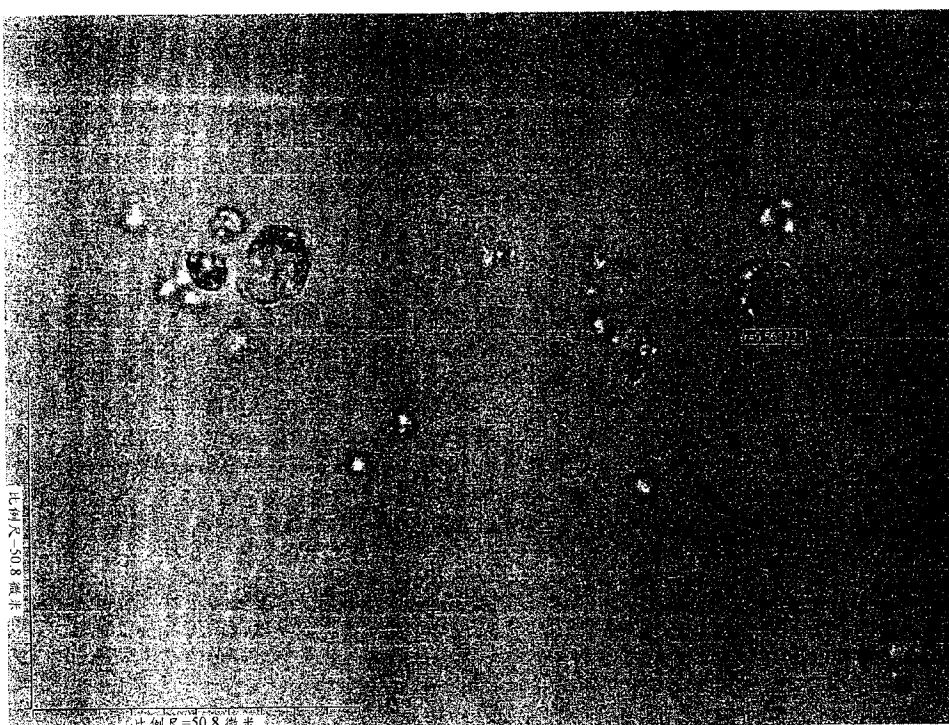
(54)名稱

使用植物生長調節劑增進藻類生長以生產附加值產品

USE OF PLANT GROWTH REGULATORS TO ENHANCE ALGAE GROWTH FOR THE
PRODUCTION OF ADDED VALUE PRODUCTS

(57)摘要

本發明提供一種增進自以自養方式、異養方式或光異養方式生長之藻類生產生物質的方法，其係經由使用植物生長調節劑(例如生長激素、吡啶乙酸等)及激素模擬物(苯氧基乙酸化合物等)來達成。植物生長調節劑或其模擬物可進一步在藻類培養物或所收穫生物質中增加期望附加值產品(例如生物柴油或澱粉)之比例。



(21)申請案號：098146446

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 31 日

(51)Int. Cl. : C12N1/12 (2006.01)

(30)優先權：2009/01/13 美國 61/204,920

(71)申請人：阿法傑研發有限合夥公司(加拿大) ALPHA-J RESEARCH LIMITED PARTNERSHIP
(CA)

加拿大

(72)發明人：麥可卡夫雷 威廉 MCCAFFREY, WILLIAM (US)；柏瑞 羅伯特 愛德華
BURRELL, ROBERT EDWARD (CA)；柏瑞 馬克 史帝芬 BURRELL, MARK
STEPHEN (CA)；寇特科 布雷特 KOTELKO, BRETT (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：39 項 圖式數：6 共 57 頁

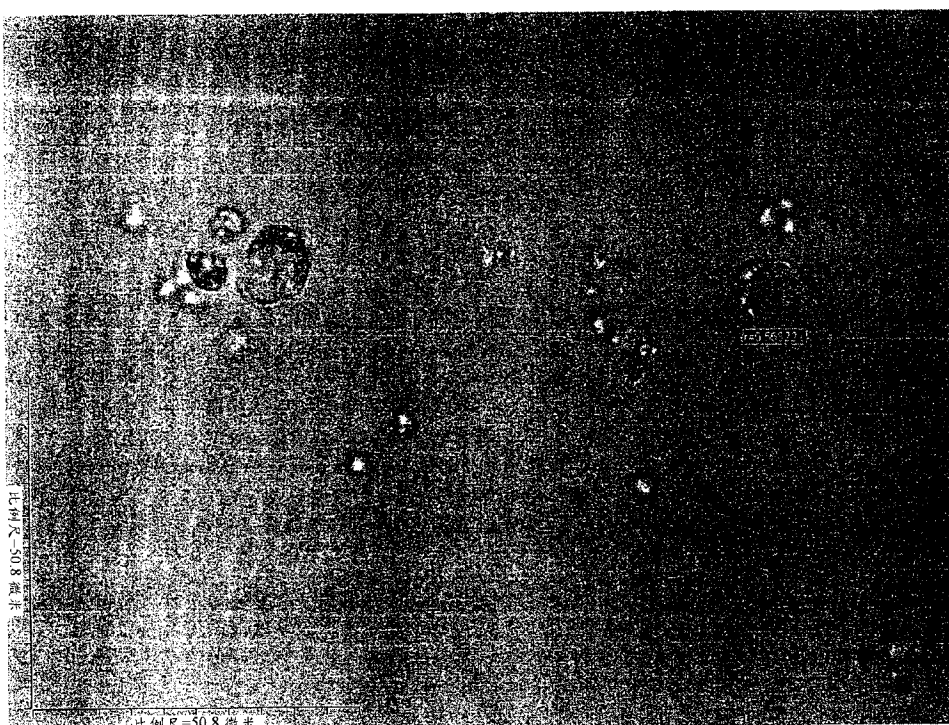
(54)名稱

使用植物生長調節劑增進藻類生長以生產附加值產品

USE OF PLANT GROWTH REGULATORS TO ENHANCE ALGAE GROWTH FOR THE
PRODUCTION OF ADDED VALUE PRODUCTS

(57)摘要

本發明提供一種增進自以自養方式、異養方式或光異養方式生長之藻類生產生物質的方法，其係經由使用植物生長調節劑(例如生長激素、吡啶乙酸等)及激素模擬物(苯氧基乙酸化合物等)來達成。植物生長調節劑或其模擬物可進一步在藻類培養物或所收穫生物質中增加期望附加值產品(例如生物柴油或澱粉)之比例。



六、發明說明：

本申請案在35 U.S.C. § 119(e)下主張2009年1月13日提出申請之美國臨時專利申請案第61/204,920號之申請日期的權利，其全部內容以引用方式併入本文中。

【先前技術】

藻類係地球上最多產且分佈廣泛之有機體群之一。目前已知有150,000種以上之藻類，且很可能還有很多種仍有待發現的藻類。對於大部分藻類而言，基本的識別特性及性質已眾所周知，但在生命之總體分類法中對於如何分類所有不同藻類可能具有一些不確定性。

藻類(包含具有許多不同大小及顏色之類植物形式、矽藻類及藍藻細菌)組成了地球上最重要的生命類型中的一種，其負責我們所需的大部分空氣以及形成許多其他生命形式之食物鏈的基礎。整個生態系統伴隨藻類進化或與藻類共生，且藻類環境包含食物源、捕食者、病毒及通常與更高級生命形式聯繫之許多其他環境要素。

不管藻類之範圍及重要性如何，應限制人類直接使用。藻類通常以「海藻」形式生長或收穫作為食物(尤其在亞洲)。其亦廣泛用於生產諸如著色劑及食物添加劑等各種成份。藻類亦用於工業過程中來濃縮及去除重金屬污染物，且矽藻殘餘物(稱作矽藻土)可用作過濾介質並用於其他應用。

藻類亦可生產油、澱粉及氣體，該等物質可用於生產柴油、醇(例如乙醇)、及氫氣或甲烷氣體。

儘管其他生物材料亦可產生該等燃料，但藻類之突出特徵在於其高生產力及低理論成本。藻類之生長速度可比其他形式之植物快10至100倍。藻類亦可高度多產性地用於生產期望油或澱粉，在一些情形下可生產多達60%之其自身重量的該等形式。除高產率益處外，使用藻類用於生物產品並不與耕地農業競爭，其無需農田及淡水。此外，藻類以最基本的投入達成所有該等益處，其在大多數情形下僅需要陽光、水分、空氣、二氧化碳及簡單營養素，此乃因其係光自養生物。

儘管藻類具有用作燃料源之明顯潛在益處，但過去實際上已證實，因諸多原因，達成此潛能遇到挫折且難以達成。舉例而言，藻類細胞增殖之最佳條件並未明確界定，且其通常與附加值生物產品(例如油/脂質或多醣)之最佳生產所需的彼等條件不同。

【發明內容】

本發明提供使用某些植物生長調節劑(例如生長激素)調節藻類生長以用於(例如)生產附加值生物產品(例如油或澱粉)的系統及方法。

因此，本發明之一態樣提供促進藻類細胞增殖之方法，其包括在植物生長調節劑或其模擬物存在下培養藻類以增加藻類細胞數量。

在某些實施例中，藻類細胞數量增加至少約5%、10%、20%、50%、75%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、 10^4 倍(4 log)、 10^5 倍(5 log)、 10^6 倍(6

log)、 10^7 倍(7 log)、 10^8 倍(8 log)、 10^9 倍(9 log)或更多。

在某些實施例中，藻類細胞之分裂速率增加至少約5%、10%、20%、50%、75%、100%、200%、500%、1,000%等或更多。

在某些實施例中，藻類培養物在本發明之培養條件下之群體倍增時間為約0.05-2天。

在某些實施例中，植物生長調節劑包括至少一種、兩種、三種、四種、五種或更多種選自生長素(Auxin)、細胞分裂素(Cytokinin)、赤黴素(Gibberellin)及/或其混合物之生長激素。較佳地，生長激素包含至少一或兩種來自選自生長素、細胞分裂素、或赤黴素之每一種/類激素者。

舉例而言，生長素可包括吲哚乙酸(IAA)及/或1-萘乙酸(NAA)。其他生長素模擬物可為2,4-D；2,4,5-T；吲哚-3-丁酸(IBA)；2-甲基-4-氯苯氧基乙酸(MCPA)；2-(2-甲基-4-氯苯氧基)丙酸(2甲4氯丙酸(mecoprop)，MCPP)；2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸(2,4-滴丙酸(dichlorprop)，2,4-DP)；或(2,4-二氯苯氧基)丁酸(2,4-DB)。

在某些實施例中，赤黴素包括GA3。

在某些實施例中，細胞分裂素係腺嘌呤型細胞分裂素或苯脲型細胞分裂素。舉例而言，腺嘌呤型細胞分裂素或模擬物可包括激動素、玉米素、及/或6-苄胺嘌呤，且苯脲型細胞分裂素可包括二苯脲及/或苯基噻二唑脲(TDZ)。

在某些實施例中，植物生長調節劑進一步包括維他命B1或其類似物/模擬物。

在某些實施例中，僅使用標的生長調節劑(例如生長素家族生長調節劑或細胞分裂素家族生長調節劑)中之一種來用於藻類生長。

在某些實施例中，使用一種以上的標的生長調節劑。在某些實施例中，使用至少一種生長素家族生長調節劑及至少一種細胞分裂素家族生長調節劑，且至少一種生長素與至少一種細胞分裂素之重量比率為約1:2-2:1 (w/w)，較佳約1:1 (w/w)。在某些實施例中，生長素與赤黴素之比率(w/w)為約1:2-2:1，較佳約1:1。在某些實施例中，生長素與維他命B1之比率(w/w)為約1:4-1:1，較佳約1:2。

在某些實施例中，模擬物係苯氧基乙酸化合物。

在某些實施例中，該方法進一步包括在具有最佳細胞增殖所需之無限制營養素及痕量元素含量的培養基中培養藻類。

在某些實施例中，營養素包含一或多種C、N、P、S、及/或O源。較佳地，營養素之濃度對細胞分裂及/或生長而言無毒。

在某些實施例中，培養基可包括厭氧生物消解物(biodigestate)之液體分離物，視需要在需要時按需補充有其他營養素。厭氧生物消解物可源自動物內臟、家畜糞肥、食物加工廢物、城市廢水、稀廢醪、酒粕、或其他有機材料之厭氧消解。

在某些實施例中，營養素濃度對細胞分裂及/或生長而言無毒。

在某些實施例中，在最適合細胞分裂之溫度下培養藻類，該最適合溫度對於非嗜熱性藻類而言介於約0-40°C之間且對於嗜熱性藻類而言為約40-95°C、或約60-80°C。

在某些實施例中，在生物反應器中培養藻類。較佳地，生物反應器適於最佳細胞增殖。較佳地，可對生物反應器進行滅菌。

在某些實施例中，使用異養、光異養、或自養生理機制使藻類發生代謝。

在某些實施例中，藻類係黃藻(Chromophyte)，較佳為綠藻(Chlorophyte)或矽藻(Bacillariophyte)。在某些實施例中，藻類係小球藻(*Chlorella* sp.)(例如普通小球藻(*Chlorella vulgaris*))、植物綠藻(*Auxenochlorella* sp.)(原殼綠藻(*Auxenochlorella protothecoides*))、柵藻(*Scenedesmus* sp.)及纖維藻(*Ankistrodesmus* sp)等。在某些實施例中，藻類具有矽藻細胞之游離形式。在某些實施例中，藻類並非褐藻類(褐藻綱(*Phaeophyceae*))或紅藻類。在某些實施例中，藻類並非破囊壺菌(*Thraustochytriales*)。

本發明之另一態樣提供產生藻類產品之方法，其包括在植物生長調節劑或其模擬物存在下培養藻類以累積藻類產品。

在某些實施例中，藻類細胞數量增加至多約1,000%、300%、200%、100%、或50%。

在某些實施例中，藻類生物質顯著增加。舉例而言，在某些實施例中，藻類生物質增加至少約5%、10%、20%、

40%、60%、80%、100%、150%、200%。在某些實施例中，藻類生物質在很大程度上係由於累積該藻類產品而增加。

在某些實施例中，在限氮培養基或具有最適合合成藻類產品之氮含量之培養基中培養藻類。

在某些實施例中，植物生長調節劑包括油刺激因子。舉例而言，油刺激因子可包括腐殖酸物質，例如富啡酸或腐殖酸。

在某些實施例中，在生物反應器中培養藻類。較佳地，生物反應器適用於藻類產品之最佳生產。

在某些實施例中，藻類產品係油或脂質，例如包括 ω -3 (Omega-3)、 ω -6、及/或 ω -9之藻類產品。

在某些實施例中，藻類產品係澱粉(或多糖)。在澱粉或多糖係期望藻類產品時，藻類較佳不接受限氮之生長條件。

本發明之另一態樣提供適用於本發明之藻類生長方法之系統。較佳地，可對生物反應器進行滅菌以促進在異養及光異養條件下之無菌藻類生長。

期望在適用處可組合本文所述之所有實施例與其他實施例中之特徵。

【實施方式】

本發明一態樣係部分地基於以下發現：可藉由某些植物生長調節劑或其模擬物來刺激藻類生長(例如在(例如)指數生長階段或指數生長階段後期間之細胞增殖)。

因此，本發明之一態樣提供促進藻類細胞增殖之方法，其包括在植物生長調節劑或其模擬物存在下培養藻類以增加藻類細胞數量。

植物激素或調節劑影響基因表現及轉錄程度、細胞分裂及植物生長。人類合成了大量相關化合物，且已使用其來調節所培養植物、雜草及活體外生長之植物及植物細胞的生長。該等人造化合物有時稱作植物生長調節劑或簡稱為PGR。對於合成調節劑而言，其可與天然存在之調節劑相同，或者其可含有在自然界中未發現之化學修飾物。本文所用之「植物激素(或其模擬物)」包含天然植物激素及人造/合成調節劑、其模擬物或衍生物。較佳地，生長激素/調節劑、或其模擬物至少在一濃度下、較佳在與下文實例(例如實例3-7)中所用條件類似或相同之條件下刺激藻類生長。術語「生長激素」及「生長調節劑」在本文中可互換使用。

通常，植物激素及調節劑分為五大類，一些係由在不同植物間結構可有所變化之許多不同化學物質構成。該等化學物質根據其結構相似性及其對於植物生理學之影響而各自分組成該等種類中之一種。其他植物激素及生長調節劑不易於分組成該等種類。而是，其天然存在或藉由人類或其他有機體合成，包含抑制植物生長或干擾植物內之生理過程之化學物質。

該五大類係：脫落酸(亦稱作ABA)；生長素；細胞分裂素；乙烯；及赤黴素。其他確認之植物生長調節劑包含：

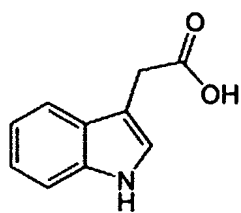
油菜甾醇內酯(Brassinolides)(在化學上與動物類固醇激素相似之植物類固醇。其促進細胞伸長及細胞分裂、木質部組織之分化並抑制葉片脫離)；水楊酸(其活化在一些植物中可產生有助於防禦致病侵入物之化學物質的基因)；茉莉酸酯(Jasmonate)(自脂肪酸產生且似乎促進產生用於防禦入侵有機體之防禦性蛋白質。據信，其亦用於種子發芽且影響蛋白質在種子中之儲存，且似乎影響根生長)；植物肽激素(涵蓋涉及細胞至細胞信號傳導之所有小分泌肽。該等小肽激素在植物生長及發育(包含防禦機制)、控制細胞分裂及擴增、及花粉自交不親和性中起重要作用)；聚胺(在迄今為止研究之所有有機體中發現之具有低分子量的強鹼性分子。其對植物生長及發育至關重要且影響有絲分裂及減數分裂過程)；一氧化氮(NO)(用作激素及防禦反應中之信號)；巫婆醇內酯(Strigolactones)(參與抑制苗分支)。

脫落酸類之PGR係由通常在植物葉中產生之一種化合物組成，其源於葉綠體，尤其在植物處於應力下時。通常，其用作影響芽生長、種子及芽休眠之抑制性化合物。

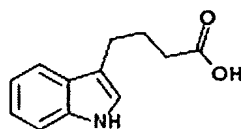
生長素係正性影響細胞增大、芽形成及生根之化合物。其亦促進其他激素之產生並與細胞分裂素有關，其控制莖、根、及果實之生長並將莖轉變成花。生長素藉由改變細胞壁之可塑性來影響細胞伸長。生長素在光中會減少且在黑暗中會增加。生長素在濃度較大時對植物具有毒性；其對雙子葉植物之毒性最大且對單子葉植物之毒性較小。

鑒於此性質，已研究包含2,4-D及2,4,5-T之合成生長素除莠劑並用於除草。生長素、尤其1-萘乙酸(NAA)及吲哚-3-丁酸(IBA)亦通常用於在切削植物時刺激根生長。植物中發現之最常見生長素係吲哚乙酸或IAA。

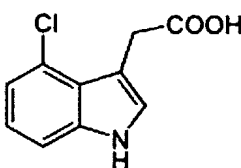
生長素家族之重要成員係吲哚-3-乙酸(IAA)。其在完整植物中產生大部分生長素效應，且係最有效的天然生長素。然而，IAA分子在水溶液中化學不穩定。其他天然存在之生長素包含4-氯-吲哚乙酸、苯乙酸(PAA)及吲哚-3-丁酸(IBA)。常見之合成生長素類似物包含1-萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)、及其他。可用於本發明中之若干實例性(非限制性)天然及合成生長素如下所示。



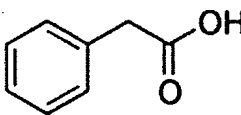
吲哚-3-乙酸(IAA)；



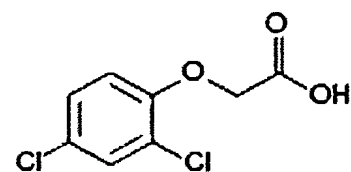
吲哚-3-丁酸(IBA)；



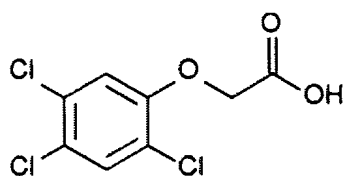
4-氯吲哚-3-乙酸(4-Cl-IAA)；



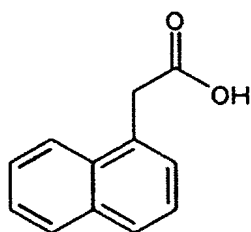
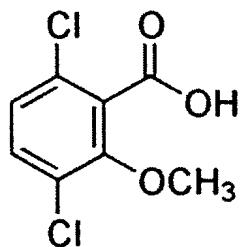
2-苯乙酸(PAA)；



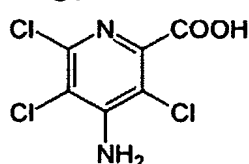
2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)；



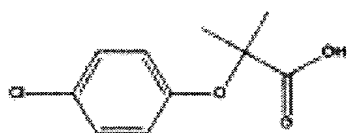
2,4,5-三氯苯氧基乙酸(2,4,5-T)；

 α -萘乙酸(α -NAA)；

2-甲氧基-3,6-二氯苯甲酸(麥草畏(dicamba))；

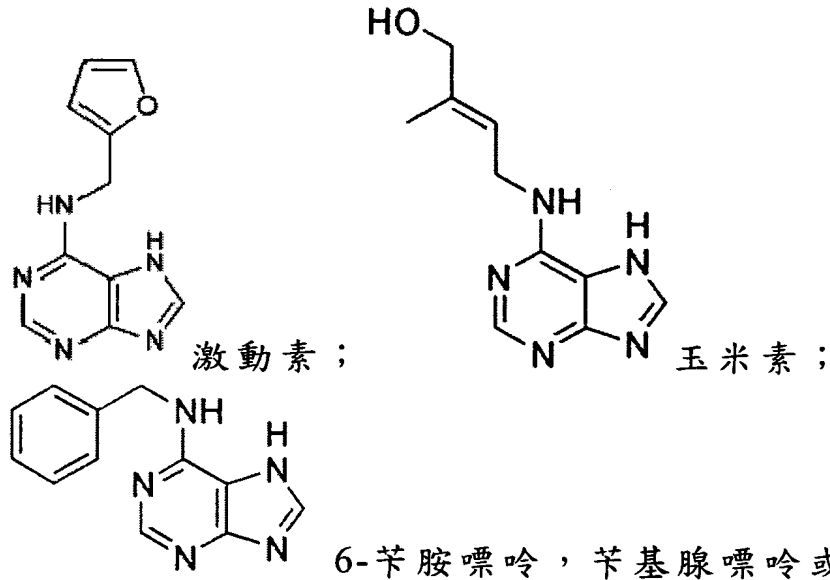


4-胺基-3,5,6-三氯吡啶甲酸(毒莠定(tordon或picloram))；

 α -(對氯苯氧基)異丁酸(PCIB，抗生長素)。

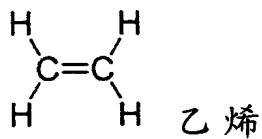
細胞分裂素或CK係影響細胞分裂及苗形成之化學物質群。其亦幫助延遲組織之衰老或老化，且負責調介生長素經過植物之輸送，並影響結間長度及葉生長。其與生長素具有高度協同性，且該兩種植物激素群之比率在植物生命期間可影響大部分主要生長期。細胞分裂素抵抗由生長素誘導之頂端優勢；其與乙烯一起促進葉、花部分及果實之脫落。

存在兩類細胞分裂素：腺嘌呤型細胞分裂素(代表有激動素、玉米素及6-苄胺嘌呤)，以及苯脲型細胞分裂素(例如二苯脲或苯基噻二唑脲(TDZ))。



乙烯係由存於所有細胞中之甲硫胺酸經過楊氏循環 (Yang Cycle) 分解形成的氣體。其用作植物激素之有效性取決於其產生速率與其逸出至大氣之速率的對比。乙烯在快速生長及分裂中之細胞中以較快速率產生，尤其在黑暗中。新生長及新發芽之幼苗所產生乙烯多於逸出植物之乙烯，此使得乙烯量增加，進而可抑制葉伸展。隨著新苗曝露於光，植物細胞中光敏色素之反應產生使乙烯生成減少之信號，進而容許葉伸展。乙烯影響細胞生長及細胞形狀；當生長中之幼苗於地下遇到障礙物時，乙烯生成大大增加，阻止細胞伸長並促使莖發生膨脹。所產生較粗的莖可向阻礙其到達表面之路徑之物體施加更大壓力。若苗並未到達表面而乙烯刺激延長時，會影響莖的自然向地性反應(即，直立生長)，而使其在物體周圍生長。研究似乎顯

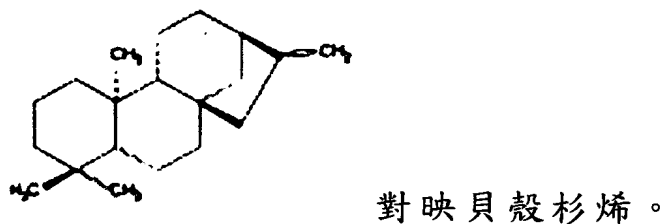
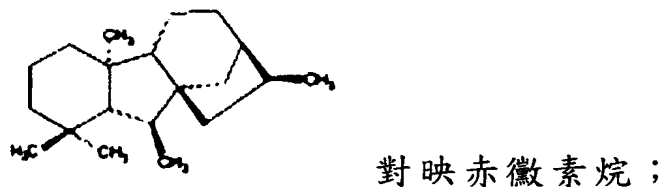
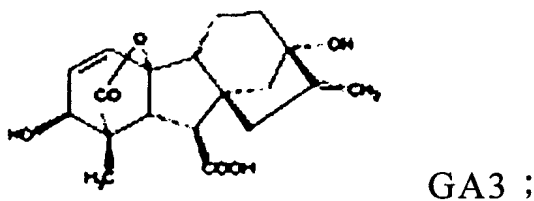
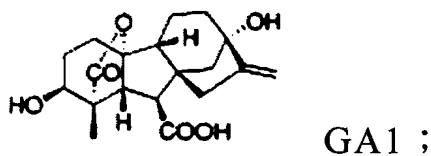
示乙烯會影響莖之直徑及高度：在莖受到風從而產生橫向應力時，生成更多乙烯，從而產生更粗、更強健的樹幹及枝。乙烯可影響果實成熟：通常，在種子成熟時，乙烯產量增加，並在果實內累積，從而在種子分散之前產生後熟變化。藉由乙烯生成來調控核蛋白 ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)，且進而調控包含ABA及應激激素在內之其他激素。



赤黴素或GA包括植物內天然產生及由真菌產生之較大範圍的化學物質。赤黴素對種子發芽很重要，其會影響可促進用於新細胞生長之食物生成的酶生成。此係藉由調整染色體轉錄來進行。在穀類(稻米、小麥、玉米等)種子中，稱作糊粉層之細胞層包圍著胚乳組織。種子吸收水分使得產生GA。GA被輸送至糊粉層，其效應為產生可分解在胚乳內所儲存食物儲備物之酶，該等酶被生長中之幼苗利用。GA引起花結形成之植物發生抽苔，進而增加結間長度。其會促進開花、細胞分裂、及發芽後之種子生長。赤黴素亦反向抑制苗生長及由ABA誘導之休眠。

所有已知赤黴素皆係藉由萜類路徑在質體中合成且然後在內質網及細胞溶膠中修飾直至達到其生物活性形式的二萜酸。所有赤黴素皆衍生自對映赤黴素烷骨架，但經由對映貝殼杉烯合成。赤黴素以發現之順序命名為GA1....GAn。赤黴酸係GA3，其係欲在結構上予以描述之

第一赤黴素。在2003年，自植物、真菌、及細菌鑑別出126種GA。赤黴素係四環二萜酸。根據存在19個碳還是20個碳，有兩類赤黴素。19-碳赤黴素(例如赤黴酸)失去碳20且在此位置具有連接碳4及碳10之5員內酯橋。19-碳形式通常係赤黴素之生物活性形式。羥基化亦對赤黴素之生物活性具有重大影響。通常，最具生物活性之化合物係二羥基化赤黴素，其在碳3及碳13上具有羥基。赤黴酸係二羥基化赤黴素。代表性(非限制)赤黴素如下所示：



可用於本發明之實例性生長激素/調節劑或其模擬物(例如，添加至藻類培養物中以促進細胞分裂或增殖者)包含彼等屬於生長素家族、細胞分裂素家族、及/或赤黴素家族者。

舉例而言，用於本發明之生長素及模擬物包含(不限

於)：吲哚乙酸(IAA)；2,4-D；2,4,5-T；1-萘乙酸(NAA)；吲哚-3-丁酸(IBA)；2-甲基-4-氯苯氧基乙酸(MCPA)；2-(2-甲基-4-氯苯氧基)丙酸(2甲4氯丙酸，MCP)；2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸(2,4-滴丙酸，2,4-DP)；(2,4-二氯苯氧基)丁酸(2,4-DB)；4-氯-吲哚乙酸(4-Cl-IAA)；苯乙酸(PAA)；2-甲氧基-3,6-二氯苯甲酸(麥草畏)；4-胺基-3,5,6-三氯吡啶甲酸(毒莠定(tordon或picloram))； α -(對氯苯氧基)異丁酸(PCIB，抗生長素)、或其混合物。在用作混合物時，混合物較佳與有效量IAA(在單獨使用時)或有效量IAA+NAA具有等效生物活性(例如，在基本相同生長條件下及較佳在基本相同量時間內，刺激藻類細胞生長至基本相同程度)。舉例而言，參見下文實例中所用之條件。

用於本發明之細胞分裂素及模擬物可為腺嘌呤型或苯脲型，且可包含(不限於)激動素、玉米素、6-苄胺嘌呤(6-BA或6-BAP)、二苯脲、苯基噻二唑脲(TDZ)、或其混合物。較佳使用腺嘌呤型細胞分裂素，例如激動素、玉米素、6-苄胺嘌呤(6-BA或6-BAP)、或其混合物。在用作混合物時，混合物較佳與有效量之激動素+6-BA具有等效生物活性(例如，在基本相同生長條件下及較佳在基本相同量時間內，刺激藻類細胞生長至基本相同程度)。舉例而言，參見下文實例中所用之條件。

用於本發明之赤黴素及模擬物可為本文所述或業內已知之赤黴素中之任一者，例如GA3。較佳地，赤黴素、其模擬物或衍生物、或混合物與有效量之GA3具有等效生物活

性(例如，在基本相同生長條件下及較佳在基本相同量時間內，刺激藻類細胞生長至基本相同程度)。舉例而言，參見下文實例中所用之條件。

模擬物亦可為苯氧基乙酸化合物。

為達成最佳生長刺激效果，在某些實施例中，僅使用標的生長調節劑中之一種(例如生長素家族生長調節劑、細胞分裂素家族生長調節劑、或赤黴素家族生長因子)來用於藻類生長。在某些其他實施例中，使用一種以上之標的生長調節劑。舉例而言，可使用至少一種生長素家族生長調節劑及至少一種細胞分裂素家族生長調節劑，且可將培養基中總生長素與總細胞分裂素之(重量)比率調節至約1:2-2:1，較佳約1:1。

較佳地，在存在赤黴素時，可將培養基中總生長素與總赤黴素之(重量)比率調節至約1:2-2:1，較佳約1:1。

在某些實施例中，可存在維他命B1或其模擬物、衍生物、或功能等效物。較佳地，可將培養基中總生長素與總維他命B1之(重量)比率調節至約1:4-1:1，較佳約1:2。

在某些實施例中，生長培養基中生長素之總濃度係約0.01-0.04 $\mu\text{g/L}$ 、約0.003-0.12 $\mu\text{g/L}$ 、約0.002-0.2 $\mu\text{g/L}$ 、或約0.001-0.4 $\mu\text{g/L}$ 。

在某些實施例中，生長培養基中細胞分裂素之總濃度係約0.01-0.04 $\mu\text{g/L}$ 、約0.003-0.12 $\mu\text{g/L}$ 、約0.002-0.2 $\mu\text{g/L}$ 、或約0.001-0.4 $\mu\text{g/L}$ 。

在某些實施例中，生長培養基中赤黴素之總濃度係約

0.01-0.04 $\mu\text{g/L}$ 、約 0.003-0.12 $\mu\text{g/L}$ 、約 0.002-0.2 $\mu\text{g/L}$ 、或約 0.001-0.4 $\mu\text{g/L}$ 。

在某些實施例中，生長培養基中維他命B1化合物之總濃度係約 0.02-0.08 $\mu\text{g/L}$ 、約 0.006-0.24 $\mu\text{g/L}$ 、約 0.004-0.4 $\mu\text{g/L}$ 、或約 0.002-0.8 $\mu\text{g/L}$ 。

在某些實施例中，可使用乙烯、油菜甾醇內酯、水楊酸、茉莉酸酯、植物肽激素、聚胺、一氧化氮、及/或巫婆醇內酯。

在某些實施例中，可使用乙烯、油菜甾醇內酯、茉莉酸酯、植物肽激素、及/或聚胺。

在某些實施例中，較佳在各實例(例如，實例3-7)中之生長條件中之一者下，一或多種激素/調節劑之存在將藻類增殖增加約15%(例如，1.4至1.6)、20%、25%、30%、35%或更多。

根據本發明之此態樣，藻類細胞數量可增加至少約5%、10%、15%、20%、50%、75%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、 10^4 倍(4 log)、 10^5 倍(5 log)、 10^6 倍(6 log)、 10^7 倍(7 log)、 10^8 倍(8 log)、 10^9 倍(9 log)、或更多。

不論在培養基中使用何種具體植物生長調節劑，可使用各種不同培養基來支持藻類生長。通常，適宜培養基可含有氮、痕量金屬(例如，磷、鉀、鎂、及鐵等)之無機鹽、維他命(例如，硫胺)及諸如此類，該等物質可對生長至關重要。舉例而言，可使用諸如下列培養基：VT培養基、C

培養基、MC培養基、MBM培養基、及MDM培養基(參見Sorui Kenkyuho, Mitsuo Chihara及Kazutoshi Nishizawa編輯, Kyoritsu Shuppan (1979))、OHM培養基(參見Fabregas等人, J. Biotech., 第89卷, 第65-71頁, (2001))、BG-11培養基、Bristol培養基、及其變化形式。適宜培養基之其他實例包含但不限於Luria Broth、半咸水、添加營養素之水、乳流、鹽度小於或等於1%之培養基、鹽度大於1%之培養基、鹽度大於2%之培養基、鹽度大於3%之培養基、鹽度大於4%之培養基及其組合。最佳培養基包含厭氧生物消解物之液體分離物, 視需要補充有額外營養素。液體可藉由機械方式自厭氧生物消解物分離, 例如藉由使用螺旋壓榨機或藉由離心。理想液體包括至多5-10%之固體內容物, 較佳至多8%之固體內容物。

該等培養基可端視其目的進行選擇, 例如期望藻類產品之生長或增殖或誘導。舉例而言, 對於最佳細胞分裂/增殖而言, 使用具有大量用作氮源之組份的培養基(例如, 豐富培養基: 含有至少約0.15 g/L, 以氮表示)。對於藻類產品生產(例如油)而言, 具有少量用作氮源之組份的培養基較佳(例如, 含有小於約0.02 g/L, 以氮表示)。或者, 可使用在該等培養基之間含有中等濃度之氮源的培養基(低營養素培養基: 含有至少0.02 g/L且小於0.15 g/L, 以氮表示)。

換言之, 在指數生長階段期間, 培養基較佳具有最佳細胞數量增加所需之無限制營養素(包含一或多種C、N、P、

S、及/或O源)及痕量元素的含量。較佳地，營養素濃度對細胞分裂及/或生長而言無毒。

培養基之氮濃度、磷濃度、及其他性質可取決於所接種藻類之量及其預期生長速率。舉例而言，在低營養素(例如氮)培養基中接種約 10^5 個細胞/毫升之藻類計數時，藻類將生長至某一程度，但生長將會因氮源量過小而停止。此一低營養素培養基適於在單一步驟中連續實施生長及藻類產品生產(例如，以間歇方式)。另外，藉由將N/P莫耳比率調節至約10-30、較佳15-25之值，或藉由將C/N莫耳比率調節至約12-80之值(例如，較低N含量)，可誘導藻類生產期望之生物產品(例如，油)。在用於接種之藻類計數較高之情形下，可使用豐富培養基實施上述培養。以此方式，可考慮各種條件來確定培養基之組成。

藻類生長培養基中之氮源或氮補充物可包含硝酸鹽、氨、尿素、亞硝酸鹽、銨鹽、氫氧化銨、硝酸銨、麩胺酸單鈉、可溶性蛋白質、不溶性蛋白質、水解蛋白質、動物副產品、牛奶場廢水、酪蛋白、乳清、水解酪蛋白、水解乳清、大豆產品、水解大豆產品、酵母、水解酵母、玉米漿、玉米浸漬液、玉米浸漬固體、酒粕、酵母提取物、氮氧化物、 N_2O 、或其他適宜源(例如，其他肽、寡肽及胺基酸等)。碳源或碳補充物可包含糖、單糖、二糖、糖醇、脂肪、脂肪酸、磷脂、脂肪醇、酯、寡糖、多糖、混合糖、甘油、二氧化碳、一氧化碳、澱粉、水解澱粉、或其他適宜源(例如，其他5-碳糖等)。

其他培養基成份或補充物可包含緩衝劑、礦物質、生長因子、消泡劑、酸、鹼、抗生素、表面活性劑、或抑制不期望細胞之生長之材料。

所有營養素皆可在開始時添加，或一些在開始時添加且一些在生長過程期間隨後單獨添加、在藻類生長期間作為連續進料添加、在生長過程期間多次供給相同或不同營養素、或該等方法之組合。

若需要，可在開始時或在生長過程期間經由使用緩衝劑或藉由添加酸或鹼來控制或調節培養物之pH。在一些情形下，可在相同或不同時間在反應器之不同區域或相同區域使用酸及鹼來達成以期望程度控制pH。緩衝劑系統之非限制性實例包含單-、二-、或三-鹼式磷酸鹽、TRIS、TAPS、二羥乙甘胺酸、三羥乙甘胺酸、HEPES、TES、MOPS、PIPES、二甲基胍酸鹽、MES、及乙酸鹽。酸之非限制性實例包含硫酸、HCl、乳酸、及乙酸。鹼之非限制性實例包含氫氧化鉀、氫氧化鈉、氫氧化銨、氨、碳酸氫鈉、氫氧化鈣、及碳酸鈉。經添加以改變pH之該等酸及鹼之一些亦可用作細胞營養素。可在整個生長過程中將培養物之pH控制為接近恆定值，或其可在生長期間有所變化。該等變化可用於開始或終止不同的分子路徑，從而促進一種特定產品之生產，促進諸如脂肪、染料或生物活性化合物等產品之累積，抑制其他微生物之生長，抑制或促進發泡體生產，促使細胞進入休眠狀態，使其自休眠狀態復原，或用於某些其他目的。

在某些實施例中，較佳地在整個培養期間將pH維持為約4-10、或約6-8。

同樣，在一些實施例中，可將培養物之溫度控制或調節至接近特定值，或在生長過程期間其可有所變化以用於針對pH變化所列示之相同或不同目的。舉例而言，細胞分裂之最適合溫度可為對於嗜熱性藻類而言介於約0-40℃、20-40℃、15-35℃、或約20-25℃之間，且對於嗜熱性藻類而言為約40-95℃、較佳約60-80℃。

在某些該等實施例中，所提供之溫度控制組件包括溫度量測組件來量測系統內之溫度(例如培養基之溫度)及控制組件以可響應量測來控制溫度。控制組件可在培養物容器之側面或底部壁上包括浸沒線圈或夾套。

藻類可在自然環境(例如開口池、溝槽、或溝渠等)或密閉生物反應器(容器或器皿等)中培養。若需要改變或調節生長條件，則藻類培養物可在第一生長條件下於第一生物反應器中生長，且在第二生長條件下於第二生物反應器中生長等。可使用單獨的培養罐或器皿以間歇方式獨立地實施不同步驟。亦可在一步驟結束時洗滌並收集生長之藻類，將藻類放回同一培養罐中，且然後實施下一步驟。在某些實施例中，洗滌係可選的，且端視第一反應器中之培養基而定可能需要或可能不需要。

可以間歇模式、連續模式、或半連續模式來操作開口池(或溝槽等)或密閉(較佳可滅菌)生物反應器。舉例而言，在間歇模式中，使用新鮮及/或循環之培養基及接種物將

池/生物反應器填充至適宜位準。然後使此培養物生長直至發生期望程度的生長。此時，收穫產品。在一實施例中，收穫全部池/生物反應器內容物，然後可視需要清洗池/生物反應器並消毒(例如，將生物反應器滅菌)，且使用培養基及接種物重新填充。在另一實施例中，僅收穫一部分內容物(例如約50%)，然後添加培養基以重新填充池/生物反應器並繼續生長。

或者，在連續模式中，向池/生物反應器連續供給新鮮及/或循環之培養基及新鮮接種物同時連續收穫細胞材料。在連續作業中，可具有初始啟動期，其中將收穫延遲以累積足夠之細胞濃度。在此啟動期期間，可中斷培養基供給及/或接種物供給。或者，可向池/生物反應器中添加培養基及接種物且在池/生物反應器達到期望液體體積時，開始收穫。可視需要使用其他啟動技術以滿足操作需要且視需要用於特定產品有機體及生長培養基。在第一池/生物反應器中生長培養物時，可將約10-90%、或20-80%、或30-70%之培養物轉移至第二池/生物反應器中，同時殘餘內容物在第一池/生物反應器中用作隨後生長的起始培養物。或者，將約100%之培養物轉移至第二池/生物反應器中，同時自新的源對第一池/生物反應器進行接種。

可以「攪拌模式」或「活塞流模式」或「組合模式」來操作連續池/生物反應器培養物。在攪拌模式中，添加培養基及接種物並在具有一般體積之池/生物反應器中混

合。混合器件包含但不限於在垂直、水平或組合方向上作業之漿輪、螺旋槳、渦輪、攪拌槳、或氣升式混合器。在一些實施例中，混合可藉由通過添加培養基或接種物所產生之湍流來達成或予以輔助。細胞及培養基組份之濃度在橫跨池/生物反應器之水平區域上變化並不大。在活塞流模式中，在池/生物反應器之一端添加培養基及接種物，且在另一端收穫。在活塞流模式中，培養物通常自培養基入口朝收穫點移動。細胞生長隨著培養物自入口移動至收穫位置而進行。培養物之移動可經由包含但不限於以下之方式來達成：傾斜池/生物反應器、混合器件、幫浦、鼓吹氣體經過池/生物反應器表面、及與在池/生物反應器一端添加材料並在另一端去除相關之移動。可在池/生物反應器之不同點添加培養基組份以提供不同生長條件來用於細胞生長之不同時期。同樣，培養物之溫度及pH在池/生物反應器之不同點可有所變化。視需要，可在不同點提供返混。可經由使用混合器、攪拌槳、擋板或其他適宜技術來達成充分混合。

在組合模式中，一部分池/生物反應器係以活塞流模式作業，且一部分係以攪拌模式作業。舉例而言，可在攪拌區域中添加培養基以產生「自注入」或「自接種」系統。具有生長中細胞之培養基自攪拌區移動至活塞流區，在此細胞繼續生長直至收穫點。端視期望效果，可將攪拌區置於池/生物反應器之開始端、中部或接近末端處。除產生自注入培養物外，該等攪拌區可用於包含但不限於以下之

目的：提供將細胞暴露於特定條件或濃度之特定試劑或培養基組份之特定停留時間。該等攪拌區可經由使用擋板、障壁、分流器、及/或混合器件來達成。

半連續培養物可藉由向池/生物反應器中裝填起始量之培養基及接種物來作業。隨著生長繼續進行，連續或間歇性地添加額外培養基。

在某些較佳實施例中，藻類培養物可在一或多個密閉(較佳可滅菌)生物反應器中生長。可對該等密閉培養及收穫系統進行滅菌，由此顯著減少了以下問題：污染性藻類、細菌、病毒以及藻類消耗性微生物及/或其他外來物質。

本文所用之「滅菌」包含自表面、設備、食物或醫藥物件、或生物培養基有效殺死或消除可傳遞物質(例如，真菌、細菌、病毒、孢子形式等)的任一過程。滅菌可經由施加熱量、化學物質、輻照、高壓、過濾、或其組合來達成。至少存在兩大類滅菌：物理滅菌及化學滅菌。物理滅菌包含：加熱滅菌、輻射滅菌、高壓氣體滅菌(超臨界CO₂)。化學滅菌包含：環氧乙烷、臭氧、氯漂白劑、戊二醛、甲醛、過氧化氫、過乙酸、或醇(例如70%乙醇、70%丙醇)等。經由輻射之滅菌包含使用紫外(UV)光。本文所述之所有方式及業內已知之彼等方式皆可用於對用於本發明之培養罐、器皿、及容器進行滅菌。

在某些實施例中，該等生物反應器可經設計在戶外環境中安裝及作業，其中將其曝露於環境光及/或溫度。可設

計裝置、系統及方法以改進熱調控從而用於將溫度維持於適於最佳生長及油生產之範圍內。在某些實施例中，可在貧瘠或不能用於培養標準農作物(例如，玉米、小麥、大豆、芸苔或稻米)之土地上來構造及操作該等系統。

在某些實施例中，藻類可至少在某些階段期間在可滅菌或可不滅菌之開口池中生長。舉例而言，在某些實施例中，異養親鹽性藻類可在戶外於基於鹽水之培養基中生長，該等條件基本限制了所有其他細胞之生長。同樣，在某些實施例中，親熱性異養藻類可在限制基本所有其他有機體之生長之溫度下生長。

對用於培養藻類之最簡單裝置並無特定限制。然而，裝置較佳能夠供應用於自養生長之營養素(包含二氧化碳)及光，且視需要供應用於異養生長之營養素(包含有機碳)，且視需要能夠在光異養生長條件下使用光輻照培養物懸浮液。舉例而言，在小規模培養之情形下，較佳可使用平式培養瓶。在大規模培養之情形下(例如在輸液管或具有溝槽設計之系統中之培養)，可使用培養罐或器皿，培養罐或器皿係藉由透明板(例如，由玻璃、塑膠或諸如此類製得)構成且視需要配備有輻照裝置及攪拌器。此一培養罐之實例包含板型培養罐、管型培養罐、充氣圓頂型培養罐、及空心圓柱體型培養罐。在任一情形下，較佳使用密封容器。

儘管天然光可用於自養及光異養生長，但在本發明中亦可使用人工光源。在某些實施例中，在本發明中可使用引

導光源(天然或人工來源)。舉例而言，可使用太陽能收集器來聚集天然日光，天然日光進而可經由波導器(例如，光纖電纜)傳輸至特定位點(生物反應器)。較佳人工光源係LED，其提供最有效的光能源之一，此乃因LED可提供可用於最大電池利用之具有極特定波長的光。在某些實施例中，可使用發射波長為約400-500 nm、400-460 nm、620-680 nm或600-700 nm之光之LED。

可使用不同碳源來用於不同的藻類生長階段。舉例而言，可使用單糖作為碳源。或者，可使用CO₂作為碳源。

若使用CO₂作為碳源，則可藉由(例如)使其鼓泡經過水性培養基來將其引入密閉系統生物反應器。在一較佳實施例中，可藉由使氣體鼓泡經過多孔氣丁橡膠膜來引入CO₂，多孔氣丁橡膠膜產生具有高表面與體積比率之小氣泡以用於最大交換。在另一較佳實施例中，可在水體積底部引入氣泡，其中水以與氣泡移動相反之方向流動。此逆流佈置亦藉由增加氣泡暴露於水性培養基之時間來最大化氣體交換。為進一步增加CO₂之溶解，可增加水管柱之高度以延長氣泡暴露於培養基之時間。CO₂溶於水中以生成H₂CO₃，H₂CO₃然後可由光合藻類「固定」以產生有機化合物。舉例而言，可以約1-3% (v/v)之濃度在約0.2-2 vvm之速率下供應二氧化碳。在其他實施例中，亦可使用較高CO₂濃度(例如高達100%)及/或較低速率(例如，小於0.2 vvm)。在使用板型培養罐時，亦可藉由供應二氧化碳來攪拌培養物懸浮液，進而藻類(例如綠藻)可由光均勻輻照。

為使藻類培養物在不同生長條件之間轉移(例如藉由以相繼方式將其暴露於不同類型之植物生長調節劑)，可以物理方式收穫藻類並自培養基分離。可直接自池收穫或在將培養物轉移至儲存罐之後收穫。收穫步驟可包含自大量培養基分離細胞及/或將培養基重新用於其他批次之藻類培養物之步驟。

或者，可藉由以下方式來實現轉移培養基：連續稀釋在第一生長條件下(例如，第一植物生長調節劑)於第一生物反應器中生長之藻類培養物，並收集排出之藻類培養物以用於在第二生長條件下(例如，第二植物生長調節劑)於第二生物反應器中生長。

本發明之另一態樣係部分地基於以下發現：可使用某些植物生長調節劑來刺激某些藻類產品之生產。因此，本發明之另一態樣提供產生藻類產品之方法，其包括在植物生長調節劑或其模擬物存在下培養藻類以累積藻類產品。在一較佳實施例中，藻類產品係油/脂質。

較佳地，對於油生產而言，植物生長調節劑係油刺激因子，例如腐殖酸物質(例如富啡酸、腐殖酸或腐黑酸)。腐殖酸物質可得自各種來源，包含商業小販。在某些較佳實施例中，可使用下列程序來製備腐殖酸物質：使用約500 mL 1%之NaOH溶液使約25 g 粉末化風化褐煤材料(挖掘於Alberta, Canada，且由Black Earth Humates有限公司，Edmonton, Alta., T5L 3C1供應)水合。據信，此可將腐殖酸及富啡酸之組合釋放至溶液中。使此混合物靜置以便有

機灰分材料沉降到底部後，小心分離頂部液體部分。然後添加約2 mL 98%之硫酸以酸化分離之部分。據信，此可使腐殖酸沉澱至器皿底部。然後將此部分分至兩個150 mL的離心容器中。然後使兩個容器在約10,000 rpm下離心約10分鐘。此迫使腐殖酸到達底部，且自頂部小心傾倒出富啡酸部分。富啡酸之產率可端視所用風化褐煤之品質而有所變化。熟習此項技術者可容易地對本文所述方法作出微小改變，此並不背離本發明之精神。

在某些實施例中，所用富啡酸佔生長培養基之約5-12.5% (v/v)。

根據本發明之此態樣，生長藻類之主要目的係生產期望藻類產品。因此，進一步的藻類細胞數量增加可耗費有價值的資源或能量，且由此係不期望的。較佳地，藻類細胞數量在此生長條件下增加至多1 log(10倍)、300%、200%、100%、或50%。

較佳地，藻類生物質在生物產品累積之生長條件下顯著增加。舉例而言，藻類生物質在很大程度上可由於累積藻類產品而增加。在某些實施例中，藻類生物質在該生長條件下增加至少約2倍、5倍、10倍、20倍或50倍。舉例而言，若細胞之藻類產品比例(例如，油、脂質等)自1%增加至99%，則藻類生物質達成增加約19-20倍。

在某些實施例中，累積之藻類產品在該生長條件下增加至少約10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍或更高。舉例而言，若細胞

之藻類產品比例(例如，油、脂質等)自1%增加至99%，則藻類產品達成增加約1900倍。

較佳地，亦在限氮培養基或具有最適合合成藻類產品之氮含量之培養基中培養藻類。

如上所述，可在可適用於最佳產生藻類產品之開口池或生物反應器中培養藻類。

在生長期間結束時，可自生長器皿(池及生物反應器)回收藻類。可以諸多方式來達成自大量水/培養基中分離細胞群。非限制性實例包含篩選、離心、旋轉真空過濾、壓濾、旋液分離、浮選、撇渣、篩析及重力沉降。亦可使用其他技術與該等技術之組合，例如添加沉澱劑、絮凝劑或促凝劑等。亦可使用兩個或更多階段之分離。在使用多階段時，其可基於相同或不同技術。非限制性實例包含篩選大量藻類培養物內容物，隨後過濾或離心流出物。

舉例而言，可使用立式漩渦循環、收穫渦旋器及/或吸管自培養基部分地分離藻類，如下文所述。或者，可使用大體積容量之工業規模商業離心機來補充或代替其他分離方法。該等離心機可自已知商業源(例如，Cimbria Sket或IBG Monforts, Germany；Alfa Laval A/S, Denmark)獲得。離心、過濾、及/或沉降亦可用於自其他藻類組份純化油。可藉由添加絮凝劑來促進自水性培養基分離藻類，例如黏土(例如，粒徑小於2微米)、硫酸鋁或聚丙烯醯胺。在存在絮凝劑時，可藉由簡單的重力沉降來分離藻類，或可藉由離心來更容易地分離。基於絮凝劑來分離藻類揭示於

(例如)美國專利申請公開案第20020079270號中，其以引用方式併入本文中。

熟習此項技術者應認識到，可利用業內已知之任一方法自液體培養基分離細胞(例如藻類)。舉例而言，美國專利申請公開案第20040121447號及美國專利第6,524,486號(每一者皆以引用方式併入本文中)揭示用於自水性培養基部分分離藻類之切線流過濾器件及裝置。用於自培養基分離藻類之其他方法揭示於美國專利第5,910,254號及第6,524,486號中，每一者皆以引用方式併入本文中。亦可使用用於藻類分離及/或提取之其他公開方法。參見(例如)Rose等人，Water Science and Technology 25: 319-327, 1992；Smith等人，Northwest Science 42: 165-171, 1968；Moulton等人，Hydrobiologia 204/205: 401-408, 1990；Borowitzka等人，Bulletin of Marine Science 47: 244-252, 1990；Honeycutt, Biotechnology and Bioengineering Symp.13: 567-575, 1983。

一旦收穫到細胞群，可立即藉由使用機械方式、化學(例如，酶)方式、及/或溶劑提取破裂(例如，裂解)藻類細胞來釋放藻類產品(例如，油)。

用於細胞破裂之機械方式之非限制性實例包含各種類型的壓榨機，例如螺旋壓榨機、間歇壓榨機、過濾壓榨機、冷榨機、法式壓榨機(French press)；壓降器件；壓降勻化器、膠體磨、珠磨機或球磨機、機械剪切器件(例如，高剪切混合器)、熱衝擊、熱處理、滲透衝擊、音處理或超

音處理、擠出、壓榨、研磨、蒸汽爆破、轉子-定子破裂器、閥型處理器、幾何結構固定之處理器、氮減壓或任一其他已知方法。高容量商業細胞破裂器可購自已知源。(例如, GEA Niro公司, Columbia, MD; Constant Systems 有限公司, Daventry, England; Microfluidics, Newton, MA)。破裂水性懸浮液中之微藻之方法揭示於(例如)美國專利第6,000,551號中, 其以引用方式併入本文中。

化學方式之非限制性實例包含使用酶、氧化劑、溶劑、表面活性劑、及螯合劑。端視所用技術之確切性質而定, 可以乾式進行破裂, 或可存在溶劑、水、或蒸汽。

可用於破裂或輔助破裂之溶劑包含但不限於己烷、庚烷、醇、超臨界流體、氯化溶劑、醇、丙酮、乙醇、甲醇、異丙醇、醛、酮、氯化溶劑、氟化-氯化溶劑、及其組合。實例性表面活性劑包含但不限於洗滌劑、脂肪酸、部分三酸甘油酯、磷脂、溶血磷脂素、醇、醛、聚山梨醇酯化合物、及其組合。實例性超臨界流體包含二氧化碳、乙烷、乙烯、丙烷、丙烯、三氟甲烷、氯三氟甲烷、氮、水、環己烷、正戊烷、及甲苯。亦可藉由納入水或某一額外化合物來修飾超臨界流體溶劑以改善流體之溶劑性質。用於化學破裂法之適宜酶包含蛋白酶、纖維素酶、脂肪酶、磷脂酶、溶菌酶、多糖酶、及其組合。適宜螯合劑包含但不限於EDTA、吡啶、DTPA、NTA、HEDTA、PDTA、EDDHA、葡庚糖酸鹽、磷酸根離子(各種質子化及未質子化者)、及其組合。在一些情形下, 可組合溶劑提

取法與本文所述之機械或化學法打破細胞。亦可使用化學及機械方法之組合。

可藉由各種技術來達成自含有產品之部分或相中分離破裂之細胞。非限制性實例包括離心、旋液分離、過濾、浮選、及重力沉降。在一些情形下，期望包含溶劑或超臨界流體，以(例如)溶解期望產品、減少產品與破裂細胞之相互作用、減少在分離後與破裂細胞一起殘留之產品量、或提供洗滌步驟以進一步減少損失。用於此目的之適宜溶劑包含但不限於己烷、庚烷、超臨界流體、氯化溶劑、醇類、丙酮、乙醇、甲醇、異丙醇、醛類、酮類、及氟化-氯化溶劑。實例性超臨界流體包含二氧化碳、乙烷、乙烯、丙烷、丙烯、三氟甲烷、氯三氟甲烷、氨、水、環己烷、正戊烷、甲苯、及該等之組合。亦可藉由納入水或某一額外化合物來修飾超臨界流體溶劑，以改善流體之溶劑性質。

然後可視需要藉由諸如以下方式進一步處理如此分離之產品以用於期望用途：溶劑去除、乾燥、過濾、離心、化學修飾、酯基轉移、進一步純化、或各步驟之某些組合。

舉例而言，可自生物質分離脂質/油，然後用於使用形成生物柴油之習知方法來形成生物柴油。舉例而言，可使用任一本文所述方法來壓榨生物質並分離所得富含脂質之液體。然後可使用標準酯基轉移技術將分離之油處理成生物柴油，例如習知之 Connemann 方法(參見(例如)美國專利第 5,354,878 號，其全部內容以引用方式併入本文中)。

舉例而言，可收穫藻類，自液體培養基分離，破裂並分離油內容物(如上所述)。藻類生成之油富含三酸甘油酯。可使用諸如 Connemann 方法等習知方法將該等油轉化成生物柴油(參見(例如)美國專利第 5,354,878 號，其以引用方式併入本文中)，該方法已經確立可以自諸如菜籽油等植物源生產生物柴油。標準酯基轉移方法涉及三酸甘油酯與醇(通常係甲醇)之鹼催化酯基轉移反應。三酸甘油酯之脂肪酸轉變成甲醇，從而產生烷基酯(生物柴油)並釋放甘油。去除甘油並可用於其他目的。

與間歇反應方法(例如，J. Am. Oil Soc. 61: 343, 1984)相反，Connemann 方法利用反應混合物連續流經反應器管柱，其中流速低於甘油之沉沒速率。此使得自生物柴油連續分離甘油。可經由其他反應器管柱處理反應混合物以完成酯基轉移過程。可藉由水性萃取去除殘餘甲醇、甘油、游離脂肪酸及觸媒。

然而，熟習此項技術者將認識到，可利用業內已知用於自含有三酸甘油酯之油製備生物柴油的任一方法，舉例而言，如美國專利第 4,695,411 號、第 5,338,471 號、第 5,730,029 號、第 6,538,146 號、第 6,960,672 號中所揭示，每一者皆以引用方式併入本文中。亦可使用不涉及酯基轉移之替代性方法。舉例而言，藉由熱分解、氣化、或熱化學液化(參見(例如)Dote, Fuel 73: 12, 1994; Ginzburg, Renewable Energy 3: 249-252, 1993; Benemann and Oswald, DOE/PC/93204-T5, 1996)。

儘管存在上千種天然存在之已知藻類，但許多種(若非大部分)可用於油/脂質/生物柴油生產及其他產品之形成。該等藻類可在異養、光異養、或自養條件下代謝。可用於本發明之尤佳藻類包含綠藻或矽藻類(矽藻)。

在某些實施例中，可在遺傳上修飾/設計藻類以進一步增加每單位英畝之生物柴油原料產量。使用業內習知之技術來針對特定產品產量進行藻類遺傳修飾相對較簡單。然而，本文所揭示之培養、收穫、及產品提取之低成本方法可供遺傳修飾(例如，轉基因、非轉基因)之藻類使用。熟習此項技術者將認識到，不同藻類菌株顯示不同的生長及油生產力且在不同條件下，系統可含有單一藻類菌株或具有不同性質之菌株的混合物、或藻類加共生細菌之菌株。可對所用藻類在以下方面進行最佳化：地理位置、溫度敏感性、光強度、pH敏感性、鹽度、水質、營養可用度、溫度或光之季節差異、自藻類獲得之期望終端產品及各種其他因素。

在某些實施例中，可在遺傳上設計用於生產生物產品(例如油/生物柴油)之藻類(例如，轉基因或藉由定點誘變生成等)以含有一或多種分離之核酸序列，從而增進生物產品產量或提供用於藻類培養、生長、收穫或用途之其他有用特性。穩定轉化藻類之方法及包括所分離有用核酸之組合物在業內已眾所周知，且任一該等方法及組合物皆可用於實踐本發明。實例性有用轉化方法可包含微粒轟擊、電穿孔、原生質體融合、PEG調介之轉化、DNA塗覆之碳

化矽須狀物或使用病毒調介之轉化(參見(例如)Sanford等人, 1993, Meth. Enzymol. 217:483-509; Dunahay等人, 1997, Meth. Molec. Biol. 62:503-9; 美國專利第5,270,175號、第5,661,017號, 其以引用方式併入本文中)。

舉例而言, 美國專利第5,661,017號揭示諸如以下等含葉綠素C之藻類的藻類轉化方法: 矽藻綱(Bacillariophyceae)、金藻綱(Chrysophyceae)、褐藻科(Phaeophyceae)、黃藻綱(Xanthophyceae)、針胞藻綱(Raphidophyceae)、定鞭藻綱(Prymnesiophyceae)、隱藻綱(Cryptophyceae)、小環藻屬(Cyclotella)、舟形藻屬(Navicula)、筒柱藻(Cylindrotheca)、三角褐指藻(Phaeodactylum)、雙眉藻屬(Amphora)、角毛藻屬(Chaetoceros)、菱形藻屬(Nitzschia)或海煉藻屬(Thalassiosira)。亦揭示包括有用核酸之組合物, 例如乙醯輔酶A羧化酶。

在各實施例中, 可向分離之核酸或載體中納入可選標記來選擇轉化之藻類。有用之可選標記可包含新黴素(neomycin)磷酸轉移酶、胺基葡糖苷磷酸轉移酶、胺基葡糖苷乙醯轉移酶、氯黴素(chloramphenicol)乙醯轉移酶、潮黴素(hygromycin)B磷酸轉移酶、博來黴素(bleomycin)結合蛋白、草銨磷乙醯轉移酶、溴苯腈水解酶、草甘膦抗性5-烯醇丙酮醯莽草酸-3-磷酸合酶、小穗甯麻素(cryptopleurine)抗性核蛋白體蛋白S14、依米丁(emetine)抗性核蛋白體蛋白S14、磺胺嘧啶抗性乙醯乳酸合酶、咪唑啉酮抗性乙醯乳酸合酶、鏈黴素(streptomycin)抗性16S核

糖體RNA、大觀黴素(spectinomycin)抗性16S核糖體RNA、紅黴素(erythromycin)抗性23S核糖體RNA或甲基苯并咪唑抗性微管蛋白。已知用於增進轉基因之表現的調節核酸序列，例如，C.隱性乙醯輔酶A羧化酶5'-非轉譯調節控制序列、C.隱性乙醯輔酶A羧化酶3'-非轉譯調節控制序列、及其組合。

實例1

在Bristol培養基中培養普通小球藻(參見，Nichols, Growth Media-freshwater. In: Phycological Methods . J.R. Stern. 編輯，Cambridge University Press, 第7-24頁，1973，以引用方式併入；亦參見下文之表1)，該Bristol培養基經0.1%之酵母提取物(DIFCO, MI-Bacto酵母提取物，產品編號：212750)及0.5%之葡萄糖(對照細胞)修飾。在添加10%富啡酸之相同培養基中培養第二組，富啡酸係自風化褐煤(20-25%富啡酸)中提取。

表1.自養及異養Bristol培養基(mg/L)

化學物質	自養	異養
NaNO ₃	250	250
CaCl ₂ .2H ₂ O	25	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	75
K ₂ HPO ₄	75	75
KH ₂ PO ₄	175	175
NaCl	25	25
EDTA	50	50
KOH	31	31

Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	4.98	4.98
H ₂ SO ₄	0.001 mL/L	0.001 mL/L
H ₃ BO ₃	11.42	11.42
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82	8.82
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44	1.44
MoO ₃	0.71	0.71
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57	1.57
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49	0.49
酵母提取物	-	1000
C ₆ H ₁₂ O ₆	-	5000

可藉由向培養基中簡單添加各化學物質來製備原液。

為製備富啡酸，使用約500 mL 1% NaOH溶液使約25 g 粉末化風化褐煤材料(挖掘於Alberta, Canada，且由Black Earth Humates有限公司，Edmonton, Alta.，T5L 3C1供應)水合。據信，此可將腐殖酸及富啡酸之組合釋放至溶液中。使此混合物靜置以便有機灰分材料沉降至底部後，小心分離頂部液體部分。然後添加約2 mL 98%之硫酸以酸化分離之部分。據信，此可使腐殖酸沉澱至器皿底部。然後將此部分分至兩個150 mL的離心容器中。然後使兩個容器在約10,000 rpm下離心約10分鐘。此迫使腐殖酸到達底部，且自頂部小心傾倒出富啡酸部分。富啡酸之產率可端視所用風化褐煤之品質而有所變化。通常，使用現有材料獲得約250-280 mL富啡酸部分。然後以佔生長培養基之5-12.5% (v/v)的比率使用此富啡酸。

對照細胞具有約3.4 μm之平均半徑且產生最小之液泡。

在經富啡酸修飾之培養基中培養之細胞具有各種不同的細

胞大小。大細胞達到約5.6 μ m之平均半徑且顯示極大的液泡。該等液泡含有脂質，如使用尼羅紅染色(Nile Red staining)所證實。富啡酸刺激細胞產生顯著超過對照細胞之儲存產品。

顯而易見，在本文所示之實例中，儘管事實上在培養基中氮不受限制，但在富啡酸存在下大量藻類細胞被誘導進入儲存模式。期望在藻類細胞於限氮條件下培養時，含液泡之大脂質細胞之頻率顯著增加。此外，期望培養物中之油含量屬於80+%(可能90+%)之範圍。

實例2

在經0.1%酵母提取物(參見上文)及0.5%葡萄糖(對照細胞)修飾之Bristol培養基(參見上文)中生長原殼綠藻。在添加吡啶乙酸(2 mg/L，目錄編號12886，Sigma-Aldrich Canada有限公司)或赤黴酸(2 mg/L，目錄編號G7645，Sigma-Aldrich Canada有限公司)之相同培養基中培養另外兩組。測定乾重量並在7天後比較各培養組。

彼等使用吡啶乙酸處理者之乾細胞質量相對於對照組增加50%。彼等使用赤黴酸處理者之乾細胞質量增加20%。另外，彼等使用吡啶乙酸處理之細胞之油產量增加15%。

實例3 在有或沒有某些生長因子組合之情況下原殼小球藻(*Chlorella protothecoides*)之生長的對比

所用原料配方為0.25 g激動素、0.25 g 6-BA、0.5 g NAA、0.5 g GA3、1.0 g維他命B1、1.0 L dH₂O。向250

mL HGM(參見下表)添加19.5 nL以產生配方2。使用原殼小球藻接種燒瓶以產生0.04吸收單位之起始光密度。在異養(黑暗)條件下將燒瓶置於處於125 rpm下之振盪器中。將溫度維持在約23℃。每日皆量測光密度。結果匯總於圖3中。

表2.異養生長培養基(HGM)

原液	組份	量(L ⁻¹)	原液濃度(400 mL ⁻¹)	最終濃度
1	NaNO ₃	30 ml	10 g	8.82 mM
2	CaCl ₂ ·(2H ₂ O)	30 ml	1 g	0.17 mM
3	MgSO ₄ ·(7H ₂ O)	30 ml	3 g	0.30 mM
4	K ₂ HPO ₄	30 ml	3 g	0.43 mM
5	KH ₂ PO ₄	30 ml	7 g	1.29 mM
6	NaCl	30 ml	1 g	0.43 mM
7	痕量金屬(溶膠)	18 ml	參見註釋1	
8	酵母提取物(Bacto)	4 g	NA	0.4 %
9	C ₆ H ₁₂ O ₆	20 g	NA	2.0 %

註釋1：NaEDTA·2H₂O, 075 g/L；FeCl₃·6H₂O, 0.097 g/L；MgCl₂·4H₂O, 0.041 g/L；硼酸，0.011 g/L；ZnCl₂, 0.005 g/L；CoCl₂·6H₂O, 0.002 g/L；CuSO₄, 0.002 g/L；Na₂MoO₄·H₂O, 0.002 g/L。

註釋2：HGM係具有以下物質之經修飾之Bristol培養基：濃度增加之NaNO₃(自2.94 mM之最終濃度至8.82 mM之最終濃度)、及其他組份，包含0.4%酵母提取物(Bacto)、2.0%葡萄糖、及痕量金屬之混合物(參見註釋1)。葡萄糖在傳統Bristol培養基中不存在，此乃因在光養條件下生長

之藻類使用光合作用產生有機化合物(例如碳水化合物)。

註釋3：將培養基置於Nephelo燒瓶(250 ml)中並在121°C下實施滅菌20分鐘。

顯示配方1較對照異養生長培養基以較快速率生成生物質。對照及配方1之比生長速率 μ 分別為1.4及1.8。

實例4 在有或沒有某些生長因子組合之情況下原殼小球藻之生長的對比

所用原料配方為0.25 g激動素、0.25 g 6BA、0.5 g NAA、0.5 g GA3、1.0 g 維他命B1、1.0 L dH₂O。向250 mL HGM(參見上表)添加4.7 nL以產生配方2。使用原殼小球藻接種燒瓶以產生0.04吸收單位之起始光密度。在異養(黑暗)條件下將燒瓶置於處於125 rpm下之振盪器中。將溫度維持在約23°C。每日皆量測光密度。結果匯總於圖4中。

顯示配方2較對照異養生長培養基以較快速率生成生物質。對照及配方2之比生長速率 μ 分別為1.4及1.6。

實例5 在有或沒有某些生長因子組合之情況下原殼小球藻之生長的對比

所用原料配方為0.25 g激動素、0.25 g 6BA、0.25 g NAA、0.25 g IAA、0.5 g GA3、1.0 g 維他命B1、1.0 L dH₂O。向250 mL HGM(參見上表)添加19.5 nL以產生配方3。使用原殼小球藻接種燒瓶以產生0.04吸收單位之起始光密度。在異養(黑暗)條件下將燒瓶置於處於125 rpm下之振盪器中。將溫度維持在約23°C。每日皆量測光密度。結

果匯總於圖5中。

顯示配方3較對照異養生長培養基以較快速率生成生物質。對照及配方3之比生長速率 μ 分別為1.4及1.8。

實例6 在有或沒有某些生長因子組合之情況下原殼小球藻之生長的對比

所用原料配方為0.25 g 激動素、0.25 g 6BA、0.25 g NAA、0.25 g IAA、0.5 g GA3、1.0 g 維他命B1、1.0 L dH₂O。向250 mL HGM(參見上表)添加4.7 nL以產生配方4。使用原殼小球藻接種燒瓶以產生0.04吸收單位之起始光密度。在異養(黑暗)條件下將燒瓶置於處於125 rpm下之振盪器中。將溫度維持在約23℃。每日皆量測光密度。結果匯總於圖6中。

顯示配方4較對照異養生長培養基以較快速率生成生物質。對照及配方4之比生長速率 μ 分別為1.4及1.8。上文所用之調節劑濃度匯總於下表3中。

表3.植物生長調節劑刺激之藻類生長的匯總

激動素 (L ⁻¹)	6BA (L ⁻¹)	NAA及/或 IAA (L ⁻¹)	GA3 (L ⁻¹)	維他命B1 (L ⁻¹)	每燒瓶之 原料體積	對照生長 速率(μ)	實驗生長 速率(μ)
0.25 g	0.25 g	0.5 g NAA	0.5 g	1.0 g	19.5 nL	1.4	1.8
0.25 g	0.25 g	0.5 g NAA	0.5 g	1.0 g	4.7 nL	1.4	1.6
0.25 g	0.25 g	0.25g NAA; 0.25 g IAA	0.5 g	1.0 g	19.5 nL	1.4	1.8
0.25 g	0.25 g	0.25 g NAA; 0.25 g IAA	0.5 g	1.0 g	4.7 nL	1.4	1.8

實例7 光異養及異養生長

評價在斜生柵藻(*Scenedesmus obliquus*)及原殼小球藻生長期間光曝露之影響。兩種藻類在光異養生長條件下之生長速率皆較高。斜生柵藻在光異養生長下之生長速率高約86.7%。同時，在光異養生長下實施生長時，原殼小球藻之生長速率增加39.07%。該等實驗結果匯總於下表4-7中。

表4.不同激素濃度對在光異養條件下培養48小時之斜生柵藻之生長速率的影響

激素	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
吲哚-3-乙酸	0.62±0.092	0.49±0.023	0.49±0.030	0.47±0.061	0.42±0.020
1-萘-乙酸	0.73±0.046	0.80±0.141	0.81±0.042	0.85±0.042	0.84±0.087
2,4-二氯-苯氧基 乙酸	0.33±0.042	0.44±0.028	0.47±0.023	0.44±0.000	0.42±0.035
激動素	0.36±0.060	0.37±0.070	0.92±0.113	0.73±0.042	0.57±0.133
6-苄基-胺基嘌呤	0.52±0.060	0.47±0.064	0.47±0.011	0.37±0.099	0.46±0.056
赤黴酸	0.51±0.110	0.56±0.141	0.56±0.087	0.47±0.081	0.59±0.064
對照	0.41±0.042				

表5.不同激素濃度對在異養條件下培養48小時之斜生柵藻之生長速率的影響

激素	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
吲哚-3-乙酸	0.41±0.053	0.47±0.020	0.42±0.081	0.36±0.127	0.23±0.020
1-萘-乙酸	0.39±0.053	0.28±0.099	0.33±0.020	0.28±0.011	0.26±0.042
2,4-二氯-苯氧基 乙酸	0.23±0.040	0.24±0.081	0.31±0.020	0.23±0.040	0.28±0.030
激動素	0.28±0.076	0.31±0.028	0.36±0.042	0.26±0.076	0.28±0.061

6-苄基-胺基嘌呤	0.33±0.104	0.36±0.092	0.39±0.092	0.32±0.061	0.28±0.081
赤黴酸	0.42±0.064	0.36±0.050	0.43±0.020	0.50±0.046	0.44±0.083
對照	0.35±0.023				

表 6. 不同激素濃度對在光異養條件下培養48小時之原殼
小球藻之生長速率的影響

激素	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
吲哚-3-乙酸	1.02±0.061	1.13±0.019	0.97±0.020	1.05±0.019	1.06±0.030
1-萘-乙酸	1.16±0.152	1.07±0.028	1.05±0.035	1.02±0.050	1.00±0.058
2,4-二氯-苯 氧基乙酸	1.03±0.069	1.08±0.030	1.01±0.035	1.08±0.133	1.09±0.035
激動素	1.19±0.035	1.18±0.050	1.02±0.011	1.10±0.042	1.08±0.023
6-苄基-胺基 嘌呤	1.08±0.023	1.04±0.083	1.07±0.035	1.12±0.011	1.00±0.030
赤黴酸	1.10±0.070	1.09±0.122	1.00±0.030	1.02±0.046	1.06±0.011
對照	1.05±0.020				

表 7. 不同激素濃度對在異養條件下培養48小時之原殼小球
藻之生長速率的影響

激素	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
吲哚-3-乙酸	1.60±0.076	1.60±0.099	1.49±0.122	1.61±0.072	1.62±0.133
1-萘乙酸	1.62±0.064	1.57±0.028	1.62±0.136	1.54±0.081	1.66±0.140
2,4-二氯-苯氧基 乙酸	1.50±0.081	1.31±0.087	1.43±0.069	1.53±0.069	1.40±0.061
激動素	1.58±0.061	1.60±0.070	1.44±0.110	1.50±0.050	1.60±0.050
6-苄基-胺基嘌呤	1.46±0.150	1.52±0.117	1.50±0.012	1.54±0.081	1.48±0.121
赤黴酸	1.46±0.050	1.52±0.099	1.46±0.090	1.52±0.151	1.52±0.201
對照	1.54±0.080				

【圖式簡單說明】

圖 1 展示在經 0.1% 酵母提取物及 0.5% 葡萄糖修飾之 Bristol 培養基中生長 7 天之對照普通小球藻；

圖 2 展示在經 0.1% 酵母提取物、0.5% 葡萄糖及富啡酸修飾之 Bristol 培養基中生長 7 天之普通小球藻；

圖 3 展示在存在或缺乏植物生長調節劑之組合時原殼小球藻的實例性生長曲線；

圖 4 展示在存在或缺乏植物生長調節劑之組合時原殼小球藻的實例性生長曲線；

圖 5 展示在存在或缺乏植物生長調節劑之組合時原殼小球藻的實例性生長曲線；及

圖 6 展示在存在或缺乏植物生長調節劑之組合時原殼小球藻的實例性生長曲線。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98146446

※申請日：98-12-31

※IPC 分類：C12N ¹/₁₂ (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

使用植物生長調節劑增進藻類生長以生產附加值產品

USE OF PLANT GROWTH REGULATORS TO ENHANCE ALGAE
GROWTH FOR THE PRODUCTION OF ADDED VALUE PRODUCTS

二、中文發明摘要：

本發明提供一種增進自以自養方式、異養方式或光異養方式生長之藻類生產生物質的方法，其係經由使用植物生長調節劑(例如生長激素、吲哚乙酸等)及激素模擬物(苯氧基乙酸化合物等)來達成。植物生長調節劑或其模擬物可進一步在藻類培養物或所收穫生物質中增加期望附加值產品(例如生物柴油或澱粉)之比例。

三、英文發明摘要：

The invention provides methods that enhance the production of biomass from algae that grow autotrophically, heterotrophically, or photoheterotrophically, through the use of plant growth regulators (such as growth hormones, indole acidic acid, *etc.*) and hormone mimics (phenoxyacetic compounds, *etc.*). The plant growth regulators or mimics thereof may further increase the proportion of the desired value-added products, such as biodiesel or starch, in the algae culture or the harvested biomass.

七、申請專利範圍：

1. 一種促進藻類細胞增殖之方法，其包括在一或多種植物生長調節劑、其模擬物、或其混合物存在下培養該等藻類以增加藻類細胞數量。
2. 如請求項1之方法，其中藻類細胞數量增加至少約5%、10%、20%、50%、75%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、 10^8 倍、 10^9 倍或更多。
3. 如請求項1之方法，其中藻類細胞之分裂速率增加至少約5%、10%、20%、50%、75%、100%、200%、500%、1,000%或更多。
4. 如請求項1之方法，其中該藻類培養物之群體倍增時間為約0.05-2天。
5. 如請求項1之方法，其中該植物生長調節劑包括至少一種、兩種、三種、四種、五種或更多種選自生長素(Auxin)、細胞分裂素(Cytokinin)、赤黴素(Gibberellin)、及/或其混合物之生長激素。
6. 如請求項5之方法，其中該生長素包括吲哚乙酸(IAA)及/或1-萘乙酸(NAA)。
7. 如請求項5之方法，其中該赤黴素包括GA3。
8. 如請求項5之方法，其中該細胞分裂素係腺嘌呤型細胞分裂素或苯脲型細胞分裂素。
9. 如請求項8之方法，其中該腺嘌呤型細胞分裂素包括激動素、玉米素、及/或6-苄胺嘌呤，且該苯脲型細胞分裂

素包括二苯脲及/或苯基噻二唑脲(thidiazuron)(TDZ)。

10. 如請求項1之方法，其中該植物生長調節劑進一步包括維他命B1或其類似物/模擬物。

11. 如請求項5之方法，其中生長素與細胞分裂素之比率(w/w)為約1:2至2:1 (w/w)、或約1:1 (w/w)。

12. 如請求項5之方法，其中生長素與赤黴素之比率(w/w)為約1:2至2:1 (w/w)、或約1:1 (w/w)。

13. 如請求項1之方法，其中該模擬物係苯氧基乙酸化合物。

14. 如請求項1之方法，其進一步包括在具有最佳細胞增殖所需之無限制營養素及痕量元素含量的培養基中培養該等藻類。

15. 如請求項14之方法，其中該等營養素包含一或多種C、N、P、S、及/或O源。

16. 如請求項14之方法，其中該等營養素之濃度對於細胞分裂及/或生長而言無毒。

17. 如請求項1之方法，其中在最適合細胞分裂之溫度下培養該等藻類，該最適合溫度對於非嗜熱性藻類介於約0-40°C之間，且對於嗜熱性藻類為約40-95°C、或約60-80°C。

18. 如請求項1之方法，其中該等藻類係在生物反應器中培養。

19. 如請求項18之方法，其中該生物反應器適於進行滅菌。

20. 如請求項18之方法，其中該生物反應器適用於最佳細胞

增殖。

21. 如請求項1之方法，其中該等藻類使用異養、光異養、或自養生理機制來代謝。
22. 如請求項1之方法，其中該等藻類係黃藻(Chromophyte)。
23. 如請求項1之方法，其中該等藻類係綠藻(Chlorophyte)或矽藻(Bacillariophyte)。
24. 如請求項1之方法，其中該等藻類具有矽藻細胞之游離形式。
25. 如請求項1之方法，其中該等藻類並非褐藻類(褐藻綱(Phaeophyceae))或紅藻類。
26. 如請求項1之方法，其中該等藻類並非破囊壺菌(Thraustochytriales)。
27. 一種產生藻類產品之方法，其包括在植物生長調節劑或其模擬物存在下培養藻類，以累積該藻類產品。
28. 如請求項27之方法，其中藻類細胞數量增加至多1 log (1,000%)、300%、200%、100%、或50%。
29. 如請求項27之方法，其中藻類生物質顯著增加。
30. 如請求項29之方法，其中藻類生物質增加至少約20%、40%、60%、80%、100%、150%、200%。
31. 如請求項29之方法，其中藻類生物質在很大程度上係由於累積該藻類產品而增加。
32. 如請求項27之方法，其中該等藻類係在限氮培養基(例如，約1.5-15 mgN/L)或具有最適合合成藻類產品之氮含量之培養基中培養。

33. 如請求項27之方法，其中該植物生長調節劑包括油刺激因子。
34. 如請求項33之方法，其中該油刺激因子包括腐殖酸物質，例如富啡酸(fulvic acid)或腐殖酸。
35. 如請求項27之方法，其中該等藻類係在生物反應器中培養。
36. 如請求項35之方法，其中該生物反應器適於進行滅菌。
37. 如請求項35之方法，其中該生物反應器適用於藻類產品之最佳生產。
38. 如請求項27之方法，其中該藻類產品係油或脂質。
39. 如請求項38之方法，其中該藻類產品包括 ω -3 (Omega-3)、 ω -6、及/或 ω -9。

八、圖式：

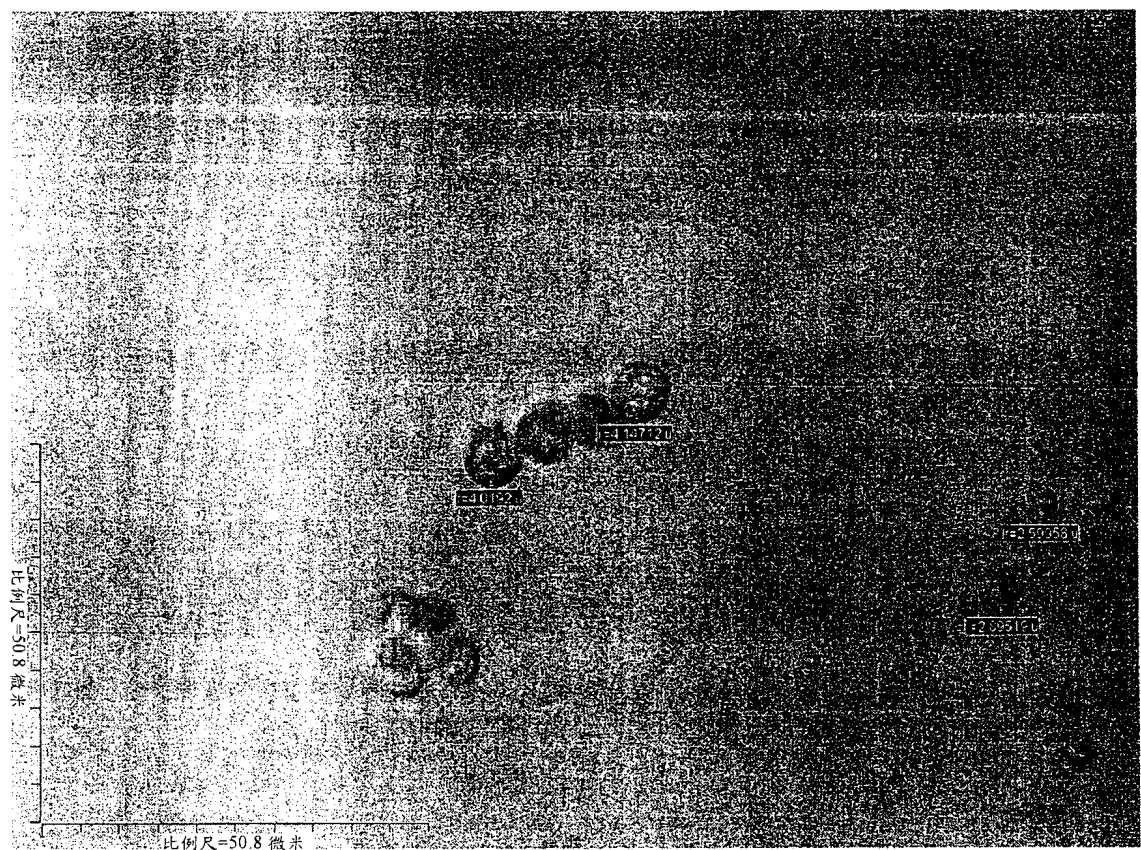


圖 1

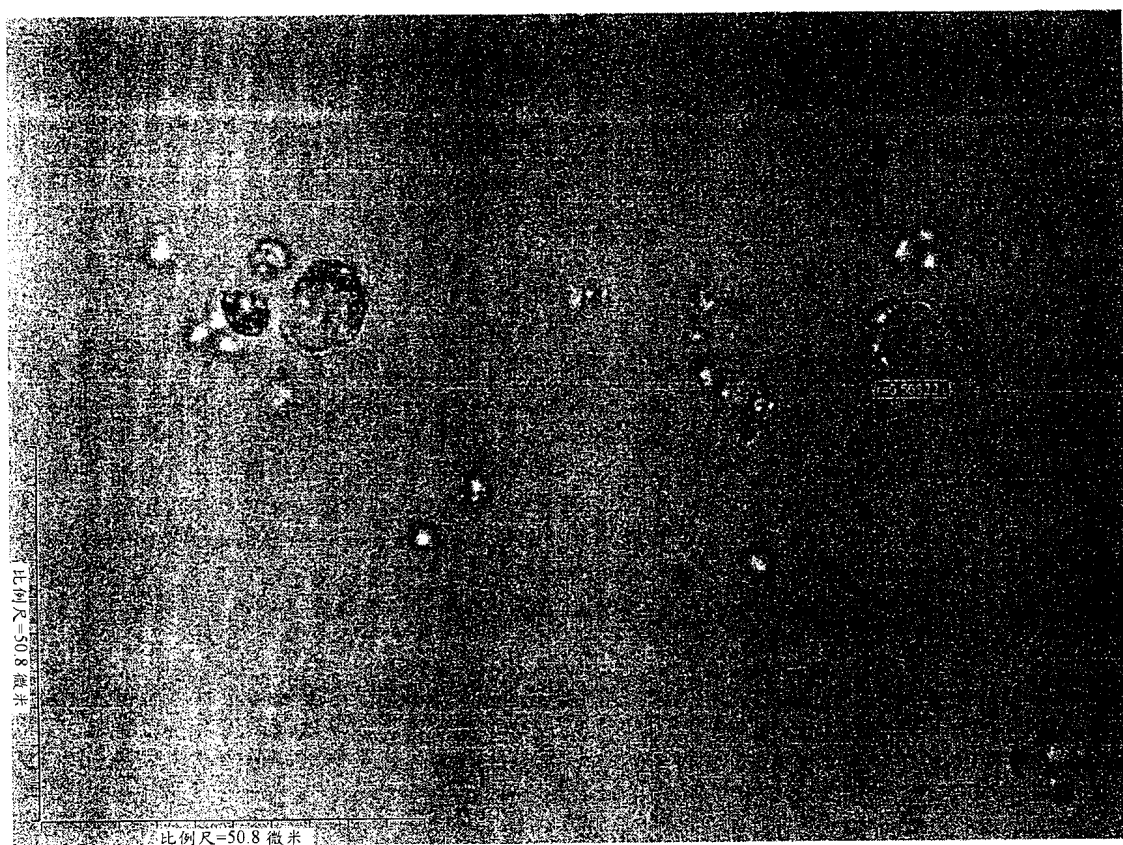


圖 2

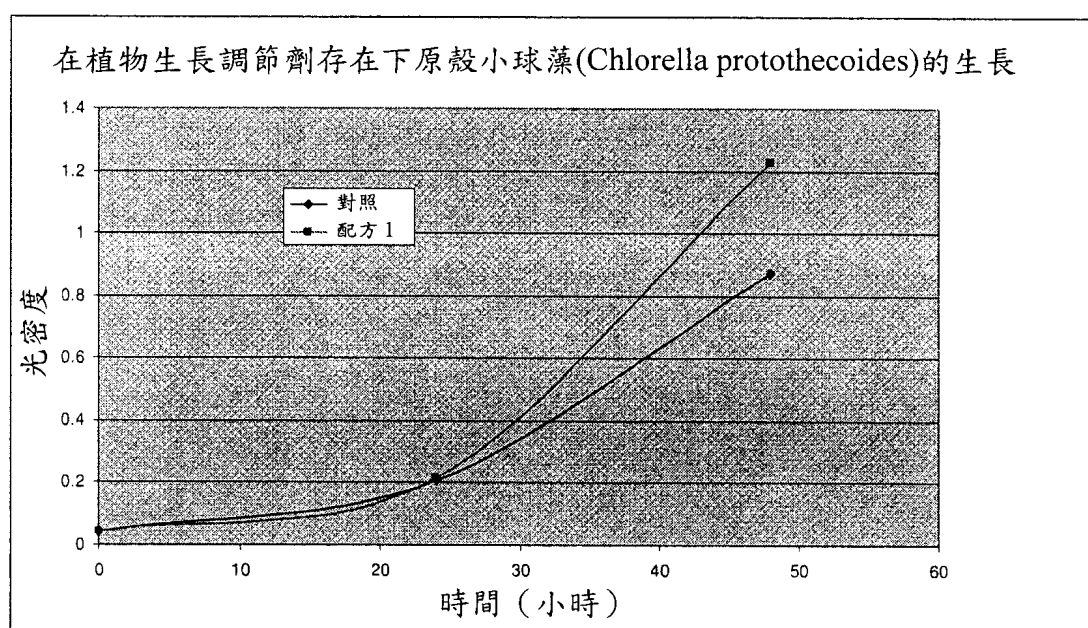


圖 3

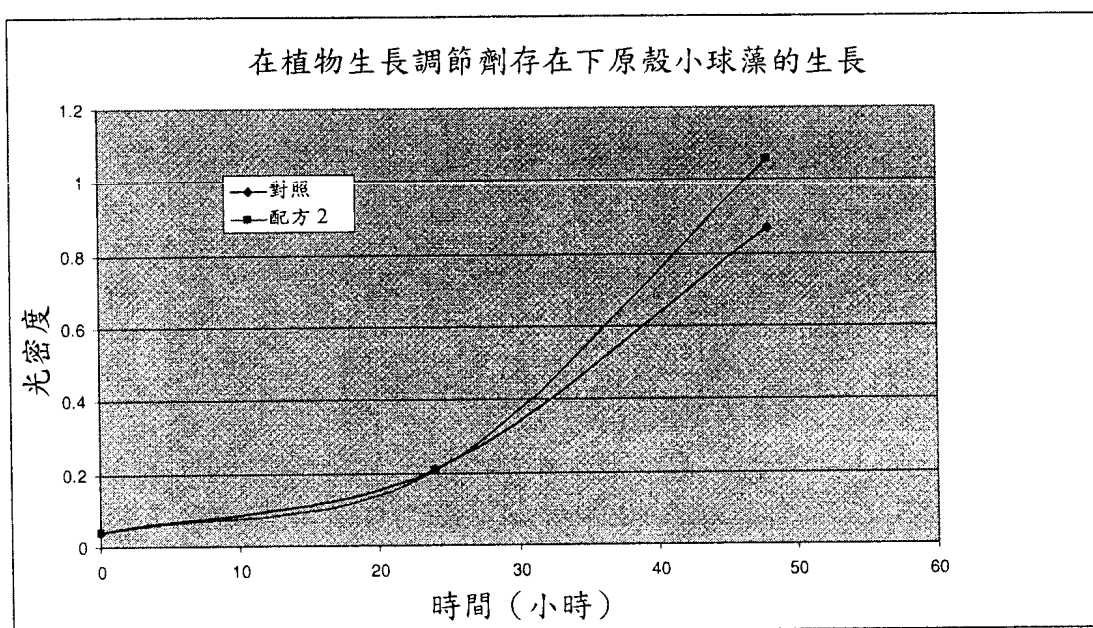


圖 4

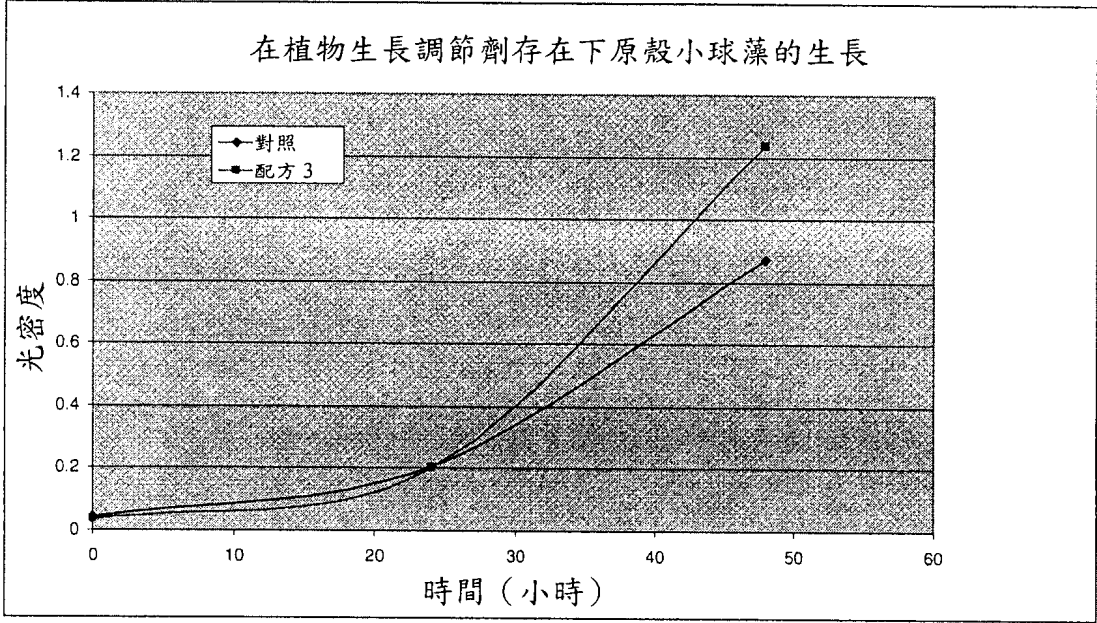


圖 5

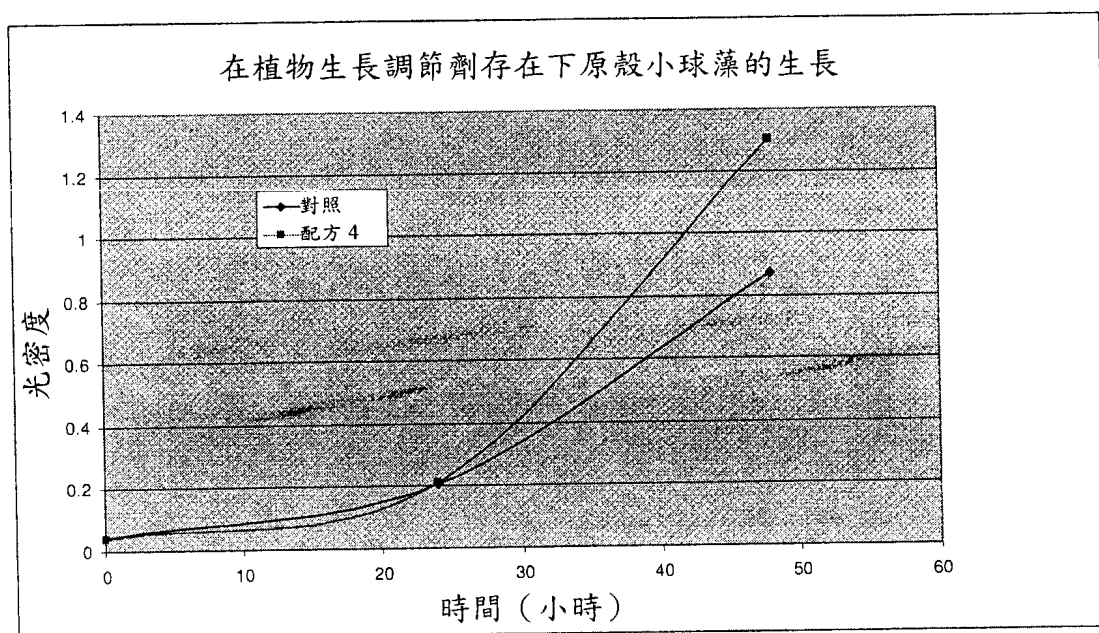


圖 6

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)