



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104955937 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201380058619. 1

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

(22) 申请日 2013. 11. 08

代理人 刘粉宝

(30) 优先权数据

61/724, 710 2012. 11. 09 US

61/798, 969 2013. 03. 15 US

61/799, 151 2013. 03. 15 US

61/877, 894 2013. 09. 09 US

(51) Int. Cl.

C12N 1/12(2006. 01)

A01G 33/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/069046 2013. 11. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/074769 EN 2014. 05. 15

(71) 申请人 赫里开发公司

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 艾尼可·格鲁扎

詹森·D·利卡米勒

安娜·李·唐克维奇

权利要求书6页 说明书29页 附图25页

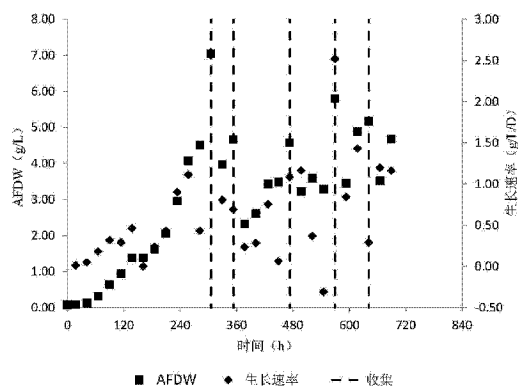
(54) 发明名称

在非纯性兼养条件中培养微生物和用乙酸盐和 / 或氧化剂控制培养物中细菌污染的方法

(57) 摘要

公开了在非纯性兼养条件中培养微生物的方法。具体描述了一种以兼养方式培养微藻并且用乙酸 / 恒 pH 培养 (pH auxostat) 系统控制细菌污染的方法。还描述了以兼养方式培养微藻, 通过增加向所述培养物中的氧传递来增加生产力, 并且用氧化剂控制细菌污染的方法。

浓度和体积生长速率随时间推移



1. 一种在非纯性兼养条件中培养微生物的方法,其包含:

- a. 将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;
- b. 向所述微生物培养物供应至少一些光;
- c. 向所述微生物培养物供应包含有机酸的有机碳源;以及
- d. 其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的25%并且微生物产量为至少 50g/m²天。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物包含至少一种选自由以下组成的群组的属的微生物:小球藻属 (*Chlorella*)、倒囊藻属 (*Anacystis*)、聚球藻属 (*Synechococcus*)、集胞藻属 (*Synechocystis*)、土壤绿藻属 (*Neosporangiococcum*)、绿球藻属 (*Chlorococcum*)、褐指藻属 (*Phaeodactylum*)、螺旋藻属 (*Spirulina*)、微星藻属 (*Micractinium*)、红球藻属 (*Haematococcus*)、微拟球藻属 (*Nannochloropsis*) 以及咸胞藻属 (*Brachiomonas*)。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述污染性细菌包含选自由以下组成的群组中的至少一种:无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.)、食酸菌属 (*Acidovorax* sp.)、气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium* sp.)、交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp.)、水螺菌属 (*Aquaspirillum* sp.)、固氮螺菌属 (*Azospirillum* sp.)、固氮菌属 (*Azotobacter* sp.)、伯杰菌属 (*Bergeyella* sp.)、环丝菌属 (*Brochothrix* sp.)、布鲁米克氏菌属 (*Brumimicrobium* sp.)、伯克氏菌属 (*Burkholderia* sp.)、柄杆菌属 (*Caulobacter* sp.)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.)、短小杆菌属 (*Curtobacterium* sp.)、代尔夫特菌属 (*Delftia* sp.)、稳杆菌属 (*Empedobacter* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)、埃希氏菌属 (*Escherichia* sp.)、黄杆菌属 (*Flavobacterium* sp.)、海杆菌属 (*Marinobacter* sp.)、微杆菌属 (*Microbacterium* sp.)、香味菌属 (*Myroides* sp.)、副球菌属 (*Paracoccus* sp.)、地杆菌属 (*Pedobacter* sp.)、褐杆菌属 (*Phaeobacter* sp.)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、拉恩氏菌属 (*Rahnella* sp.)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia* sp.)、根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、弧菌属 (*Vibrio* sp.) 以及周氏菌属 (*Zobellia* sp.)。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有机碳源的所述有机酸包含 0.5-50%乙酸。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 20%。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 10%。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 5%。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有机酸与至少一种其它营养物组合并以组合形式供应到所述培养基,所述至少一种其它营养物包含选自由以下组成的群组中的至少一种:硝酸盐、磷酸盐、铁、钴、铜、钠、钼、锰、锌、盐以及二氧化硅。

9. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包含向所述微生物培养物供应至少一种氧化

剂,所述至少一种氧化剂包含选自由以下组成的群组中的至少一种:臭氧、过氧化氢、氯气、亚氯酸盐、氯酸盐、次氯酸盐、硝酸、铬、高锰酸、氧化银以及溴。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中当所述培养物的经测量pH水平达到阈值水平时,通过恒pH培养(pH auxostat)系统向所述培养物供应所述有机碳源。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述pH阈值水平是7.5。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述恒pH培养系统维持所述微生物培养物的pH水平基本上恒定。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中所述恒pH培养系统维持所述微生物培养物的pH水平在抑制污染性细菌增殖的规定滞后范围内。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中向所述培养物供应所述有机碳源直到所述培养物的经测量溶解氧水平达到低于2mg O₂/L的临界水平为止。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水性培养基包含初始浓度的乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾的所述初始浓度介于0.1g/L与6g/L之间。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中每天向所述微生物培养物供应所述至少一些光持续10-16小时的光周期。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中每天向所述微生物培养物供应所述至少一些光持续小于15小时的光周期。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一些光每天供应超过15小时。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一些光是自然光。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一些光是人造光。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一些光是自然光与人造光的组合。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一些光包含至少一种来自自由以下组成的群组的特定波长光谱:紫光(约380-450nm)、蓝光(约450-495nm)、绿光(约495-570nm)、黄光(570-590nm)、橙光(约590-620nm)、红光(约620-750nm)以及远红光(约700-800nm)。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养器皿是安置在室外的敞开式器皿。

25. 一种控制在非纯性条件中在兼养型微生物培养物中的细菌污染的方法,其包含:

a. 将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;

b. 向所述微生物培养物供应至少一些光;

c. 向所述微生物培养物供应有机碳源;

d. 向所述微生物培养物供应氧化剂;以及

e. 其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述微生物培养物的总细胞计数的25%。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述氧化剂包含选自由以下组成的群组中的至少一种:臭氧、过氧化氢、氯气、亚氯酸盐、氯酸盐、次氯酸盐、硝酸、铬、高锰酸、氧化银以及溴。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述臭氧以介于0.01mg/L与2.0mg/L之间的浓

度供应。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述臭氧以介于 0.01mg/L 与 0.50mg/L 之间的浓度供应。

29. 根据权利要求 25 所述的方法,其中通过喷雾器和文丘里注射器(venturi injector)中的至少一个向所述微生物培养物供应所述氧化剂。

30. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述微生物包含至少一种选自由以下组成的群组的属的微生物:阿格门氏藻属(Agmenellum)、双眉藻属(Amphora)、项圈藻属(Anabaena)、倒囊藻属、顶丝藻属(Apistonema)、节旋藻属(Arthrospira(螺旋藻属))、葡萄藻属(Botryococcus)、咸胞藻属、衣藻属(Chlamydomonas)、小球藻属、绿球藻属(Chlorococcum)、十字扁盘石藻属(Cruciplacolithus)、筒柱藻属(Cylindrotheca)、绿群藻属(Coenochloris)、蓝载藻属(Cyanophora)、小环藻属(Cyclotella)、杜氏藻属(Dunaliella)、艾石属(Emiliania)、眼虫藻属(Euglena)、无管眼藻属(Extubocellulus)、脆杆藻属(Fragilaria)、嘉乐德藻属(Galdieria)、功奥曲藻属(Goniotrichium)、红球藻属、哈洛绿藻属(Halochlorella)、等鞭金藻属(Isochrysis)、细柱藻属(Leptocylindrus)、微星藻属、直链藻属(Melosira)、蒜头藻属(Monodus)、念珠藻属(Nostoc)、微绿球藻属(Nannochloris)、微拟球藻属、舟形藻属(Navicula)、土壤绿藻属、菱形藻属(Nitzschia.)、齿状藻属(Odontella)、棕鞭藻属(Ochromonas)、奥克洛斯藻属(Ochrosphaera)、帕夫洛娃藻属(Pavlova)、皮克路藻属(Picochlorum)、褐指藻属、颗石藻属(Pleurochrysis)、紫球藻属(Porphyridium)、波特里奥洛藻属(Poteriochromonas)、定鞭金藻属(Prymnesium)、红细胞藻属(Rhodomonas)、栅藻属(Scenedesmus)、骨条藻属(Skeletonema)、泡虫属(Spumella)、辐节藻属(Stauroneis)、裂丝藻属(Stichococcus)、奥辛洛藻属(Auxenochlorella)、角毛藻属(Cheatocheros)、新绿藻属(Neochloris)、棕鞭藻属(Ochromonas)、紫球藻属(Porphiridium)、聚球藻属、集胞藻属、扁藻(Tetraselmis)、破囊壶菌(Thraustochytrids)以及海链藻属(Thalassiosira)。

31. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述污染性细菌包含选自由以下组成的群组中的至少一种:无色杆菌属、食酸菌属、气单胞菌属、土壤杆菌属、交替单胞菌属、水螺菌属、固氮螺菌属、固氮菌属、伯杰菌属、环丝菌属、布鲁米克氏菌属、伯克氏菌属、柄杆菌属、纤维单胞菌属、金黄杆菌属、短小杆菌属、代尔夫特菌属、稳杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、黄杆菌属、海杆菌属、微杆菌属、香味菌属、副球菌属、地杆菌属、褐杆菌属、假交替单胞菌属、假单胞菌属、拉恩氏菌属、罗尔斯通氏菌属、根瘤菌属、红球菌属、玫瑰单胞菌属、葡萄球菌属、寡养单胞菌属、弧菌属以及周氏菌属。

32. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 20%。

33. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 10%。

34. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述微生物培养物维持污染性细菌的水平低于所述培养物的总细胞计数的 5%。

35. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述有机碳源包含选自由以下组成的群组中的至少一种:乙酸盐、乙酸、亚油酸铵、阿拉伯糖、精氨酸、天冬氨酸、丁酸、纤维素、柠檬酸、乙

醇、果糖、脂肪酸、半乳糖、葡萄糖、甘油、甘氨酸、乳酸、乳糖、顺丁烯二酸、麦芽糖、甘露糖、甲醇、糖蜜、蛋白胨、基于植物的水解产物、脯氨酸、丙酸、核糖、蔗糖、淀粉的部分或完全水解产物、蔗糖、酒石酸、TCA 循环有机酸、酒槽水、脲、工业废液以及酵母提取物。

36. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述有机碳源与至少一种其它营养物组合并且以组合形式供应到所述培养基,所述至少一种其它营养物包含选自以下组成的群组中的至少一种:硝酸盐、磷酸盐、铁、钴、铜、钠、钼、锰、锌、盐以及二氧化硅。

37. 根据权利要求 25 所述的方法,其中每天向所述微生物培养物供应所述至少一些光持续 10-16 小时的光周期。

38. 根据权利要求 25 所述的方法,其中每天向所述微生物培养物供应所述至少一些光持续小于 15 小时的光周期。

39. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一些光每天供应超过 15 小时。

40. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一些光是自然光或人造光。

41. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述至少一些光是自然光与人造光的组合。

42. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述光包含来自由以下组成的群组中的至少一种特定波长光谱:紫光(约 380-450nm)、蓝光(约 450-495nm)、绿光(约 495-570nm)、黄光(570-590nm)、橙光(约 590-620nm)、红光(约 620-750nm)以及远红光(约 700-800nm)。

43. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述培养器皿是安置在室外的敞开式器皿。

44. 一种在非纯性兼养条件中培养微生物的方法,其包含:

- a. 将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;
- b. 向所述微生物培养物供应至少一些光;
- c. 向所述微生物培养物供应有机碳源;
- d. 向所述培养物供应包含氧气的气体;以及
- e. 其中所述气体以至少 $2.40 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的 $k_L a$ 供应到所述培养物,并且促使所述微生物的生产率为至少 0.4g/L d。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述 $k_L a$ 介于 $2.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 与 21 s^{-1} 之间。

46. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述微生物的所述生产率介于 0.5g/L d 与 50g/L d 之间。

47. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述微生物的所述生产率介于 0.5g/L d 与 5g/L d 之间。

48. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述微生物的所述生产率介于 0.5g/L d 与 2.5g/L d 之间。

49. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述污染性细菌包含选自以下组成的群组中的至少一种:无色杆菌属、食酸菌属、气单胞菌属、土壤杆菌属、交替单胞菌属、水螺菌属、固氮螺菌属、固氮菌属、伯杰菌属、环丝菌属、布鲁米克氏菌属、伯克氏菌属、柄杆菌属、纤维单胞菌属、金黄杆菌属、短小杆菌属、代尔夫特菌属、稳杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、黄杆菌属、海杆菌属、微杆菌属、香味菌属、副球菌属、地杆菌属、褐杆菌属、假交替单胞菌属、假单胞菌属、拉恩氏菌属、罗尔斯通氏菌属、根瘤菌属、红球菌属、玫瑰单胞菌属、葡萄球菌属、寡养单胞菌属、弧菌属以及周氏菌属。

50. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述微生物包含至少一种选自以下组成的群

组的属的微生物：阿格门氏藻属、双眉藻属、项圈藻属、倒囊藻属、顶丝藻属、节旋藻属（螺旋藻属）、葡萄藻属、咸胞藻属、衣藻属、小球藻属、绿球藻属、十字扁盘石藻属、筒柱藻属、绿群藻属、蓝载藻属、小环藻属、杜氏藻属、艾石属、眼虫藻属、无管眼藻属、脆杆藻属、嘉乐德藻属、功奥曲藻属、红球藻属、哈洛绿藻属、等鞭金藻属、细柱藻属、微星藻属、直链藻属、蒜头藻属、念珠藻属、微绿球藻属、微拟球藻属、舟形藻属、土壤绿藻属、菱形藻属、齿状藻属、棕鞭藻属、奥克洛斯藻属、帕夫洛娃藻属、皮克路藻属、褐指藻属、颗石藻属、紫球藻属、波特里奥洛藻属、定鞭金藻属、红细胞藻属、栅藻属、骨条藻属、泡虫属、辐节藻属、裂丝藻属、奥辛洛藻属、角毛藻属、新绿藻属、棕鞭藻属、紫球藻属、聚球藻属、集胞藻属、扁藻、破囊壶菌以及海链藻属。

51. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述气体通过选自由以下组成的群组中的至少一种供应到所述微生物培养物：气体注射器、多孔扩散器、微孔扩散器、透气膜、微泡发生器、文丘里注射以及微泡流体振荡器。

52. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述有机碳源包含选自由以下组成的群组中的至少一种：乙酸盐、乙酸、亚油酸铵、阿拉伯糖、精氨酸、天冬氨酸、丁酸、纤维素、柠檬酸、乙醇、果糖、脂肪酸、半乳糖、葡萄糖、甘油、甘氨酸、乳酸、乳糖、顺丁烯二酸、麦芽糖、甘露糖、甲醇、糖蜜、蛋白胨、基于植物的水解产物、脯氨酸、丙酸、核糖、蔗糖、淀粉的部分或完全水解产物、蔗糖、酒石酸、TCA 循环有机酸、酒槽水、脲、工业废液以及酵母提取物。

53. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述有机碳源与至少一种其它营养物组合并且以组合形式供应到所述培养基，所述至少一种其它营养物包含选自由以下组成的群组中的至少一种：硝酸盐、磷酸盐、铁、钴、铜、钠、钼、锰、锌、盐以及二氧化硅。

54. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述有机碳源包含乙酸并且所述水性培养基包含初始浓度的乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾。

55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾的所述初始浓度介于 0.1g/L 与 6g/L 之间。

56. 根据权利要求 54 所述的方法，其中在微生物生长的前一天到五天供应所述浓度的乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾。

57. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述器皿是安置在室外的敞开式器皿。

58. 一种使微生物以兼养方式生长的方法，其包含：

a. 在培养器皿中提供含微生物培养物的水性培养基，所述微生物能够利用光和有机碳作为能源；

b. 向所述微生物培养物供应至少一些光；以及

c. 向所述微生物培养物供应包含有机酸和草酰乙酸促进剂的有机碳源。

59. 根据权利要求 58 所述的方法，其中所述有机酸包含来自由乙酸、乙酸酯和乙酸酐组成的群组中的至少一种。

60. 根据权利要求 58 所述的方法，其中所述草酰乙酸促进剂包含来自由丙酸、缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和蛋氨酸组成的群组中的至少一种。

61. 根据权利要求 58 所述的方法，其中有机酸比草酰乙酸促进剂的比率介于 10:0.01 到 10:2 的范围内。

62. 根据权利要求 58 所述的方法，其中所述有机碳源使用恒 pH 培养器件供应。

63. 根据权利要求 58 所述的方法,其中所述微生物包含选自由微藻和蓝藻细菌组成的群组中的至少一种。

在非纯性兼养条件中培养微生物和用乙酸盐和 / 或氧化剂 控制培养物中细菌污染的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下各者的权益 :2012 年 11 月 9 日提交的名称为在兼养条件中培养微生物的方法 (Methods of Culturing microorganisms in Mixotrophic Conditions) 的美国临时申请第 61/724,710 号 ;2013 年 3 月 15 日提交的名称为兼养系统和方法 (Mixotrophy Systems and Methods) 的美国临时申请第 61/798,969 号 ;2013 年 3 月 15 日提交的名称为兼养技术 (Mixotrophy Technology) 的美国临时申请第 61/799,151 号 ;以及 2013 年 9 月 13 日提交的名称为在非纯性兼养条件中培养微生物的方法 (Methods of Culturing microorganisms in Non-Axenic Mixotrophic Conditions) 的美国临时申请第 61/877,894 号,所述申请的完整内容特此以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 例如 (但不限于) 微藻和蓝藻细菌的微生物由于在例如废水介质的各种条件中快速生长的能力,已经获得了作为切实可行的食物源、燃料源、肥料源、化妆品源、化学品源和药物源的关注。每一个微藻种和蓝藻细菌种都具有不同的蛋白质、矿物质和脂肪酸概况,这使得对于某些产品来说,一些种优于其它种成为更好的来源。不同的微藻种和蓝藻细菌种可以使用不同的能源和碳源。光养微生物使用光能以及无机碳 (例如,二氧化碳) 来进行代谢活动。异养微生物不使用光作为能源,并且实际上关于能量和碳使用有机碳源来进行代谢活动。兼养微生物可以使用能源和碳源的混合物,包括光、无机碳 (例如,二氧化碳) 和有机碳。能够使用各种能源和碳源的兼养微生物的多功能性提供了以下可能性 :在对于专性光养生物或异养生物来说具有挑战性的条件中茁壮成长,并且减少由细胞物质的呼吸所造成的生物量损失的影响。另外,可归因于光养代谢与异养代谢的比率的兼养微生物的生长不同于在纯的光养或异养培养物中,产生了限制微生物生长的不同营养物。

[0004] 即使兼养微生物具有使用不同能源和碳源的多功能性,兼养培养物依然面临着其自身的一套挑战。将使用有机碳源的异养培养物维持在纯性或无菌条件下以防止被细菌、真菌或使用有机碳源作为进料源的其它不希望的污染性物种污染。这些异养微生物培养物通常包含封闭、密封并且可高压处理的生物反应器系统,导致成本和复杂性高于简单的敞开式生物反应器系统。光养微生物培养物可以在非无菌条件中在外部生长以便暴露于自然光中,其成本低于封闭式异养生物反应器系统,并且不使用有机碳源 (有机碳源可以为污染性细菌提供进料源)。

[0005] 兼养微生物培养物利用光,可以在室外在敞开式生物反应器系统中生长以便获得自然光,但也包括有机碳源,这使得被培养物中的细菌和其它污染性生物体污染的可能性增加,这归因于细菌和真菌使用有机碳源生长的速率比兼养型微藻或蓝藻细菌快的能力。或者,兼养微生物培养物可以在室内在存在环境光或来自人造光源 (例如发光二极管 (LED) 和荧光灯) 的增强光的情况下生长,但是由于有机碳源的存在,所以仍会存在类似的污染可能性。

[0006] 另外,污染性细菌会影响微生物产物形成(例如,脂质、颜料、蛋白质)和生长。微生物生长中归因于异养代谢的部分还会受到培养物中所存在的微生物控制。已经证实了,如果不控制污染性细菌群体并且允许它消耗为微藻和蓝藻细菌所需的资源,那么兼养微生物培养物中的污染性细菌和其它污染性生物体的增殖对微藻和蓝藻细菌的生产是不利的。因此,在本领域中需要一种在非纯性兼养条件下有效地培养微藻和蓝藻细菌的方法,所述方法控制污染并将培养物营养物质维持在使微藻和蓝藻细菌的生长达到最大的水平。

[0007] 在一个实施例中,本发明描述一种使微生物在非纯性条件中兼养型生长的方法,所述方法使用乙酸/恒 pH 培养(pH auxostat)来供应有机碳源并控制培养物的 pH 水平。其它实施例描述采用不同碳源并且也在非纯性条件中操作的替代性方法。本发明公开了现有技术中未教授的细节,所述细节允许这种方法在非纯性条件、例如敞开式池中运行,同时维持对细菌污染物的控制。

[0008] 在现有技术中,首先由两个不同的研究小组在 1960 年代报告了恒 pH 培养培养系统(邦吉(Bungay),1972;沃森(Watson)1969)并且由马丁(Martin)和亨普夫林(Hempfling)(1976)提出了详细进展。虽然这项研究涉及细菌和酵母培养物,但是拉特雷奇(Ratlidge)和合作者(2001)报告了在异养条件中的基于微藻的乙酸/恒 pH 培养。由拉特雷奇使用乙酸作为有机碳源以异养方式培养的寇氏隐甲藻(*Cryptothecodinium cohnii*)展示,用乙酸/恒 pH 培养培养方法,异养型生长和脂质累积改善。虽然拉特雷奇使用了乙酸/恒 pH 培养使微藻生长,但是所述系统限于在封闭式发酵系统中的异养物种,其在关于污染控制方面并不面临与敞开式兼养系统相同的挑战。已经报告了除乙酸以外还采用有机碳源的在敞开式池中的兼养型单一藻类培养物,但培养物的细菌群体未得到控制或解决。W02012/109375A2 描述了在敞开式池中以低密度以兼养方式生长的小球藻属(*Chlorella*)培养物中,利用葡萄糖作为有机碳源,然后收获生物量用于在异养系统中进行脂质生产。由于兼养期时间短,所以所述培养物不经历与纯粹兼养培养物相同的污染挑战,在更长的时间内生产出高密度生物量和脂质。

[0009] 此外,乙酸作为杀细菌剂的作用在本领域中是已知的(黄(Huang)等人,2011;罗伊(Roe)等人,2002),但是到目前为止,其尚未应用于控制大规模兼养型微藻培养物中的细菌群体。总的来说,已经在实验室规模的实验中在兼养型微藻培养物中利用乙酸,其中标准实验室条件假定纯性操作并且不解决培养物的细菌群体(叶(Yeh)等人 2011)。在 US 3,444,647 中,村上(Takashi)公开了在含有不同碳源的烧瓶培养物中兼养培养小球藻并观察到与包含乙酸的培养物相关的较低细菌水平,但是使用 CO₂而不是乙酸来控制烧瓶培养物内的 pH 水平。最重要的是,US 3,444,647 没有公开用于控制小规模或大规模微藻培养物中的污染性细菌的方法或用于使非纯性兼养型生长条件中微藻的生物量产量达到最大的方法。在此描述的本发明方法基于现有技术进行创新,建立了一种控制异养污染同时将微藻产量升高到比先前针对照明培养物所描述的水平高的水平(例如,3g/L d)的稳定方法。

发明内容

[0010] 本文中所述的实施例大体上涉及用于在非纯性条件中以兼养方式培养微生物的系统和方法。具体来说,本文中所述的实施例用有机碳源、氧化剂和气体传递来优化生长并

控制培养物中的污染。

[0011] 在本发明的一些实施例中,在非纯性兼养条件中培养微生物的方法包含:将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;向微生物培养物供应至少一些光;向微生物培养物供应包含有机酸的有机碳源;以及其中微生物培养物维持污染性细菌的水平低于培养物的总细胞计数的 25% 并且微生物产量为至少 50g/m²天。

[0012] 在一些实施例中,所述微生物包含至少一种选自由以下组成的群组的属的微生物:小球藻属、倒囊藻属 (*Anacystis*)、聚球藻属 (*Synechococcus*)、集胞藻属 (*Synechocystis*)、土壤绿藻属 (*Neosporangiococcum*)、绿球藻属 (*Chlorococcum*)、褐指藻属 (*Phaeodactylum*)、螺旋藻属 (*Spirulina*)、微星藻属 (*Micractinium*)、红球藻属 (*Haematococcus*)、微拟球藻属 (*Nannochloropsis*) 以及咸胞藻属 (*Brachiomonas*)。在一些实施例中,所述污染性细菌包含选自由以下组成的群组中的至少一种:无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.)、食酸菌属 (*Acidovorax* sp.)、气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium* sp.)、交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp.)、水螺菌属 (*Aquaspirillum* sp.)、固氮螺菌属 (*Azospirillum* sp.)、固氮菌属 (*Azotobacter* sp.)、伯杰菌属 (*Bergeyella* sp.)、环丝菌属 (*Brochothrix* sp.)、布鲁米克氏菌属 (*Brumimicrobium* sp.)、伯克氏菌属 (*Burkholderia* sp.)、柄杆菌属 (*Caulobacter* sp.)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.)、短小杆菌属 (*Curtobacterium* sp.)、代尔夫特菌属 (*Delftia* sp.)、稳杆菌属 (*Empedobacter* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)、埃希氏菌属 (*Escherichia* sp.)、黄杆菌属 (*Flavobacterium* sp.)、海杆菌属 (*Marinobacter* sp.)、微杆菌属 (*Microbacterium* sp.)、香味菌属 (*Myroides* sp.)、副球菌属 (*Paracoccus* sp.)、地杆菌属 (*Pedobacter* sp.)、褐杆菌属 (*Phaeobacter* sp.)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、拉恩氏菌属 (*Rahnella* sp.)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia* sp.)、根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、弧菌属 (*Vibrio* sp.) 以及周氏菌属 (*Zobellia* sp.)。

[0013] 在一些实施例中,有机碳源的有机酸包含 0.5–50% 乙酸。在一些实施例中,微生物培养物维持污染性细菌的水平低于培养物的总细胞计数的 20%、10% 或 5%。在一些实施例中,有机酸与至少一种其它营养物组合并且以组合形式供应到培养基,所述至少一种其它营养物包含选自由以下组成的群组中的至少一种:硝酸盐、磷酸盐、铁、钴、铜、钠、钼、锰、锌、盐 (salts) 以及二氧化硅。在一些实施例中,所述方法进一步包含向微生物培养物供应至少一种氧化剂,所述至少一种氧化剂包含选自由以下组成的群组中的至少一种:臭氧、过氧化氢、氯气、亚氯酸盐、氯酸盐、次氯酸盐、硝酸、铬、高锰酸、氧化银以及溴。

[0014] 在一些实施例中,当培养物的经测量 pH 水平达到阈值水平时,通过恒 pH 培养系统 (pH auxostat system) 向培养物供应有机碳源。在一些实施例中,pH 阈值水平是 7.5。在一些实施例中,恒 pH 培养系统维持微生物培养物的 pH 水平基本上恒定。在一些实施例中,恒 pH 培养维持 pH 水平在抑制微生物培养物中的污染性细菌增殖的规定滞后范围内。在一些实施例中,向培养物供应有机碳源直到培养物的经测量溶解氧水平达到低于 2mg O₂/L 的临界水平为止。

[0015] 在一些实施例中,水性培养基包含初始浓度介于 0.1g/L 与 6g/L 之间的乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾。在一些实施例中,每天向微生物培养物供应至少一些光持续 10-16、小于 15 或大于 15 小时的光周期。在一些实施例中,所述至少一些光是自然光、人造光或其组合。在一些实施例中,所述至少一些光包含至少一种来自以下组成的群组的特定波长光谱:紫光(约 380-450nm)、蓝光(约 450-495nm)、绿光(约 495-570nm)、黄光(570-590nm)、橙光(约 590-620nm)、红光(约 620-750nm)以及远红光(约 700-800nm)。在一些实施例中,培养器皿是安置在室外的敞开式器皿。

[0016] 在本发明的一些实施例中,在非纯性条件中控制兼养型微生物培养物中的细菌污染的方法包含:将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;向微生物培养物供应至少一些光;向微生物培养物供应有机碳源;向微生物培养物供应氧化剂;以及其中微生物培养物维持污染性细菌的水平低于微生物培养物的总细胞计数的 25%。在一些实施例中,氧化剂包含选自由以下组成的群组中的至少一种:臭氧、过氧化氢、氯气、亚氯酸盐、氯酸盐、次氯酸盐、硝酸、铬、高锰酸、氧化银以及溴。

[0017] 在一些实施例中,以介于 0.1mg/L 与 2.0mg/L 之间的浓度供应臭氧。在一些实施例中,通过喷雾器和文丘里注射器(venturi injector)中的至少一个向微生物培养物供应氧化剂。在一些实施例中,所述微生物包含至少一种选自由以下组成的群组的属的微生物:阿格门氏藻属(Agmenellum)、双眉藻属(Amphora)、项圈藻属(Anabaena)、倒囊藻属、顶丝藻属(Apistonema)、节旋藻属(Arthrospira(螺旋藻属))、葡萄藻属(Botryococcus)、咸胞藻属、衣藻属(Chlamydomonas)、小球藻属、绿球藻属(Chlorococcum)、十字扁盘石藻属(Cruciplacolithus)、筒柱藻属(Cylindrotheca)、绿群藻属(Coenochloris)、蓝载藻属(Cyanophora)、小环藻属(Cyclotella)、杜氏藻属(Dunaliella)、艾石属(Emiliania)、眼虫藻属(Euglena)、无管眼藻属(Extubocellulus)、脆杆藻属(Fragilaria)、嘉乐德藻属(Galdieria)、功奥曲藻属(Goniotrichium)、红球藻属、哈洛绿藻属(Halochlorella)、等鞭金藻属(Isochrysis)、细柱藻属(Leptocylindrus)、微星藻属、直链藻属(Melosira)、蒜头藻属(Monodus)、念珠藻属(Nostoc)、微绿球藻属(Nannochloris)、微拟球藻属、舟形藻属(Navicula)、土壤绿藻属、菱形藻属(Nitzschia.)、齿状藻属(Odontella)、棕鞭藻属(Ochromonas)、奥克洛斯藻属(Ochrosphaera)、帕夫洛娃藻属(Pavlova)、皮克路藻属(Picochlorum)、褐指藻属、颗石藻属(Pleurochrysis)、紫球藻属(Porphyridium)、波特里奥洛藻属(Poteriochromonas)、定鞭金藻属(Prymnesium)、红细胞藻属(Rhodomonas)、栅藻属(Scenedesmus)、骨条藻属(Skeletonema)、泡虫属(Spumella)、辐节藻属(Stauroneis)、裂丝藻属(Stichococcus)、奥辛洛藻属(Auxenochlorella)、角毛藻属(Cheatochlorella)、新绿藻属(Neochloris)、棕鞭藻属(Ochromonas)、紫球藻属(Porphyridium)、聚球藻属、集胞藻属、扁藻(Tetraselmis)、破囊壶菌(Thraustochytrids)以及海链藻属(Thalassiosira)。

[0018] 在一些实施例中,有机碳源包含选自由以下组成的群组中的至少一种:乙酸盐、乙酸、亚油酸铵、阿拉伯糖、精氨酸、天冬氨酸、丁酸、纤维素、柠檬酸、乙醇、果糖、脂肪酸、半乳糖、葡萄糖、甘油、甘氨酸、乳酸、乳糖、顺丁烯二酸、麦芽糖、甘露糖、甲醇、糖蜜、蛋白胨、基于植物的水解产物、脯氨酸、丙酸、核糖、蔗糖、淀粉的部分或完全水解产物、蔗糖、酒石酸、TCA 循环有机酸、酒糟水、脲、工业废液以及酵母提取物。

[0019] 在本发明的一些实施例中,在非纯性兼养条件中培养微生物的方法包含:将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中;向微生物培养物供应至少一些光;向微生物培养物供应有机碳源;向培养物供应包含氧气的气体;以及其中所述气体以至少 $2.40 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的 $k_L a$ 供应到所述培养物,并且促使所述微生物的生产率为至少 0.4 g/L d 。在一些实施例中, $k_L a$ 介于 $2.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 与 21 s^{-1} 之间。在一些实施例中,所述微生物的生产率介于 0.5 g/L d 与 50 g/L d 之间。

[0020] 在一些实施例中,所述气体通过选自由以下组成的群组中的至少一种供应到微生物培养物:气体注射器、多孔扩散器、微孔扩散器、透气膜、微泡发生器、文丘里注射以及微泡流体振荡器。在一些实施例中,有机碳源包含乙酸并且水性培养基包含初始浓度并且在前 1-5 天供应的乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾。

[0021] 在本发明的一些实施例中,使微生物以兼养方式生长的方法包含:在培养器皿中提供含微生物培养物的水性培养基,所述微生物能够利用光和有机碳作为能源;向微生物培养物供应至少一些光;以及向微生物培养物供应包含乙酸和草酰乙酸促进剂的有机碳源。在一些实施例中,有机酸包含来自由乙酸、乙酸酯和乙酸酐组成的群组中的至少一种。在一些实施例中,草酰乙酸促进剂包含来自由丙酸、缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和蛋氨酸组成的群组中的至少一种。在一些实施例中,有机酸比草酰乙酸促进剂的比率介于 10:0.01 到 10:2 的范围内。

附图说明

[0022] 图 1 是对比图,示出了光合自养培养物与兼养培养物之间的细胞干重和以细胞干重的百分比形式表示的脂质的生产力。

[0023] 图 2 是对比图,示出了光合自养培养物与兼养培养物之间的细胞干重和以细胞干重的百分比形式表示的脂质的生产力。

[0024] 图 3 是对比图,示出了光合自养培养物与兼养培养物之间的 NaNO_3 吸收量,和兼养培养物的乙酸盐吸收量。

[0025] 图 4 是对比图,示出了光合自养培养物与兼养培养物之间的 NaNO_3 吸收量,和兼养培养物的乙酸盐吸收量。

[0026] 图 5 是对比图,示出了两种兼养培养物的残留乙酸盐。

[0027] 图 6 是对比图,示出了光合自养培养物和兼养培养物在 24 小时和 14 小时光周期的情况下的细胞干重的生产力。

[0028] 图 7 是对比图,示出了光合自养培养物和兼养培养物在 24 小时和 14 小时光周期的情况下的硝酸盐吸收量。

[0029] 图 8 是对比图,示出了兼养培养物在 24 小时和 14 小时光周期的情况下的乙酸盐吸收量。

[0030] 图 9 是对比图,示出了光合自养培养物和兼养培养物在 24 小时和 14 小时光周期的情况下的溶解氧水平。

[0031] 图 10 是对比图,示出了光合自养培养物和兼养培养物在 24 小时和 0 小时光周期的情况下的无灰细胞干重生产力,和溶解氧浓度。

[0032] 图 11 是对比图,示出了兼养培养物和异养培养物的乙酸添加量。

- [0033] 图 12 是对比图,示出了光合自养培养物和兼养培养物在 24 小时和 0 小时光周期的情况下的 NaNO_3 吸收量。
- [0034] 图 13 是对比图,示出了两种兼养培养物的细胞干重生产力。
- [0035] 图 14 是对比图,示出了两种兼养培养物的溶解氧水平和最高温度。
- [0036] 图 15 是对比图,示出了兼养培养物的细胞干重生产力、残留 NaNO_3 和溶解氧水平。
- [0037] 图 16 是对比图,示出了兼养培养物的细胞干重生产力、残留 NaNO_3 和溶解氧水平。
- [0038] 图 17 是对比图,示出了两种兼养培养物的细菌计数和温度。
- [0039] 图 18 是对比图,示出了从兼养条件转换到光合自养条件的培养物的无灰细胞干重生产力。
- [0040] 图 19 是对比图,示出了初始乙酸钠浓度为 2g/L 和 0g/L 的兼养培养物和光合自养培养物的无灰细胞干重生产力。
- [0041] 图 20 是对比图,示出了初始乙酸钠浓度为 2g/L 和 0g/L 的兼养培养物的乙酸添加量。
- [0042] 图 21 是对比图,示出了向含有葡萄糖和乙酸盐的培养基中施加 H_2O_2 的影响。
- [0043] 图 22 是对比图,示出了向含有葡萄糖和乙酸盐的培养基中施加 H_2O_2 的影响。
- [0044] 图 23 是对比图,示出了两种兼养培养物的无灰干重生产力。
- [0045] 图 24 是对比图,示出了两种兼养培养物的产量,以 g/m^2 天为单位。
- [0046] 图 25 是对比图,示出了两种兼养培养物的体积生长速率。
- [0047] 图 26 是对比图,示出了两种兼养培养物的生产力(以 g/m^2 天为单位)和乙酸消耗量。
- [0048] 图 27 是对比图,示出了两种兼养培养物的硝酸盐消耗量。
- [0049] 图 28 是对比图,示出了两种兼养培养物中细菌比小球藻的百分比。
- [0050] 图 29 是对比图,示出了两种兼养培养物的氧浓度。
- [0051] 图 30 是对比图,示出了一种兼养培养物的氧浓度。
- [0052] 图 31 是对比图,示出了经声处理的微藻培养物的细菌浓度和活微藻细胞。
- [0053] 图 32 是示出了兼养型微藻培养物随时间推移的浓度和体积生长速率(g/L)的图。
- [0054] 图 33 是示出了兼养型微藻培养物随时间推移的面积生长速率(g/m^2)的图。
- [0055] 图 34 是示出了兼养型微藻培养物的体积生长速率(克/升/天)与浓度的关系的图。
- [0056] 图 35 是示出了兼养型微藻培养物的面积生长速率(g/m^2)与浓度的关系的图。
- [0057] 图 36 是示出了兼养型微藻培养物温度随时间推移的图。
- [0058] 图 37 是示出了兼养型微藻培养物 pH 随时间推移的图。
- [0059] 图 38 是示出了兼养型微藻培养物溶解氧浓度随时间推移的图。
- [0060] 图 39 是示出了兼养型微藻培养物供应的光合有效辐射随时间推移的图。
- [0061] 图 40 是示出了兼养型微藻培养物硝酸盐浓度随时间推移的图。
- [0062] 图 41 是示出了供应了不同有机碳源的兼养型微藻培养物的细胞干重生产力随时间推移的图。

具体实施方式

[0063] 引言

[0064] 术语“微生物”是指微观生物体,例如微藻和蓝藻细菌。微藻包括微观多细胞植物(例如浮萍)、光合微生物、异养微生物、硅藻、沟鞭藻以及单细胞藻类。

[0065] 可以在兼养培养条件中生长的微生物包含微藻和蓝藻细菌。兼养微生物的非限制性实例可以包含以下各属的生物体:阿格门氏藻属、双眉藻属、项圈藻属、倒囊藻属、顶丝藻属、节旋藻属(螺旋藻属)、葡萄藻属、咸胞藻属、衣藻属、小球藻属、绿球藻属、十字扁盘石藻属、筒柱藻属、绿群藻属、蓝载藻属、小环藻属、杜氏藻属、艾石属、眼虫藻属、无管眼藻属、脆杆藻属、嘉乐德藻属、功奥曲藻属、红球藻属、哈洛绿藻属、等鞭金藻属、细柱藻属、微星藻属、直链藻属、蒜头藻属、念珠藻属、微绿球藻属、微拟球藻属、舟形藻属、土壤绿藻属、菱形藻属、齿状藻属、棕鞭藻属、奥克洛斯藻属、帕夫洛娃藻属、皮克路藻属、褐指藻属、颗石藻属、紫球藻属、波特里奥洛藻属、定鞭金藻属、红细胞藻属、栅藻属、骨条藻属、泡虫属、辐节藻属、裂丝藻属、奥辛洛藻属、角毛藻属、新绿藻属、棕鞭藻属、紫球藻属、聚球藻属、集胞藻属、扁藻、破囊壶菌、海链藻属以及其种。

[0066] 适用于使用乙酸作为有机碳源进行兼养型生长的微生物种的非限制性实例可以包含以下各属的生物体:小球藻属、倒囊藻属、聚球藻属、集胞藻属、土壤绿藻属、绿球藻属、褐指藻属、螺旋藻属、微星藻属、红球藻属、微拟球藻属、咸胞藻属以及其种。

[0067] 适用于使微生物以兼养方式或以异养方式生长的有机碳源可以包含:乙酸盐、乙酸、亚油酸铵、阿拉伯糖、精氨酸、天冬氨酸、丁酸、纤维素、柠檬酸、乙醇、果糖、脂肪酸、半乳糖、葡萄糖、甘油、甘氨酸、乳酸、乳糖、顺丁烯二酸、麦芽糖、甘露糖、甲醇、糖蜜、蛋白胨、基于植物的水解产物、脯氨酸、丙酸、核糖、蔗糖、淀粉的部分或完全水解产物、蔗糖、酒石酸、TCA 循环有机酸、酒槽水、脲、工业废液、酵母提取物以及其组合。有机碳源可以包含任何单一来源、来源组合以及单一来源或来源组合的稀释物。

[0068] 虽然能够兼养型生长的微生物也可以在 100% 光养条件或 100% 异养条件中生长,但是已经发现,在包括敞开式系统的生物反应器中,光与有机碳源的组合可以胜过光养条件。能够兼养型生长的微生物还可以在条件组合中生长,例如在光养条件、兼养条件以及异养条件之间转换。借由营养条件之间的转换的培养方法可以调控细菌的进料源,同时允许兼养微生物在已改变条件中继续生长。

[0069] 举例来说,微藻生长在光养条件中相比于兼养条件或异养条件会有所减缓,但是细菌生长同样会减缓,并且如果细菌缺乏光合代谢,那么细菌不能以光养方式生长。在非纯性条件中以兼养方式生长的能力还提供了一种比传统发酵简单并且更接近光养方法的简单性的方法。因此,优化兼养微生物在非纯性条件中的生产力包含以下各者的选择:有机碳源、用于投与有机碳源的系统和方法、用于施加最佳类型的光和最佳量光的系统和方法、用于投与营养物的系统和方法、用于控制 pH 水平的系统和方法以及用于控制污染性生物体群体(例如,细菌、真菌)的系统和方法。使用乙酸/恒 pH 培养系统提供一种使兼养型微生物培养物在非纯性条件中生长的有效方法,所述方法是通过将培养物中的有机碳源维持在恒定或基本上恒定水平同时帮助维持抑制污染性细菌生长的培养条件。

[0070] 贯穿本文,在式中使用例如 $\text{g/m}^2\text{d}$ 、 g/L d 、 h/天 、 L/d 、 Wh/g 或 mg/L d 的缩写。 $\text{g/m}^2\text{d}$ 意指克/平方米/天。 g/L d 意指克/升/天; L/d 意指升/天; h/天 和 h/d 意指小时/天; Wh/g 意指瓦小时/克。

[0071] 术语“生产力”是指微藻或蓝藻细菌生长速率的度量。

[0072] 术语“面积生产力”或“面积生长速率”(面积 (areal) 有时也拼写成面积 (aerial)) 意指每单位陆地面积每天产生的微藻或蓝藻细菌的质量。所述速率的一个实例是克 / 平方米 / 天 ($\text{g}/\text{m}^2\text{d}$), 这是每平方米反应器面积每天产生的微藻或蓝藻细菌的克数。

[0073] 术语“体积生产力”或“体积生长速率”意指每单位培养体积每天产生的微藻或蓝藻细菌的质量。这种单位的一个实例是 $\text{g}/\text{L d}$ (克 / 升 / 天), 这是每升培养物每天产生的微藻或蓝藻细菌的克数。实例 4 是指深度为 10cm 的池, 因此面积生产力 $\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 是体积生产力 $\text{g}/\text{L}/\text{天}$ 的 1/100 倍。

[0074] 恒培养器 (auxostat) 是一种使用进料速率来控制连续培养物中的可变状态的器件。培养物中的生物体确定其自身的稀释率。恒培养器在高稀释率下往往比本领域中通常已知的恒化器要稳定得多。恒培养器中的群体选择压力产生快速生长的培养物。实际应用包括高速繁殖、以用于最大速率的浓度控制废弃物的破坏、开放培养 (因为可能存在的污染性生物体不能在洗去之前调整) 以及受益于营养物浓度比的谨慎平衡的工艺操作。

[0075] 术语“恒 pH 培养”是指将新鲜培养基 (例如, 含有有机碳或乙酸的培养基) 的添加与 pH 控制相耦合的微生物培养技术。当 pH 偏离指定设定点时, 添加新鲜培养基以将 pH 带回设定点。pH 改变的速率通常是生长情况的优良指示并且满足作为生长相关参数的要求。进料将维持残留营养物浓度与培养基的缓冲能力平衡。pH 设定点可以取决于当时存在于培养物中的微生物而改变。所存在的微生物可以通过操作生物反应器的场所和季节以及培养物的位置离其它污染源 (例如, 其它农场、农业、海洋、湖泊、河流、废水) 有多近来驱动。培养基添加的速率由缓冲能力和限制性营养物的进料浓度决定, 而不是如传统恒培养器中那般由设定点 (pH) 直接决定。恒 pH 培养是稳固的, 但间接控制营养物浓度。pH 水平表示在碳和营养物吸收期间释放的不同离子物质和离子的产量的总和。因此, pH 水平可以随微生物的生长而变, 上移或下移。最常见的情况是由有机酸产生和铵吸收引起的 pH 减小。然而, 关于在富含蛋白质或氨基酸的培养基上的微生物生长, pH 水平将随着生长上升, 因为释放出过量的氨。

[0076] 术语“微生物培养 (microbiological culture/microbial culture/microorganism culture)”是指用于通过在预定培养基中、包括在受控制的实验室条件下繁殖而使微生物倍增的方法或系统。使用微生物培养来使生物体倍增, 测定生物体的类型或所测试样品中的生物体的丰度。在液体培养基中, 术语微生物培养一般是指整个液体培养基和液体培养基中的微生物, 无论培养物所处的器皿如何。液体培养基通常被称作“培养基 (media/culture medium/culture media)”。当重点放在复数个微生物上时, 培养的动作一般称作“培养多个微生物”。当重要性放在微生物的一个种或属上时, 培养的动作一般称作“培养一种微生物”。所使用的微生物培养物与多种微生物的培养物是同义词。

[0077] 术语“单一藻类”和“单种藻的”是指在非纯性条件下操作但单一微藻或蓝藻细菌属或种占优势的微藻或蓝藻细菌培养物。尽管存在其它异养微生物 (即, 非纯性条件), 但是由于培养物中所用的无机矿物质培养基, 所以培养物维持稳定。单一藻类培养物可以用于异养培养, 但有机培养基与异养细菌和真菌的存在的组合“本身”不保证所存在的单一藻类培养物在光养条件中的稳定性并且因此所述术语不太恰当。单一藻类培养物还可以用于定义单一属或种占优势的非纯性微生物培养物。

[0078] 术语“接种”是指向培养基中植入或引入微生物。贯穿本说明书,将微生物培养物接种在所述培养条件中是指在培养条件中开始微生物培养物,如微生物培养领域中常用的那样。被引入到培养基中的微生物可以被称作种子或接种物。

[0079] 术语“臭氧”意指一种形式的氧气 O_3 , 其独特的气味表明含弱氯, 是在电火花或紫外光穿过空气或氧气时产生的。臭氧是一种具有强大的氧化特性的无色不稳定有毒气体, 通过放电由氧气形成。

[0080] 术语“凝固”意指引起液体悬浮液转化成粘性或变稠的软的半固体或固体物质。凝固意指脱水, 如用于去除足够的水以便引起液体悬浮液变成变稠的软的、粘性半固体或固体物质。脱水方法可以结合微生物培养一起使用, 从而引起微生物凝固并且形成可以更适用于收集和下游处理的更稠密物质。

[0081] 术语“兼养型”和“兼养”是指其中可以向微生物培养物施加光、有机碳和无机碳(例如, 二氧化碳、碳酸盐、碳酸氢盐)的培养条件。能够在兼养条件中生长的微生物具有光养微生物和异养微生物的代谢概况, 并且可以使用光和有机碳两者作为能源, 以及无机碳和有机碳两者作为碳源。兼养微生物可以使用光、无机碳和有机碳, 同时进行光养代谢和异养代谢, 或可以在每一种代谢的采用之间进行转换。取决于微生物所用的能源和碳源, 兼养培养条件中的微生物可以是净氧气或二氧化碳生产者。能够兼养型生长的微生物包含具有自然代谢和在兼养条件中生长的能力的微生物, 以及借助于例如诱变或基因工程的方法修饰细胞获得所述代谢和能力的微生物。

[0082] 术语“光养的”、“光养”、“光合自养”、“光合自养的”以及“自养生物”是指可以向微生物培养物施加光和无机碳(例如, 二氧化碳、碳酸盐、碳酸氢盐)的培养条件。能够在光养条件中生长的微生物可以使用光作为能源并且使用无机碳(例如, 二氧化碳)作为碳源。微生物在光养条件中可以产生氧气。

[0083] 术语“异养的”和“异养”是指可以在不存在光的情况下向微生物培养物施加有机碳的培养条件。能够在异养条件中生长的微生物可以使用有机碳作为能源和作为碳源两者。微生物在异养条件中可以产生二氧化碳。

[0084] 术语“纯性”描述了完全不含所有其它“污染性”生物体(即, 对微藻或蓝藻细菌培养物的健康不利的生物体)的生物体培养物。贯穿本说明书, 纯性是指当接种到含细菌基础培养基的琼脂板中时不形成除相关微生物以外的任何群落的培养物。纯性描述了未被任何其它活的生物体污染或不与任何其它活的生物体相关的培养物, 例如(但不限于)细菌、蓝藻细菌、微藻及/或真菌。纯性通常用于指代完全不存在其它不同生物体的纯微生物培养物。微藻或蓝藻细菌的纯性培养物完全不含其它不同生物体。

[0085] 术语“收集”是指从培养器皿中移出微生物培养物和/或分离微生物与培养基。微生物的收集可以通过本领域中已知的任何方法执行, 所述方法例如(但不限于)除沫、排液、溶气浮选、泡沫分离、离心、过滤、沉降、化学絮凝以及电脱水。

[0086] 兼养培养法

[0087] 在非纯性兼养条件中培养微生物的方法包含: 将包含至少一些污染性细菌的微生物培养物接种到培养器皿中的水性培养基中; 向微生物培养物供应至少一些光; 以及向微生物培养物供应有机碳源。选择有机酸作为有机碳源可以有助于维持污染性细菌的水平低于可接受的阈值, 从而获得高生长速率。公认的是, 实际上, 包含在非纯性条件中的微生物

的培养（例如用有机碳源对微藻或蓝藻细菌进行照明培养）会具有至少一些污染性细菌，因为将细菌群体减少到接近零的实际能力（例如，通过蒸汽灭菌或其它已知程序）对于培养物密度为 0.05–10g/L 的大体积照明培养来说可能成本过高。另外，可以不必完全消除培养物的细菌群体，因为某些细菌可以参与为微藻或蓝藻细菌所必需的营养物的生产，例如氰钴维生素或其它有价值的产物。因此，在一些实施例中，可以将污染性细菌的水平维持在低于培养物的总细胞计数的 25%、20%、10% 或 5%。

[0088] 如先前所述，维持一定水平的特定类型的细菌对微藻或蓝藻细菌培养物可以是有利的。可以存在于微藻和蓝藻细菌培养物中的细菌包含（但不限于）无色杆菌属、食酸菌属、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、气单胞菌属、土壤杆菌属、交替单胞菌属、屈曲杆菌属 (*Ancylobacter* sp.)、水螺菌属、固氮螺菌属、固氮菌属、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、伯杰菌属、短波单胞菌属 (*Brevundimonas* sp.)、环丝菌属、布鲁米克氏菌属、伯克氏菌属、柄杆菌属、纤维单胞菌属、金黄杆菌属、短小杆菌属、代尔夫特菌属、稳杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、黄杆菌属、芽单胞菌属 (*Gemmatimonas* sp.)、盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.)、噬氢菌属 (*Hydrogenophaga* sp.)、紫色杆菌属 (*Janthinobacterium* sp.)、乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp.)、海杆菌属、马赛菌属 (*Massilia* sp.)、微杆菌属、香味菌属、泛菌属 (*Pantoea* sp.)、副球菌属、地杆菌属、褐杆菌属、叶杆菌属 (*Phyllobacterium* sp.)、假交替单胞菌属、假单胞菌属、拉恩氏菌属、罗尔斯通氏菌属、根瘤菌属、红球菌属、玫瑰单胞菌属、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.)、葡萄球菌属、寡养单胞菌属、弧菌属以及周氏菌属。

[0089] 对微藻和蓝藻细菌具有负面或有害影响的细菌可以表示为污染性细菌。可以对培养物中的微藻或蓝藻细菌具有负面或有害影响的细菌包含（但不限于）：无色杆菌属、食酸菌属、气单胞菌属、土壤杆菌属、交替单胞菌属、水螺菌属、固氮螺菌属、固氮菌属、伯杰菌属、环丝菌属、布鲁米克氏菌属、伯克氏菌属、柄杆菌属、纤维单胞菌属、金黄杆菌属、短小杆菌属、代尔夫特菌属、稳杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、黄杆菌属、海杆菌属、微杆菌属、香味菌属、副球菌属、地杆菌属、褐杆菌属、假交替单胞菌属、假单胞菌属、拉恩氏菌属、罗尔斯通氏菌属、根瘤菌属、红球菌属、玫瑰单胞菌属、葡萄球菌属、寡养单胞菌属、弧菌属、周氏菌属以及共享类似特征的其它细菌。

[0090] 可以对培养物中的微藻或蓝藻细菌具有中性或有利影响的细菌包含（但不限于）：食酸菌属、不动杆菌属、气单胞菌属、土壤杆菌属、交替单胞菌属、屈曲杆菌属、固氮螺菌属、固氮菌属、芽孢杆菌属、短波单胞菌属、布鲁米克氏菌属、伯克氏菌属、柄杆菌属、纤维单胞菌属、代尔夫特菌属、稳杆菌属、芽单胞菌属、盐单胞菌属、噬氢菌属、紫色杆菌属、乳杆菌属、海杆菌属、泛菌属、副球菌属、褐杆菌属、叶杆菌属、假交替单胞菌属、假单胞菌属、根瘤菌属、鞘氨醇单胞菌属、周氏菌属以及共享类似特征的其它细菌。虽然在一个特定属中的细菌一般具有相同特征，但是公认的是，大部分种一般被鉴定为对微藻或蓝藻细菌有害的细菌属也可以包括在所述属内对微藻或蓝藻细菌的特定培养物是中性的或有利的特定种，并且反之亦然。举例来说，已经观察到，假单胞菌属的多个种对微藻有害，然而文献中已经描述了假单胞菌属中具有可以对微藻或蓝藻细菌培养物有利的抗真菌官能性的某些种。

[0091] 可以向微藻或蓝藻细菌培养物中添加提供中性或有利影响的细菌，发挥益生作用来帮助控制污染性细菌的水平、提高微藻或蓝藻细菌的生长量或增加培养物寿命。在一个

非限制性实例中,最新数据已经显示,通过对兼养型小球藻属培养物接种芽孢杆菌属、根瘤菌属和鞘氨醇单胞菌属,小球藻属在 35℃ 下生长良好并且胜过未接种细菌的对照培养物。可以向培养基中施加抑制革兰氏 (gram) (+) 和 / 或革兰氏 (-) 细菌以减少培养物中所存在的所有细菌及 / 或特定细菌的生长的其它添加剂。

[0092] 已经观察到某些细菌种对微藻或蓝藻细菌具有中性或有利影响并且可以添加到培养物中发挥益生作用,从而提供例如以下功能:循环有机和无机营养物;产生有价值的工业和医药产物,例如细胞外聚物质、营养物、维生素和螯合矿物质;产生抗真菌剂;产生生长增强剂;产生抗生素;产生生物化合物;固氮;转换营养物;分解有机物质;有助于维持微生物培养物中的生物平衡的平衡;以及有助于硝化作用和反硝化作用。一些细菌可以具有与光反应的光色素,类似于微藻或蓝藻细菌。作为一个非限制性实例,在含小球藻属的培养物中生长的固氮螺菌属可以增加色素含量、脂质含量、脂质多样性以及生长。文献中已知,鞘氨醇单胞菌属与植物有关并且能够固氮。含光色素的细菌还可以用光强度和 / 或特定的光波长操控以影响培养物。

[0093] 将微生物接种在用于生长的任何合适器皿中所含有的水性培养基中。在一些实施例中,所述培养基可以是适用于培养微生物的任何液体培养基,例如(但不限于)BG-11 培养基、经修饰的 BG-11 培养基、f/2 培养基以及经修饰的 f/2 培养基。在一些实施例中,所述培养基包含以下中的任何一或多种:海水、湖水、河水、废水或其它可获得的水源;在接种微生物培养物之前通过过滤或灭菌清洁的可获得的水源;以及接种了有益微生物(例如,细菌)以快速启动微生物培养的水性培养基。在一些实施例中,取决于培养物中所存在的微生物和培养物的健康,视需要可以操控培养物的参数并且可以向培养基中添加有益微生物(例如,细菌)。在一些实施例中,培养器皿可以包含槽、生物反应器、光生物反应器、池、跑道池、管状反应器、平板式反应器、食槽、塔式生物反应器、袋式生物反应器或本领域中已知的任何其它生物反应器。在一些实施例中,所述器皿可以是敞开的。在一些实施例中,所述器皿可以是封闭的。在一些实施例中,所述器皿可以位于室内。在一些实施例中,所述器皿可以位于室外。在一些实施例中,所述器皿可以位于外部,但安置在温室结构内,或涵盖基本上包封反应器以使从环境进入的不希望的要素和外来物质降到最低,并且阻断至少一些光或光波长。

[0094] 微生物培养物可以维持在恒定或基本上恒定的 pH 水平和温度下。在其它实施例中,可以在 pH 水平范围或温度的滞后范围、包括在昼夜循环之后的温度或 pH 水平和温度范围之间操作微生物培养物。在一些实施例中,pH 水平介于约 6 到 9 的范围内并且温度介于约 10℃ 到 30℃ 的范围内。在其它实施例中,pH 水平介于约 1 到约 5 的范围内并且温度介于 30℃ 到 50℃ 的范围内。在一些实施例中,pH 水平和温度可以维持在确定范围持续至少一部分生长周期,所述生长周期可以关联日照时数或日落之后的时数。在其它实施例中,pH 水平是约 7.5 并且温度是约 25-28℃。

[0095] 在一些实施例中,可以用热交换器控制培养物的温度,所述热交换器例如(但不限于)冷却或加热线圈。在一些实施例中,可以取决于所存在的微生物组成,在培养期间在适用于微藻生长的范围内改变 pH 设定点。可以使用 pH 改变来冲击(即,胁迫)细菌并减少培养物中主要对微藻或蓝藻细菌有害的污染性细菌的增殖。pH 改变可以与以下各者相组合:持续一段时间(例如,4 小时到 48 小时)停止碳源供应、操控溶解氧(DO)水平、修改温

度、添加杀细菌剂、添加氨基酸或其它进料源以及其组合,所述组合可以减少可能对微藻或蓝藻细菌有害的细菌的增殖和 / 或促进可能是有益 / 非有害细菌的细菌的增殖。

[0096] 包含光合有效辐射 (PAR) 的照明光源向培养物供应至少一些光进行光合活动。光源可以是自然光、人造光或其任何组合。曝光期 (即,光周期) 可以介于约 0 到 24h/ 天的范围内。在其它实施例中,曝光期 (即,光周期) 可以介于约 10 到 16h/ 天的范围内。在一些实施例中,光的供应可以是连续的、不连续的 (例如,闪光)、恒定强度或可变强度。在一些实施例中,自然光源可以包含太阳辐射。在替代性实施例中,可以在培养物生命结束时使培养物间歇曝光数分钟 / 天或一天等。在一些实施例中,人造光源可以包含发光二极管 (LED)、微型 LED、荧光灯、白炽灯、气体灯或卤素灯。

[0097] 在其它实施例中,可以过滤自然光源或可以调节人造光源以将所供应的光限制在特定波长光谱或特定波长光谱的组合,例如 (但不限于) 紫光 (约 380-450nm)、蓝光 (约 450-495nm)、绿光 (约 495-570nm)、黄光 (570-590nm)、橙光 (约 590-620nm)、红光 (约 620-750nm) 以及远红光 (约 700-800nm) 光谱。可以使用调节到特定波长光谱或通过特定温室膜过滤的光波长的 LED 来操控培养物中的微生物的生长和产物产量。可以在收集之前、在收集期间或在收集之后使用特定波长的 LED 进行结束步骤,从而影响微生物中的产物概况。可以在特定时间向微生物施加不同强度和 / 或波长的光,从而:增强生长、增强产物形成、操控色素形成或用紫外 (UV) 光对培养物进行“天然灭菌”。举例来说,提高红球藻属培养物中的 UV 光的强度可以产生包囊和色素形成。

[0098] 可以通过水力混合 (例如,泵)、机械混合 (例如,搅动器、搅拌器、推进器) 或桨轮混合培养物。在一些实施例中,可以用空气、二氧化碳、氧气或任何其它合适的气体对培养物进行充气。在一些实施例中,可以通过气体注射器、多孔扩散器、微孔扩散器、透气膜、微泡发生器、文丘里注射或微泡流体振荡器提供充气。培养物的混合、搅动和 / 或充气允许培养物中的微生物的循环,得到营养物、气体和有机碳源的均匀分布,以及获得光。

[0099] 在一些实施例中,可以使用例如乙酸的有机酸作为有机碳源并将其通过恒 pH 培养系统从进料槽供应到微生物培养物。在一些实施例中,恒 pH 培养系统可以包含电磁阀、蠕动泵、pH 探针和 pH 控制器。在一些实施例中,恒 pH 培养系统可以包含通过针阀控制的滴液施加器件、计量泵或蠕动泵以及 pH 控制器。碳和氮吸收 (即,乙酸钠、硝酸钠) 和光合活动 (即,碳酸氢钠吸收) 引起培养物的 pH 水平上升。可以将 pH 控制器设定在阈值水平 (即,设定点) 并且当所测量的 pH 水平超过所设定的阈值水平时,激活恒培养器系统以向培养物供应乙酸。组合控制 pH 测量的频率、通过恒培养器系统进行的乙酸的投与以及培养物的混合来维持 pH 值基本上恒定。在一些实施例中,可以将乙酸进料在水中稀释到低于 100% 并且低到 0.5% 的浓度,其中优选浓度介于 15% 与 50% 之间。在其它实施例中,乙酸浓度可以是低于 10%,以便连续稀释微生物培养物。在其它实施例中,可以将乙酸与其它培养基或有机碳源混合在一起。

[0100] 在其它实施例中,例如乙酸的有机碳源可以与例如氮源或磷源的其它营养物组分组合或混合在一起。在其它实施例中,其它营养物可以直接添加到例如乙酸的有机碳源中,并且可以通过受恒 pH 培养控制的乙酸供应向培养物中添加单一溶液 (或多种溶液)。在一个实施例中,可以在向培养物供应所述溶液之前向乙酸或替代性有机碳源中直接添加营养物。在使用有机酸的此类实施例中,可以降低对营养培养基的过滤要求,因为例如乙酸的有

机酸保持营养培养基无菌。可以通过测量进料槽中的有机碳（例如，乙酸）的水平来监测例如乙酸的有机碳源的消耗量，这可能与微生物细胞生长有关。还可以向培养物中添加已知为植物所用的硝酸盐（例如， NO_3 ）、磷酸盐和其它营养物（例如，一组非限制性营养物将是铁、钴、铜、钠、锰、锌、钼、二氧化硅、盐以及其组合），用于将硝酸盐和营养物维持在所要水平。在一些实施例中，有机碳源和至少一种其它营养物可以呈浓缩形式。在一些实施例中，有机碳源和至少一种其它营养物可以呈稀释形式。

[0101] 在一些实施例中，可以管理兼养型微生物培养物（例如，微藻或蓝藻细菌）中的污染水平以限制残留的或自由浮动的可用以污染微生物的进料源（例如，细菌、真菌）。在一些实施例中，有机碳进料和至少一种其它营养物进料可以混合在一起并供应，从而以将基本上被兼养微生物消耗并且使残留的或自由浮动的有机碳和至少一种可用于污染微生物的其它营养物的量降到最低的量一起引入有机碳和至少一种其它营养物。所述实施例可以有效地维持针对有机碳和至少一种其它营养物的培养物浓度接近于零。在一些实施例中，可以选择有机碳比至少一种其它营养物的比率以使得有机碳的兼养微生物消耗量匹配至少一种其它营养物的消耗量。可以通过实验和可用文献的综述单独地测定各种微生物的有机碳和营养物的消耗速率。

[0102] 在一些实施例中，有机碳源包含乙酸。在一些实施例中，乙酸可以稀释到约 30% 或更小的浓度。在一些实施例中，至少一种其它营养物包含 NO_3 。在一些实施例中， NO_3 : 乙酸的比率可以介于 0.5:10 到 2:10 的范围内、优选地约 1:10。在一些实施例中，乙酸可以包含乙酸和其前体，例如乙酸酯和乙酸酐。

[0103] 在一些实施例中，可以选择有机碳比至少一种其它营养物的比率以使得至少一种其它营养物的用量使培养基中的浓度剧增，从而维持基线水平。此类实施例的一个非限制性应用可以是为了废水培养基中的废弃物补救，培养废水处理微生物，例如（不限于）细菌。可以将有机碳与例如硝酸盐的另一种生长限制营养物混合并投与，从而有效地维持硝酸盐的培养浓度在最小水平或基线，例如（但不限于）100ppm。

[0104] 兼养微生物生长消耗并产生氧气，因此改变了培养基中的溶解氧 (DO) 浓度 (mg/L)。可以控制溶解氧浓度以增强兼养微生物生长并且保持污染性细菌群体在控制内。微藻和蓝藻细菌中的细胞呼吸似乎不如细菌中有效，细菌可以清除低浓度的氧气或甚至比微藻和蓝藻细菌更好地以厌氧方式生长。因此，溶解氧可以用作用于管理兼养培养物中对微藻和蓝藻细菌的生产力和活力几乎没有影响的污染性细菌群体的可变参数。可以减少或增加氧传递以管理兼养培养物内的污染性细菌群体，从而增加培养物寿命并且减少细菌污染。

[0105] 可以以机械方式、以化学方式或以生物方式控制培养物溶液中的溶解氧浓度。机械控制可以包含纯空气注射；通过使用氧浓缩器或压缩氧气注射掺合氧浓度增加的空气；或掺合空气与氮气，减少溶解氧浓度。机械控制还可以包含反应器、培养单元的深度、混合速率以及指示空气/水气体交换的反应器的表面积的设计和尺寸标定。化学控制可以包含减少溶解氧浓度的亚硫酸钠，或将增加溶解氧的其它化学品，例如臭氧。亚硫酸钠可以充当氧清除剂，例如当溶解于水中时，两个亚硫酸钠分子将与两个氧原子反应。因此，为了去除 1ppm 氧，可以采用 7.8ppm 亚硫酸钠 ($2\text{Na}+2\text{SO}_3+2\text{O} = 2\text{Na}+2\text{SO}_4$)。

[0106] 氧清除剂的非限制性清单包括亚硫酸钠和肼（密苏里州圣路易斯的西格玛-阿尔德里奇 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO)）、Eliminox® 甲酰肼和 SurGard® 异抗血酸

盐（伊利诺伊州内珀维尔的纳尔科化学公司（Nalco Chemical Co. Naperville, IL））、Mekor® 甲基乙基酮肟（新泽西州布恩顿的杜鲁化学公司（Drew Chemical Corporation, Boonton, NJ））、Magni-Form® 氢醌（宾夕法尼亚州特里沃斯的贝茨实验室（Betz Laboratories, Trevose, PA））、Steamate® 二乙基羟胺（伊利诺伊州祖里克湖的迪尔伯恩化学公司（Dearborn Chemical Co. Lake Zurich, IL））。还可以通过在兼养条件与光养条件之间转换培养物以生物方式控制溶解氧。当溶解氧浓度达到目标浓度并且污染性细菌群体已被减少时，所述系统可以从光养条件转换回兼养条件，由此建立减少污染性细菌并且增加微藻或蓝藻细菌培养物寿命的循环模式。

[0107] 取决于细菌群体和种以及微藻或蓝藻细菌群体和种，兼养微生物培养物中的溶解氧的阈值水平（即，设定点）可以介于约 0.1mg O₂/L 到约 30mg O₂/L 的范围内。溶解氧范围可以保持在目标浓度持续较长时间。当污染性细菌群体达到不适合兼养微生物培养物的寿命和活力的浓度时，可以将溶解氧增加到目标浓度，减少污染性细菌群体但不影响微藻或蓝藻细菌培养物活力。溶解氧的目标浓度可以介于 1-6mg O₂/L 之间，或超过大气饱和浓度，例如 100% 到 300% 饱和。在一些实施例中，可以向培养物供应有机碳源直到培养物的经测量溶解氧水平达到低于约 2mg O₂/L 的临界水平为止。

[0108] 在一个非限制性示例性实施例中，有助于恒 pH 培养系统向培养物供应乙酸（即，有机碳）的效率的因素包括最初激活恒培养器系统并且开始供应乙酸以控制 pH 水平的能力。在一些实施例中，可以通过微生物的光合活动最初激活乙酸 / 恒 pH 培养系统，升高培养物的 pH。在一些实施例中，可以向初始培养基中添加乙酸钠、氢氧化钠或氢氧化钾以提高残留乙酸浓度并且自动地激活乙酸 / 恒 pH 培养系统，随后由微生物开始光合活动。在一些实施例中，最初可以向培养基中添加 0.05-10g/L 乙酸钠。在其它实施例中，最初可以向培养基中添加 0.1-6g/L 乙酸钠用于帮助从光养条件转换到兼养条件。在一些实施例中，乙酸钠浓度可以超过 1.6g/L 以便抑制污染性微生物（例如，细菌、真菌）的生长。在一些实施例中，可以在微生物生长的至少第一天供应所述浓度的乙酸钠。在其它实施例中，可以在微生物生长的前 1-5 天，并且优选地在微生物生长的前两天供应乙酸钠。

[0109] 在替代实施例中，可以向培养基的营养物配制品中添加乙酸钠，从而确保存在初始浓度的乙酸钠。还可以在收集时向培养物中连续地添加其中营养物配制品包含乙酸钠的培养基。在另一个实施例中，可以向用于再填充培养物的补给水中和用于冲洗培养系统的水中添加低水平的有机碳源作为向培养物给予有机碳源的系统的替代方案。

[0110] 在微生物培养物达到所要浓度或成熟期之后，可以收集至少一部分微生物培养物进行进一步加工。可以通过本领域中已知的任何方法收集微生物，所述方法例如（但不限于）溶气浮选、泡沫分离、离心、过滤、沉降、化学絮凝以及电脱水。所述收集可以连续进行或以一天、每天、在一定数量的天数之后或每周发生多次的分批方法进行。

[0111] 在其它实施例中，还可以使用恒氮培养器或其它 pH 改变培养基。在其它实施例中，可以用二氧化碳来平衡有机碳的添加，从而使有机物质在培养物内循环并且使污染性细菌受控制或保持受抑制，但不使培养物占优势（如通过包含污染性细菌的培养物中的活细胞超过 50% 所界定）。在其它实施例中，操控碳源供应（例如，乙酸或 CO₂）可以允许控制 pH 水平，但可以故意使 pH 水平的波动较大，从而维持培养物中微藻或蓝藻细菌超过污染性细菌的优势的平衡（例如，pH 水平从 7.5 波动到 8.5，或从 6.5 波动到 9 或在培养物内相差

至少 0.5 个 pH 的任何范围内波动)。pH 水平的所述操控影响污染性细菌的程度会大于微藻或蓝藻细菌,因为所述 pH 水平在微藻或蓝藻细菌的生长范围内。在一些实施例中,将 pH 水平维持在抑制微生物培养物中的污染性生物体增殖的规定滞后范围内。

[0112] 污染控制方法

[0113] 在培养基中使用有机碳源所引入的微生物培养物的细菌污染的风险高于不含有机碳源的光养培养基中。一些细菌种能够生长得比微藻或蓝藻细菌快,所述细菌可以超过微藻或蓝藻细菌培养物资源以及微藻或蓝藻细菌本身。因此,控制细菌污染的能力是有助于兼养培养效率的一个因素。已经发现,例如乙酸的有机酸在某些条件中抑制细菌生长,这可能与负责蛋氨酸合成的酶(α -琥珀酰转移酶)的变性有关。已经发现,细菌增殖在含葡萄糖的培养基中比在含乙酸的培养基中快,证明了选择乙酸作为有机碳源的益处。另外,发现相比于用喂入了葡萄糖的培养物所观察到的,乙酸进一步降低了针对氧化应激(即,臭氧、过氧化氢)的细菌抗性。

[0114] 在一些实施例中,在对微藻或蓝藻细菌属具有特异性的最低限度矿质确定成分培养基中维持 pH 超过 7.5 并且温度低于 30°C 的条件已被证明是例如细菌的污染性生物体的增殖的次优条件。在一些实施例中,pH 水平可以低于 5 并且温度介于 30°C 到 50°C 之间。通过本文中所述的污染控制方法,包括采用乙酸/用于向非纯性培养物中投与乙酸的恒 pH 培养系统,通过可以包含培养基中的残留乙酸、维持恒定 pH 水平或使用氧化剂的组合的培养方法,培养物的污染性细菌细胞计数可以维持在低于总细胞的 25%、低于总细胞的 20%、低于总细胞的 10%,并且优选地低于培养物的总细胞的 5%(<0.05%总生物量)。维持温度恒定的热交换器(例如冷却或加热线圈)当与其它污染控制方法组合使用时也改善了对污染性细菌群体的控制,所述其它污染控制方法例如(但不限于)乙酸/恒 pH 培养系统和氧化剂。

[0115] 兼养培养物中的污染性细菌和生物体控制的额外方法可以包含施加过氧化氢、臭氧、抗生素、紫外(UV)辐射/灭菌或其它氧化剂(例如,氯气、亚氯酸盐、氯酸盐、次氯酸盐、硝酸、铬、高锰酸、氧化银、溴)。控制兼养培养物中的污染的方法可以单独使用或以组合形式使用。以介于 2.5mM 与 30mM H_2O_2 之间的施加量向包含污染性细菌的培养基中添加过氧化氢已被证明可抑制污染性细菌的生长。细菌在包含乙酸的兼养培养基中的生长已被证明比在包含葡萄糖的兼养培养基中易受氧化应激的影响。可以通过任何已知的气体注射方法向培养物中施加臭氧,所述方法例如(但不限于)喷射和文丘里注射。可以按 0.01-2.0mg/L 的浓度、并且优选地按 0.01-0.50mg/L 的浓度向微生物培养物施加臭氧处理。抗生素处理可以包含(但不限于)青霉素(penicillin)(100-500mg/L)、四环素(tetracycline)(10-100mg/L)、氯霉素(chloramphenicol)(1-20mg/L)以及金霉素(aureomycin)(1-20mg/L)。

[0116] 使用电凝法进行培养物的周期性浓缩和净化提供了以下方法的一个实例,所述方法包含每天或连续收集培养物,从而通过微藻或蓝藻细菌的常规浓缩并去除被污染的培养基,并且更换已处理或新培养基中的培养物来帮助控制污染。还可以通过从培养物中收集或分离微藻的已知方法,例如(但不限于)泡沫分离、溶气浮选、离心和絮凝,来执行为了污染控制而对培养物进行收集并净化的方法。当使用收集和净化方法时,可能需要相应地调整有机碳源的添加。收集和净化可以促进微藻或蓝藻细菌群体的健康并且因此促进其对污

染的抗性。在一些实施例中,可以对经分离培养基进行处理以将正在腐烂的有机物质(矿化)转化成兼养微生物可用的碳源。

[0117] 在替代实施例中,可以使用声处理来控制兼养培养物中的污染。可以使培养物经历各种强度的声能以减少污染。声处理可以通过形成与污染性细菌内部的气泡相同大小的气泡来减少培养物内的污染。当气泡破裂时,细菌中相同大小的气泡将共振并且也破裂。声处理还可以通过破坏污染性细菌的细胞壁来减少培养物内的污染,所述污染性细菌的细胞壁相对于微藻、蓝藻细菌或硅藻的细胞壁来说较弱。在一些实施例中,可以从 30kHz 喇叭提供约 40-99% 强度的声能。在一些实施例中,可以冷却有待用声处理进行处理的培养物,从而将培养物的温度维持在所要范围内。在一些实施例中,可以对培养物使用声处理以升高温度并且同时处理污染。在一些实施例中,可以与细胞壁减弱化学品或酶组合使用声处理作为培养物的预处理。在一些实施例中,声处理喇叭可以和培养物的流动路径成一直线。在一些实施例中,通过声处理破坏的细胞可以使用本领域中已知的任何器件从培养物中去除,所述器件例如(但不限于)溶气浮选器件、泡沫分离器件或蛋白质除沫器。

[0118] 在替代实施例中,向培养物中添加植物提取物可以通过减缓细菌的生长,以允许微藻或蓝藻细菌胜过培养物内的污染性细菌,来控制污染性细菌。在一些实施例中,含污染性细菌的培养物可以用先前所述的手段减少群体,其中群体减少了 1、2 或 3 或更多个对数。

[0119] 溶解氧水平

[0120] 溶解氧(DO)水平已被证明是最佳兼养型生长的限制性营养物。因此,向培养物中高速传递例如氧气的气体的能力是有助于兼养培养效率的一个因素。在稳定状态下,氧传递速率等于微藻或蓝藻细菌细胞的耗氧速率。气-液界面传质可以使用下式计算:

[0121] 因此, $k_L a = \text{氧利用率} / (\text{浓度梯度})$;

[0122] k_L 是进入液体培养基中的氧传递的传质系数;

[0123] a 是每体积液体,气体的界面表面积;

[0124] $k_L a$ 是用 Hz 或 (s^{-1}) 测量的气-液界面传质的度量值,其中较大的 $k_L a$ 值相当于较好的传质和较高的反应器性能,如通过微藻的体积生长速率所测定。

[0125] 通过增加器皿中的 $k_L a$, 可以解决由于氧气供应不足所造成的对微生物生长的限制。在实施例中,用乙酸作为碳源培养微藻或蓝藻细菌, $k_L a$ 可以介于 $2.00 \times 10^{-3} s^{-1}$ 到 $2.10 \times 10^4 s^{-1}$ 的范围内。在一些实施例中, $k_L a$ 可以是至少 $2.40 \times 10^{-3} s^{-1}$ 。用于增加器皿中的 $k_L a$ 的方法包括减小气泡的大小并且增加滞留时间,并且可以通过以下来实现:增加机械混合的剪切应力、减小注射点的大小和/或增加注射点的数量以便将更多气体溶解到微生物培养溶液中或增加气体压力。 $k_L a$ 的增加可以通过用于向液体中注射气体微流或气体微泡的任何已知系统来实现,所述系统例如(但不限于)气体注射器、多孔扩散器、微孔扩散器、透气膜、微泡发生器、文丘里注射以及微泡流体振荡器。气体压力的增加可以通过任何已知方法来实现,例如(但不限于)增加液柱高度。还可以通过用机械剪切使气泡破裂并且通过水平混合、垂直混合或成角度混合增加气泡的滞留时间来改善氧传递。增加对兼养的光合贡献将进一步改善通过化学品传递路径的氧传递。

[0126] 在一些实施例中,可以通过 pH 稳定来控制向兼养培养物中供应乙酸,导致微生物培养方法的随后限制性反应物相继是氧气、硝酸盐和其它营养物。在一些实施例中,硝酸盐以及其它营养物可以是在基于反馈控制在微藻培养物中使用传感器的自动进料方案上。在

替代实施例中,可以使用来自硝酸盐传感器、淡水系统中的电导率读数或溶解氧传感器的反馈,馈入营养物、有机碳或空气。另外,氧气限制与机械设计之间的关系允许机械设计的变化相应地改变培养物的溶解氧条件。在实例 11 中基于化学计量学计算需氧量。在一些实施例中,可以按远高于化学计量最小值(在实例 11 中计算为氧利用率比平衡浓度(C^*)的比率)的 k_La 进行培养,从而确保以代谢方式限制反应并且不限制传质。

[0127] 本领域中已知用于增强培养物 k_La 和溶解氧条件的各种方法可以用于兼养微生物培养方法。本领域中已知的方法可以分成机械法和化学法。在一些实施例中,增强培养物 k_La 和氧条件的方法可以是机械法或机械法的组合。机械法可以包括(但不限于)添加富氧空气、文丘里注射、喷射器、堰以及降低培养物的温度。在一些实施例中,增强培养物 k_La 和氧条件的方法可以是化学法或化学法的组合。化学法可以包括添加含培养物相容产物(例如臭氧)的高表面积气泡、纳米大小的烃气泡、植物油、矿物油以及纳米大小的金属氧载体。以上方法中的任一种可以单独或以组合形式使用以增强培养物 k_La 和氧条件,包括机械法和化学法的组合。在这些方法中,机械法可能是对培养物生长的侵袭性最小的,并且可能模块化用于部署。

[0128] 另外,还可以监测溶解氧浓度来管理污染性细菌群体。以好氧方式生长的污染性细菌可以在培养物中使用过量氧气;因此如果可用于污染性细菌的氧气有限,那么污染性细菌的生长就会受到限制。

[0129] 实例 1

[0130] 在非纯性条件中使用乙酸/恒 pH 培养进料系统,使小球藻属 SNL 333(由亚利桑那州立大学(Arizona State University)分离并且最初在测试时报告为小球藻属的地方品系;由芭芭拉梅尔科尼安博士(Dr. Barbara Melkonian)在科隆大学(University of Cologne),佐勒皮休大街(Zùlpicher Strasse)47 b, 50674 科隆(Köln),德国(Germany)执行进一步分析,证实微藻品系与其它已知小球藻属共享鉴定特征)在非纯性兼养条件下生长 8 天。在 8 天时间内,按单批形式执行实验,不进行收集。在 2 英尺 × 2 英尺平板式气携光生物反应器中执行试验,其中运行体积是 14 升(L)。由于添加了乙酸溶液,所以增加体积直到 15L。还在 CO_2 /恒 pH 培养系统上对光合自养生物(光养)培养物运行对照处理。以 0.1g/L 给反应器接种 3L 小球藻属 SNL 333 的正以指数方式生长的单一藻类培养物。从约在 0.5g/L 下在 BG-11 培养基中运行的室外跑道池获得接种物。然后使培养物适应 2 英尺 × 2 英尺平板式光生物反应器直到它们获得 1 到 2.5g/L 的密度为止。向培养物中分批馈入硝酸盐-磷酸盐溶液,用以维持硝酸盐水平在 400 与 1500ppm 之间。将培养物大致维持在约 7.5 的恒定 pH 和约 25°C 的温度下。在所述处理中,在 24h 光周期(恒定光)中使培养物暴露于来自反应器的每一侧上的 FT5-HO 8 个灯泡组的光(一个灯泡 = $259.6 \mu mol/m^2s$),并且充气(0.7 升空气/升培养基/分钟)。首先,用 25% 光强度和 CO_2 pH 控制开始培养直到培养物达到 0.5g/L 为止,并且然后用 50% 光强度直到培养物达到 2g/L 为止。在培养物达到 2g/L 之后,借由添加乙酸,开始控制 pH 处理。 CO_2 处理包含以 1 比 10 的比率向气流中注射 CO_2 并且通过螺线管和设定在 7.5 的 pH 控制器控制。

[0131] 乙酸处理系统包含螺线管、蠕动泵和设定在 7.5 的 pH 控制器,用于控制从乙酸进料槽泵吸到反应器中的乙酸进料。用水将乙酸进料稀释到介于 10% 与 50% 浓度之间。将探针系到进料管,用以确保泵吸稳定并且在 pH 波动的控制范围内。每 24s 取样,关于干重

和无灰干重,一式三份,一天一次取样。每天获取污染图片。每 2-3 天获取单一无损干重样品(离心 200ml)用于冷冻干燥脂肪酸分析。将离心上清液进行冷冻用于通过气相色谱进行乙酸分析。通过监测乙酸进料槽中的水平测量乙酸消耗量。

[0132] 参看图 1-2 和表 1,结果显示,就细胞干重(g/L)来说,兼养培养物比标准光合自养(自养生物)培养物多产。表 1 列举了小球藻属 SNL 333 的兼养培养物和光合自养培养物的体积生产力和面积生产力。结果还显示,兼养培养物的脂质含量(干重的%)高于光合自养培养物。关于表 1 中所列的值,2×2 英尺反应器的表面(照明)比体积比是 19L/m²。通过使体积生产力乘以 1m²中可以含有的体积(19L)计算来自平板式反应器实验的面积生产力。在兼养中,外推得到的面积生产力克/平方米/天(g/m²d)假定是 300L/m²。另外,证明兼养而不是光养才是驱动小球藻的兼养型生长。这些结果得出了以下结论:表面(照明)比体积比对于生长来说不太关键,并且可以放在一平方米中的升的量的限制取决于系统的氧传递。

[0133] 表 1

[0134]

生产力范围	生长期 (2 d)	整批 (8 d)
处理	体积生产力 (g/L d)	
光合自养	0.5	0.4
兼养	2.6	1.6
	面积生产力 (g/m ² d)	
光合自养	9.5	7.6
兼养	49.4	30.4
	外推得到的面积生产力 (g/m ² d)	
光合自养	9.5	7.6
兼养	780	480

[0135] 参看图 3-4,结果显示,NaNO₃在兼养培养物中的吸收量高于光合自养(自养生物)培养物。参看图 5,结果显示,在使用乙酸/恒 pH 培养系统,pH 水平设定在 7.5 的兼养培养物中的残留乙酸浓度相对较低(比食醋小 8 倍),并且将携带低风险的环境问题(溢出、挥发性有机碳排放)、工作危险或底层废弃物。残留乙酸随着硝酸盐和其它营养物的消耗而增加。

[0136] 实例 2

[0137] 在非纯性条件中使用乙酸/恒 pH 培养进料系统,使小球藻属 SNL 333 在非纯性兼养条件下生长 10 天。除了曝光期(光周期)、乙酸进料系统和仅在生长期添加硝酸盐(不是磷酸盐或微量营养物)之外,用与实例 1 中所用相同的反应器和程序执行试验。在 10 天时间内,还根据实例 1 中的程序,按单批形式运行试验,不进行收集。以每天在人造光中 24 小时的曝光期并且还以在人造光中 14 小时(每天 10 小时暗处理)的曝光期运行试验。通过由针阀控制的滴液系统响应于 pH 水平控制器馈入乙酸。还在数据记录器中连续地测量溶解氧水平并且更新。每四天在 20× 和 100× 下(油浸没)进行显微镜照相,以及测量细胞计数、细胞大小、叶绿素含量和不含叶绿素的粒子的比例。

[0138] 参看图 6 和表 2,结果显示,就细胞干重(g/L)来说,兼养培养物胜过光合自养(自

养生物)培养物,并且兼养培养物的细胞干重比光合自养培养物较不受曝光减少的影响。表2列举了在24h和14h光周期下生长的小球藻属SNL 333的兼养培养物和光合自养培养物的体积生产力和面积生产力。关于表2中的值,2×2英尺反应器的表面(照明)比体积比是19L/m²。通过使体积生产力乘以1m²中可以含有的体积(19L)计算来自平板实验的面积生产力。在兼养中,外推得到的面积生产力(g/m²d)假定是300L/m²。另外,基于所述结果,兼养而不是光养才是驱动小球藻的兼养型生长。

[0139] 表2

[0140]

生产力范围		生长期(2 d)	整批(8 d)
处理	光周期	体积生产力(g/L d)	
光合自养	24 h	1.06	0.70
	14 h	0.66	0.47
兼养	24 h	2.74	1.21
	14 h	2.76	1.30
		实际面积生产力(g/m ² d)	
光合自养	24 h	20.1	13.3
	14 h	12.5	8.9
兼养	24 h	52.1	23.0
	14 h	46.7	24.7
		外推得到的面积生产力(g/m ² d)	
光合自养	24 h	20.1	13.3
	14 h	12.5	8.9
兼养	24 h	822	363
	14 h	828	390

[0141] 参看图7,结果显示,NaNO₃吸收量对于光合自养(自养生物)培养物来说比对于兼养培养物来说,更受曝光期减少的影响。参看图8,结果显示,在兼养培养物中,14h曝光的乙酸吸收量低于24小时曝光。参看图9,结果还显示,溶解氧水平在可能临界点(20%)饱和,说明在限制兼养培养物的生长方面,在2英尺×2英尺平板式光生物反应器中氧气的不良气体传递比光能重要。

[0142] 参看表3,结果显示,尽管是非纯性条件并且引入了有机碳源,但是在兼养培养物中仍维持低细菌水平。表3列举了在兼养方案或光合自养方案下操作的小球藻属SNL 333培养物中的细菌群体的发病率。关于表3中所列的值,通过叶绿素自荧光鉴定藻类细胞并且通过背光绿色模具鉴定细菌细胞。表3的值还假定,小球藻重量是 27×10^{-12} 克/细胞并且细菌细胞重量是 0.2×10^{-12} 克/细胞。

[0143] 表3

[0144]

细菌群体		总细胞计数*1的%	总生物量*2的%
处理	光周期		
兼养	24 h	4.9	0.04
	14 h	3.9	0.03
光合自养	24 h	1.6	0.01
	14 h	1.6	0.01

[0145] 实例 3

[0146] 在非纯性条件中使用乙酸 / 恒 pH 培养进料系统,使小球藻属 SNL 333 在非纯性兼养条件下生长 4 天。除了曝光期(光周期)和乙酸进料之外,用与先前在实例 2 中所述的相同设备和程序执行试验。试验一和二以 24h 曝光运行并且试验三和四以 0h 曝光(异养)运行。对于 0.5 到 5-6g/L 的培养物密度,馈入 200g/L 乙酸和 1g/L 初始乙酸钠;并且在超过 5-6g/L 的培养物密度下,馈入 10g/L 乙酸。响应于 pH 改变,向恒培养器中馈入乙酸。反应器装有溢流管以便允许超过 2×2 (14L) 生物反应器的操作体积的培养物体积排出(收集)到 4L 烧瓶中用于测量和分析。

[0147] 参看图 10,结果显示,馈入了乙酸的小球藻培养物在 24h 曝光中比 0h 曝光生长得好。还发现,光合活动有助于将溶解氧值从近似异养处理(0h 曝光,最小环境光进入)的 4.9mg/L 提高到兼养处理(24h 曝光)的 6.5mg/L。参看图 11,结果显示,兼养处理(24h 曝光)的乙酸消耗量高于异养处理(0h 曝光)中。参看图 12,结果显示,兼养培养物(24h 曝光)的残留 NaNO_3 浓度低于近似异养培养物(0h 曝光)或光合自养(自养生物)培养物。

[0148] 实例 4

[0149] 使用乙酸 / 恒 pH 培养进料系统,使小球藻属 SNL 333 在非纯性兼养条件下生长 10 天。用两个由 PVC 制成的跑道池光生物反应器执行试验,其中可培养面积是 5.6m^2 并且光程(即培养物深度)是 10cm。两个光生物反应器均含有兼养培养物,用两个 50cm 多孔扩散器以 10 升 / 分钟 (LPM) 进行充气,并且位于室外。第一光生物反应器(反应器 1)进行水力混合(泵)。第二光生物反应器(反应器 2)用浆轮混合。以 0.3g/L 的密度在反应器 1 和 2 中接种小球藻属 SNL 333。使小球藻在 CO_2 /pH 控制下适应室外条件直到它获得 0.3-0.4g/L 的密度用于实验试验为止。使用先前在实例 2 中所述的滴液系统发生乙酸添加。

[0150] 视需要当培养物密度达到 1.5g/L 时收集培养物。初始培养基是 BG-11 培养基,在初始培养基中补充有乙酸钠(1g/L)。向培养物施加自然阳光,其中平均光周期在 2012 年 5 月亚利桑那州的吉尔伯特(Gilbert, AZ)是约 14.5h。通过冷却盘管将温度控制在 28°C 。如先前所述,将恒 pH 培养系统的 pH 控制器设定在 7.5。连续测量温度、pH 和溶解氧。每天通过乙酸进料槽水平监测乙酸消耗量。每天获取干重三次($n = 3$)并且每天获取硝酸盐水平。每两天执行旋转减慢以测量残留乙酸盐(200ml)和生物量。

[0151] 每 2 天执行污染观察($400\times$ 、 $1000\times$ 油浸没 - 相位对比显微照相和用细菌染色进行的细胞计数),包括通过流式细胞术测量细菌污染。关于细菌污染测量,向每 1ml 样品中添加 $1\mu\text{l}$ BacLight™绿色细菌染剂(美国俄勒冈州尤金的英杰公司(Invitrogen, Eugene, OR, USA)),并且在室温下在暗处培育样品 30 到 60 分钟。在培育之后,在 BD FACS Aria™(美国加利福尼亚州圣何塞的碧迪生物科学公司(BD Biosciences, San Jose, CA, USA))上分析样品并且基于 BacLight™荧光和叶绿素自体荧光选通细菌和藻类群体。

[0152] 参看图 13,结果显示,最大日生产力对于反应器 1(即, SP3)来说是 $97\text{g}/\text{m}^2\text{d}$ ($0.97\text{g}/\text{L d}$) 并且对于反应器 2(即, SP4)来说是 $127\text{g}/\text{m}^2\text{d}$ ($1.27\text{g}/\text{L d}$)。平均日生产力(在 9 天内)对于反应器 1 来说是 $56\text{g}/\text{m}^2\text{d}$ ($0.56\text{g}/\text{L d}$) 并且对于反应器 2 来说是 $76\text{g}/\text{m}^2\text{d}$ ($0.76\text{g}/\text{L d}$)。室外反应器中兼养培养物的生产力是先前在室外反应器中获得的光合自养培养物的生产力的大约六倍。参看图 14-16,结果显示,反应器 1 的生产力低于反应

器 2(R2), 还具有较低的溶解氧水平, 这对应于将低溶解氧水平与生长限制相关联的先前发现。参看图 17, 结果显示, 当温度维持在低于 30℃ 时, 在室外非纯性兼养条件中, 细菌水平低于总细胞计数的 5% (<0.05% 总生物量)。

[0153] 实例 5

[0154] 使用乙酸 / 恒 pH 培养系统, 使小球藻属 SNL 333 在非纯性条件中在室外敞开式跑道池光生物反应器中以兼养方式生长 10 天, 然后转移到平板式光生物反应器中进行光合自养 (光养) 生长。如上文在实例 4 中所述操作室外反应器。以 0.5g/L 的密度给平板式光生物反应器接种来自室外反应器的小球藻培养物, 并且在以下条件下操作: 25℃ 的平均温度, 通过 CO₂ 控制的 pH 7.5, 在 10LPM 下充气, 在 2LPM 下施以 CO₂ 脉冲, 从光生物反应器的每一侧上的 FTS-HO 8 个灯泡组 (一个灯泡 = 259.6 μmol/m²s) 曝光 (光周期) 14h。一天一次收集的数据包括: 在 750 和 680nm 下的光密度和 pH。在试验开始、试验中间和试验结束时执行干重测量、硝酸盐测量和叶绿素分析。参看图 18, 结果显示, 来自室外反应器的以兼养方式生长的接种物在转移到用于光合自养型生长的平板式光生物反应器中之后匹配典型的光合自养 (自养) 生长速率, 并且营养转换是瞬时的。

[0155] 实例 6

[0156] 使用乙酸 / 恒 pH 培养系统和向培养基中初始添加乙酸钠, 使小球藻属 SNL 333 以兼养方式在非纯性条件中生长。以 14h 曝光 (光周期), 使用如先前在实例 2 中所述的设备和程序以兼养方式培养小球藻。第一和第四试验最初接受 2g/L 乙酸钠, 并且第二和第三试验最初不接受乙酸钠。以 200g/L 馈入乙酸。如先前实验中所述监测干重、无灰干重、溶解氧、乙酸、细菌污染和硝酸盐。参看图 19-20, 结果显示, 残留乙酸反映了培养基的缓冲要求, 其通过矿物盐 (营养物) 的消耗量、通过光合过程消耗的 CO₂ 以及由细胞排泄的有机酸来测定。因此, 所述系统不是纯粹的恒培养器 (恒定浓度), 而是在批量内改变浓度 ±0.5g 乙酸 /L。结果还显示, 初始乙酸钠确保无论光合过程如何, 始终存在乙酸盐并且成功激活 pH 控制。

[0157] 实例 7

[0158] 使用乙酸 / 恒 pH 培养系统, 在敞开式池反应器中在非纯性条件中培养小球藻属 SNL 333。除了最初不向培养基中添加乙酸钠之外, 使用如先前在实例 4 中所述的设备 R1 和程序。结果显示, 乙酸 / 恒 pH 培养系统的激活失败并且生产力相当于在光合自养系统中所获得的那些。

[0159] 实例 8

[0160] 向大肠杆菌培养物中施加过氧化氢以测定对细菌的抑制作用。向 200ml BG-11 培养基中添加 200ml 来自被细菌污染的光生物反应器的细菌接种物。将溶液对半平方, 第一溶液接受 6.84g 葡萄糖并且第二溶液接受 5g 乙酸钠。获取两份溶液的 pH 和光密度。将两份溶液各自分成三组, 每组三份单独的 100ml 体积, 用于对照、10mM H₂O₂ 和 20mM H₂O₂ 处理。每一个体积都具有 2.092g MOPS 缓冲液 (密苏里州圣路易斯的西格玛化学品公司 (Sigma Chemical St. Louis, MO)), 并且然后放在培育箱中, 设定在 27℃、96rpm 和 100 μmol/m²s LED 光下。将所述体积培育过夜, 然后使用 10M NaOH 使 pH 达到 7.5 并测量光密度。然后添加 10mM H₂O₂ 和 20mM H₂O₂ 的处理并且培育 24h。然后测量光密度和 pH, 并且向一个体积的每种处理中添加蛋氨酸。再次在第三天和第六天测量光密度和 pH, 然后在第六天进行显

显微镜分析。结果显示,添加 H_2O_2 对培养物 pH 的影响极小。参看图 21, 结果还显示, 添加 H_2O_2 不利地影响葡萄糖和乙酸盐培养基中细菌培养物的生长, 其中 20mM H_2O_2 处理的影响大于 10mM H_2O_2 处理。

[0161] 实例 9

[0162] 从微藻培养物中分离出污染性细菌并鉴定为大肠杆菌。使用与实例 8 中所用相同的设备和程序, 向大肠杆菌培养物中施加不同浓度的过氧化氢以测定对细菌的抑制作用。用 0mM H_2O_2 (对照)、1mM H_2O_2 、2.5mM H_2O_2 和 5mM H_2O_2 处理葡萄糖和乙酸钠中的细菌培养物。参看图 22, 结果显示, 随着 H_2O_2 的浓度增加, 对细菌生长的抑制作用增加。结果还显示, 细菌培养物生长最终将从一次处理恢复, 说明为了控制细菌群体, 继续处理将是必需的。由于细菌的恢复, 周期性给予将帮助控制细菌群体。关于含葡萄糖的培养物: 2.5mM H_2O_2 处理应该每 2 天给予, 或如果使用 5mM H_2O_2 处理, 那么每 6 天。关于含乙酸钠的培养物, 2.5mM H_2O_2 处理应该每 3 天给予, 说明以乙酸盐为食的细菌对氧化应激的灵敏度高于以葡萄糖为食的藻类。

[0163] 实例 10

[0164] 使小球藻属 SNL 333 在兼养系统中在上文在实例 4 中所述的跑道池系统中生长。跑道光生物反应器的面积是 5.6m^2 , 其中操作体积是 568L, 深度 15cm。一个单元用泵混合 (反应器 1), 并且另一个通过浆轮混合 (反应器 2)。通过气石向浆轮系统中传递空气。通过文丘里注射系统向泵吸反应器中传递空气。在泵吸反应器中使用喷射器来增加水速并增强液体培养基的氧传递。生长速率与可用的氧气量成比例。估计 20–200g/ m^2d 的生产力所需的氧气将是约 34–100g/ m^2d 。以 0.48g/L 给反应器 1 和反应器 2 接种小球藻。在第 0 天以 0.3g/L 的浓度向起始培养物的培养基中添加乙酸钠。馈入系统中的营养物由 20% 乙酸和用硝酸盐水平 (350mg/L) 改良的 BG-11 营养物溶液组成。改良的 BG-11 配方中的硝酸盐水平由 400mg/L 组成, 并且通过硝酸盐消耗速率从先前试验测定。

[0165] 在试验期间, 通过试验数天, 两个系统中的残留硝酸盐均达到 0。在试验即将结束时调整硝酸盐水平以维持系统中的残留硝酸盐 (400mg/L)。在整个试验中, 每天进行收集。收集由每天 50% 培养体积组成, 其中 80% 收集发生在第 7 天。整个试验对于反应器 1 来说持续 12 天并且对于反应器 2 来说持续 10 天。

[0166] 参看图 23, 结果显示, 在反应器 1 中达到的生物量的最高浓度是 1.47g/L (120h) 并且在反应器 2 中是 1.34g/L (120h)。生物量浓度用无灰干重 (AFDW) 形式表示, 以 g/L 为单位。当浓度达到 1.0g/L 或更大时, 收集所述系统。收集物由每天 50% 总培养体积组成, 其中两个系统的 80% 收集发生在第 8 天。

[0167] 参看图 24, 结果显示, 基于总培养长度和总平均日产量, 对于以 g/ m^2d 为单位的跑道兼养系统的产量来说, 反应器 1 胜过反应器 2。反应器 1 培养运行总共 12 天, 并且反应器 2 培养运行总共 10 天。反应器 1 在 12 天时间内的平均日产量是 87g/ m^2d (包括当培养物活力由于细菌污染降低时的最后两天)。反应器 1 中前 10 天的平均日产量是 101g/ m^2d 。反应器 1 在 10 天时间内的平均日产量是 76g/ m^2d (包括当培养物活力由于细菌污染降低时的最后两天)。反应器 2 中前 8 天的平均日产量是 74g/ m^2d 。

[0168] 参看图 25, 示出了反应器 1 和反应器 2 的体积生长速率结果。反应器 1 中的平均体积生产力对于 12 天试验是 1g/L d 并且对于所述试验的前 10 天是 0.66g/L d。在试验期

间在反应器 1 中所达到的最大体积生产力是 0.92g/L d。在反应器 2 中的平均体积生产力对于 10 天试验是 0.49g/L d 并且对于所述试验的前 8 天是 0.50g/L d。在试验期间在反应器 2 中达到的最大体积生产力是 0.81g/L d。

[0169] 图 26 示出了在试验期间的结果产量和乙酸消耗量。反应器 1 在前七天内平均消耗 2.31L/d 乙酸。反应器 2 在所述试验的前六天内平均消耗 1.83L/d 乙酸。图 27 示出了在兼养条件下的硝酸盐消耗量。反应器 1 最多消耗 447mg/L d 硝酸盐。反应器 2 最多消耗 350mg/L d。

[0170] 参看图 28, 兼养培养物中细菌比小球藻的百分比使用在先前实例中所讨论的程序进行定量。用于控制细菌群体的处理发生在由垂直虚线所表示的时候。反应器 1 接受臭氧处理, 并且反应器 2 接受抗生素处理。在 190 小时, 用于再填充系统的补给水通过氯化进行灭菌, 然后添加到培养物中。在反应器 1 中, 培养物中细菌比小球藻的百分比在 240h 已经达到了 10%。在反应器 2 中, 培养物中细菌比小球藻的百分比在 240h 已经达到了 18%。在 168h, 反应器 1 和反应器 2 中的细菌水平开始上升并且对两个系统进行处理。用臭氧处理反应器 1, 所述臭氧以介于 0.10-0.20mg/L 范围内的平均水平施加 17h。将臭氧注入到空气喷雾器中并且在 PSI 5 下与空气混合。用如表 4 中所列的抗生素混合物处理反应器 2。使用臭氧处理, 反应器 1 中的细菌比小球藻的百分比从 6.5% 减少到 1.4%。在抗生素处理之后, 反应器 2 中的细菌的百分比从 65% 减少到 19%。反应器 1 中在臭氧处理之后三天的平均产量是 105g/m²d。反应器 2 中在抗生素处理之后三天的平均产量是 71g/m²d。抗生素处理减少了系统中的细菌并且也降低了生产力。臭氧处理减少了系统中的细菌并且将产量维持在超过 100g/m²d。

[0171] 表 4

[0172]

抗生素	目标浓度	实际浓度	再悬浮于以下各者中：
青霉素	250mg/L	150mg/L	水
四环素	62.5mg/L	16.1mg/L	乙醇
氯霉素	7.5mg/L	7.5mg/L	乙醇
金霉素	6.25mg/L	6.25mg/L	甲醇

[0173] 实例 11

[0174] 计算先前在实例 4 中所述的室外敞开式跑道池反应器中兼养型微藻培养物的需氧量。从实例 10 计算的速率测量为连续操作 9 天内平均 0.6g/L d。按质量计约 33% 的乙酸被转化成生物量, 这相当于产生每克生物量要 3.33g 乙酸。按以下用于消耗乙酸的氧气的理论化学计量消耗量：

[0175] $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

[0176] 1 摩尔乙酸需要 1.5 摩尔氧气或 60g 乙酸需要 64g O₂ 或每克乙酸需要 1.07g O₂。

[0177] 关于转化成生物量, 除 CO₂ 以外的替代性中间体是可能的并且未在本文中明确指出。在兼养培养物中, 除乙酸以外的碳源也是可能的, 例如 (但不限于) 葡萄糖。按以下计

算耗氧速率： $(0.6\text{g 生物量/L d} \times 3.33\text{g 乙酸/g 生物量} \times 1.07\text{g O}_2/\text{g 乙酸}) = 2.14\text{g O}_2/\text{L d}$ ，这计算出消耗速率为 $1.48\text{ppm O}_2/\text{min}$ 。

[0178] 在 25°C 下的平衡氧浓度是 8.5ppm ，因此从实例 9 中所述的实验计算的 k_{La} 是 0.17min^{-1} 或 $2.90 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 。

[0179] 实例 12

[0180] 对从如实例 4 中所述的敞开式室外反应器中移出的少量样品进行额外实验。平衡时敞开式池上的培养物的溶解氧水平低于饱和，说明所消耗的氧气等于所传递的氧气。对来自敞开式室外反应器的样品执行两个不同测试。将 1L 样品带到实验室中并用布遮盖以阻断光。用溶解氧探针（英国曼彻斯特的奥米伽工程公司（OMEGA Engineering Ltd Manchester UK）的 DOH-SD1™ 极谱法溶解氧计）测量氧气使用速率，并且数据示出在图 29 中。使用来自所述槽的培养物填充 250ml 厄伦美厄瓶（Erlenmeyer），并用于减少氧传递。绘制 DO 水平的下降对比时间的图，以便计算需氧量（在超过临界水平的 DO 水平）。

[0181] 根据图 29， O_2 的消耗速率显示为曲线的斜率，对于反应器 1 是 0.54ppm/min 并且对于反应器 2 样品是 0.57ppm/min 。初始浓度是 5ppm O_2 并且因此测试的浓度梯度将是 8.5 到 3.5ppm 。在这种情况下，反应器 1 的 k_{La} 将介于 3.5s^{-1} 与 $2.75 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 之间。

[0182] 实例 13

[0183] 在与反应器 1 不同的那天执行如实例 12 中所述的测试并且结果示出在图 30 中。图 30 中的曲线图绘制了如在对于 15cm 深的反应器来说，平均体积生长速率为 0.6g/L d 或 $100\text{g/m}^2\text{d}$ 的生长期期间在反应器 1 中测量的耗氧速率。样品的耗氧速率是 0.5413ppm/min 。初始浓度是 4.8ppm ，并且因此测试的浓度梯度将是 $8.5-4.8$ 到 3.7ppm 。在这种情况下，反应器 1 的 k_{La} 将是 0.107min^{-1} 或 $2.44 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 。实验的平均 k_{La} 是 2.7×10^{-3} 。 k_{La} 计算结果汇总在表 5 中。

[0184] 表 5

[0185]

日期	理论计算值	第 1 天	第 2 天
----	-------	-------	-------

[0186]

进行抽样的反应器		反应器 1	反应器 2	反应器 1
OUR (ppm/min)	1.48	0.54	0.57	0.54
C* ppm	8.5	8.25	8.5	8.5
C ppm	0	5	5	4.8
$k_{\text{La}} (\text{s}^{-1})$	$2.90\text{E}-03$	$2.75\text{E}-03$	$2.72\text{E}-03$	$2.44\text{E}-03$

[0187] C* 是饱和浓度，C 是氧浓度

[0188] 实例 14

[0189] 在一个预示性实例中，对于兼养反应，微藻或蓝藻细菌生物量的面积生长速率可以介于 100 到 $10,000\text{g/m}^2\text{d}$ 的范围内，其中更预计介于 100 到 $4,000\text{g/m}^2\text{d}$ 的范围内。体积

生长速率可以介于 0.6g/L d 到 600g/L d 的范围内,其中更预计介于 0.6 到 6g/L d 的范围内。预示性微生物生长反应器可以是封闭的或敞开的并且在外部或内部操作。内部反应器可以用围绕反应器的外部光或光导管或将光插入到微藻生长反应器的体积内的其它手段来操作。

[0190] 乙酸与氧气和微藻的反应在本质上是测体积的并且受到界面传质限制。如实例 2 中所述,室内体积生长速率是 2.7g/L d。本实验受到进入液体中的氧传质的限制,如通过溶解氧的低值所看到。关于实例 2,以空气形式通过由管子制成的简单喷雾器馈入氧气,其中直径约 1/32 英寸 (0.079375cm) 的孔的空间分布各自相隔 0.75 英寸 (1.905cm) 并且在两行之间交错 (总共约 32 个孔)。

[0191] 借由较少的空气注射点、增加注射点数量和 / 或增加较大气泡的破裂,更多氧气可以溶解到微藻培养物溶液中。借由在微生物培养物溶液中的更多溶解氧,可以实现微藻或蓝藻细菌的更高体积兼养型生长速率。在空气注射直径小于 0.1mm 并且更优选地介于 1×10^{-7} m 与 1×10^{-4} m 之间的情况下,对应的体积生长速率将超过 2.7g/L d 并且介于 0.6g/L d 到 600g/L d 的范围内。

[0192] 此外,还可以借由增加压力来实现增加进入到液体反应培养基中的氧气溶解度或吸收量。用于增加压力的一种方式是使用液柱高度。在一个预示性实例中,可以使用介于 0.2m 到 40m 高的范围内的反应器,优选的介于 0.2m 到 10m 高的范围内。这个反应器性质上可以是管状的并且具有空气,来自变压吸附 (PSA) 发生器或其它单元操作的增氧空气,所述其它单元操作例如 (但不限于) 膜分离,其传递馈入在反应器皿的底部或底部附近的氧气组成介于 25% 到约 98% 范围内的气体或高纯度氧气。可以控制氧气水平以增强微藻或蓝藻细菌的生长并且控制污染性生物体。本发明微藻或蓝藻细菌农场可以由多排 0.2m 到 40m 高的管状反应器组成,其中空气馈入在底部并且所述管状反应器任选地包括中心或空间分布的光导管。光导管可以优先由包含可以增强生长和 / 或光色素产物形成的任何波长的波长特异性 LED 制成,并且可以围绕所述管的外部交替地安置。管直径可以介于 0.1m 到 10m 的范围内。本发明藻类农场可以圈养在室外或围栏内部,从而避免来自恶劣条件的挑战,所述恶劣条件包括不一致的太阳辐射、UV 降解、臭虫、动物、污染、暴风、暴风雨、哈布沙暴 (haboob)、飓风等。

[0193] 在替代实施例中,水或培养基塔可以与反应器 (例如,管状、平板式或基本上平坦的反应器) 相邻,借此可以将更高的溶解氧添加到高塔中的培养基中,然后添加到本发明反应器中或从反应器往复循环以增加溶解氧的量,从而帮助反应。

[0194] 在替代实施例中,一起使用基本上平坦和基本上管状反应器,其中第一级管状反应器用于高生长并且第二基本上平坦反应器用于微藻品系的脂质或色素生产,所述微藻品系可以包含来自例如以下各属的种:阿格门氏藻属、双眉藻属、项圈藻属、倒囊藻属、顶丝藻属、颗石藻属、节旋藻属 (螺旋藻属)、葡萄藻属、咸胞藻属、衣藻属、小球藻属、绿球藻属、十字扁盘石藻属、筒柱藻属、绿群藻属、蓝载藻属、小环藻属、杜氏藻属、艾石属、眼虫藻属、无管眼藻属、脆杆藻属、嘉乐德藻属、功奥曲藻属、红球藻属、哈洛绿藻属、等鞭金藻属、细柱藻属、微星藻属、直链藻属、蒜头藻属、念珠藻属、微绿球藻属、微拟球藻属、舟形藻属、土壤绿藻属、菱形藻属、齿状藻属、棕鞭藻属、奥克洛斯藻属、帕夫洛娃属、皮克路藻属、褐指藻属、颗石藻属、紫球藻属、波特里奥洛藻属、定鞭金藻属、红细胞藻属、栅藻属、骨条藻属、泡虫属、

辐节藻属、裂丝藻属、奥辛洛藻属、角毛藻属、新绿藻属、棕鞭藻属、紫球藻属、聚球藻属、集胞藻属、扁藻、破囊壶菌以及海链藻属。在一个实例中,可以对红球藻属培养物使用高生长第一步管状反应器以产生虾青素。可以在最终步骤中使用第二基本上平坦反应器以增加虾青素的产量,因为可以使用附加光来诱导强烈的红色。基本上平坦反应器可以呈最多约 1m 的任何宽度、长度或深度的跑道池形式。

[0195] 如 越 (Yue) 等 人, 化 学 工 程 科 学 (Chemical Engineering Science) 62 (2007) 2096-2108 所述, 已经使用过程强化技术在所述文献中描述了 CO_2 在水中的气-液 $k_L a$ 是 21 s^{-1} 。气体到液体中的传质系数比来自所公开的兼养实例的计算值高 10,000 倍是可能的。随着氧传质速率增加, 其它反应现象或固有的微藻转化速率会变成限制, 并且因此, $6,000 \text{ g/L d}$ (或速率比本文中所述高 10,000 倍) 也许是不可能的。理论上来说, 在连续兼养培养物中, 在使用有所改善的进入微藻生长培养物中的气-液传质的情况下, 也许可能获得最多 600 g/Ld 。

[0196] 根据实例 10 中所述的实验, $101 \text{ g/m}^2 \text{ d}$ 的面积生产力用对应的 0.66 g/L d 的体积生长速率来衡量。在传质改善 100 倍 (这仍然远低于理论可能性 10,000 倍) 的情况下并且在反应器深度从 15cm 增加到 150cm (或对于暴露于阳光下的相同移位表面积, 反应器体积增加 10 倍) 的情况下, 同时仍然维持混合方案以允许整个培养物获得至少一些光, 那么所得面积生长将比当前报告的实验或最多 $10,000 \text{ g/m}^2 \text{ d}$ 高三个数量级。在更低的培养深度或不太优化的气-液传质的情况下, 那么兼养培养物的面积生产力范围可以介于 $100 \text{ g/m}^2 \text{ d}$ 到 $1,000 \text{ g/m}^2 \text{ d}$ 的范围内。

[0197] 实例 15

[0198] 在总体积 6600L、深度 15cm 并且长度大约 80 英尺 (23.4m) 的跑道池生物反应器中执行实验。将生物反应器中的两个圈养在温室内部用以限制泥土和污染物的进入, 以及减轻气候诱导事件的影响。以 0.2 g/L 初始密度给反应器接种小球藻属 SNL 333。遵循上文对于乙酸给予所述的程序, 用乙酸 (20% 水溶液) 控制 pH。水力混合反应器并用多孔软管充气。半连续地操作系统, 每天收集 50% 培养物, 从而将细胞密度维持在 0.5 与 1.5 g/L 干重之间。在每一次收集之前和之后测量培养物的细胞干重。在完全收集培养物之前, 连续 6 天一式二份地操作反应器。在培养期期间, 维持细菌计数低于总细胞计数的 5%。系统生产力超出 $100 \text{ g/m}^2 \text{ d}$, 显示出与实例 10 中所述的更小体积生物反应器相当的结果。

[0199] 实例 16

[0200] 执行实验来测定对在含污染性细菌的培养物中以兼养方式生长的微藻 (小球藻属 SNL 333) 的影响。使用来自希尔舍超声波公司 (Hielscher Ultrasonics GmbH) (德国泰尔托 (Teltow, Germany)) 的 UID 400 超声发生器向 600ml 以兼养方式培养的微藻和细菌培养物施加声能。使用 30kHz 频率喇叭以 1.5 分钟增量, 以 95% 强度对培养物进行声处理并冷却以将培养物温度维持在 $25-35^\circ\text{C}$ 范围内。在 15 分钟声处理之后将培养物再接种到小型测试系统中, 并且发现经处理和未处理的微藻的生长速率均在 10% 内。参看图 31, 柱代表细菌浓度并且线代表活的藻类细胞 (即, 微藻细胞) 的百分比。结果显示, 在 15 分钟声处理之后实现了细菌浓度的对数降低, 活的微藻细胞无显著损失。

[0201] 实例 17

[0202] 使用兼养型生物反应器系统在兼养培养条件中在水性培养基中培养小球藻, 所述

兼养型生物反应器系统包含跑道池,其提供生物反应器系统中接收至少一些光的部分;和蛋白质除沫器(即,使用气体注射来执行泡沫分离的塔装置),其提供生物反应器系统中不接收光的部分。跑道池在 30cm 的操作培养深度下维持 500L 的体积并且与可调整操作体积为 408-466L 的高流动文丘里泵吸 RK2RK75 蛋白质除沫器流体连通,促使总生物反应器系统体积为 908-966L。微生物培养物在跑道池中通过泵循环,并且通过与蛋白质除沫器流体连通的出口离开跑道池。用于操控培养物的溶解氧浓度的空气注射通过蛋白质除沫器文丘里泵来执行。通过奥米伽计量泵以 20% 浓度向微生物培养物给予乙酸,进入蛋白质除沫器的排出管线,其将微生物培养物返回到跑道池并且完成生物反应器系统的蛋白质除沫器与跑道池部分之间的培养物循环路径。

[0203] 通过汉纳 (Hannah) pH 探针感测跑道池中在蛋白质除沫器出口和在蛋白质除沫器入口的 pH 水平。将优特 (Eutech) 溶解氧探针安装到蛋白质除沫器入口管和排出管中以检测溶解氧浓度。将红鱼 (redfish) 温度探针安置在跑道池中靠近出口处,用于检测微生物培养物的温度。通过自然光(即,太阳辐射)提供对微生物培养物的照明。具有 30% 阿鲁米特 (aluminet) 遮光布的低剖面温室棚遮盖了跑道池并且阻断至少一些阳光,同时也使跑道池中的培养物暴露于至少一些阳光中。安装在温室棚中的风扇迫使空气循环穿过水性微生物培养物的表面和水性微生物培养物表面上方的顶部空间。培养物在跑道池部分与蛋白质除沫器部分之间的循环产生了 5% 的占空比(即,总循环时间内微生物培养物的曝光时间量)。在测试运行期间,将 pH 水平维持在约 7.5 与约 8.5 之间,其中控制设定点在 7.5。

[0204] 在实验之前,根据海利亚 (Heliae) 标准操作程序对生物反应器进行清洁和漂白灭菌。以 0.08g/L 的初始浓度对生物反应器进行接种。使用经 UV 处理的水和实验室 BG-11 储备液制成培养基。关于外部反应器,将培养基制成 1×BG-11,其中硝酸盐和磷酸盐减少。对培养基进行氮气鼓泡以将溶解氧 (DO) 浓度降低到 3mg O₂/L(仅仅在初始接种时而不是在这之后)。在接种期间,打开含有小球藻种子培养物的广口玻璃瓶并将种子直接倒入循环培养基中。应注意,在接种之后不久,DO 浓度就达到了约 9mg O₂/L。如先前在其它实例中所述收集营养物和细菌的所有常见样品。

[0205] 将样品浓度和硝酸盐水平每天发送到实验室。当合作人经训练可进行上述测试时,每天提交样品用于 FAC、纸片法和显微镜法。从生物反应器系统的南侧盖子上放置样品口的地方收集样品。每天完成登记簿三次。登记簿具有以下领域:日期、时间、pH、温度、DO 浓度、PAR、酸再填充、取样、单位体积、收集物、初始和注释。为了维持 DO 浓度,随着培养物细胞浓度增加,增加进入蛋白质除沫器中的空气流速。蛋白质除沫器单元随着其运行产生湿泡沫,并且蛋白质除沫器排出阀完全打开以允许不断地撇去干的白色泡沫并且蛋白质除沫器单位体积从先前的 946L 降低到 908L。蛋白质除沫器冲洗设定约每 4 小时 25 秒,每天清空收集桶。对于大部分运行,反应器的目标硝酸盐水平是 700ppm,并且每天馈入硝酸钠和恰当比率的磷酸钾。收集目标是等到培养物达到 5g/L 或更大的密度为止并且然后从培养物收集以将密度减少到 2.25g/L。

[0206] 小球藻生物量的收集通过从跑道池泵出相当于总生物反应器系统体积的 55% 的收集物的体积的培养物来执行。下文通过垂直虚线指出图中的收集期。关于整个反应器的体积,然后添加经 UV 处理的水以替换所收集的培养物以及 1×BG-11 储备液(硝酸盐

700ppm)。对于大部分测试运行,将培养物中的浓度维持在 2-5g/L 之间,其中浓度有两天暂时达到 7-8g/L。

[0207] 关于测试运行,浓度、体积生长速率和面积生长速率随时间推移的结果示出在图 32-33 中。图中带虚线的收集物对应于 55% (约 500L) 收集物。在第一次收集之前,浓度增加展现出经典的藻类生长曲线(滞后指数平稳)。

[0208] 图 34-35 显示关于测试运行,浓度(g/L)与体积生长速率和面积生长速率的相关性,并且可以说明对于生物反应器系统来说,当对反应器进行收集和操作时,3g/L 应该是下限阈值。在超过 5g/L 的浓度出现了两个极高生长点,说明在更高的操作浓度下,生产力的进一步优化也许是可能的。

[0209] 图 36-40 显示在兼养型生物反应器系统的培养运行期间的环境参数,包括温度、pH 水平、溶解氧浓度、照明(即,光合有效辐射)和硝酸盐浓度。在展示温度的图中,通过基于每天的小的温度变化,结果展示培养物体积的热稳定性。

[0210] 在运行期间,每天执行显微镜观察。观察结果显示,培养物遵循与大多数室外培养物相同的进展,细胞密度以及包含细胞碎片和细菌的污染增加。然而,在兼养型生物反应器系统培养物中的小球藻培养物不同于先前的反应器运行,因为观察不到预告培养失败(即,被污染性生物体占优势)的警告迹象(例如,腐败的气味、捕食者或进攻藻类的细菌)使用乙酸作为有机碳源,但在测试运行中不使用防沫剂、抗生素、臭氧或 UV。兼养型生物反应器系统不密封并且在非纯性条件中操作。培养物继续生长 34 天,其中在 34 天内的平均生长速率是 302g/m²d。

[0211] 有机碳组合

[0212] 虽然可以使用单一有机碳源供应品来操作兼养培养物,但是可以使一些微生物培养物体验来自使用有机碳源的组合的益处。在一些实施例,有机碳供应品包含至少一种有机碳源。在一些实施例,有机碳供应品包含至少两种有机碳源。在一个非限制性实施例中,兼养微生物培养物可以使用包含乙酸和至少一种额外有机碳源的有机碳供应品。

[0213] 当在兼养条件中使用乙酸作为主要有机碳源培养微生物时,会由于代谢溢出发生少量琥珀酸排泄到培养基中。琥珀酸的排泄会降低培养基的碱度并且取代培养基中所存在的残留乙酸。在一个实施例中,使用恒 pH 培养系统向小球藻兼养培养物给予乙酸,观察到琥珀酸排泄到培养基中,但仍然供应乙酸并且微生物消耗乙酸,其中残留浓度超过 0.5g 乙酸盐/L。

[0214] 因为琥珀酸是负责代谢乙酸的三羧酸循环(TCA)的中间物,所以所述琥珀酸在培养基中的累积可以说明,由于一些类型的代谢应激或损伤,有机碳源在微生物中的次优利用。通过 TCA 从乙酸产生能量,TCA 是非催化循环。因为 TCA 是非催化循环,所以所供应的草酰乙酸的量取决于起始物质而不是有多少乙酰基-coA 进入所述循环。在馈入了葡萄糖的微生物培养物中,可以通过丙酮酸羧化酶从丙酮酸产生草酰乙酸;但是在供应乙酸的微生物培养物中,可以通过光合作用-糖酵解供应丙酮酸。琥珀酸(TCA 中间物)的排泄表示,光合作用也许不能够满足草酰乙酸的代谢需求。

[0215] 本领域中已知,丙酸可以帮助再循环馈入了乙酸盐的沟鞭藻培养物(例如,寇氏隐甲藻)中的草酰乙酸。本领域中还已知,在真菌中,丙酸在转化成琥珀酰-coA 之后或通过柠檬酸进入 TCA 中。在转化成琥珀酰-coA 之后或通过柠檬酸进入 TCA 可以增加用于活

化 TCA 所需的草酰乙酸的供应量,并且因此产生足够的能量用于生长和生物合成。丙酮酸还可以通过催化丙酮酸的不可逆羧化的丙酮酸羧化酶转化成草酰乙酸。在喂入了乙酸的兼养型微生物培养物的情况下应用这个知识,可以创建一种用于改善乙酸在兼养微生物中的代谢的方法。

[0216] 在一些实施例中,少量草酰乙酸促进剂可以与供应给培养器皿中的兼养型微生物培养物的乙酸组合,以帮助使草酰乙酸再循环进入 TCA,增强生长,增强生物量生产力以及减少一或多种抑制剂对 TCA 的抑制作用。草酰乙酸促进剂可以包含丙酮酸;丙酮酸的己糖前体;丙酸;以及丙酸前体,例如奇数链脂肪酸、缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和蛋氨酸。在一些实施例中,乙酸比草酰乙酸促进剂的比率可以介于 10:0.01 到 10:2 的范围内。在一些实施例中,乙酸可以包含乙酸和其前体,例如乙酸酯和乙酸酐。

[0217] 实例 18

[0218] 在有机碳源供应容器中在包含恒 pH 培养系统的兼养型生物反应器系统中用 100g/L 乙酸和 10g/L 丙酸(乙酸:丙酸的比率是 10:1)培养小球藻属物种。关于培养器皿,采用运行体积为 800ml 的鼓泡塔反应器。以半连续模式培养小球藻,其中在兼养型生长期间每两天收集 80% 的培养物。培养物收集情况示出在图 41 中,其中细胞干重曲线图的趋势线急剧下降。向培养物中添加新鲜培养基(BG-11)以便在每一次收集时更换损耗的培养基。

[0219] 将培养物维持在 25℃ 和 50 体积空气/体积培养物/分钟(VVM)的恒定充气下。在 24 小时连续光周期中以 200 μmol 光子/ m^2s 给培养器皿的一侧提供荧光灯。培养器皿上的光程是 4cm。在整个实验中,维持细菌水平低于总细胞计数的 5%。

[0220] 在接种之后四天并且在第一次半连续收集之后,就细胞密度和生物量生产力来说,接受乙酸:丙酸(10:1)的有机碳加促进剂处理的培养物开始胜过仅接受乙酸处理的培养物。到实验结束时,接受乙酸:丙酸(10:1)的有机碳加促进剂处理的培养物显示生产力超过仅接受乙酸的培养物,增加 25%。如图 41 和表 6 中所示,乙酸和丙酸的混合物每天表现得与乙酸一样好或比乙酸好。

[0221] 表 6

[0222]

有机碳源	兼养型小球藻日生产力 (g/L 天)				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
乙酸	1.04	1.21	1.27	1.97	1.40
乙酸+丙酸	1.05	1.34	1.54	2.33	2.21

[0223] 本领域的技术人员顶多使用常规实验即可认识到或能够确定尤其在本文中所述的特定实施例的许多等效物。所述等效物打算涵盖在以上权利要求书的范围中。

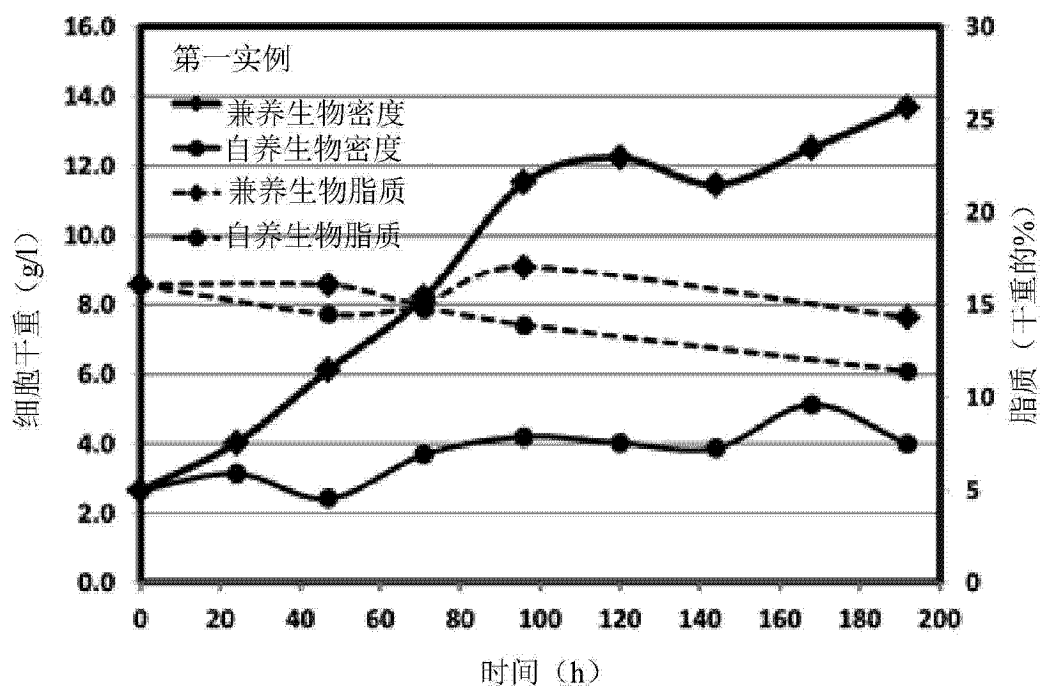


图 1

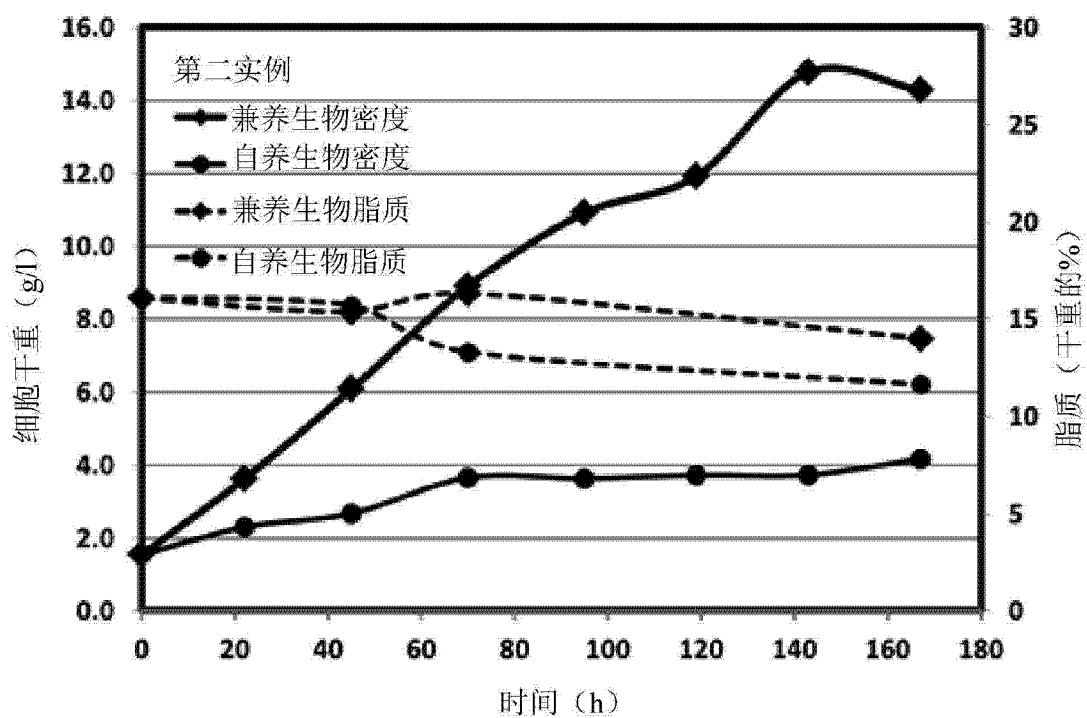


图 2

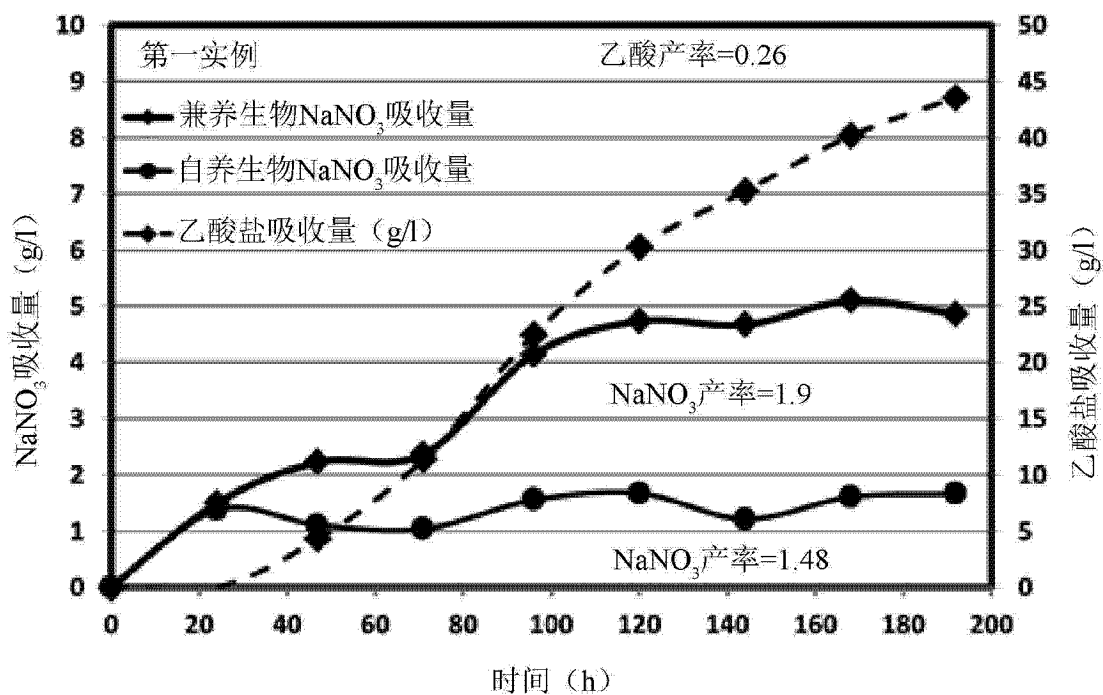


图 3

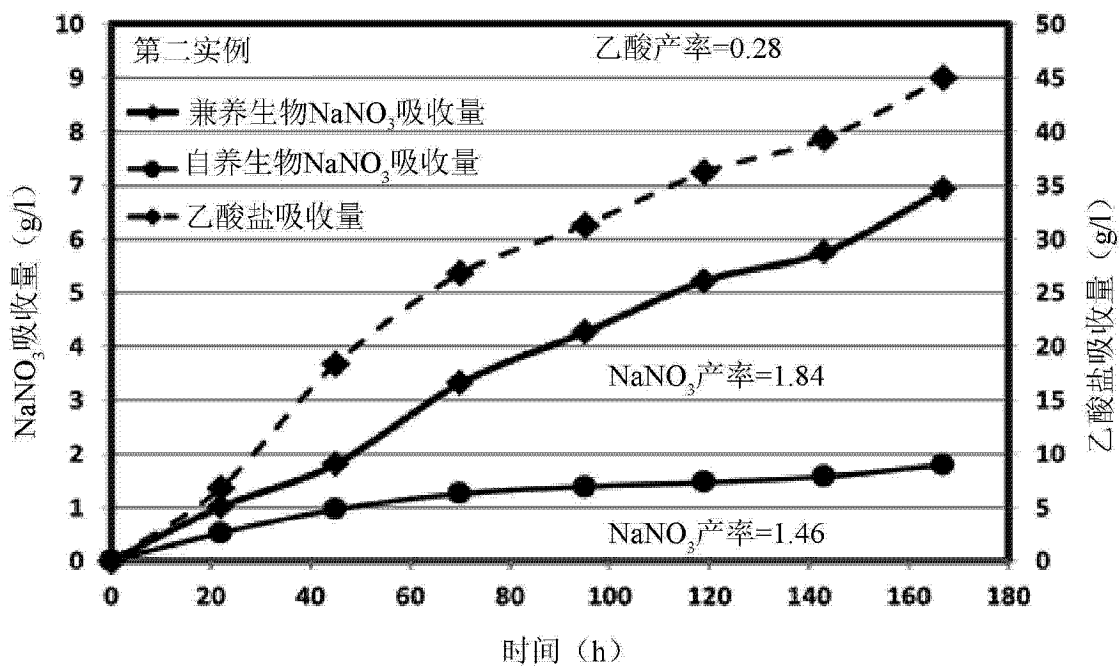


图 4

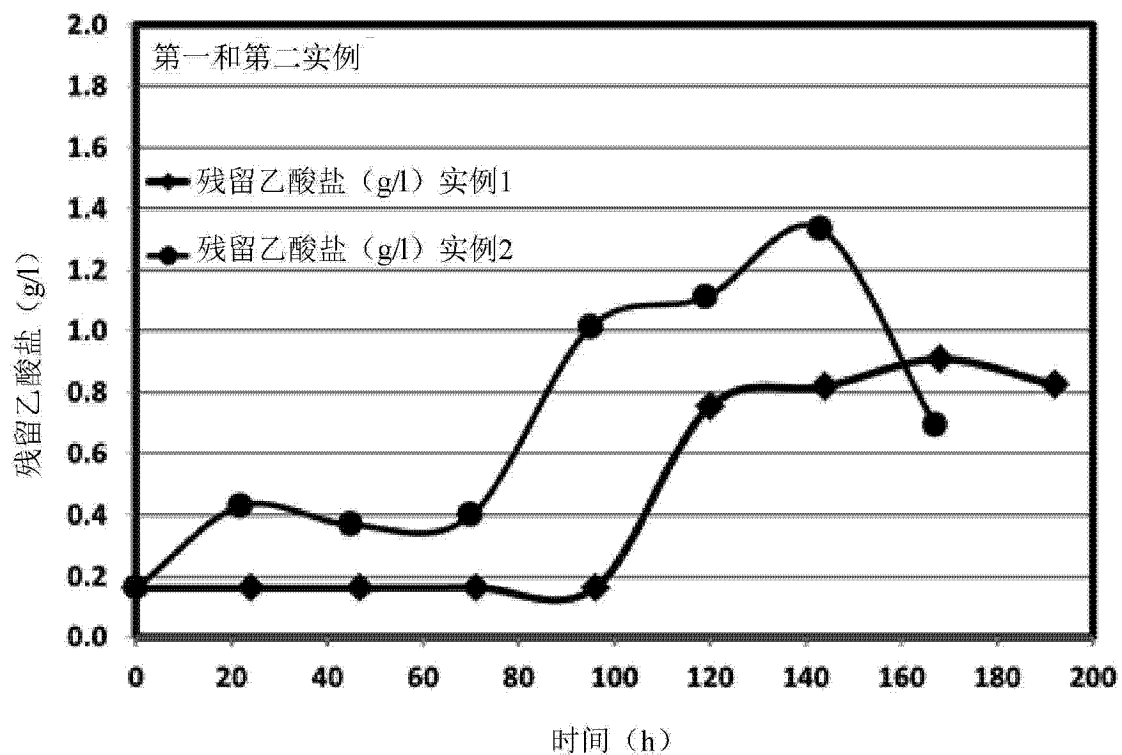


图 5

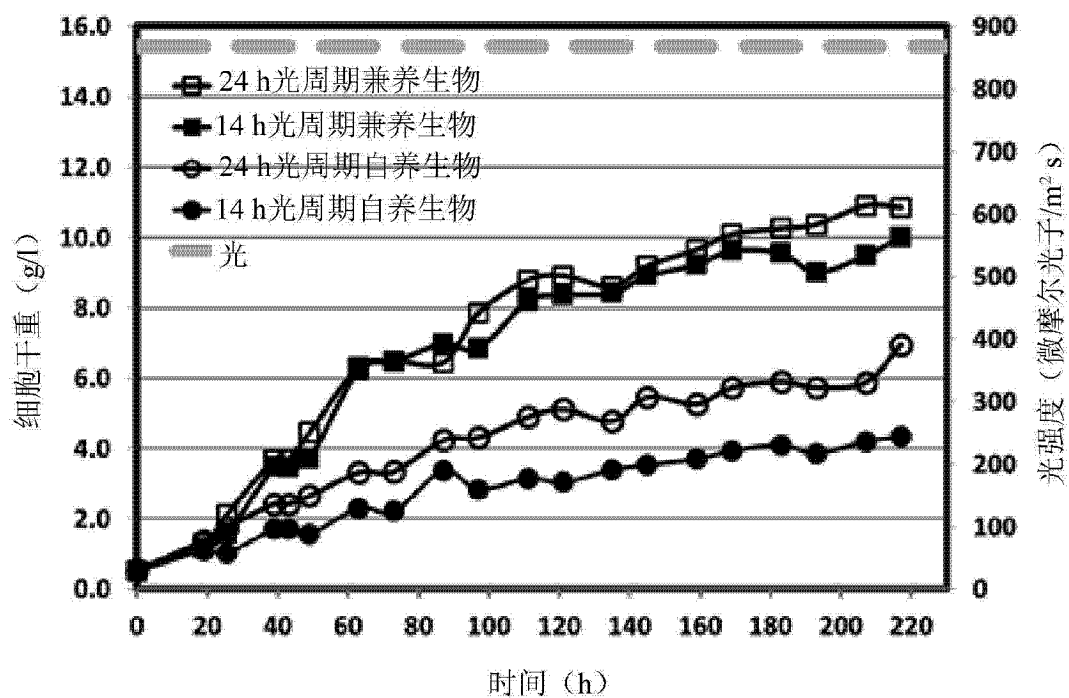


图 6

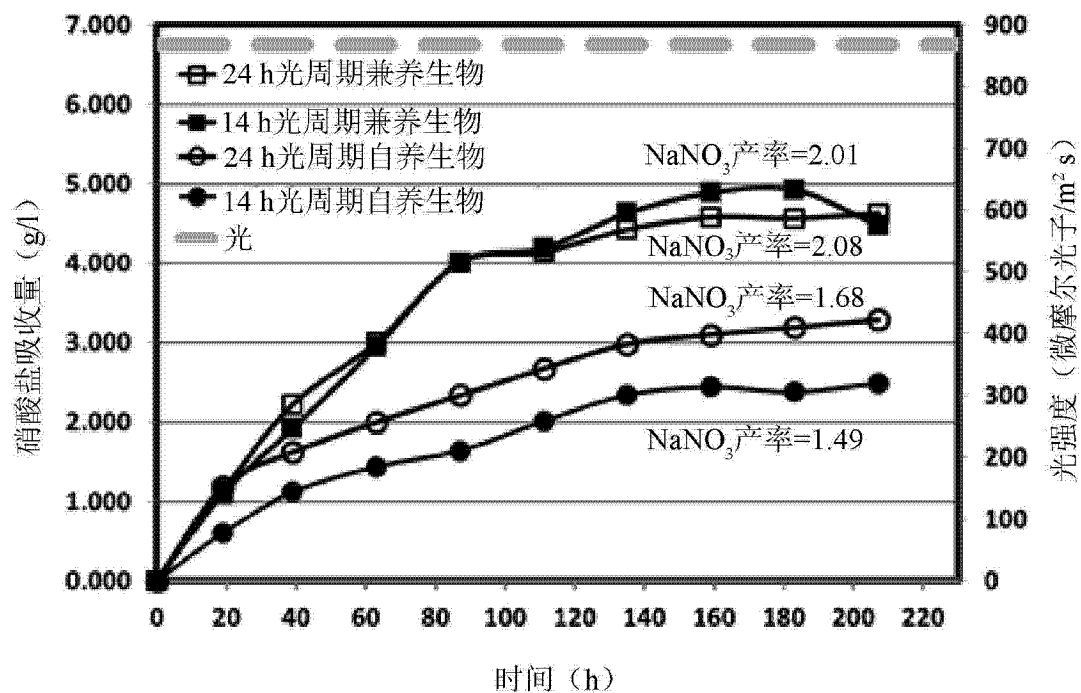


图 7

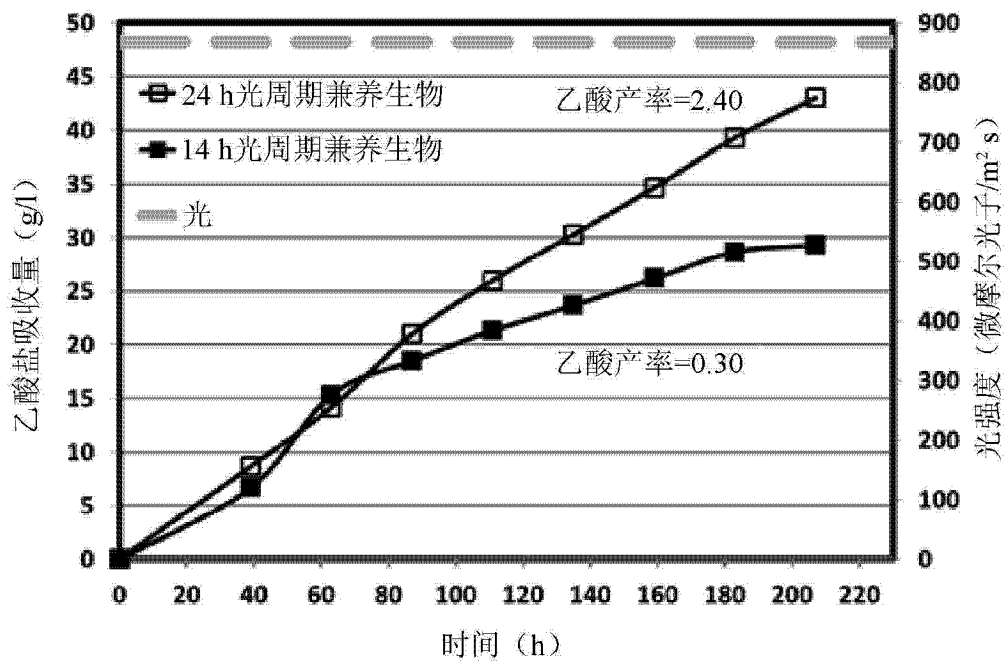


图 8

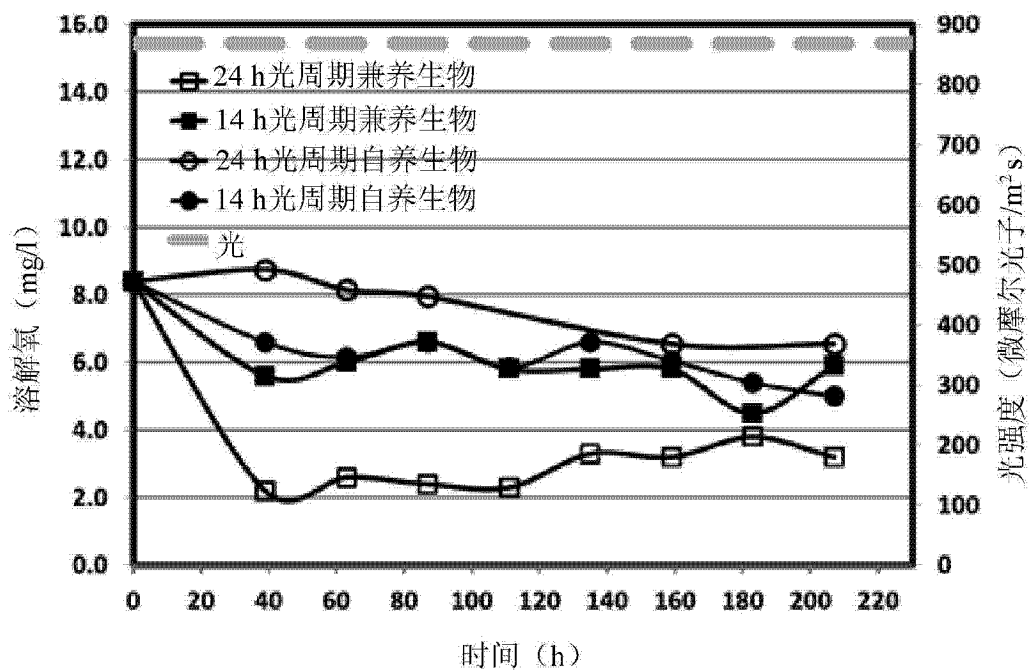


图 9

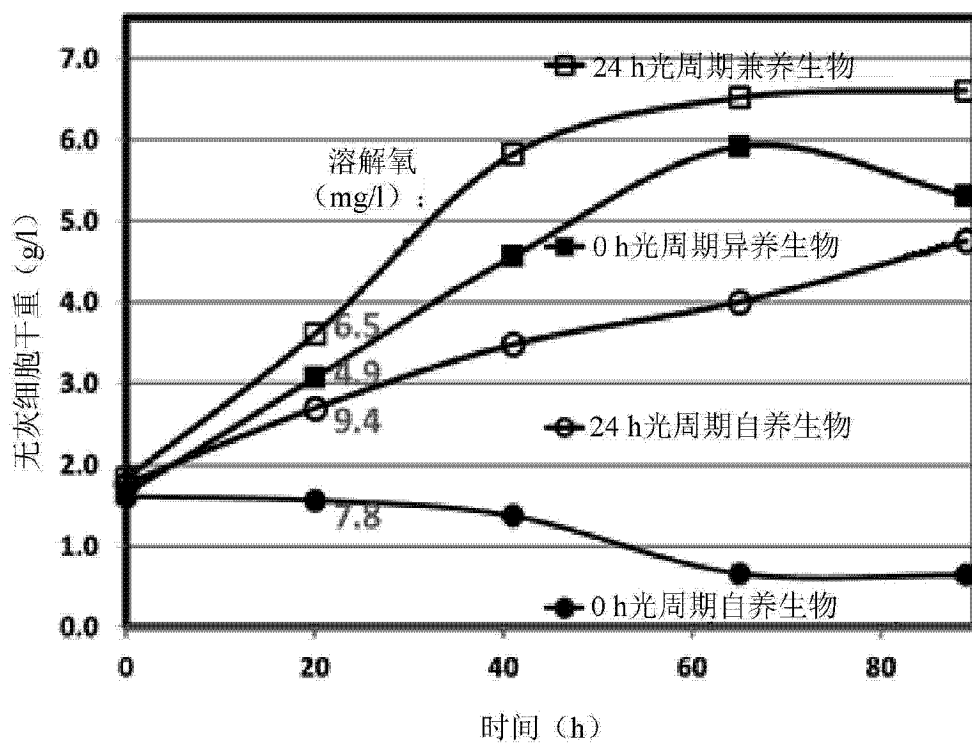


图 10

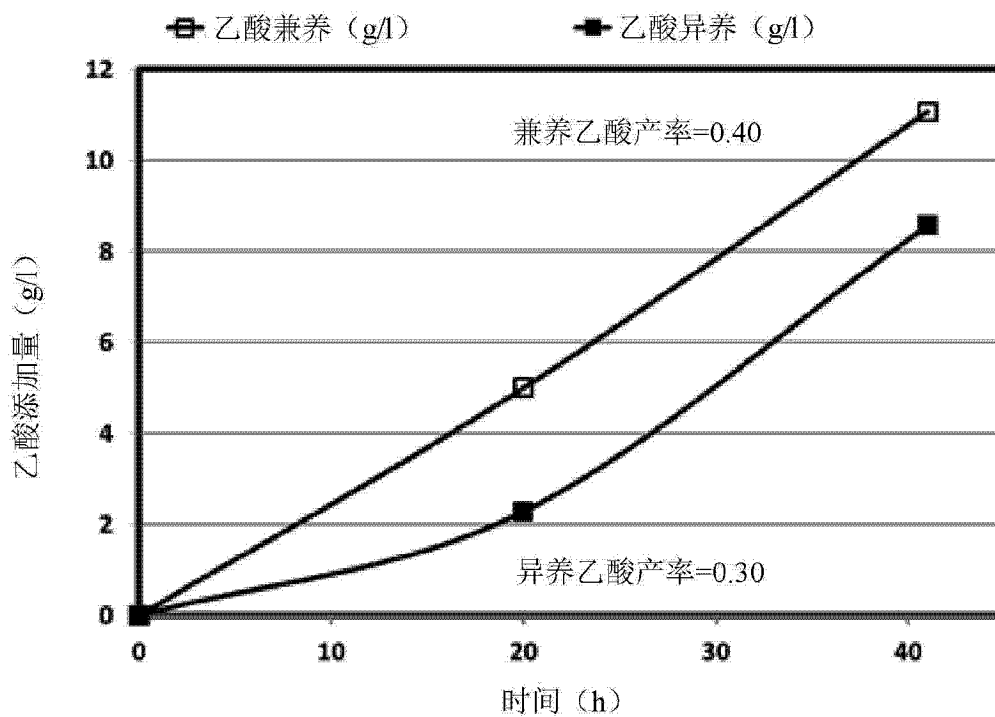


图 11

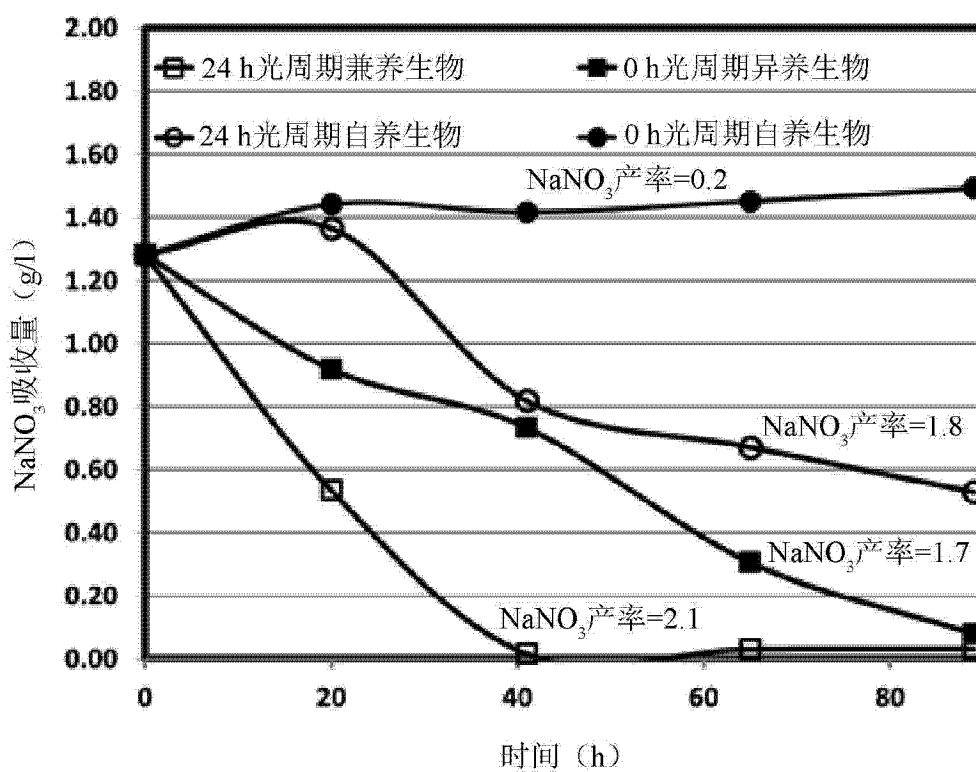


图 12

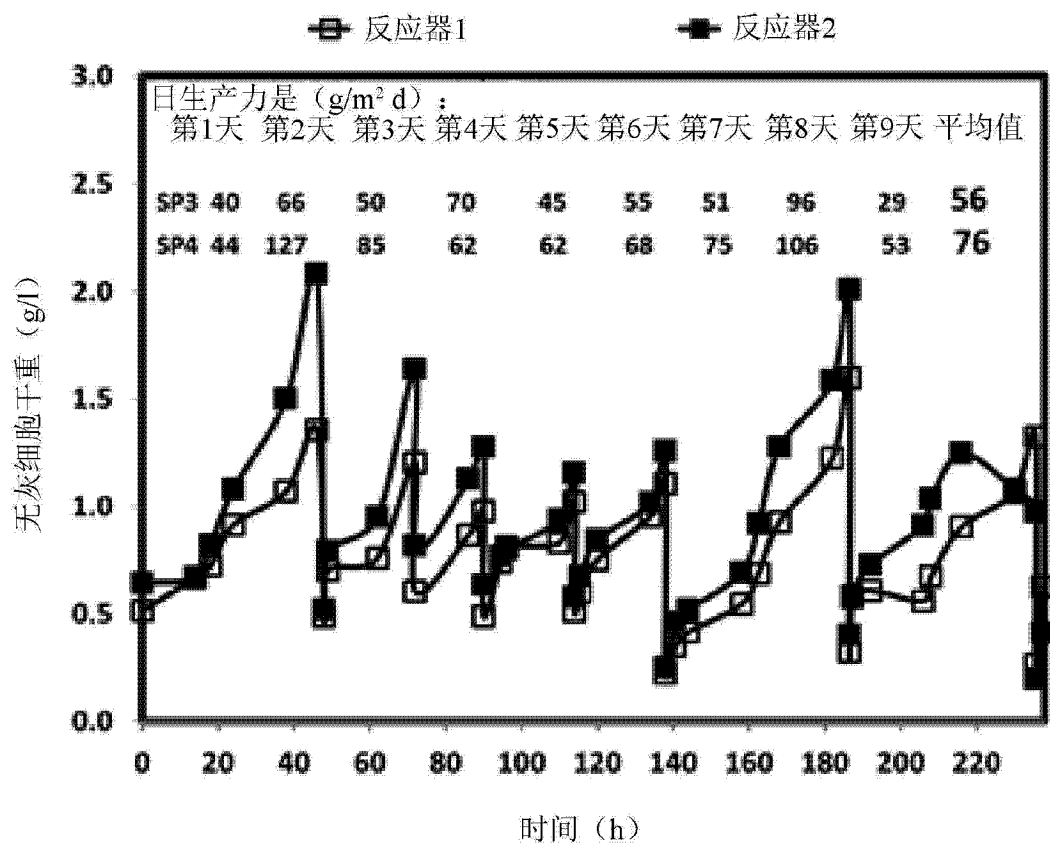


图 13

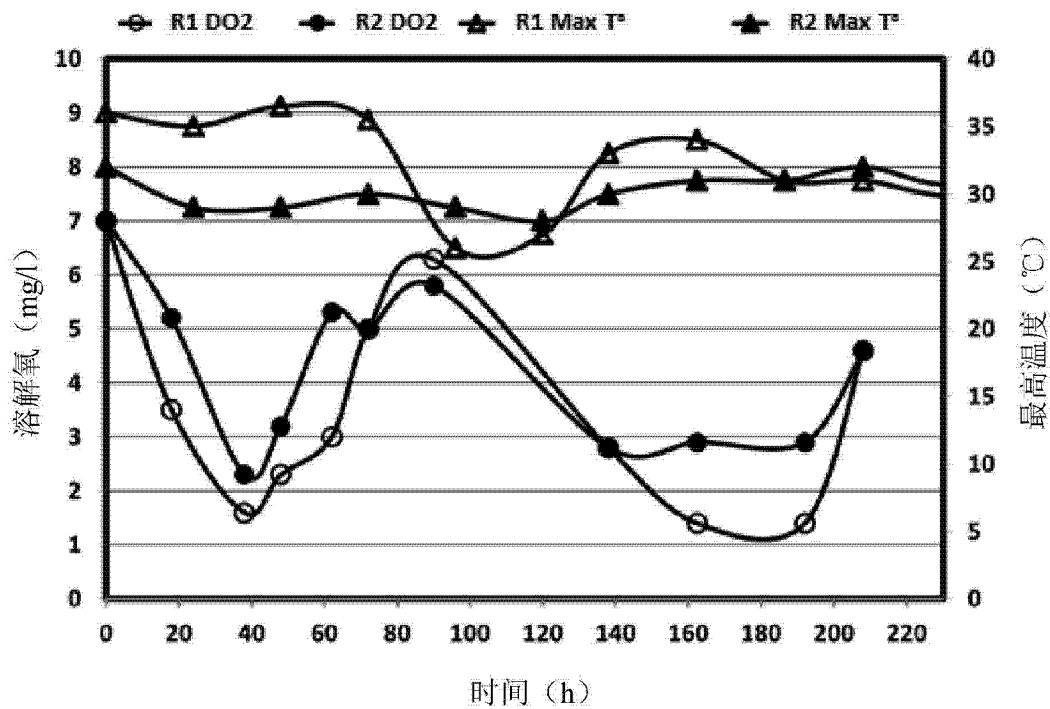


图 14

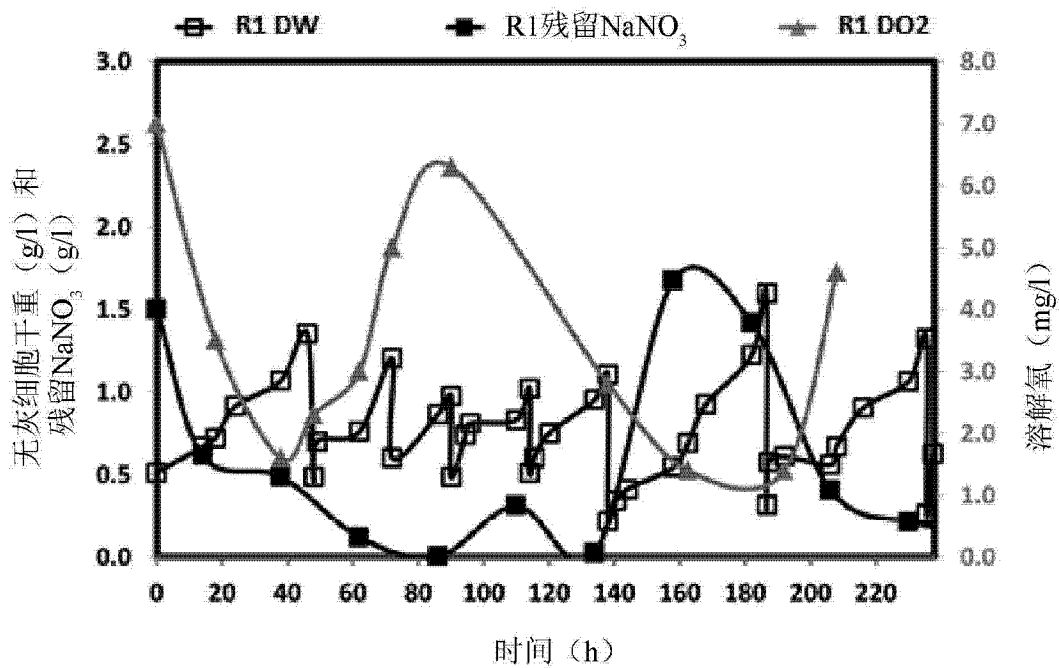


图 15

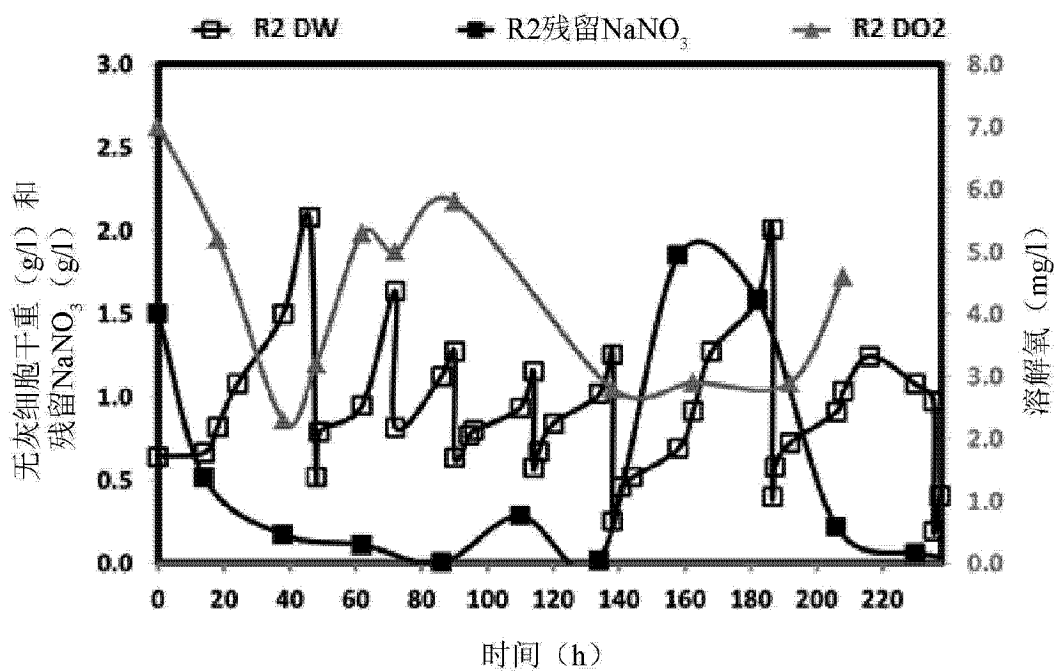


图 16

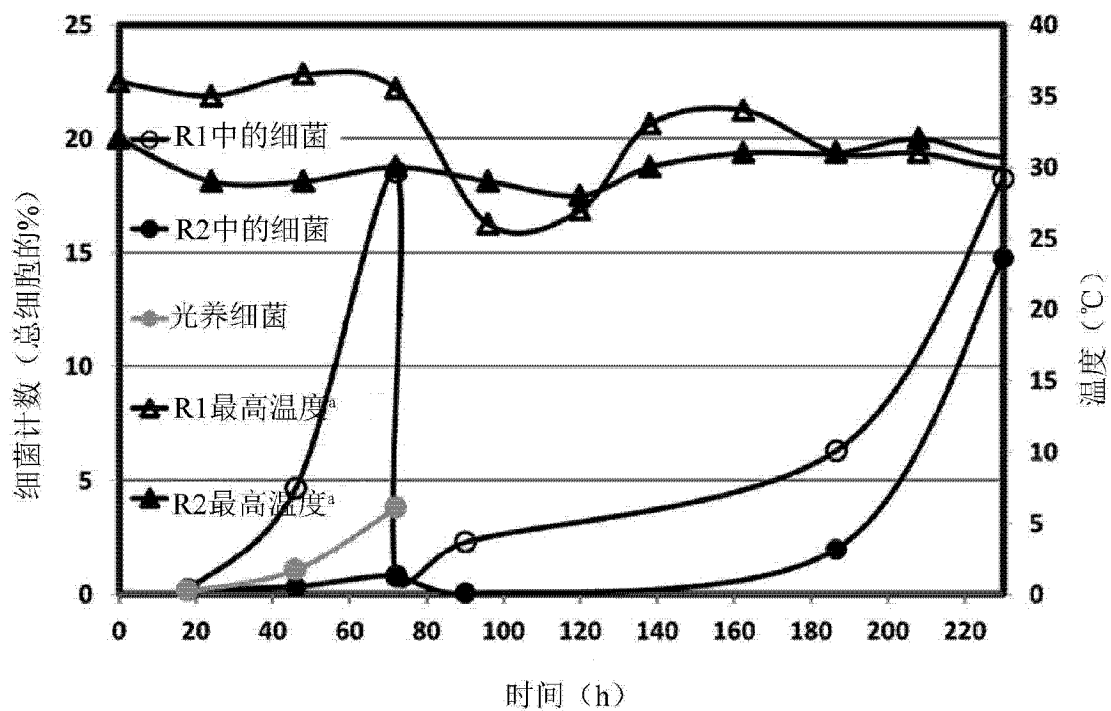


图 17

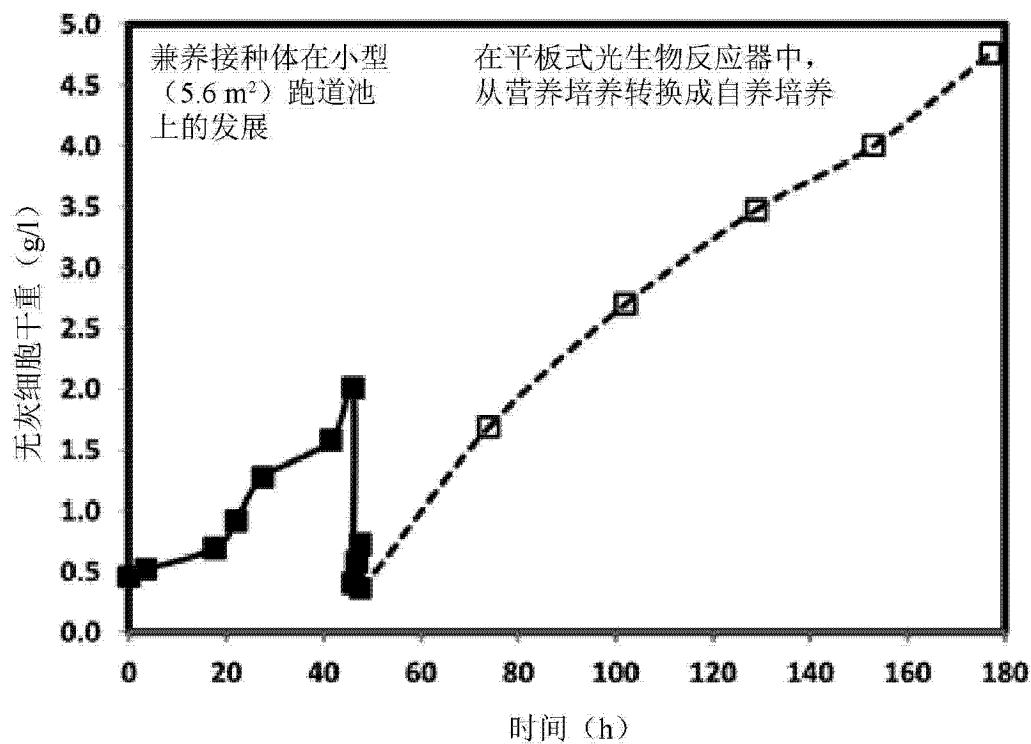


图 18

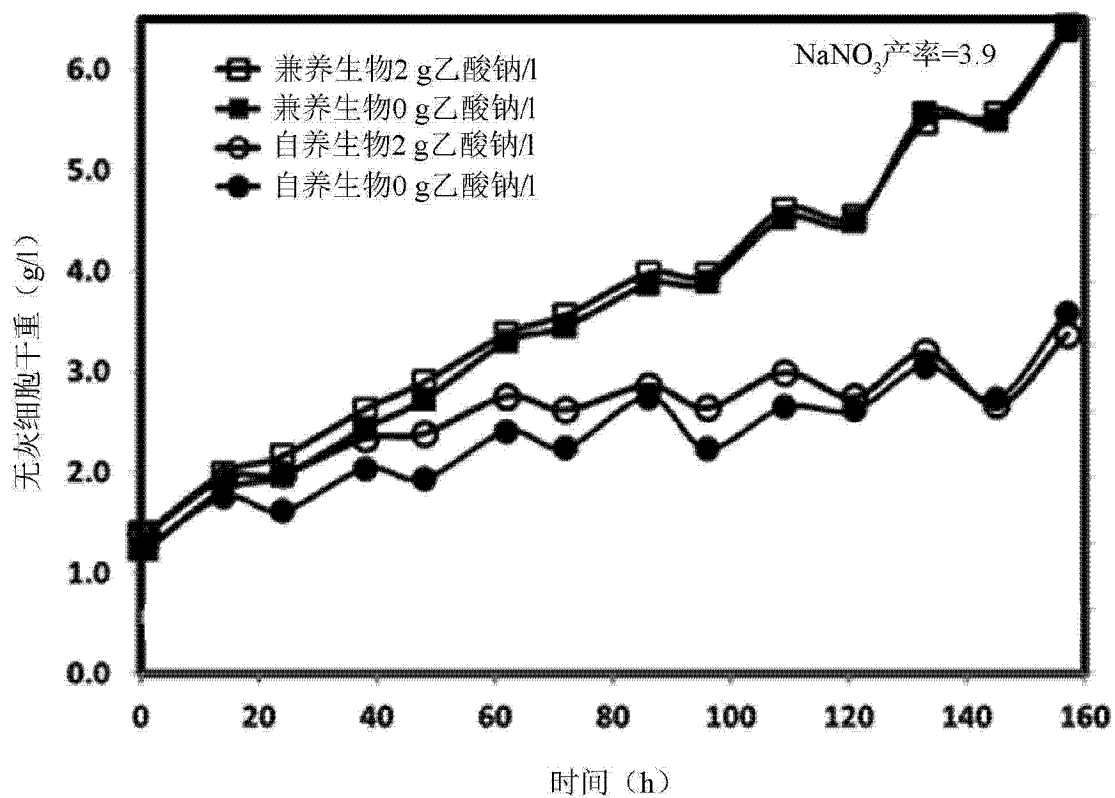


图 19

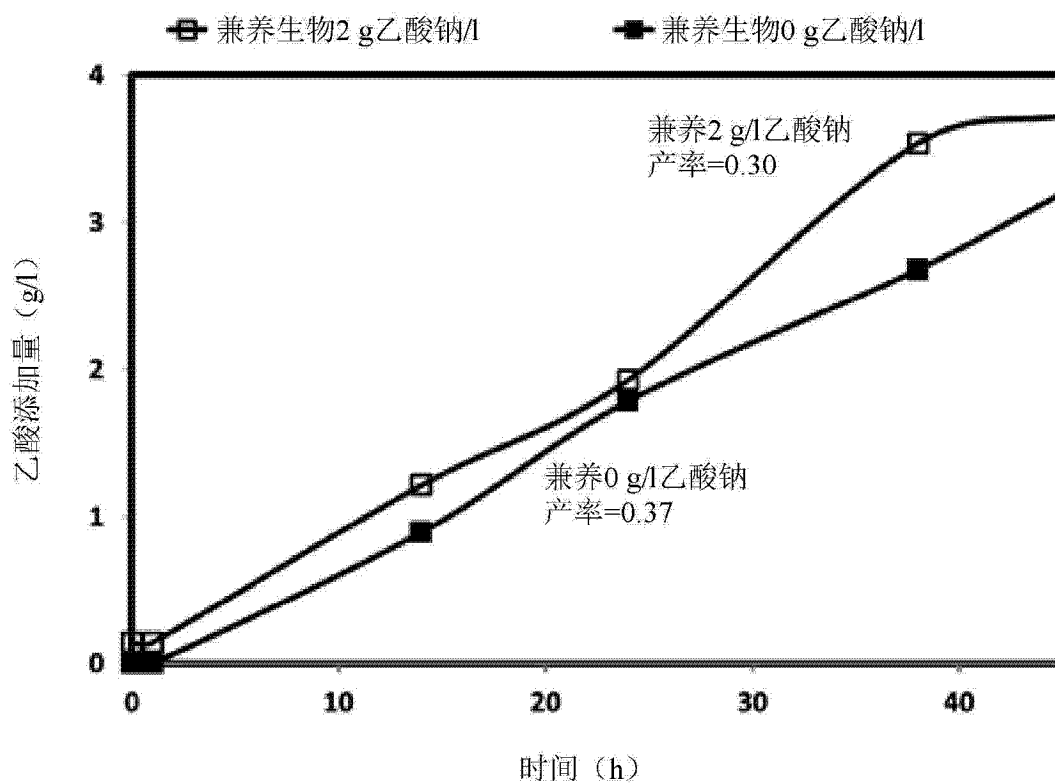


图 20

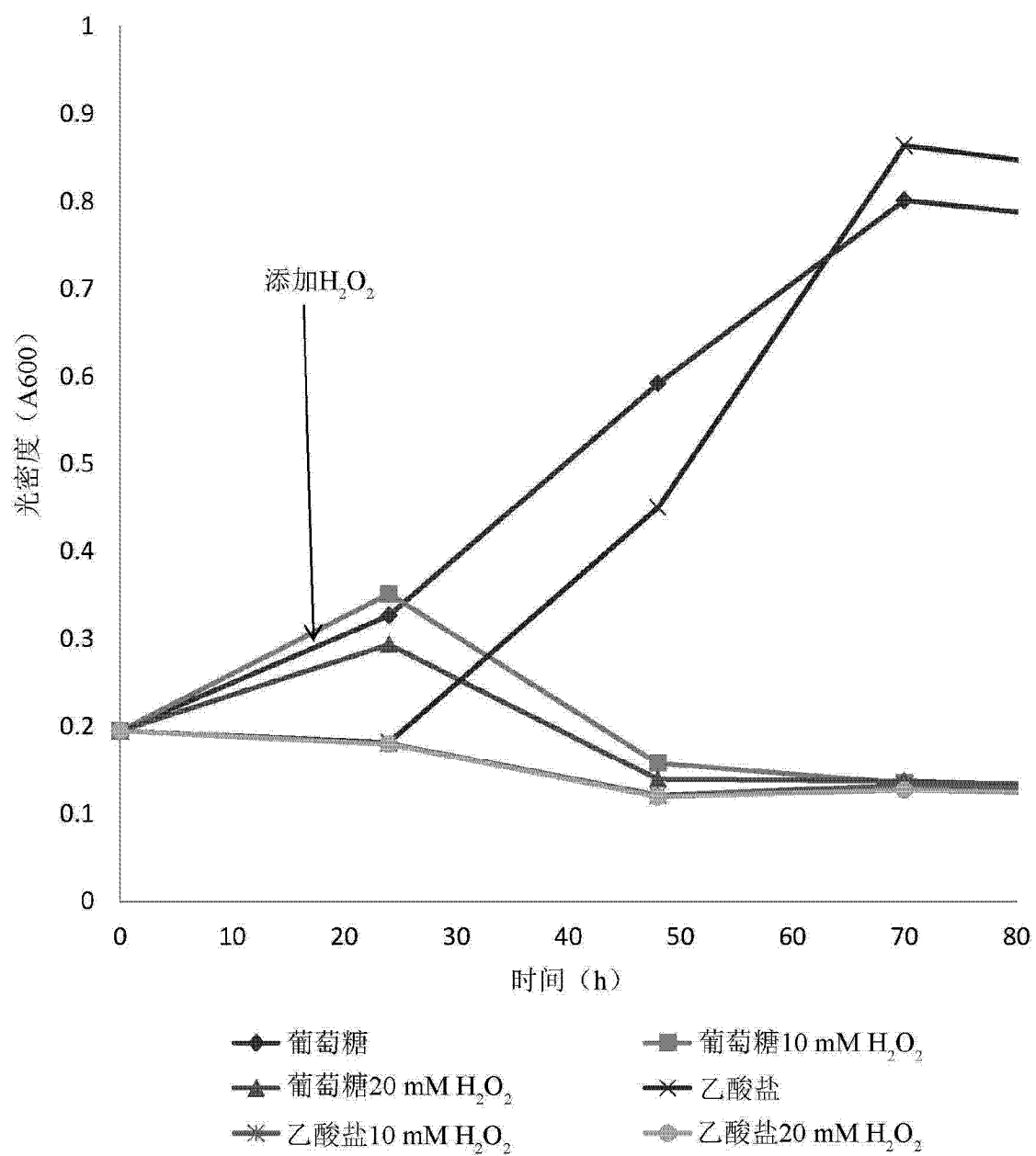


图 21

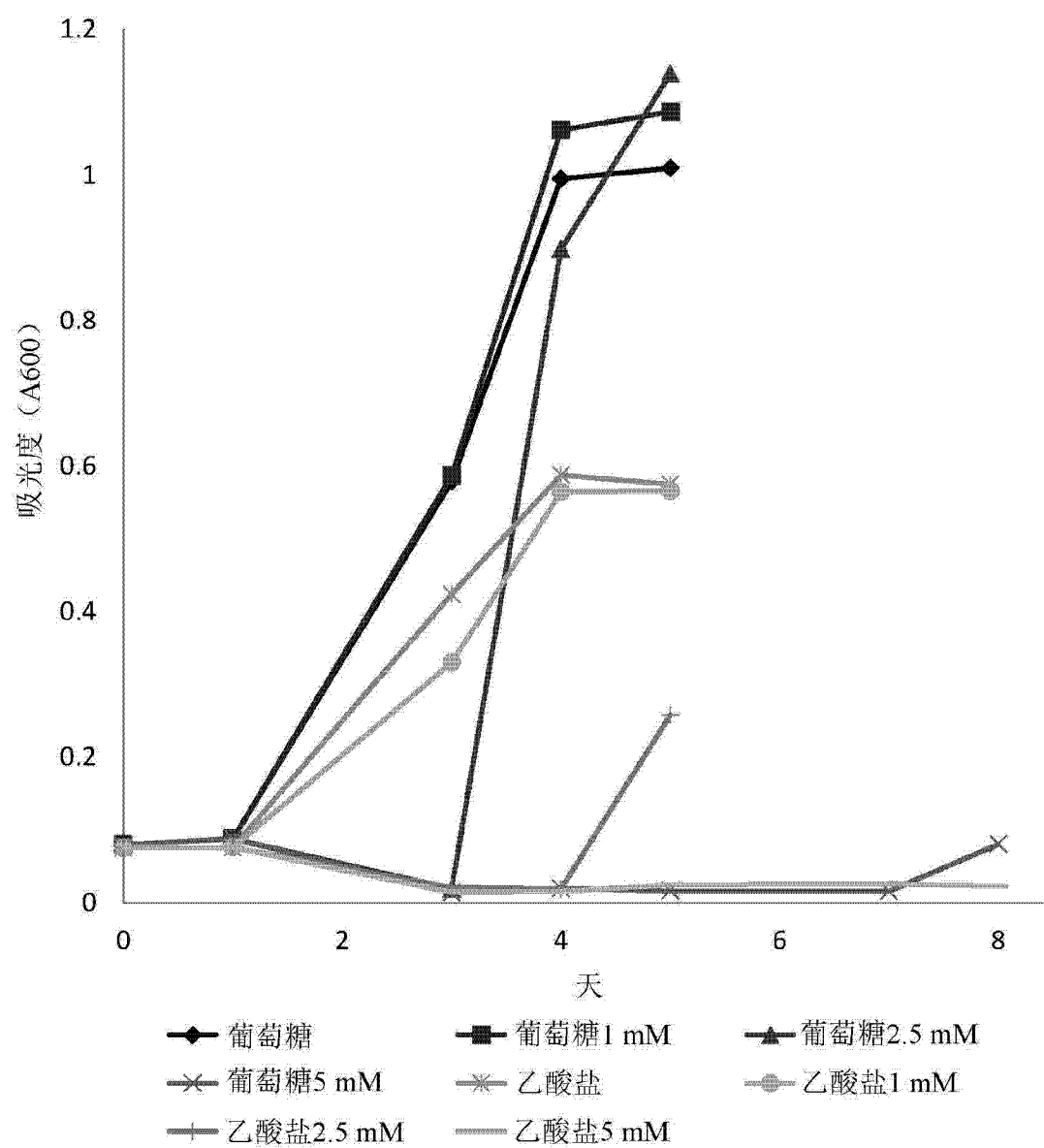


图 22

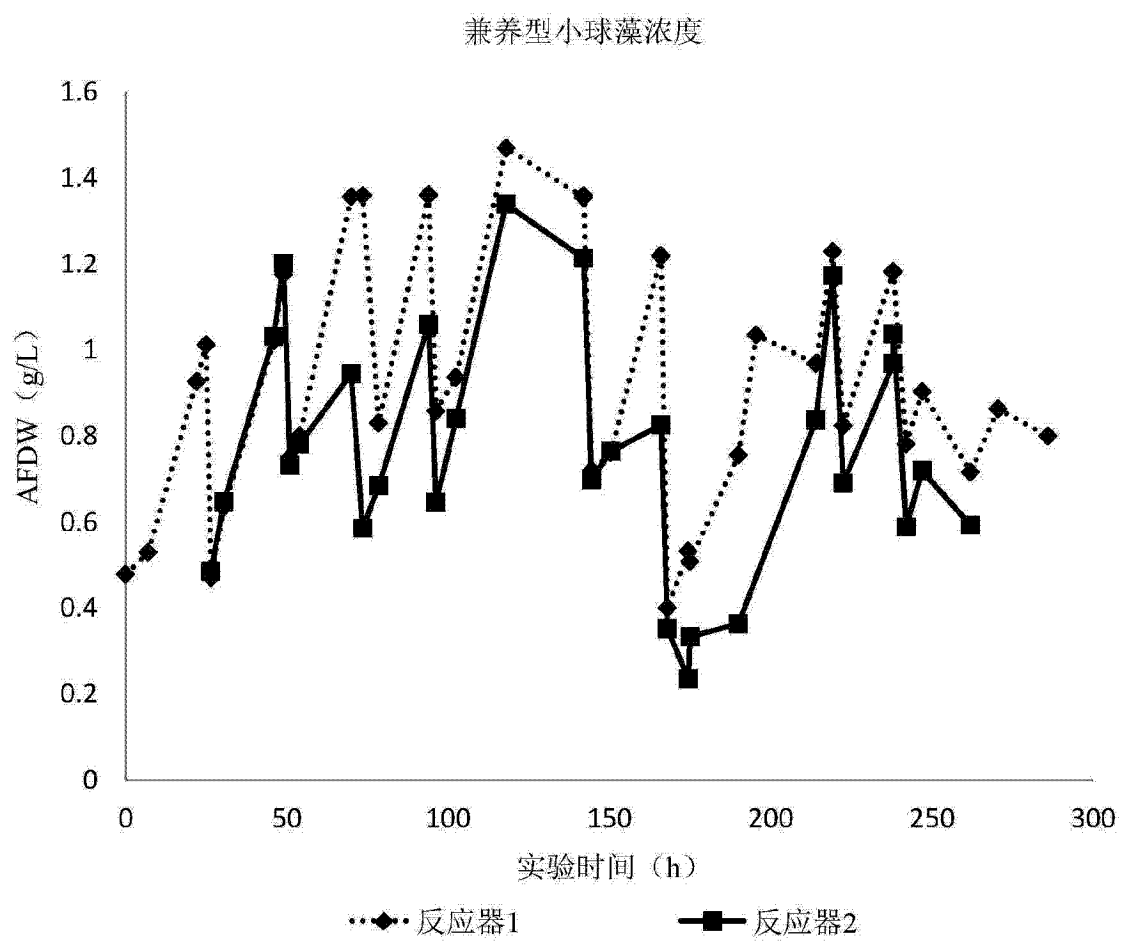


图 23

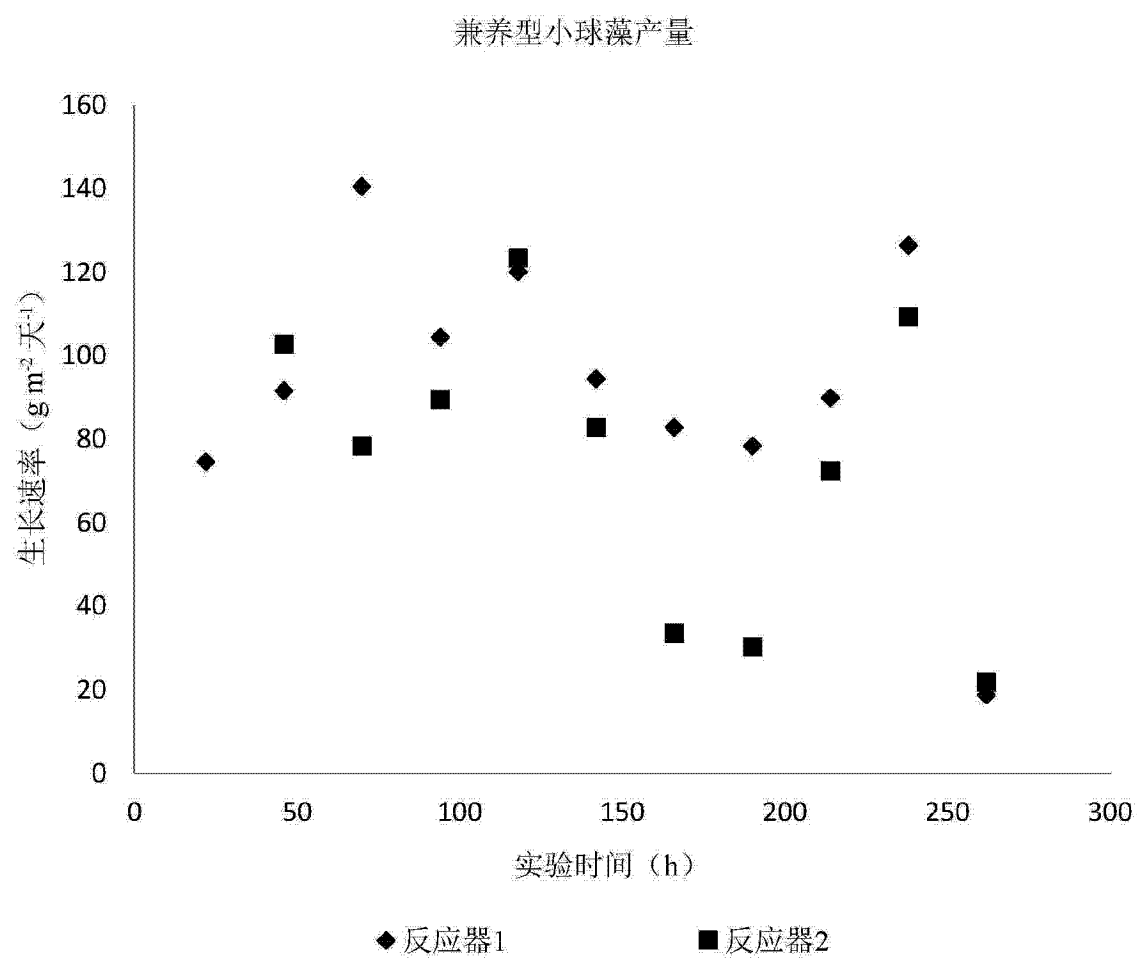


图 24

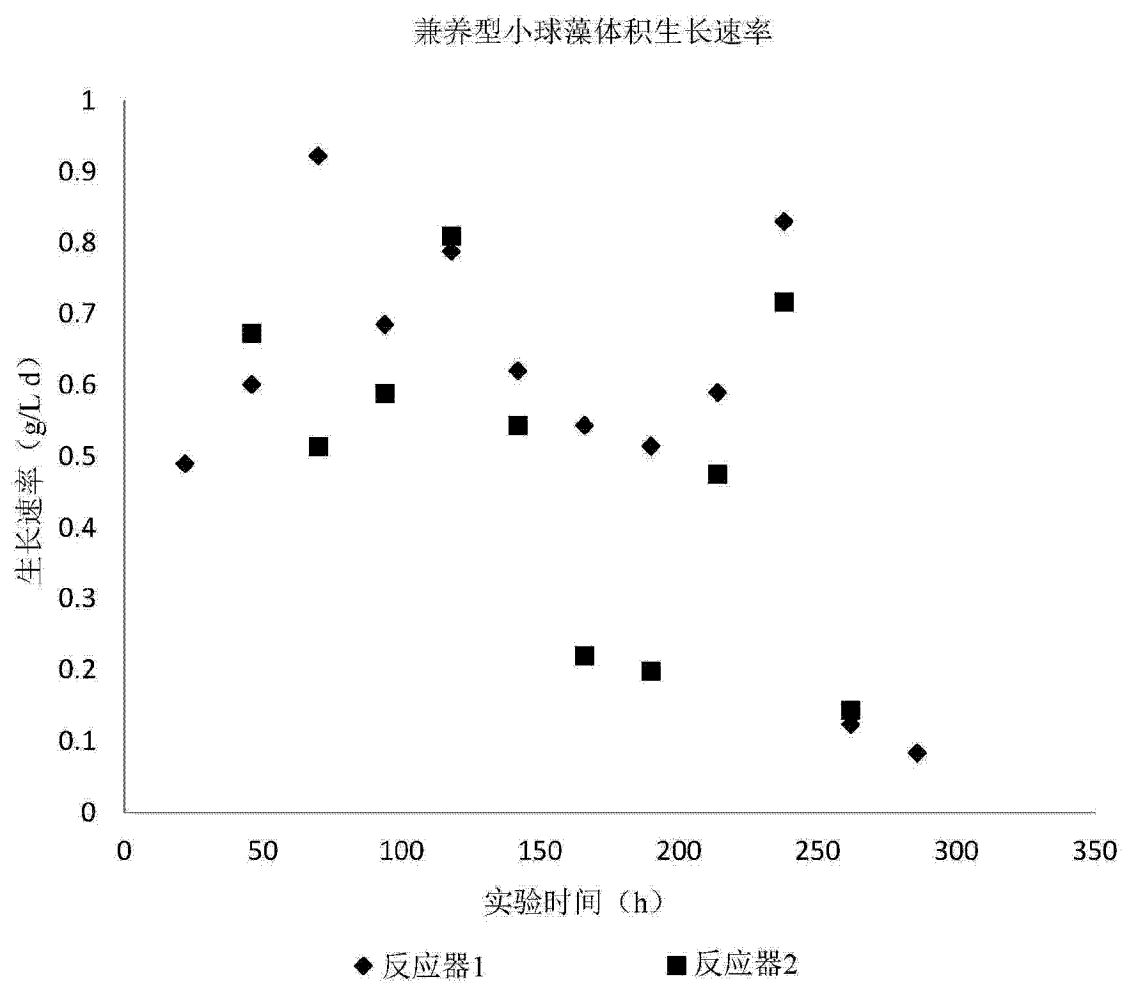


图 25

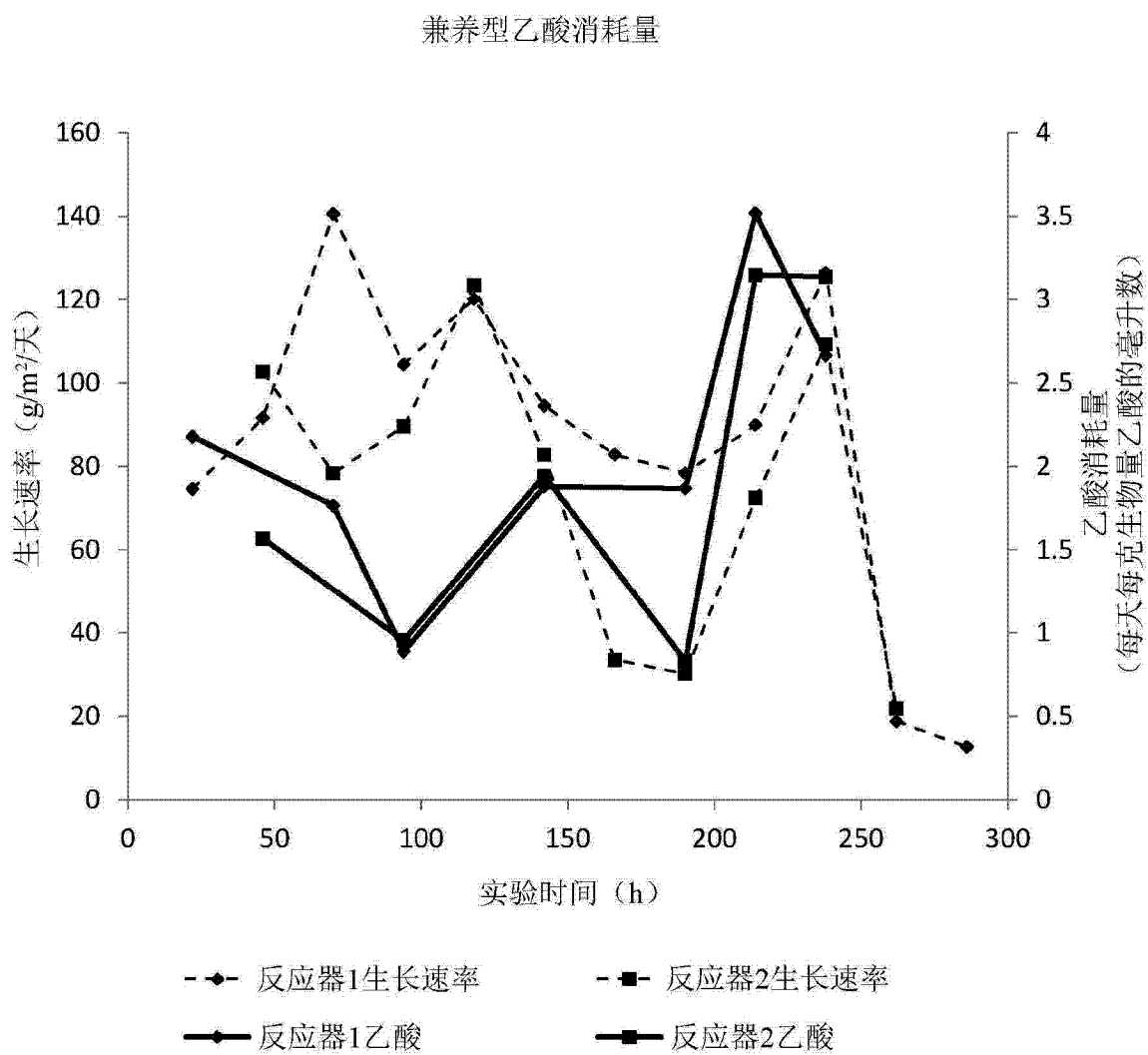


图 26

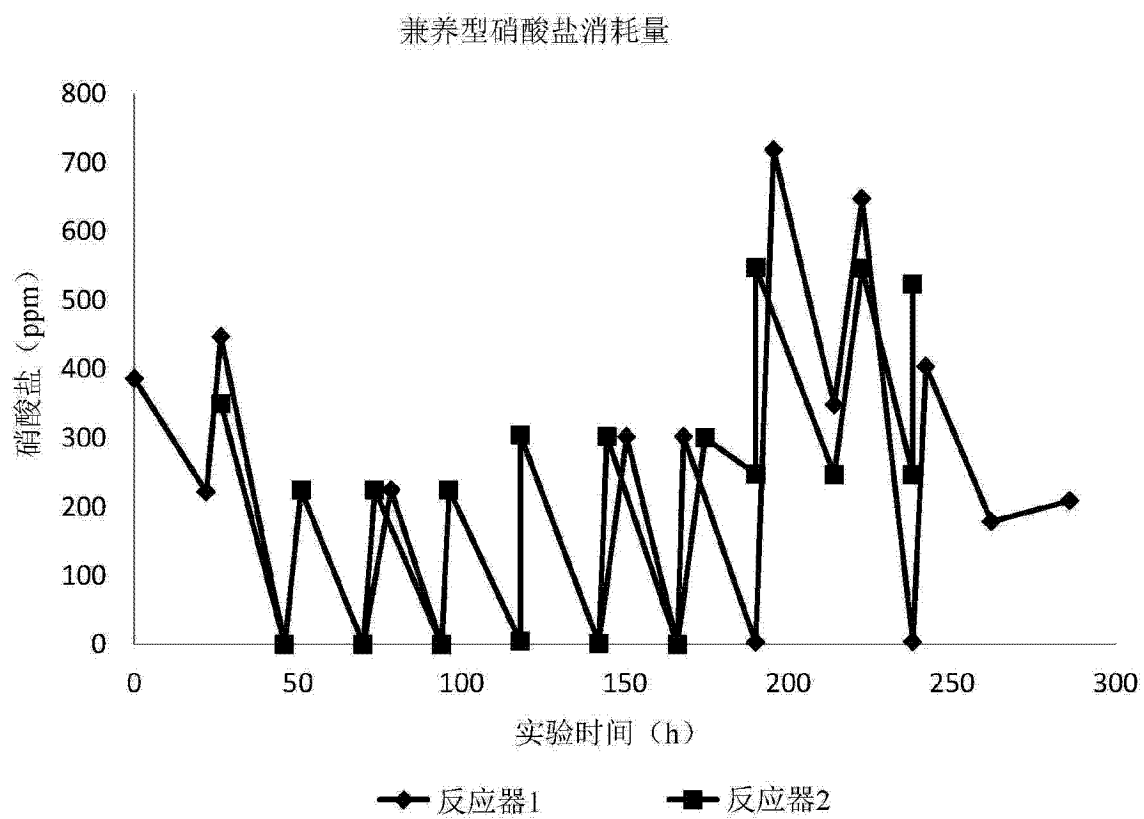


图 27

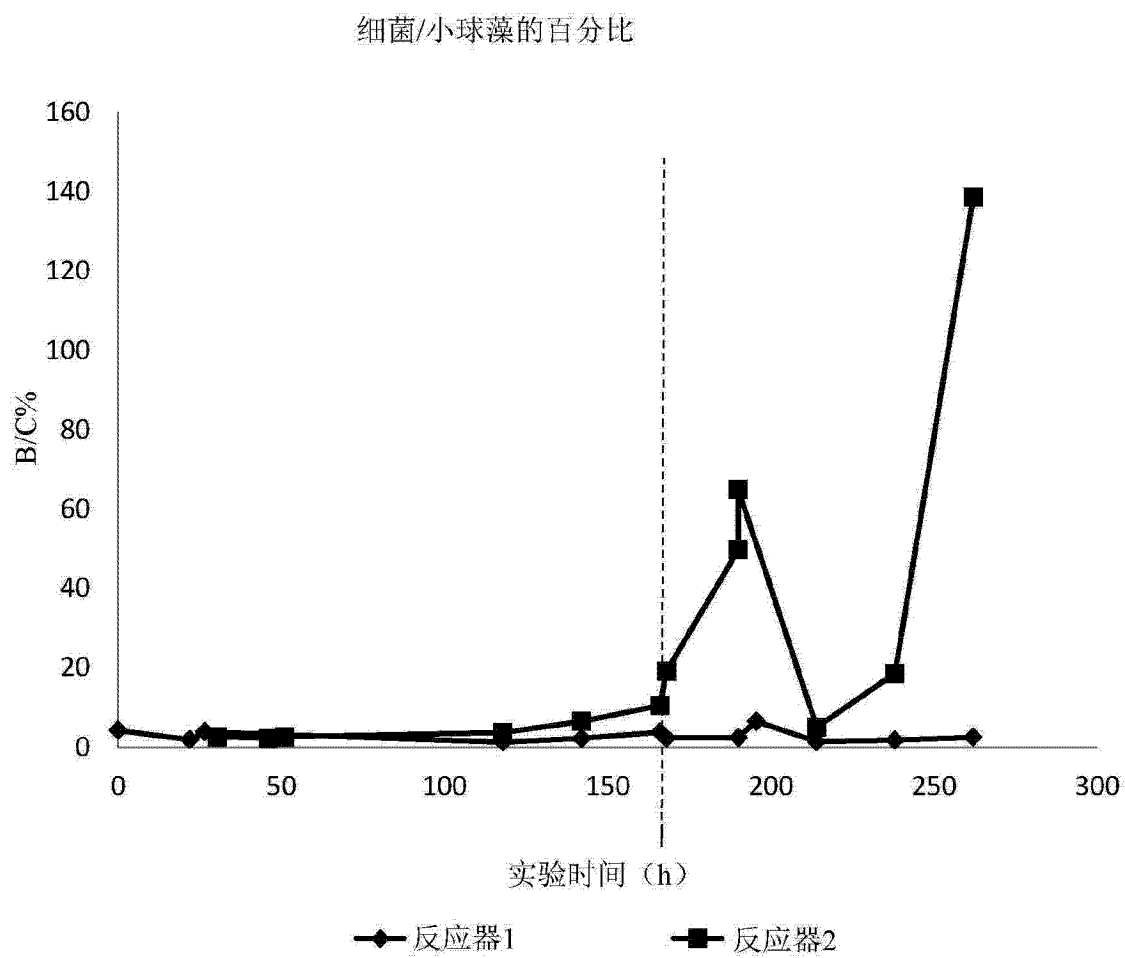


图 28

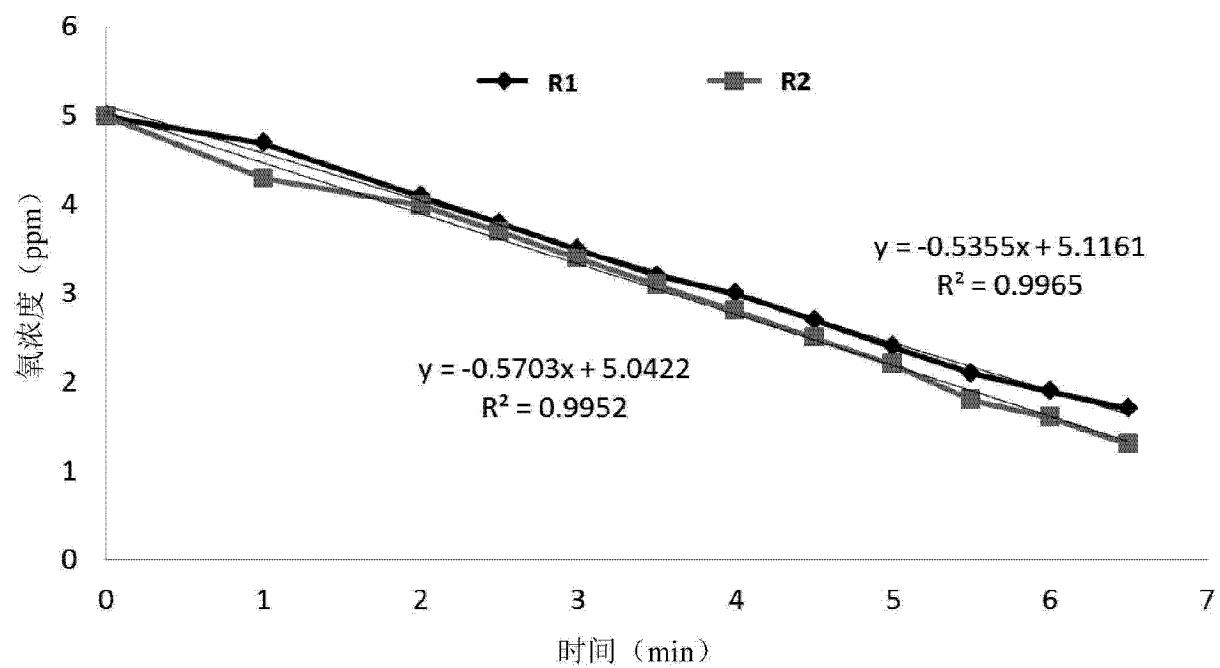


图 29

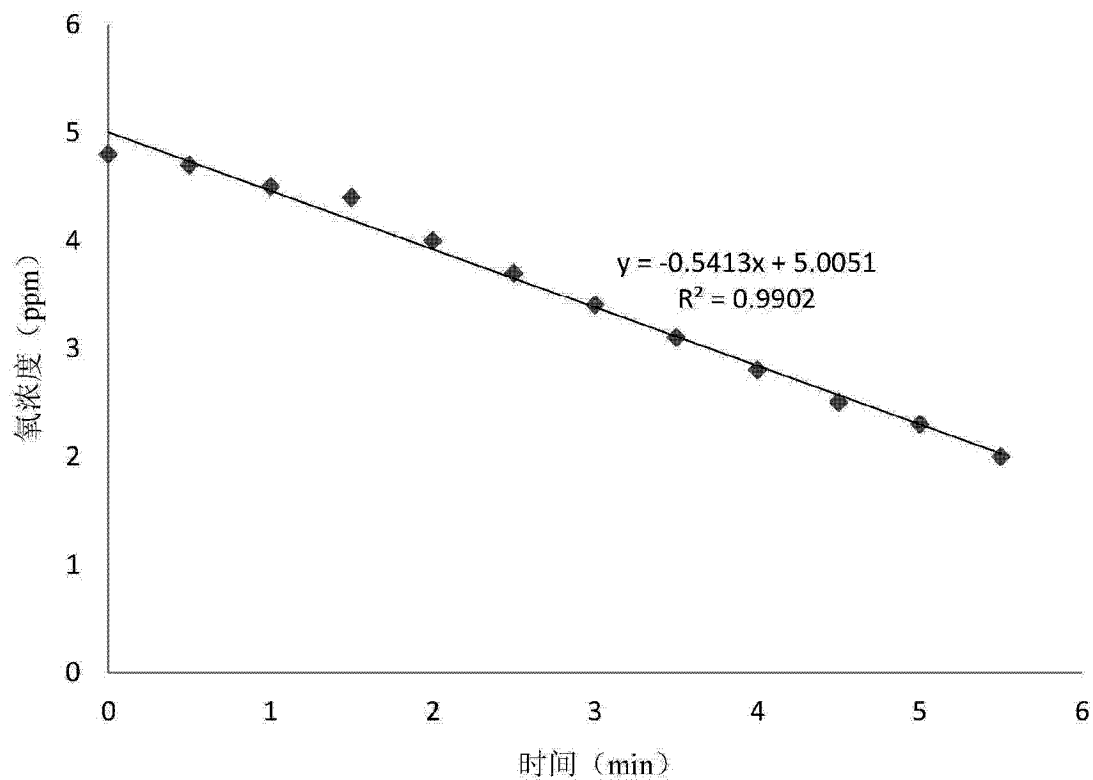


图 30

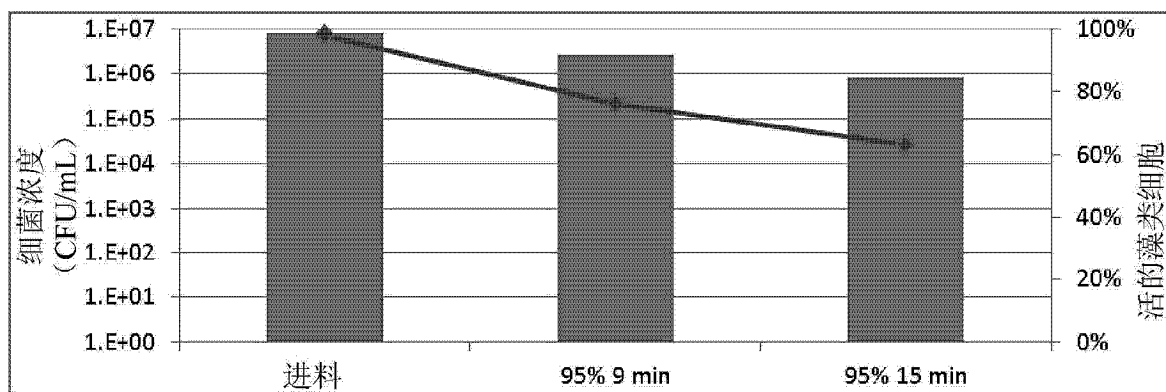


图 31

浓度和体积生长速率随时间推移

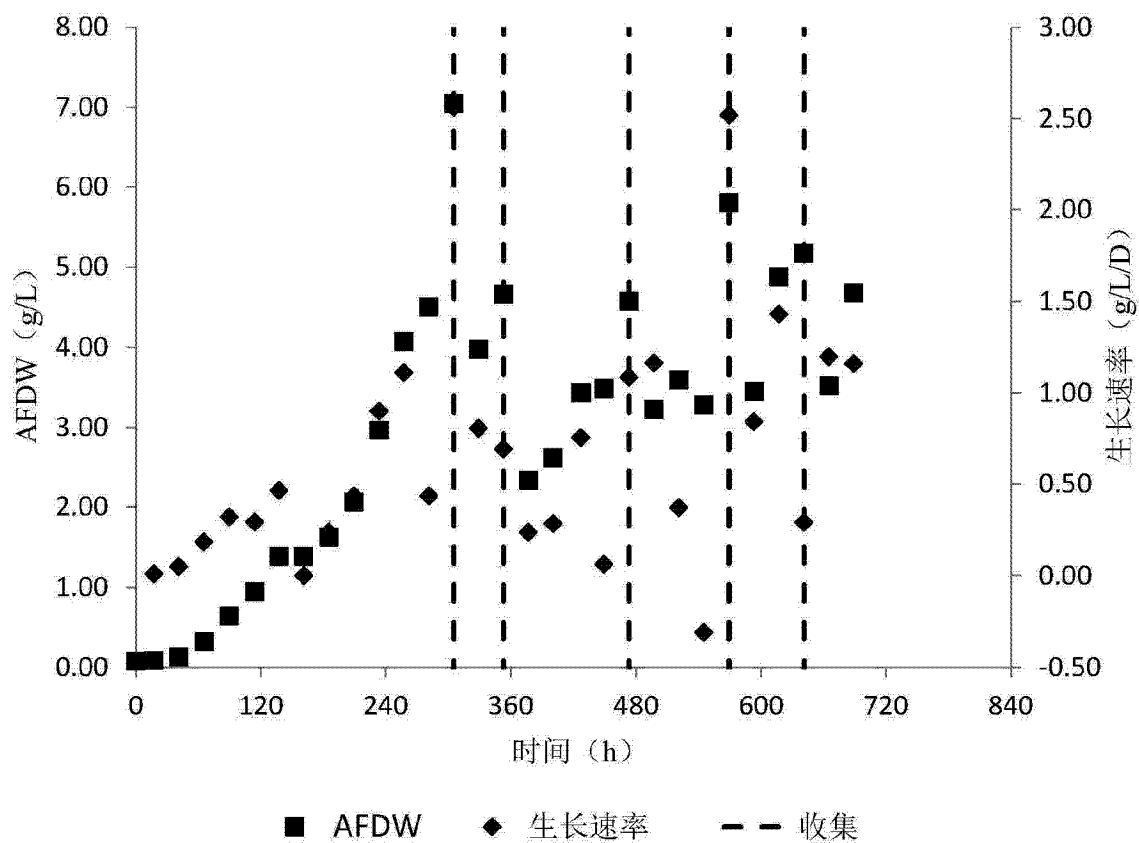


图 32

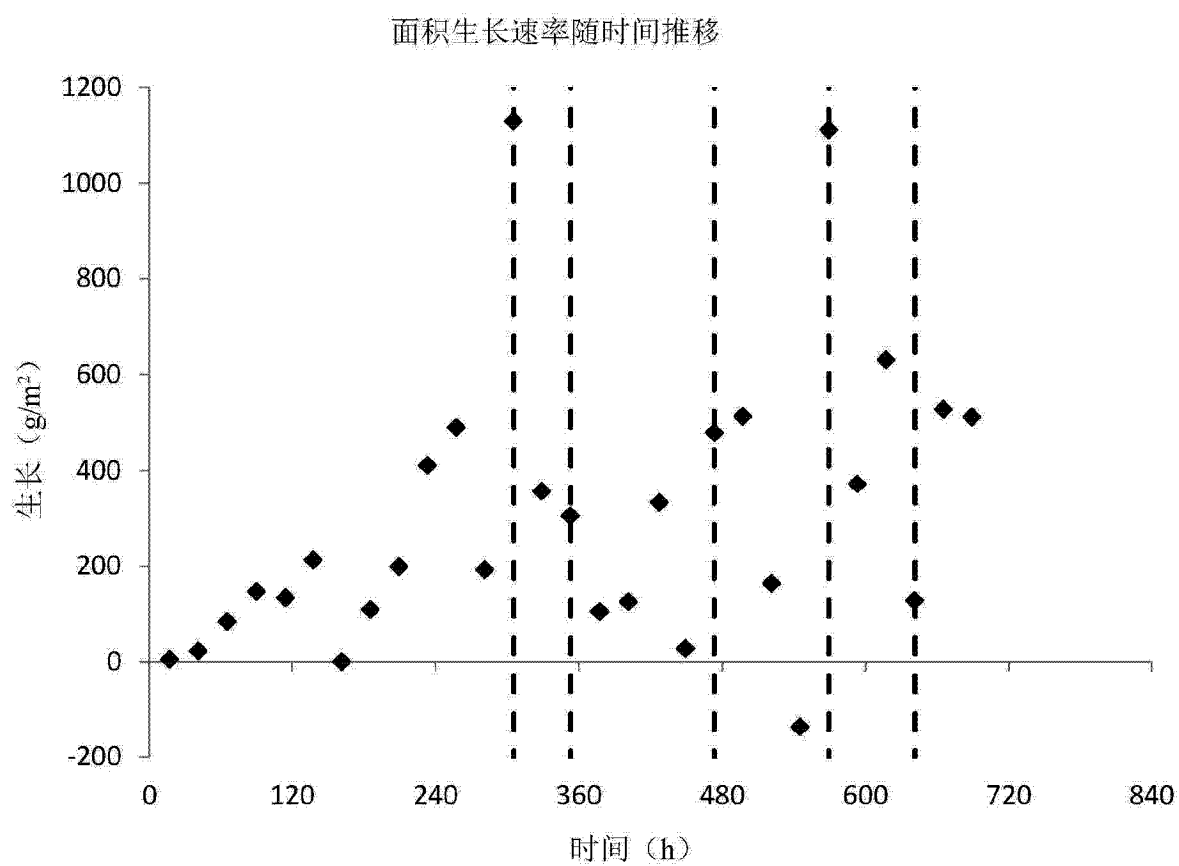


图 33

体积生长速率与浓度的关系

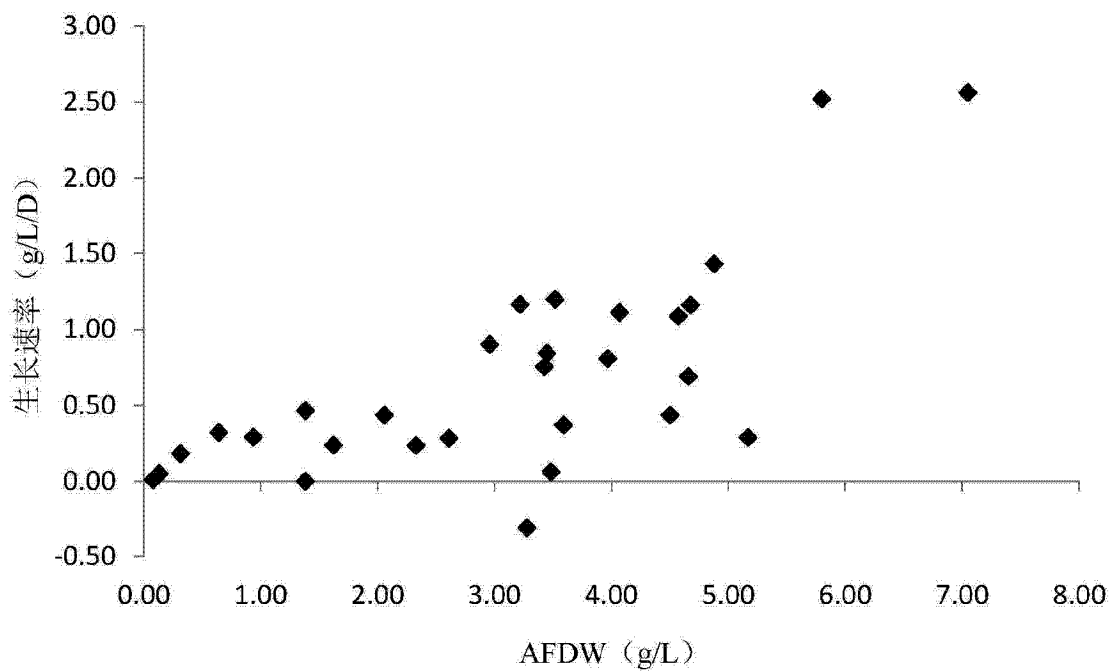


图 34

面积生长速率与浓度的关系

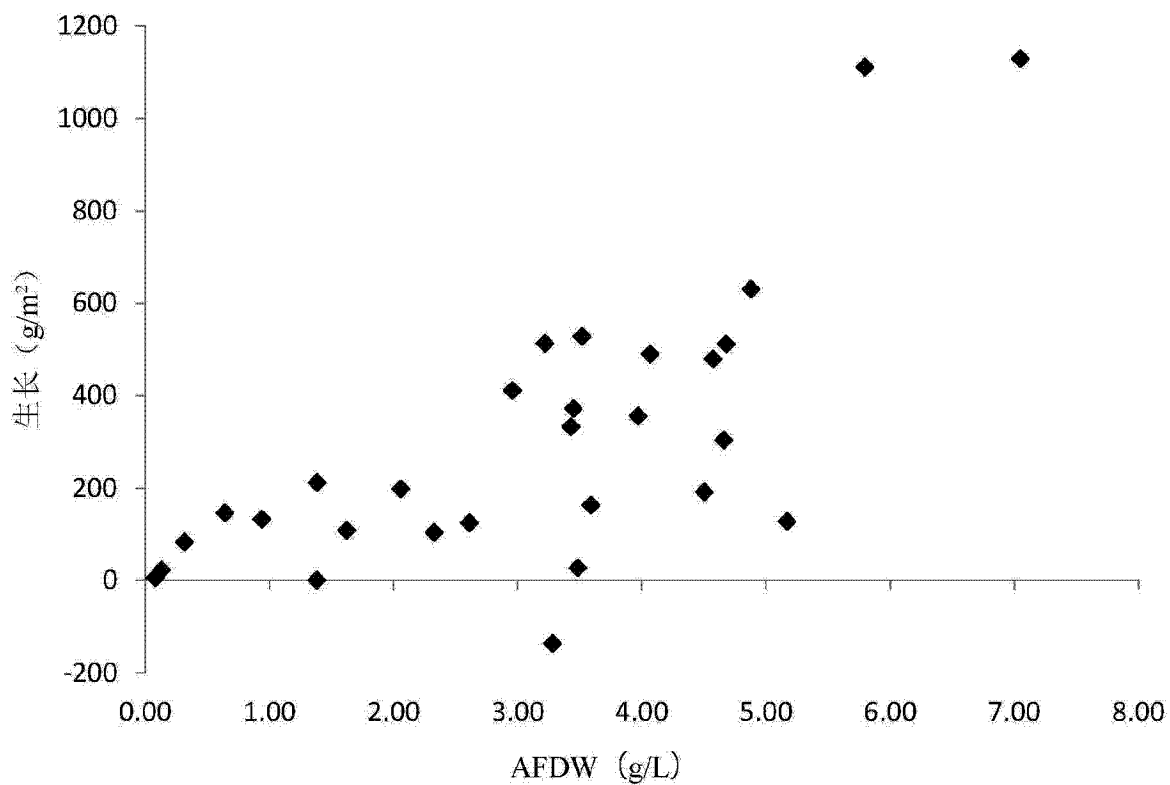


图 35

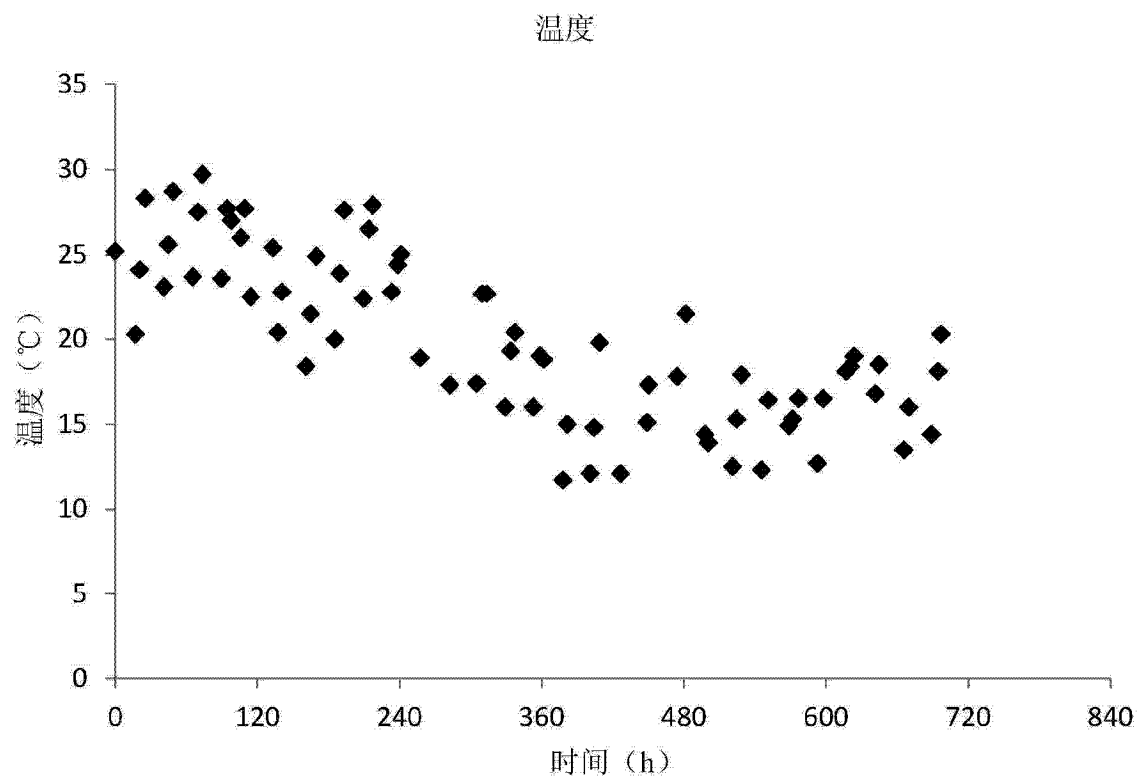


图 36

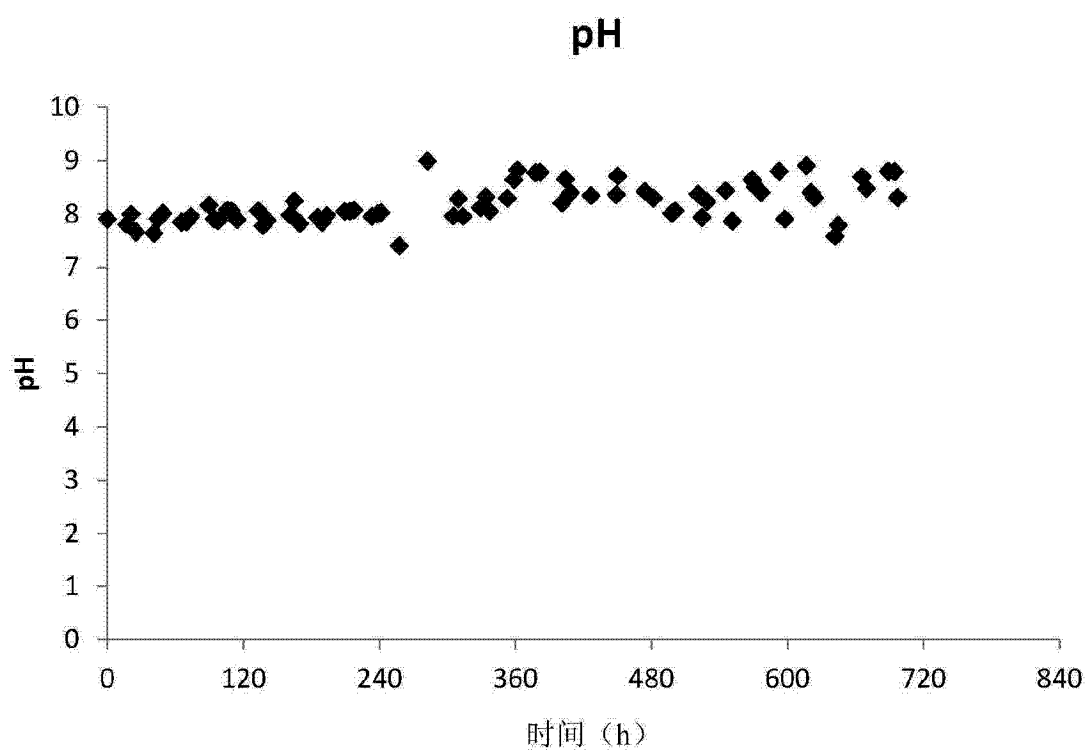


图 37

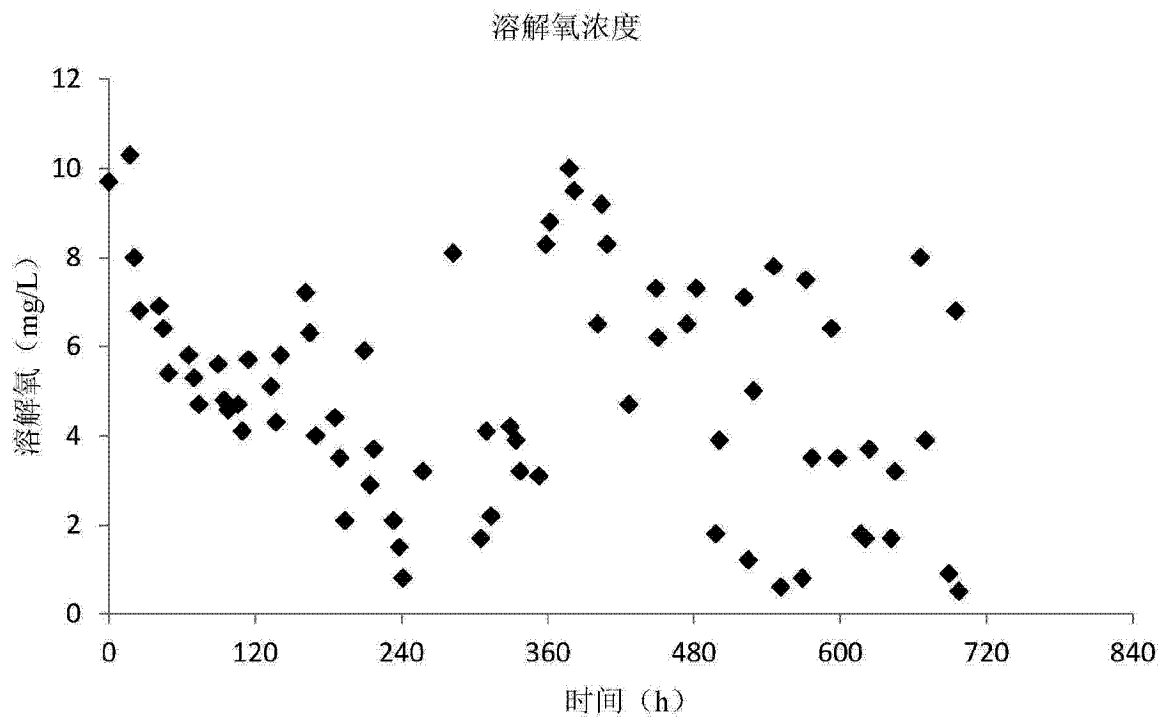


图 38

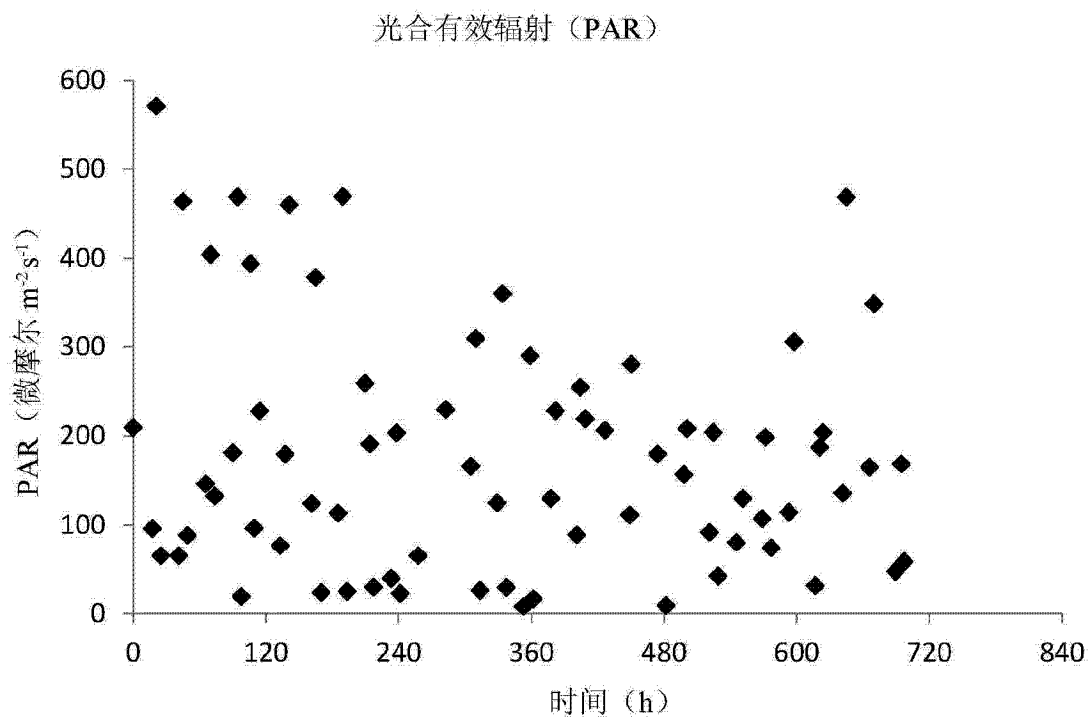


图 39

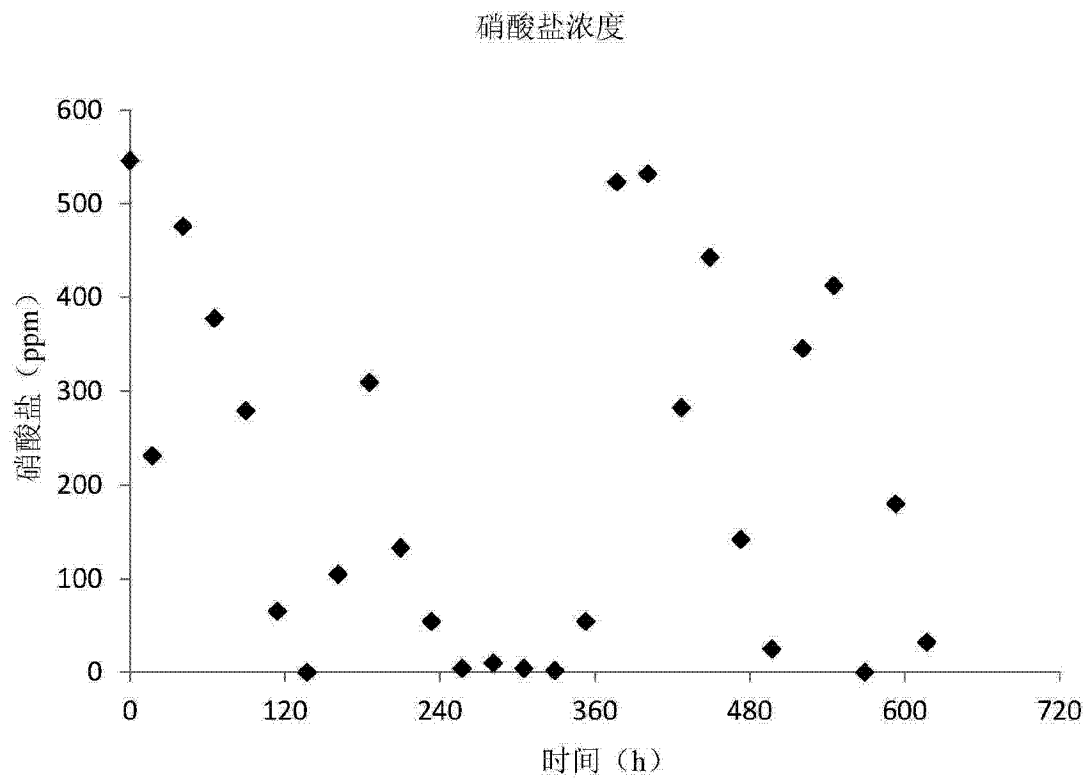


图 40

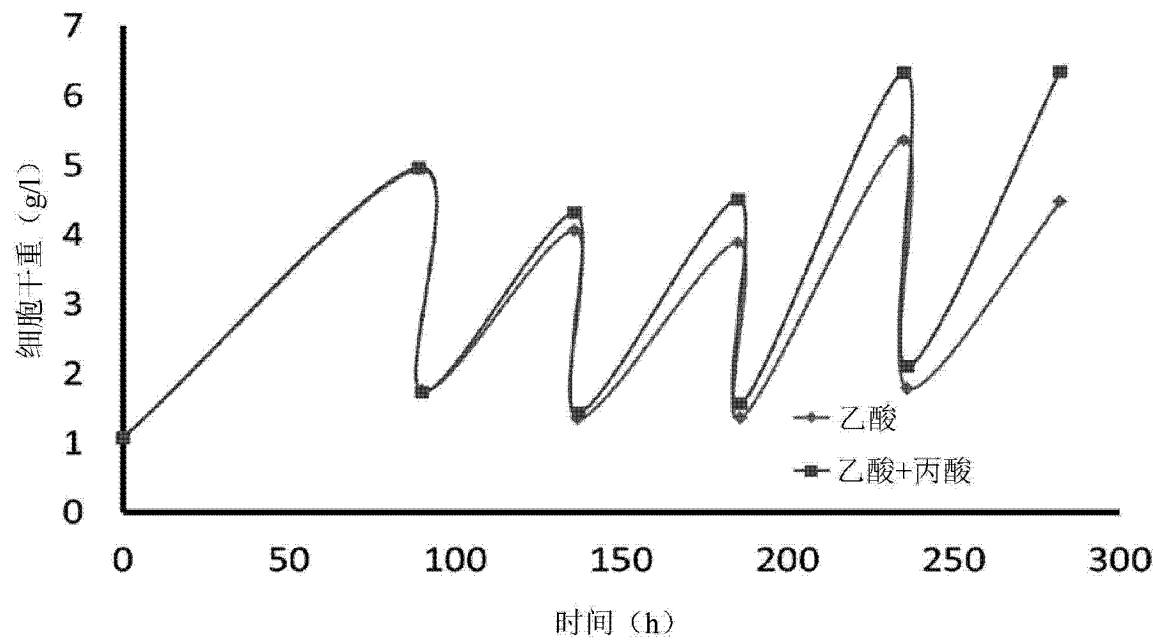


图 41