

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：97145769

※申請日期：97.11.26

※IPC 分類：C12N 1/2 <2006.01>

一、發明名稱：(中文/英文)

C12M 1/36 <2006.01>

異營性轉移

HETEROTROPHIC SHIFT

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商新美國能源公司以強力海藻生物燃料名義行銷

NEW AMERICAN ENERGY, INC. (DBA MIGHTY ALGAE BIOFUELS)

代表人：(中文/英文)

麥克 佛帝克

FERTIK, MICHAEL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州雷伍德市卡羅來納大道2749號

2749 CAROLINA AVENUE, REDWOOD CITY, CA 94061, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 查爾 A 哈克沃斯
HACKWORTH, CHERYL A.
2. 湯瑪斯 W 查伯格 二世
CHALBERG, THOMAS W. JR.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年11月29日；60/991,201

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案主張2007年11月29日申請之美國臨時申請案第60/991,201號之利益，該申請案係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

海藻之大量培養(Mass cultivation)已用於水處理及用於製造營養補充劑、肥料及食品添加劑歷時幾十年。近年來，亦已探索海藻之商業生長以產生生物學衍生之能量產品，諸如生物柴油、生物乙醇及氫氣。當與可用於生物燃料之陸地作物(諸如玉米、大豆及甘蔗)相比時，較之下一最有效作物，海藻可生長快得多且每英畝可產生高達30倍多之生物質。不同於具有根及葉之陸地植物，海藻生物質一般較少特定化，且大多數或所有細胞均可用於向燃料之轉化中。細胞物質之大分子組成可為自光合生物體獲得之產品的數量及品質之重要決定因素。

舉例而言，為製造油或生物燃料，可需要自含有占總生物質比例較大量之脂質的生物體收集有機化合物。亦可需要將細胞物質之大分子組成改為更佳脂質概況，例如以製造具有較大能量密度或較低黏度之油，其又可製造較高品質之燃料。

先前研究已使用營養素缺乏(諸如N或Si受限生長)來誘導諸如微藻類之植物細胞之脂質組成的改變("A Look Back at the US Dept of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae."NREL, 1998)。儘管此方法成功地改

變了細胞之大分子組成，但因為所得海藻培養物在營養素受限之條件中生長較緩慢，所以該方法一般並不能產生較大生產力。

在不極大地犧牲細胞生長之總生產力的情況下誘導較有利之大分子組成及細胞組成代表此項技術中之進步。

【發明內容】

在一態樣中，本發明提供改變光合細胞之大分子含量的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變該光合細胞之該大分子含量。

在本發明之另一態樣中，提供改變在光合細胞中脂質之量的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變在該光合細胞中脂質之量。在一實施例中，在該光合細胞中脂質之量增加。

在一態樣中，提供改變脂質在光合細胞中之特性的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變脂質在光合細胞中之特性。脂質之經改變特性可為比自生長於自營性生長條件中之光合細胞的脂質特性更需要之燃料或燃料前驅體。

光合細胞可為海藻細胞。在一實施例中，海藻細胞為綠藻細胞。在另一實施例中，綠藻細胞為來自綠球藻屬 (*Chlorella*) 物種之細胞。

在本發明之一態樣中，提供使海藻細胞成熟之方法，其包含將海藻細胞自第一生長條件移至第二生長條件，其中該第一生長條件包含無有機碳來源之生長介質，且其中該

第二生長條件包含含有有機碳來源之生長介質。

在一實施例中，移動海藻細胞另外包含：a)自第一條件移除該等海藻細胞；及b)將該等海藻細胞轉移至第二條件。

在另一實施例中，第二條件類似於該添加有機碳來源之第一條件。

在一實施例中，使光合細胞成熟之方法可另外包含使該海藻細胞之脂質成熟。

以引用的方式併入

在本說明書中提及之所有公開案及專利申請案均以引用的方式併入本文中，該引用程度就如同已特定地及個別地將各個公開案或專利申請案以引用的方式併入一般。

【實施方式】

儘管在本文中已展示且描述本發明之實施例，但對於熟習此項技術者將顯而易見的係僅藉助於實例提供此等實施例。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將進行眾多變化、改變及取代。應瞭解可將本文所述之本發明實施例之各種替代用於實踐本發明。

本文描述藉由將培養基由自營性轉移至異營性或混合營養條件來改變細胞之大分子組成的方法及系統。對於可生長於自營性、異營性及混合營養條件之至少兩者中的任何光合生物體而言，該等方法均可適用。在一實施例中，光合生物體為海藻物種。

在一態樣中，本文所揭示之方法及系統可增加脂質在光

合細胞中之比例。在一實施例中，該等方法及系統進一步包含改良彼等脂質之特性以使其對於使用包括燃料之生物質油而言更佳。

可將自營性生物定義為自簡單無機分子及諸如光或無機化合物之化學反應的外部能源產生複雜有機化合物之生物體。光合生物體自日光獲得能量且經常被稱為光養生物(或光自營性生物)。可將光合生物體之自營性生長定義為僅使用日光作為能源將無機碳(諸如 CO_2)轉化為有機化合物(諸如烴)之生物生長。一般而言，為使諸如海藻物種之光自營性生物體生長，生長機制需要介質中之鹽(諸如，硝酸鹽、磷酸鹽及少量金屬)，及二氧化碳或溶解性無機碳作為碳源。

可將異營性生物定義為需要有機基質作為碳源以供生長及發育之生物體。可將異營性生長定義為使用有機分子作為能源之生物生長。此等有機分子可源自植物或動物細胞或可採用糖或澱粉之形式。在一實施例中，海藻異營性生長使用葡萄糖作為能源。在一些實施例中，異營性生長介質可類似於添加有約5%葡萄糖之自營性生長介質。在許多情況下，生長於異營性條件中之細胞在無光下生長。因為異營性細胞將糖用作能源，所以與將二氧化碳用作主要碳源之自營性細胞相反，通常將自糖分解產生之碳產物用作主要碳源。

可將混合營養生物描述為能夠自光合作用及自外部能源(經常同時)取得代謝能量之生物體(通常為海藻或細菌)。

此等生物體可將光用作能源，或可吸收有機或無機化合物。其可滲透式(藉由滲透營養(osmotrophy))或藉由吞沒粒子(藉由吞噬作用或胞吞作用(myzocytosis))來吸收簡單化合物。混合營養生長可包括為生物體之生物生長提供光能來源及有機碳來源。

本發明係關於可在自營性、異營性或混合營養條件之至少兩者下生長之生物體。在一實施例中，生物體為綠藻物種。可在自營性、異營性或混合營養條件之至少兩者下生長之物種的其他實例包括(但不限於)海藻(例如，綠藻及紅藻)、維管植物(例如，煙草、芥菜屬(*Arabidopsis*)、蕨類植物)及原核藍藻細菌。在一實施例中，已將細胞或生物體遺傳修飾。舉例而言，生物體可為已經遺傳修飾為光合性之生物體、已經修飾以混合營養或異營性生長之生物體或已經修飾以產生或改變並非由該生物體天然產生之物質的生物體。

如本文中所用之光合生物體或生物質包括所有能夠光合生長之生物體，諸如能夠在液相中生長之呈單細胞或多細胞形式的植物細胞及微生物。此等術語亦可包括藉由自然選擇、選擇育種、引導進化、合成組裝或遺傳操作修飾之生物體。儘管本文所揭示之申請案尤其適用於培養海藻，但熟習此項技術者可認識到可利用其他光合生物體作為海藻之替代或除海藻外可利用其他光合生物體。

一般而言，因為所有能量均源自太陽，所以當使可在自營性、異營性或混合營養條件之至少兩者下生長之大量生

物體生長時，使生物體在純自營性條件下生長可為能量最有效之方法及成本最有效之生長方法。然而，在自營性條件下，大多數植物一般僅含有呈總細胞質量之百分比形式的中等比例之脂質。相反地，異營性生長提供影響在生物體細胞中產生之脂質的量及特性之不同脂質概況。在一些環境中，此等優勢可足以抵消異營性生長所必需之供應碳源的附加成本。脂質數量及特性在生物燃料製造中尤為重要。

綠球藻屬為當在自營性條件下生長時與異營性條件相比含有不同脂質概況的光合物種之一實例。如一般技術者將瞭解，此實例意欲為說明性的且不必要限於綠球藻屬或海藻，或甚至任何一個屬或類型之海藻。舉例而言，生長於自營性條件中之綠球藻屬細胞含有總細胞質量之約14%脂質，而異營性生長細胞含有總細胞質量之約55%脂質，在異營性生長條件中增加約四倍("High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*" Miao 及 Wu, *Journal of Biotechnology*, 2004, 110: 85-93)。

亦已知在本文中視為脂質概況之脂質物理特徵及相對量在自營性及異營性生長下不同。在許多方面，較之來自自營性生長細胞之脂質，來自異營性生長細胞之脂質更緊密近似於石油基柴油燃料之脂質。將幾個非限制性實例列於表1中。

表 1

特性	自營性生長之 綠球藻屬	異營性生長之 綠球藻屬	石油衍生之 柴油燃料
密度	1.06公斤/公升	0.92公斤/公升	0.75-1.0公斤/公升
黏度	0.10 Pa-s	0.02 Pa-s	2-1000 Pa-s
熱值	30 MJ/kg	41 MJ/kg	42 MJ/kg
氧含量	較高	較低	較低

基於所產生脂質之量及特性，先前技術已提出培養海藻以製造生物燃料之最佳方法為異營性生長。

本文中之方法及系統利用自營性生長(捕獲太陽能且將二氧化碳抽出大氣)及異營性生長(產生更需要之脂質量及特性)之優勢。組合兩種技術並不簡單地意謂使細胞混合營養式生長(在具有糖之日光中)。諸如海藻之光合生物體當得到在混合營養生長中之選擇時，通常選擇將糖用作碳源及能源。本發明提供依次利用自營性生長及異營性生長來獲得如圖 1 中所示之兩種生長方法之優勢的方法及系統。

在本發明之一態樣中，方法包含使光合細胞在捕獲太陽能及大氣二氧化碳之自營性條件中生長。接著將使細胞經受"脂質成熟期"，其中添加有機碳之來源。此第二步驟可在無任何可得日光之情況下(異營性條件)或在日光存在下(混合營養條件)進行。

細胞可在自營性條件下在透明生長腔室中首先生長至稠對數期，且可接著將其抽吸至無可得日光之暗室中。接著可以約 5% 之濃度將糖(或其他有機糖或碳水化合物分子，

諸如玉米或稻米糖粉，或衍生自海藻生物質之碳水化合物)抽吸至腔室中，從而誘導細胞異營性生長。當實踐本發明方法時，異營性生長在僅有限數目之細胞分裂後可引起脂質組成改變。在一實施例中，最終結果為已自太陽取得大部分能量、已自大氣獲得大部分碳且含有最適於生物柴油製造及使用之脂質的稠培養物。

藉由使海藻在自營性條件中連續生長，所有產生之細胞能量均源自無機碳，使得該方法極其節約能量及成本。然而，細胞之所得脂質含量以總百分比計可較低且以特定所需脂質之形式係較低的。異營性介質中之生長可增大所產生脂質之總百分比且改變脂質之比率以有利於彼等所需形式。然而，異營性介質中之生長需要糖輸入，從而增加此等脂質產物之製造成本。在本發明之方法中，可將上文兩種生長條件串聯組合，使得首先生長於自營性條件中以最優化輸入效率，且接著剛好在脂質萃取之前暫時轉移至異營性條件以最優化總脂質產率及所需脂質含量。

另外，本發明之方法可對其他大分子之組成具有所需影響。舉例而言，細胞可產生更多可適用作商業產品之複雜糖分子。此係在本發明之範疇內且可視為本發明之實踐。

在本發明之一態樣中，提供用於使光合生物體在光存在下生長且接著改變生長條件以向生物體提供有機碳來源之系統。在一實施例中，可將光生物反應器(PBR)系統用以改變生物體之生長條件。光合生物體可生長於任何合適生長系統中，包括(但不限於)開放池塘、經覆蓋之池塘、光

生物反應器、生物反應器、皮氏培養皿(Petri dish)、錐形瓶或其他類似容器，及海洋。

在一實施例中，光合生物體可在對生長系統利用外部或內部光源之自營性條件下生長。在特定時間段之後，可添加有機碳來源，由此開始異營性生長及脂質成熟期。在一實施例中，當將有機碳來源添加至PBR中時，仍向生物體提供光能，其產生混合營養生長條件。或者，可自系統消除光能，產生異營性生長條件。

在一替代性實施例中，使光合生物體在自營性條件下在系統中生長特定時間段，且接著將該生物體轉移至向生物體提供有機碳來源之第二系統中。可使生物體異營性生長於第二系統中且開始脂質成熟期。在一實施例中，仍向生物體提供光能，藉此產生混合營養生長條件。或者，可自系統消除光能，產生異營性生長條件。

在另一實施例中，使光合生物體生長於複數個在自營性條件下之池塘、腔室、PBR中，且在特定時間之後，接著將生物體轉移至提供異營性或混合營養生長條件之第二生物反應器中。圖2說明本發明之例示性系統200。在該實例中，使海藻生長於複數個在自營性條件下之模組PBR 201中。可將自營性生長之海藻轉移至為生物體提供異營性生長條件之單一較大腔室202中。可以連續、半連續或連續方式進行將海藻向脂質成熟腔室202之轉移。在另一段時間之後，可自脂質成熟腔室202收集海藻且可將脂質210收集且用於各種製程，該等製程包括製造生物柴油或其他商

業上適用產品。

可排列複數個諸如池塘或光生物反應器之自營性腔室以形成用於光合生物質之生長及製造的系統。如將對熟習此項技術者顯而易見，在一些實施例中，光生物反應器系統可包含複數個平行、串聯或呈平行與串聯組態之組合而互連之相同或類似光生物反應器中之一者。舉例而言，此可增大系統(例如，對於多個光生物反應器之平行組態而言)之生產量。亦可將該複數個自營性腔室與提供異營性或混合營養生長條件以改良生物質之脂質含量及/或特性的複數個脂質成熟腔室或單一脂質成熟腔室耦接。在一實施例中，不將生物質轉移至第二生物反應器中，而將有機碳來源添加至該複數個PBR中以產生混合營養生長條件。PBR亦可經覆蓋且不具備光能以為光合生物質製造異營性生長條件。在本文中提供之本發明光生物反應器裝置之所有此等組態及排列均在本發明之範疇內。

本發明之系統之各單元可獨立操作。該等單元可為模組且必要時其可易於調換。舉例而言，若一個單元收到另一海藻物種或其他生物體污染，則其可調換為不同單元。

儘管本發明之系統可意欲為模組及自含的，但可將收集製程、介質再循環、水儲存、動力產生及其他製程集中且分配至個別單元。可以網路形式連接獨立單元，因此可中樞協調介質之分散及生物質產物之收集。

在一些實施例中，將控制系統及方法用於系統操作中，將其組態為能夠自動即時地最佳化及/或調節操作及生長

參數以達成由自營性向異營性(或混合營養)生長條件之轉移。在又一態樣中，本發明包括針對光合生物體將隨後在利用本發明之系統期間所暴露之特定環境及/或操作條件來預選、改適及調節光合生物體之一或多個物種的方法及系統。

實例 1

本發明之一態樣包括在由自營性轉移至異營性生長後產生比自純異營性(HT)或自營性(AT)生長所得之所需產物更大量的"所需產物"(適用能量，或 $E_{\text{適用}}$)。

因此，本發明之成功實踐將產生 $\Delta E_{\text{適用}}(\text{AT} \rightarrow \text{HT}) > \Delta E_{\text{適用}}(\text{HT} \rightarrow \text{HT})$ ，如圖3中之實例。在圖3中，將限量之異營性介質(X g糖)用於HT生長，產生15個任意單位(AU)之 $E_{\text{適用}}$ 。此歷經比較期產生比僅AT情況更多之總生長，及更大比例之適用產物。然而，隨著HT轉移，X g糖燃料生長至150 AU，以及細胞之大分子組成自15% $E_{\text{適用}}$ 轉移至27% $E_{\text{適用}}$ 。預期結果為在利用自AT轉移至HT生長的本發明方法之情況下產生25 AU之 $E_{\text{適用}}$ 。因此，本發明之方法情況所用之糖量產生比僅HT情況更大量之 $E_{\text{適用}}$ 。

當在以下情形時，出現此情況且可實踐本發明方法：異營性生長介質不僅驅動新穎適用產物之合成，而且驅動以下情況中之一者或兩者：a)與單獨之HT生長相比，適用產物之不成比例合成，及b)不適用產物向適用產物之轉化。可假設在異營性生長環境中，資源豐富，其將細胞向富能量產物之儲存驅動，萬一稍後需要其。同時，在異營性生

長下，細胞並不需要繼續產生不再需要之光合蛋白質，亦預期遠離蛋白質且向能量密集儲存產物之轉移。

實例2

如何在實驗環境中定義/量測 $E_{\text{適用}}$ ？

可如上所述以實驗方式測試異營性轉移之益處。重要的在於需要定義 $E_{\text{適用}}$ 之量且開發量測其之檢定。

在一實施例中， $E_{\text{適用}}$ 可定義為脂質在培養物中之總量。此可以多種方法得以檢定，包括：

$$E_{\text{適用}} = (\# \text{細胞}) * (\% \text{脂質} / \text{細胞})$$

其中%脂質係由在顯微鏡下觀測之脂質小泡的數目及尺寸來檢定，或

$$E_{\text{適用}} = (\# \text{細胞}) * (\% \text{脂質} / \text{細胞})$$

其中%脂質係藉由染色(例如，使用NILE紅)來檢定且藉由在顯微鏡下觀測或使用分光光度計以量測染色來定量。

在一替代性實施例中， $E_{\text{適用}}$ 可定義為在培養物中脂質(例如最適用於燃料之脂質，諸如飽和脂肪酸)之子集。此可以如下多種方法來檢定，包括：

$$E_{\text{適用}} = (\text{植物物質之毫克數}) * (\text{每毫克不飽和脂肪酸之量})$$

其中飽和脂肪酸之量係由質譜分析來定量，或

$$E_{\text{適用}} = (\text{植物物質之毫克數}) * (\text{每毫克不飽和脂肪酸之量})$$

其中飽和脂肪酸之量係藉由矽酸管柱經由差分溶離，接著藉由Si凝膠薄層層析，根據Tornabene之方法(Tornabene等人，1982，如在NREL第29頁中參考)來定量。

脂質之子集可藉由在實際應用中對其測試來定義為適用

的，諸如藉由獲得脂質產物之生物柴油認證來檢驗脂質含量對於機械引擎中之生物柴油用途而言係經優化的。

【圖式簡單說明】

將藉由參考闡述說明性實施例(其中利用本發明之原理)之以下實施方式，及隨附圖式來獲得對本發明之特徵及優勢的更好理解，其中：

圖1說明依次利用自營性生長及異營性生長來獲得兩個生長方法之優勢的方法及系統。

圖2說明本發明之例示性系統，其中使海藻生長於複數個在自營性條件下之模組PBR中且可將其轉移至為生物體提供異營性生長條件之單一較大腔室中。

圖3說明用於異營性生長，從而產生15個任意單位之適用能量的界定量之異營性介質。

【主要元件符號說明】

200	本發明之例示性系統
201	模組PBR
202	單一較大腔室/脂質成熟腔室
210	脂質

五、中文發明摘要：

本發明描述在自營性及異營性生長條件下培養光合細胞之方法及系統。在不同生長條件下，光合細胞可產生不同量及特徵之脂質。本文中之方法及系統利用變化之生長條件來改變光合細胞之大分子含量。

六、英文發明摘要：

Methods and systems of cultivating photosynthetic cells under autotrophic and heterotrophic growth conditions are described herein. Under different growing conditions, photosynthetic cells may produce different quantities and characteristics of lipids. The methods and systems herein utilize changing growth conditions to alter the macromolecular content of a photosynthetic cell.

十、申請專利範圍：

1. 一種改變光合細胞之大分子含量的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變該光合細胞之大分子含量。
2. 一種改變在光合細胞中脂質之量的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變在該光合細胞中脂質之量。
3. 如請求項2之方法，其中在該光合細胞中的脂質之量增加。
4. 一種改變在光合細胞中脂質之特性的方法，其包含利用由自營性向異營性或混合營養生長條件之轉移，藉此改變在光合細胞中脂質之特性。
5. 如請求項4之方法，其中脂質之該經改變之特性可為比自生長於自營性生長條件中之光合細胞的脂質特性更需要之燃料或燃料前驅體。
6. 如請求項1、2或4之方法，其中該光合細胞為海藻細胞。
7. 如請求項6之方法，其中該海藻細胞為綠藻細胞。
8. 如請求項6之方法，其中該海藻細胞為來自綠球藻屬(Chlorella)之物種的細胞。
9. 一種使海藻細胞成熟之方法，其包含將海藻細胞自第一生長條件移至第二生長條件，其中該第一生長條件包含無有機碳來源之生長介質，且其中該第二生長條件包含含有有機碳來源之生長介質。

10. 如請求項9之方法，其中該等移動海藻細胞進一步包含：
a)自該第一條件移除該等海藻細胞；及
b)將該等海藻細胞轉移至該第二條件中。
11. 如請求項9之方法，其中該第二條件類似於添加有機碳來源之該第一條件。
12. 如請求項9之方法，其進一步包含使該海藻細胞之脂質成熟。

十一、圖式：

<p><u>異營性轉移</u></p>	
<p>植物細胞（自營性條件）→</p>	<p>植物細胞（異營性或混合營養條件）</p>
<p>生長</p>	<p>成熟</p>
<p>優勢：能量效率</p>	<p>優勢：脂質數量及品質</p>

圖1

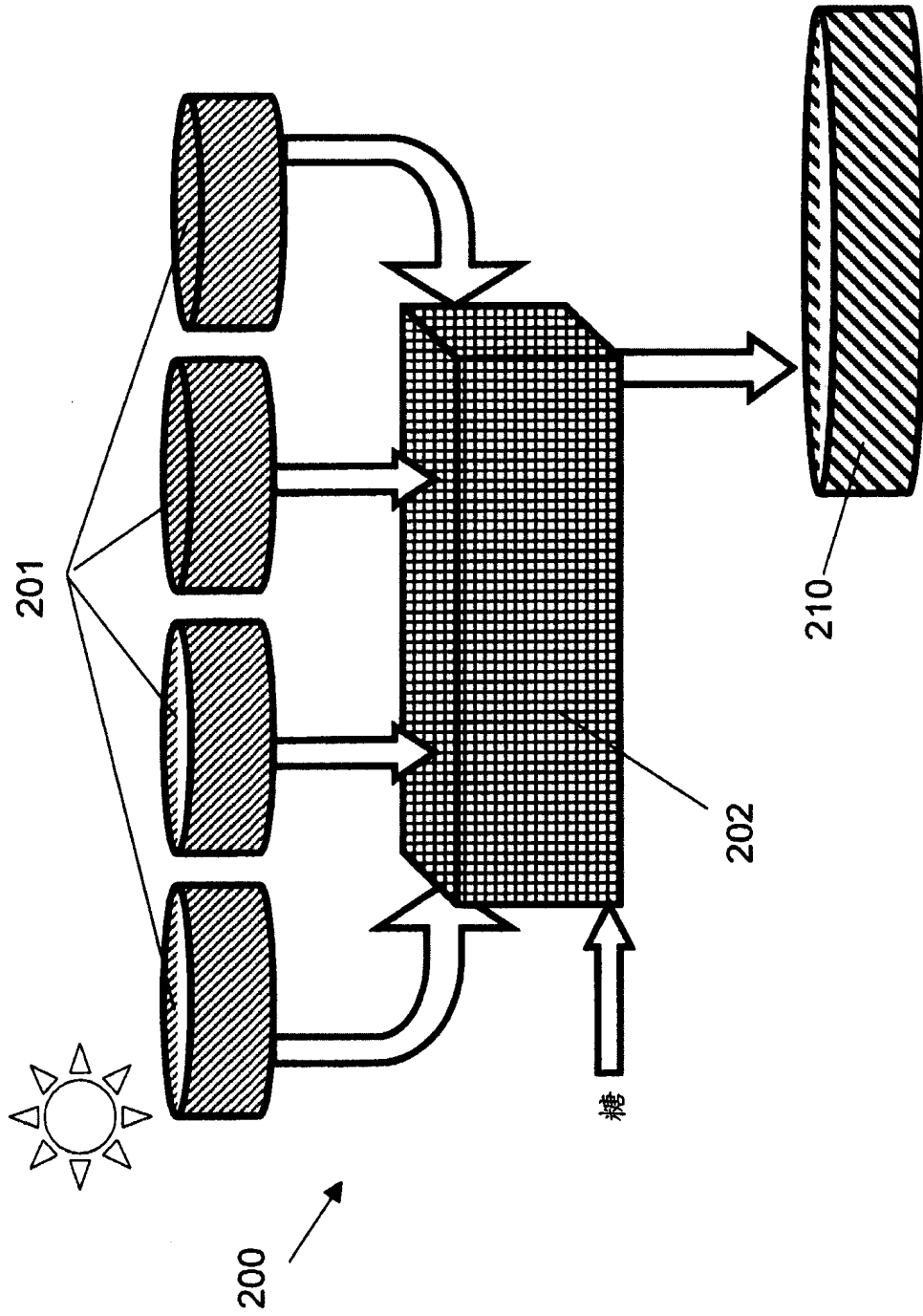


圖2

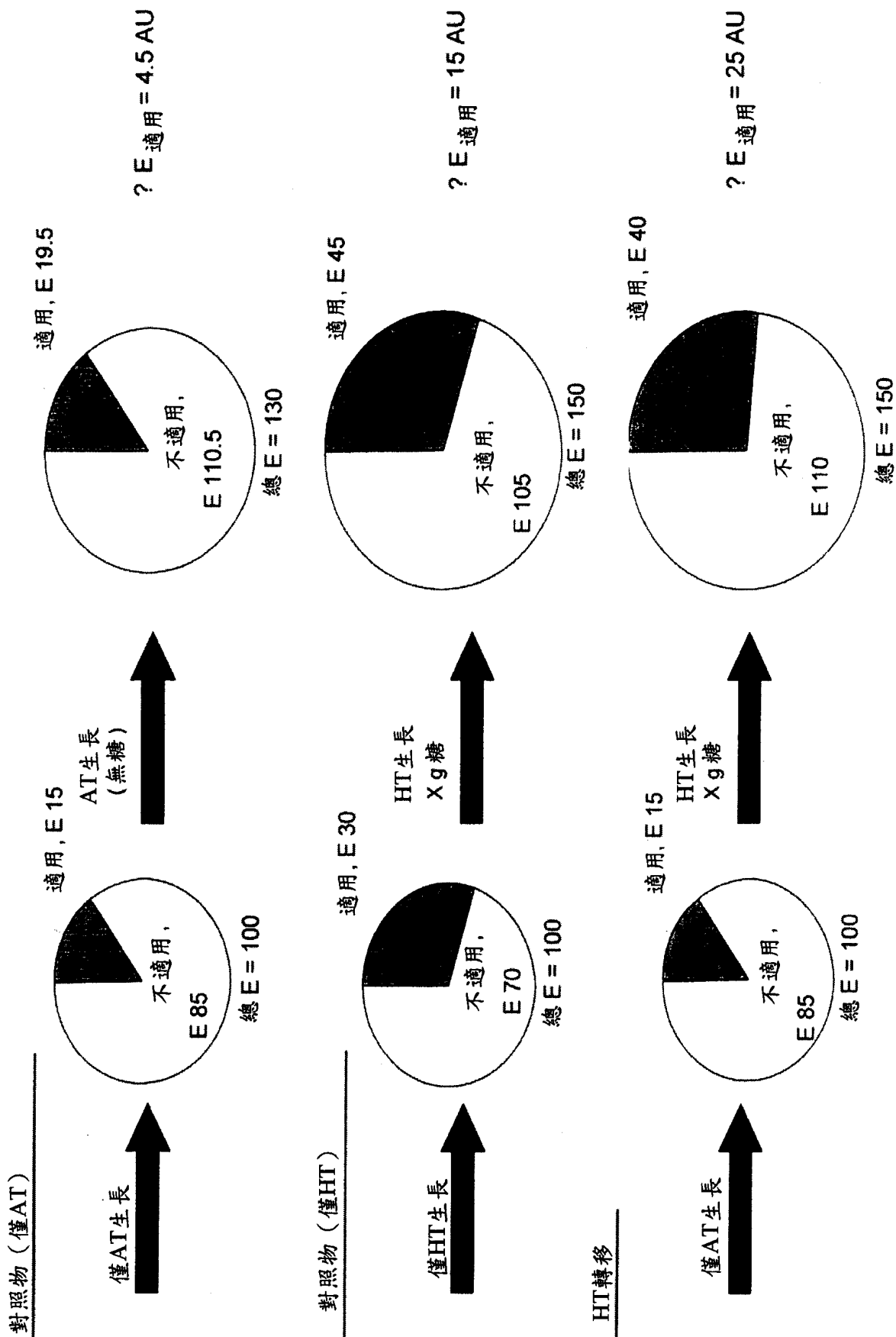


圖3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)