(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2009 年 12 月 3 日 (03.12.2009)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2009/143680 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 7/64 (2006.01) *C10G 3/00* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
C11C 3/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2008/072287

(22) 国际申请日: 2008 年 9 月 8 日 (08.09.2008)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200810112998.9 2008 年 5 月 27 日 (27.05.2008) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **清华大学 (Tsinghua University)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **吴庆余 (WU, Qing-Yu)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学生物科学与技术系, Beijing 100084 (CN)。 **熊伟 (XIONG, Wei)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学生物科学与技术系, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: **北京林达刘知识产权代理事务所 (LINDA LIU & PARTNERS)**; 中国北京市海淀区清华大学学研大厦 B 座 903 号, Beijing 100084 (CN)。

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

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

[见续页]

(54) **Title**: A METHOD FOR PRODUCING BIODIESEL BY TWO-STAGE CULTURE OF CHLORELLA FROM AUTOTROPHY TO HETEROTROPHY

(54) **发明名称**: 一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法

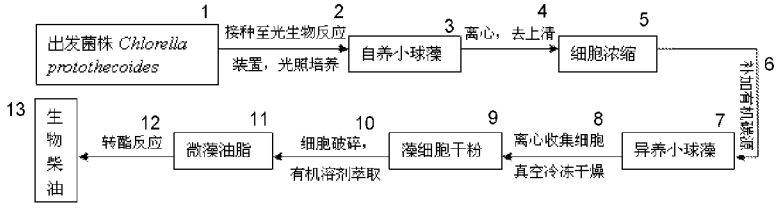


图 1 / Fig. 1

1 ORIGINAL STRAIN
2 INOCULATING TO PHOTO-BIOLOGICAL REACTION DEVICE, LIGHT CULTURING
3 AUTOTROPHIC CULTURING CHLORELLA
4 CENTRIFUGATING, REMOVING SUPERNATANT
5 CONCENTRATING CELLS
6 SUPPLEMENTING ORGANIC CARBON SOURCE
7 HETEROTROPHIC CULTURING CHLORELLA
8 COLLECTING CELLS BY CENTRIFUGATION, VACUUM FREEZE DRYING
9 CHLORELLA CELL DRY POWDER
10 DISRUPTING CELLS, ORGANIC SOLVENT EXTRACTION
11 MICROALGAL OIL
12 TRANSESTERIFICATION
13 BIODIESEL

(57) **Abstract**: Provided is a method for producing biodiesel by two-stage culture of chlorella from autotrophy to heterotrophy, which comprises the steps of: autotrophic culturing chlorella, concentrating cells, heterotrophic fermenting the concentrated chlorella, collecting and drying the chlorella cells, extracting the lipid from the dried chlorella cells and producing biodiesel by transesterification. The method can reduce carbon dioxide emission and organic carbon source consume, thus save the cost.

[见续页]

WO 2009/143680 A1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

提供了一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，包括自养培养小球藻，细胞浓缩，异养发酵浓缩后的小球藻，藻细胞收集和干燥，从干燥的藻细胞中提取油脂以及转酯化反应制备生物柴油的步骤。该方法可减少二氧化碳排放，降低有机碳源消耗，从而节省成本。

一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法

技术领域:

本发明属于可再生生物能源领域，特别涉及一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的新工艺。具体说来就是首先让小球藻细胞在光照条件下利用二氧化碳自养生长；经浓缩后，向体系中添加有机碳源（葡萄糖）供微藻异养生长，同时使油脂在微藻体内大量积累，从而为大规模制备生物柴油提供充足、廉价的原料。

背景技术:

生物柴油指的是动、植物或微生物油脂经酯化反应后得到的长链脂肪酸烷基单酯。由于具有清洁、可再生、对环境友好的特性，生物柴油已日益受到欧美及亚洲一些能耗大国的重视并获得了长足的发展。目前，欧美一些国家所生产的“第一代”生物柴油主要以大豆、油菜、棕榈等经济作物为主要原料。这种以传统农业为基础的生物能源生产方式不仅产量低而且与粮食作物争夺耕地、淡水、肥料等资源，不能满足生物柴油产业对原料油持续增长的需求。因此，为了缓解生物能源产业对农业造成的压力，在文献“Peer MS, Skye RT, Evan S, et al.2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. Bioenergy Research 1(1):20-43.”中报导，当前国际上一些大型能源公司及生产企业开始把精力转向利用非食用原料——微藻，开发“第二代”生物燃料。

微藻是一种能进行光合作用的微生物。它可以吸收空气中大量的CO_2，并合成脂肪，通过收集加工可提炼成生物柴油供汽车、火车作为动力燃料，进一步加工还可作为航空燃料，供飞机使用。由于微藻生物燃料优势明显（一是它能在咸水、污水中生长，不与农田及淡水相争；二是生产潜力惊人，繁殖速度比高等植物快40倍），它在应对全球气候变暖

和满足对非污染燃料的渴求方面都有着很大的潜力。但是，迄今为止，利用微藻生产生物柴油仍然存在许多迄待解决的问题，还无法满足商业化的要求。

目前，微藻的大规模培养主要有两条途径——自养培养和异养发酵，二者应用于生物柴油的制备各有优劣。自养培养可以固定温室气体二氧化碳并释放出氧气，对环境友好，但是由于微藻细胞间的互相遮蔽效应，光能的利用往往受到极大的限制。细胞浓度越高，这种遮蔽效应体现得越明显，严重影响细胞的生长和脂肪合成，这使在光生物反应装置中实现含油微藻的高密度培养变得十分困难。对于异养培养而言，细胞的生长主要依赖细胞对有机碳源的吸收，由于它不受光的限制，因此我们可以通过流加有机碳来实现高密度发酵和脂肪的高效合成。吴庆余课题组以一株既能自养又能异养生长的淡水绿藻*Chlorella protothecoides*为材料，率先开展了利用异养微藻来生产生物柴油的研究（参看文献: “Miao XL, Wu QY. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour Technol 97:841-846. ”、 “Xu H, Miao XL., Wu QY. 2006. High quality biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. J Biotechnol 126: 499-507. ”、 “ Li XF, Xu H, Wu QY，2007.Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoids* through heterotrophic cultivation in bioreactors. Biotechnology and Bioengineering. 98(4): 764-771.”、 “Xiong W，Li XF, Xiang JY，*et al.* 2008 High Density Fermentation of Microalga *Chlorella Protothecoides* in Bioreactor for Microbio-Diesel Production.78:29-36” ）。目前，通过建立合理的补料流加策略，异养小球藻的培养密度可达100g.L^{-1}，油脂含量超过50%。尽管异养培养具有生长速率快、培养周期短、培养过程易控制等优点，但利用异养微藻生产生物柴油的主要问题在于该方法依赖有机碳源（如葡萄糖、淀粉等）为原料，增加了生产成

本。

考虑到自养培养和异养发酵的各自优势与不足，我们设计了一套先自养后异养培养工艺生产生物柴油。流程如下：首先让小球藻利用无机碳源（CO_2），在光照自养条件下积累生物量；然后浓缩细胞；再补充有机碳源（葡萄糖），使小球藻细胞转而大量积累油脂。整个过程通过直接利用光能，提高了能量的利用效率，节省了有机碳源的使用，而且大量吸收了温室气体，对环境友好。另一方面，该工艺所采用的细胞浓缩技术有效地规避了高密度自养培养过程中光照受限的问题。再通过整合发酵技术，可以充分发挥微藻在异养生长时脂肪积累快速的优势，这对于生物柴油的产量提高和成本控制都具有重要价值。

发明内容:

本发明的目的在于开辟一条先自养后异养培养小球藻生产生物柴油的途径。在现有异养小球藻高密度发酵制备生物柴油的研究成果和专利技术的基础上，我们引入了光合自养培养、细胞浓缩、发酵污染控制等工艺，以满足微藻生物柴油大规模工业化应用的要求。本发明的关键在于创新设计并建立了一套先自养后异养培养小球藻技术和工艺，使小球藻细胞在低密度光照自养状态下快速生长积累生物量，经浓缩后转而在高密度异养状态下合成油脂。

本发明内容涉及的技术流程及方法步骤详细描述如下：

（1）光合自养培养小球藻

将淡水绿藻*Chlorella protothecoides*平板培养物接种至光生物反应装置，在自养培养基中光照培养；光生物反应装置包括通气瓶、光生物反应器和开放培养池；具体培养条件设置如下：温度控制在20-45℃的范围内，以30℃为最佳；甘氨酸初始浓度介于1-15 $g.L^{-1}$,优选5 $g.L^{-1}$；pH值控制在5-9之间，以6.5为佳；通入空气或空气、CO_2的混合气体，通气量50-300

L/h, 优选80-120L/h。培养过程中采用25-200μmol.$m^{-2}s^{-1}$的日光照射。总培养时间视细胞生长情况而定，一般介于50-400小时，优选120-200小时;

（2）细胞浓缩

细胞浓缩采用高速离心、絮凝沉降或过滤技术，以高速离心为例，在无菌条件下，离心力为2000~8000 g，4℃下离心2-5 min，离心后弃上清，保留自养细胞沉淀;

（3）异养发酵

在小球藻从自养向异养转化过程中，细胞生长特性和生化组分均发生了明显的改变，叶绿素含量降低，光合片层结构消失，细胞密度降低。通过添加有机碳源可以使大部分代谢流流向脂肪的合成途径，为此，异养条件下细胞高密度培养和脂肪的合成工艺设置如下:

将收集得到的自养细胞重新悬浮于含有机碳源的无菌培养基中，使细胞初始密度介于5-100g.L^{-1}之间，其中有机碳源为葡萄糖、果糖、玉米淀粉水解物、木薯淀粉水解物、小麦淀粉水解物或高粱汁等,初始还原糖浓度选定在0.01-100 g.L-1之间，优选23g.L-^{1}。

异养发酵可在不同容积的发酵设备中进行。发酵之前，组装好温度、pH、溶氧电极（已校正）和消泡电极，加入异养培养基并高压灭菌。发酵条件设定如下：发酵开始时，调整罐压、空气流量及转速使初始氧饱和度达到100％；温度15-45℃，优选29℃；通气速率100-300 L/h；补加酸碱溶液（KOH，H_2SO_4等）将发酵体系的pH值控制在5.0-9.0的范围之内；在发酵过程中，控制搅拌速率使氧饱和度始终维持在10%以上；当碳源耗尽溶氧（DO）水平陡然上升,这时开始补加有机碳源，维持发酵液中还原糖浓度在1-40g.L^{-1}的范围内波动。通过取样测定细胞密度和培养基中残留的还原糖浓度考察碳源消耗情况和细胞生长的状况，通过尼罗红染色及荧光测定技术监测细胞中中性脂肪的变化情况。当细胞密度超过100g.L^{-1}，油脂含量达到细胞干重的50%以上时，终止发酵。总发酵时间

介于50-300小时之间。

为了防止自养培养和细胞浓缩过程可能引起的杂菌污染，在发酵液中添加抑菌剂，抑制杂菌生长，抑菌剂为氯霉素或单氟乙酸钠（MFA），氯霉素终浓度介于0.002-0.2 $g.L^{-1}$，优选 0.01 $g.L^{-1}$，单氟乙酸钠终浓度介于0.1-100mM，优选2mM。

（4）藻细胞收集和干燥

采用固-液分离技术，从发酵液中收集藻细胞。该过程包括沉降、过滤、离心和干燥工艺；分离得到的藻细胞以固体形态（干粉）存放，干燥方式为冷冻干燥或喷雾干燥等。

（5）从干燥的藻细胞中提取油脂

从干燥的藻细胞中提取油脂的方法为高压溶剂萃取法或索式抽提法。采用索式抽提法时，以正己烷为标准萃取溶剂，从干藻粉中提取油脂，正己烷反复淋洗，直至细胞中不再残留脂肪，然后减压去除溶剂。

（6）酯化反应制备生物柴油

以藻细胞中提取的油脂制备生物柴油采用酯化反应完成。脂肪酸到脂肪酸酯的转化包括但不限于强酸催化（如浓硫酸）、脂肪酶催化等。催化生成的脂肪酸甲酯为生物柴油的主要成分。

上述自养培养基配方为：KH_2PO_4：0.2～0.7 $g.L^{-1}$，K_2HPO_4：0.1～0.4 $g.L^{-1}$，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：0.1～0.4 $g.L^{-1}$，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$：0.1～3 $mg.L^{-1}$，甘氨酸：0.1～15$g.L^{-1}$，维生素B1：0.001～0.1$mg.L^{-1}$，A5微量元素液 0.1～5$ml.L^{-1}$，其中A5微量元素液组成：H_3BO_3：2.86$g.L^{-1}$，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$：0.039 $g.L^{-1}$，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$：0.222 $g.L^{-1}$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$：1.81 $g.L^{-1}$，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$：0.074 $g.L^{-1}$。

异养培养基配方同上，但不添加甘氨酸，并加入有机碳源至初始还原糖浓度为0.01-100 $g.L^{-1}$；异养培养中，通过连续添加有机碳源控制还原糖浓度波动的范围在 1-30 $g.L^{-1}$。

本发明的有益效果在于本发明采用了先自养培养，再异养发酵的方式，将藻细胞的生长与脂肪的合成过程分别进行优化处理，并有机整合，所采用的细胞浓缩技术可以有效地规避高密度自养培养过程中光照受限的问题。本发明不仅保证了较高的光能转化效率，而且可获得较高的脂肪含量，最终得到的微藻细胞密度（单位产量）达到108g（干重）/L，细胞油脂含量大于50%。生产能力较单一的光合自养培养模式大幅度提高，而葡萄糖的消耗和二氧化碳的释放较异养发酵则显著降低。该工艺有效地控制了生物柴油的原料成本，满足了微藻生物柴油工业化应用的要求，是一条经济、高效地制备生物柴油原料油脂的新途径。

附图说明：

图1 从自养到异养两步法培养小球藻生产生物柴油的操作流程及步骤。

图2 在光生物反应装置中自养小球藻细胞的生长曲线。

图3 5L生物反应器中异养转化后微藻细胞的生长和葡萄糖消耗曲线。((●) 葡萄糖, (□)细胞干重)。

图4 荧光分光光度计测得的尼罗红染色细胞荧光强度的变化。(图4A为自养小球藻染色结果，图4B为异养转化后小球藻染色结果， 680nm处为叶绿素发射峰，570nm处为尼罗红发射峰)。

具体实施方式：

本发明提供一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法。它是在已有微藻异养发酵生产生物柴油的研究成果和专利技术的基础上，通过引入光照自养培养、细胞浓缩、发酵污染控制等工艺来进一步满足微藻生物柴油大规模工业化应用的要求。技术及方法与下面根据图1所示的本发明的流程步骤，列举实施例对本发明予以进一步说明。

实施例

含油藻株—淡水绿藻（原始小球藻）(*Cholorella protothecoides*)购自美国Texas大学藻种中心，自1990年起，清华大学生物科学与技术系微藻生物能源实验室长期培养该藻种用于生物能源的研究，其自养培养基配方如下：

KH_2PO_4：0.6 $g.L^{-1}$，K_2HPO_4：0.4 $g.L^{-1}$，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：0.4 $g.L^{-1}$，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$：1 $mg.L^{-1}$，甘氨酸：3$g.L^{-1}$，维生素B1：0.03 $mg.L^{-1}$，A5微量元素液 1.5$ml.L^{-1}$，其中A5微量元素液组成：H_3BO_3：2.86$g.L^{-1}$，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$：0.039 $g.L^{-1}$，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$：0.222 $g.L^{-1}$，$MnCl_2 \cdot 4H_2O$：1.81 $g.L^{-1}$，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$：0.074 $g.L^{-1}$。

通过步骤（1）中所描述的方法，将生长在固体培养基上的小球藻单菌落接种至1L通气瓶中，使细胞初始密度达到 0.1 $g.L^{-1}$，置通气培养瓶于25℃光照培养箱中培养，通入空气，通气量设为100L/h。培养液pH值控制在5-9之间。在自养培养过程中，考察了不同培养条件如氮源、光照强度等对小球藻细胞生长的影响。生长条件优化过程如下：分别采用含1、3、5、7、9 $g.L^{-1}$甘氨酸的自养培养基，在光照强度为25、50、100、200$\mu mol.m^{-2}s^{-1}$的条件下进行考察培养，优化结果显示，在上述培养温度、通气量条件下，甘氨酸浓度为5$g.L^{-1}$，光照强度100$\mu mol.m^{-2}s^{-1}$时，细胞生长最佳（如图2所示）。

当细胞进入对数生长末期后，停止通气，静置12小时，使细胞自然沉降，弃上清，残留培养基通过离心（3000g, 2min）去除，该过程采用无菌操作。

准备5L发酵罐（MINIFORS, 瑞士），组装好温度、pH、溶氧电极（已校正）和消泡电极，加入异养培养基，121℃灭菌30分钟。异养培养基成分如下：KH_2PO_4：0.6 $g.L^{-1}$，K_2HPO_4：0.4 $g.L^{-1}$，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：0.4 $g.L^{-1}$，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$：0.5 $mg.L^{-1}$，维生素B1：0.08 $mg.L^{-1}$，A_5微量元素

液 1.5 ml.L^{-1}，葡萄糖 23g.L^{-1}，为防止杂菌污染，向培养基中添加单氟乙酸钠（MFA）至终浓度为1mM。将收集得到的自养小球藻细胞重新悬浮，并转入发酵罐，使细胞初始密度达到20g.L^{-1}。

异养培养条件设定如下：温度29℃，通气速率150 L/h，通过补加酸或碱溶液（KOH，H_2SO_4等）调节pH值为6.2±0.2，在线监测发酵罐中的溶氧变化，一旦溶氧低于饱和度的10%以下时，通过逐步提高搅拌速率，使发酵液中的溶氧饱和度维持在10%以上；当碳源耗尽时溶氧（DO）水平陡然上升,这时开始添加葡萄糖，将作为还原糖的葡萄糖浓度控制在1-30 g.L^{-1}的范围内，通过在5L发酵罐中采用补料流加和过程控制的方式建立高密度培养策略：监控发酵罐中溶氧、葡萄糖、细胞浓度的变化，并同时采用尼罗红荧光检测技术检测藻细胞中的中性脂肪含量（具体检测步骤参见参考文献“Danielle E, David J, Barry R, *et al.* 2007.Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. Journal of Microbiological Methods, 68 (3): 639-642.”）。发酵过程中细胞密度通过定时测定光密度值（OD_{540nm}）来估算。OD_{540nm}与细胞干重的线性关系可以用以下公式表示：$y = 0.4155x, (R^2 = 0.9933, P < 0.05)$，其中y表示细胞密度（g.$L^{-1}$），x表示540 nm处光吸收密度值。发酵完成后，从发酵液离心收集细胞，并真空干燥。发酵液以8000g的速度离心2min，收集沉淀，真空干燥，称重，共得到108 g.L^{-1}的干藻粉（如图3所示）。

利用半自动的溶剂萃取装置－索式抽提器，以正己烷为标准萃取溶剂，从干藻粉中提取油脂。在索式抽提器中，用正己烷反复淋洗细胞，直至细胞中不再残留脂肪。异养藻油脂的分子量计算公式如下：

分子量（M）= 56.1×1000×3/(SV-AV)，式中SV（Saponification Value）代表微藻油脂的皂化值，AV（Acid Value）代表微藻油脂的酸值，计算得到的微藻油脂的分子量是无量纲数值。

经过溶剂减压旋转蒸馏后对索式抽提法获得的油脂干燥后进行称

重，以油脂净重除以细胞干重，得细胞干重的油脂含量为52％（w/w）。整个培养过程中总共消耗的葡萄糖为280 $g.L^{-1}$，得到油脂56.16$g.L^{-1}$(即108 $g.L^{-1}$×52%)，转化率达20.06％。根据我们以前的实验数据，采用异养高密度发酵时，糖油转化率大约在10－17%之间。这充分说明在同等条件下，采用两步法培养可有效降低有机碳源的消耗。

酯化反应由浓硫酸催化完成。取一定摩尔质量的藻油于烧瓶中，加入等量的浓硫酸作为催化剂，再加入甲醇溶剂，使醇油摩尔比达到30: 1，反应在55°C的恒温摇床中进行，转速160转/分，反应48h。反应结束后，混合反应体系分成上下两层，分离位于上层的生物柴油，并置于30℃的温水中淋洗，旋转蒸发，去除溶剂，得到纯净的生物柴油。

通过利用气相色谱-质谱连用技术可分析体系中甘油三酯、二酯、一酯、甲醇和甘油等的含量，据此可计算从油脂到脂肪酸甲酯的转化率。采用DSQ GC（Thermo, USA，VARIAN VF-5ms毛细管柱30M*0.25MM）气相色谱-质谱串联仪进行分析。流速设定为10 ml min^{-1}。升温程序：先升温到70 ℃，保持2 min；然后以10℃ min^{-1}的速度将温度上升到300℃，保持20 min。注射口温度250℃，分流比为30:1。在48小时的酯化反应过程中，90%以上的微藻油脂可转化为脂肪酸甲酯（生物柴油），柴油的主要成分与异养发酵得到的藻油成分一致（如图4所示）。

权利要求

1. 一种从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于该方法是以先自养后异养培养方式获得高含油量的微藻细胞为原料制备生物柴油，具体步骤包括：(1)小球藻的自养培养；（2）细胞浓缩；（3）异养发酵；（4）藻细胞收集和干燥；（5）从干燥的藻细胞中提取油脂；（6）酯化反应制备生物柴油。

2. 根据权利要求1所述从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于，所述步骤(1)的自养培养步骤为将淡水绿藻*Chlorella protothecoides*平板培养物接种至培养瓶、培养池或光生物反应装置中进行光照培养，温度控制在20-45℃的范围内；甘氨酸初始浓度1-15 $g.L^{-1}$；pH值控制在5-9之间；通气量50-300 L/h，培养过程中采用25-200$\mu mol.m^{-2}s^{-1}$的日光照射,使细胞生长达到最佳。

3. 根据权利要求1所述自养-异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于，所述步骤(2)的细胞浓缩方法为高速离心、絮凝沉降或过滤技术。

4. 根据权利要求1所述从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于，所述步骤(3)异养发酵的细胞初始密度控制在5-100 $g.L^{-1}$之间，温度15-45 ℃，通气速率控制在100-300L/h。通过补加酸或碱溶液，将pH值控制在5.0-9.0的范围之内；通过补加有机碳源维持发酵液中还原糖浓度在1-40 $g.L^{-1}$的范围内波动；控制搅拌速率使发酵液中的氧饱和度始终维持在10%以上；在发酵液中添加氯霉素或单氟乙酸钠，以防止自养培养和细胞浓缩过程可能引起的杂菌污染，氯霉素终浓度控制在0.002-0.2 $g.L^{-1}$，单氟乙酸钠终浓度控制在0.1-100mM。

5. 根据权利要求1所述从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于，所述的自养培养基成分为：KH_2PO_4：0.2～0.7 $g.L^{-1}$，

K_2HPO_4: 0.1 ~ 0.4 $g.L^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 ~ 0.4 $g.L^{-1}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.1 ~ 3 $mg.L^{-1}$, 甘氨酸: 0.1 ~ 15$g.L^{-1}$, 维生素B1: 0.001 ~ 0.1$mg.L^{-1}$, A5微量元素液 0.1 ~ 5$ml.L^{-1}$, 其中A5微量元素液组成: H_3BO_3: 2.86$g.L^{-1}$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 0.039 $g.L^{-1}$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.222 $g.L^{-1}$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 1.81 $g.L^{-1}$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0.074 $g.L^{-1}$;

异养培养基配方同上，但不添加甘氨酸，并加入有机碳源至初始还原糖浓度为0.01-100 $g.L^{-1}$; 异养培养中，通过连续添加有机碳源控制还原糖浓度波动的范围在 1-30 $g.L^{-1}$。

6. 根据权利要求5所述从自养到异养两步培养小球藻生产生物柴油的方法，其特征在于，所述异养培养基加入属于还原糖的有机碳源包括葡萄糖或其他单糖、二糖或多糖; 有机碳源来源包括葡萄糖、果糖、玉米淀粉水解物、木薯淀粉水解物、小麦淀粉水解物或高粱汁。

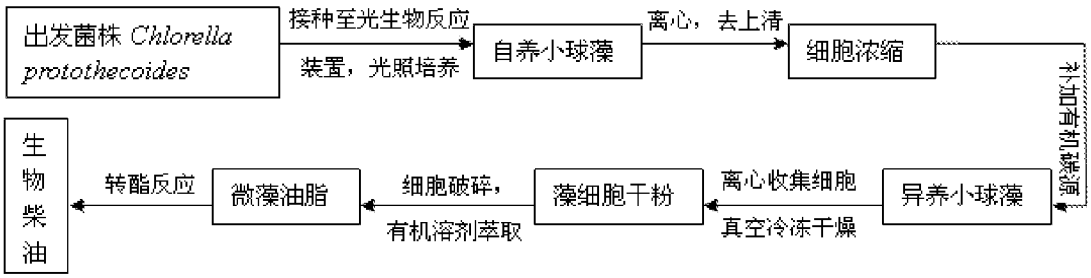

出发菌株 Chlorella protothecoides
接种至光生物反应
装置，光照培养
自养小球藻
离心，去上清
细胞浓缩
补加有机碳源
生物柴油
转酯反应
微藻油脂
细胞破碎，
有机溶剂萃取
藻细胞干粉
离心收集细胞
真空冷冻干燥
异养小球藻

图 1

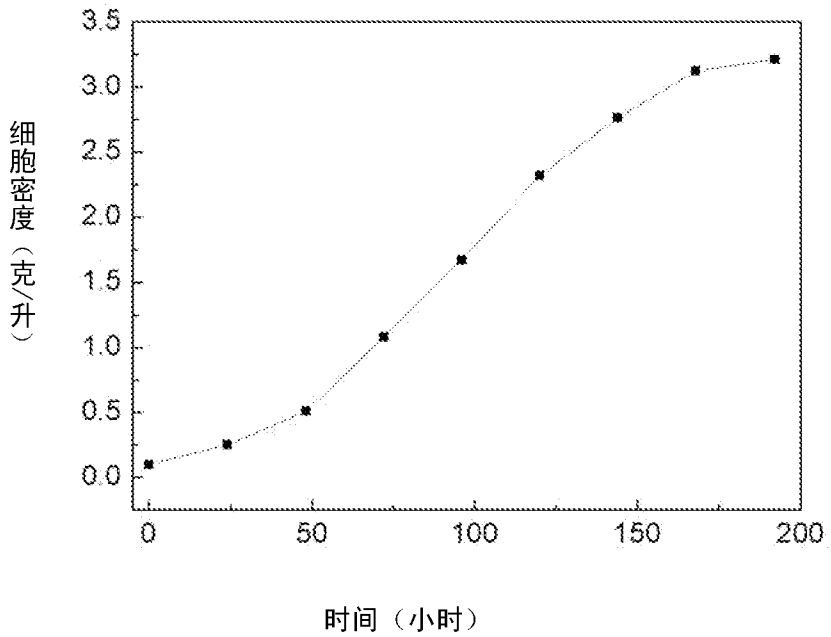

细胞密度（克/升）
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
50
100
150
200
时间（小时）

图 2

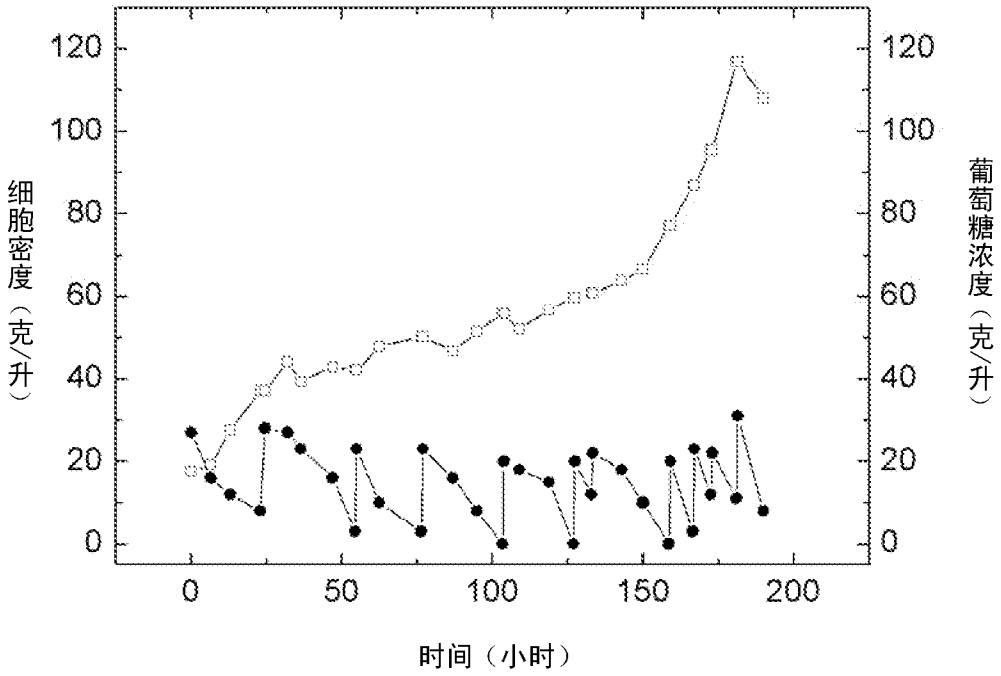


图 3

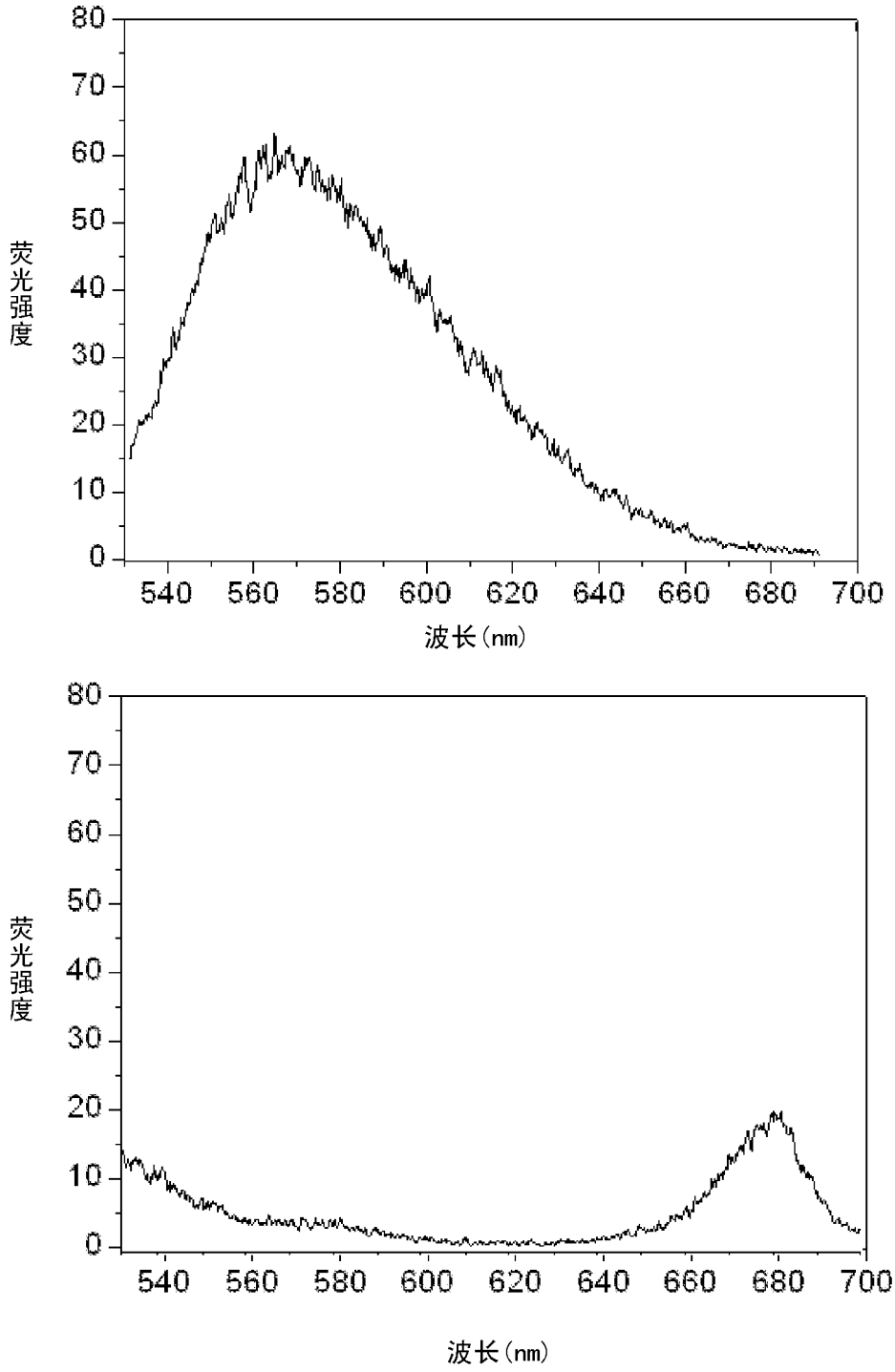

A
荧光强度
80
70
60
50
40
30
20
10
0
540
560
580
600
620
640
660
680
700
波长(nm)
B
荧光强度
80
70
60
50
40
30
20
10
0
540
560
580
600
620
640
660
680
700
波长(nm)

图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/072287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12P; C12N; C11C; C10G; C12R

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

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

CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; PAJ; CA and keywords: microalgae, algae, chlorella, biodiesel, biofuel, autotrophic, heterotrophic etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	MIAO, X. L. et al. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. April 2006, vol. 97, No. 6, pages 841-846, ISSN 0960-8524	
X	page 842, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 4	1, 3
Y	page 842, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 4	1, 3
A	the whole document	2, 4-6

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 Feb. 2009(12.02.2009)	**26 Feb. 2009 (26.02.2009)**
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer LIN, Junkai Telephone No. (86-10)62411095

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/072287

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	WU, Q. Y. et al. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. SCIENCE IN CHINA (Series B). March 1994, vol. 37, No. 3, pages 326-335, ISSN 1006-9291	
Y	page 327, paragraph 2 – page 328, paragraph 1	1, 3
A	the whole document	2, 4-6
	MIAO, X. L. et al. Study on preparation of biodiesel from microalgal oil. Acta Energiae Solaris Sinica. February 2007, vol. 28, No. 2, pages 219-222, ISSN 0254-0096	
Y	page 219, right column, paragraph 2 – page 220, left column, paragraph 2	1, 3
A	the whole document	2, 4-6
	WU, Q. Y. et al. A comparative study of gases generated from stimulant thermal degradation of autotrophic and heterotrophic Chlorella. Prog Nat Sci (in Chinese). 1992, vol. 2, No. 5, pages 435-440, ISSN 1002-008X	
A	the whole document	1-6
	CN 1699516 A (UNIV QINGHUA) 23 Nov. 2005(23.11.2005)	
Y	claim 1	1, 3
A	the whole document	2, 4-6
	CN 1837352 A (UNIV QINGHUA) 27 Sep. 2006(27.09.2006)	
A	the whole document	1-6
	WO 2008083352 A1 (GENIFUEL CORP) 10 Jul. 2008(10.07.2008)	
PY	claims 1-12	1，3
PA	the whole document	2，4-6
	US 20080160593 A1 (OYLER J R) 03 Jul. 2008(03.07.2008)	
PY	claims 1-12	1，3
PA	the whole document	2，4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2008/072287

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1699516 A	23.11.2005	None	
CN 1837352 A	27.09.2006	None	
WO 2008083352 A1	10.07.2008	US 2008155890 A1	03.07.2008
		WO 2008083351 A2	10.07.2008
US 20080160593 A1	03.07.2008	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/072287

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/64 (2006.01) i

C12N 1/12 (2006.01) i

C11C 3/10 (2006.01) i

C10G 3/00 (2006.01) i

C12R 1/89 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2008/072287

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC：C12P; C12N; C11C; C10G; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CPRS; CNKI 和关键词：小球藻，微藻，绿藻，生物柴油，生物燃料，自养，异养等；

WPI; EPODOC; PAJ; CA 和关键词：microalgae, algae, chlorella, biodiesel, biofuel, autotrophic, heterotrophic 等。

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
	MIAO, X. L. 等 Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology. 4 月 2006，第 97 卷，第 6 期，第 841-846 页，ISSN 0960-8524	
X	第 842 页左栏第 2 段-右栏第 4 段	1，3
Y	第 842 页左栏第 2 段-右栏第 4 段	1，3
A	全文	2，4-6
	WU, Q. Y. 等 New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. SCIENCE IN CHINA (Series B). 3 月 1994，第 37 卷，第 3 期，第 326-335 页，ISSN 1006-9291	
Y	第 327 页第 2 段-第 328 页第 1 段	1，3
A	全文	2，4-6

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
12.2 月 2009(12.02.2009)	**26.2 月 2009 (26.02.2009)**
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 **林峻凯** 电话号码：(86-10) **62411095**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
	缪晓玲等，微藻油脂制备生物柴油的研究，太阳能学报，2 月 2007，第 28 卷，第 2 期，第 219-222 页，ISSN 0254-0096	
Y	第 219 页右栏第 2 段-第 220 页左栏第 2 段	1，3
A	全文	2，4-6
	吴庆余等，自养与异养小球藻热模拟产气对比研究，自然科学进展，1992，第 2 卷，第 5 期，第 435-440 页，ISSN 1002-008X	
A	全文	1-6
	CN 1699516 A (清华大学) 23.11 月 2005(23.11.2005)	
Y	权利要求 1	1，3
A	全文	2，4-6
	CN 1837352 A (清华大学) 27.9 月 2006(27.09.2006)	
A	全文	1-6
	WO 2008083352 A1 (GENIFUEL CORP) 10.7 月 2008(10.07.2008)	
PY	权利要求 1-12	1，3
PA	全文	2，4-6
	US 20080160593 A1 (OYLER J R) 03.7 月 2008(03.07.2008)	
PY	权利要求 1-12	1，3
PA	全文	2，4-6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/072287

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1699516 A	23.11.2005	无	
CN 1837352 A	27.09.2006	无	
WO 2008083352 A1	10.07.2008	US 2008155890 A1	03.07.2008
		WO 2008083351 A2	10.07.2008
US 20080160593 A1	03.07.2008	无	

主题的分类

C12P 7/64 (2006.01) i

C12N 1/12 (2006.01) i

C11C 3/10 (2006.01) i

C10G 3/00 (2006.01) i

C12R 1/89 (2006.01) n