

(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



PCT



(10) 国际公布号

WO 2011/050578 A1

(43) 国际公布日
2011 年 5 月 5 日 (05.05.2011)

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/12 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/001715
- (22) 国际申请日: 2010 年 10 月 28 日 (28.10.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910207918.2 2009 年 10 月 29 日 (29.10.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **新奥科技发展有限公司 (ENN SCIENCE & TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国河北省廊坊市经济技术开发区华祥路新奥工业园区南区 B 座, Hebei 065001 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **韩春梅 (HAN, Chunmei)** [CN/CN]; 中国河北省廊坊市经济技术开发区华祥路新奥工业园区南区 B 座, Hebei 065001 (CN)。 **李静 (LI, Jing)** [CN/CN]; 中国河北省廊坊市经济技术开发区华祥路新奥工业园区南区 B 座, Hebei 065001 (CN)。 **张蕊 (ZHANG, Rui)** [CN/CN]; 中国河北省廊坊市经济技术开发区华祥路新奥工业园区南区 B 座, Hebei 065001 (CN)。 **刘敏胜 (LIU, Minsheng)** [CN/CN]; 中国河北省廊坊市经济技术开发区华祥路新奥工业园区南区 B 座, Hebei 065001 (CN)。
- (74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司 (CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市海淀区王庄路 1 号清华同方科技大厦 B 座 25 层, Beijing 100083 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:
- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
 - 包括经修改的权利要求(条约第 19 条(1))。

(54) Title: METHOD FOR CULTURE OF MICROALGAE AND PHOTOBIOREACTOR SYSTEM THEREOF

(54) 发明名称: 一种微藻培养方法及其光生物反应器系统

(57) Abstract: The invention provides a novel photobioreactor system for the culture of microalgae, and a method for the culture of microalgae by using the photobioreactor system. The invention employs different photobioreactors in different stages of microalgae culture. The design of photobioreactor of every stage takes into consideration the optimal culturing conditions of microalgae of the stage reasonably to achieve high density culture of microalgae and rapid accumulation of product, thus provides a novel process and apparatus for the large scale culture of microalgae.

(57) 摘要:

本发明提供一种培养微藻的新式的光生物反应器系统, 以及用所述光生物反应器系统培养微藻的方法。本发明在培养微藻的不同阶段采用不同的光生物反应器, 每一阶段反应器的设计都合理地考虑到了该阶段的微藻最佳培养条件, 以实现微藻的高密度培养和产品快速积累, 从而为微藻的规模化养殖提供新的工艺和装置。

WO 2011/050578 A1

一种微藻培养方法及其光生物反应器系统

技术领域

本发明涉及微藻养殖领域，具体而言，涉及一种用新型光生物反应器系统来培养
5 微藻的方法以及所述方法中使用的新型光生物反应器系统。

背景技术

在当前资源和环境面临双重危机的情况下，找到一种高效的可再生资源的同时实现CO₂减排就变得尤为重要。微藻是光合效率最高的原始植物之一，与农作物相比，
10 单位面积的产率可高出数十倍。且微藻富含大量蛋白质、多糖、色素等活性物质，可以广泛应用于饲料、食品、医药保健品、化妆品、可再生燃料等领域。进入21世纪以后，石油价格快速飙升，对微藻的研究迅速成为一个热点，微藻生物柴油技术也取得了长足的进步。在美国、澳洲、日本、西欧、印度和南非，无论是政府还是企业，都投入大量资金来进行产油微藻的开发。

15 在微藻的规模化培养中，传统方法有人工控制光照、温度、相对无菌条件等，但成本均较高。这些方法中采用较多的是控制光照。现有的光照控制技术，有的采用添加内置人工光源补光，但要求使用防水材料，成本较高；有的采用外置的单排或双排光照，但是占地面积大，且光照利用率偏低。这些限制因素大大降低了生物柴油的市场竞争力。

20 微藻高效培养首先要有一个高效的光生物反应器；其次，藻种要抗逆性较强、生长速率高、总脂含量高。符合上述条件的微藻藻种，主要有小球藻、硅藻、栅藻等。一般采用两步培养法：第一步，在指数培养期保证最佳的生长条件和营养条件，让其生物量快速累积；第二步，在指数末期和稳定期前期开始转化培养条件，从而在体内积累油脂或色素等物质。

25 与本发明最相近的实现方案为 CN200410017249.X，该发明选用的是多级气升式反应器，在第一级反应器中添加培养液，通过重力作用来转移藻液，并添加了一个人工光源，创造较佳条件，可以生产大量的对数生长期的高活性的藻种。但该发明的技术方案没有补光系统，因而很难保证一级反应器中的微藻快速生长，且反应器较多，反应器之间的液液输送繁琐，能耗较大。

发明内容

本发明针对微藻的规模化培养中，高密度培养和产品的快速累积一直制约规模化培养的问题，提供了一种新型的微藻光生物反应器系统及采用该反应器系统的培养工艺。本发明为微藻的规模化培养提供了新的工艺和装置。

5 一方面，本发明提供一种生产油脂的培养藻种的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 在一级反应器中将微藻生长保持在对数期，优选通过半连续培养将微藻生长保持在对数期；

(b) 将步骤(a)中收获的藻液在二级反应器中继续进行微藻的对数期和稳定期生长；

(c) 对步骤(b)中得到的藻液进行浓缩，然后在三级反应器中进行营养和/或环境胁迫诱导，以促进微藻中的油脂积累，优选所述营养胁迫是在缺氮的培养基中进行氮胁迫培养来进行的。

在一个实施方案中，一级反应器为柱式反应器、板式反应器或袋式反应器，其中中心位置为空心，空心处设置有人工光源。在一个实施方案中，二级反应器为空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器。在一个实施方案中，一级反应器和二级反应器呈同心圆分布，二级反应器内径大于一级反应器内径，优选在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源。在一个实施方案中，二级反应器和一级反应器的体积比为 8-6: 1。

在一个实施方案中，三级反应器为开放式反应器。在一个实施方案中，所述三级反应器为跑道形状的反应器（跑道池反应器）、板式反应器或袋式反应器。

20 在一个实施方案中，在一级反应器中进行半连续培养，每天补入按体积计 20-80% 的新鲜培养液，并收集按体积计 20-80% 的藻液，其中按体积计 20-80% 的量通过一级反应器中初始藻液和剩余藻液的高度差来实现。

在一个实施方案中，在一级反应器的培养过程中，同时通入 CO_2 ，调节 pH 值至适合微藻生长的范围，并补充生长所需的碳源。

25 在一个实施方案中，藻液在二级反应器中培养 3-5 天。

在一个实施方案中，藻液从一级反应器到二级反应器的转移是通过三通在重力的作用下进行的。

在一个实施方案中，转移藻液的量是通过初始藻液和剩余藻液的高度差来实现的。

在一个实施方案中，所述的藻硅藻门、绿藻门、金藻门和红藻门等多种藻，优选为小球藻、硅藻或栅藻。在一个实施方案中，所述藻选自牟氏角毛藻、三角褐指藻、

小球藻、雨生红球藻、拟微绿球藻、荒漠栅列藻等多种藻。

在一个实施方案中，其中所述人工光源在培养过程中连续打开，或根据接种的藻株和藻液的浓度差异选择部分或全部将人工光源关闭。在一个实施方案中，在一级反应器的接种初期，将人工光源全部关闭，单纯依靠自然光生长；在接种的 3-6 小时后，
5 部分打开人工光源；在接种 7-10 小时后，全部打开人工光源。

另一方面，本发明提供一种光生物反应器系统，如图 1 和图 3 所显示，所述光生物反应器系统包括一级反应器和二级反应器，其中一级反应器为柱式反应器、板式反应器或袋式反应器，其中心位置为空心，空心处设置有人工光源，二级反应器也为空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器，一级反应器和二级反应器呈同心圆分布，
10 一级反应器和二级反应器通过三通连接，其中二级反应器内径大于一级反应器外径，优选在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源以补充微藻生长所需要的光源。在一个实施方案中，所述光生物反应器系统还包括独立设置的三级反应器。在一个实施方案中，所述三级反应器为开放式反应器。在一个实施方案中，所述三级反应器为跑道形状的反应器（跑道池反应器）或者是板式反应器。在一个实
15 施方案中，所述一级反应器的内径为 50-70mm，外径为内径+（10-20mm），二级反应器的内径为一级反应器的外径+10mm，外径为二级反应器的内径+(50-100mm)。在一个实施方案中，二级反应器和一级反应器的体积比为 8-6:1。在一个实施方案中，人工光源、一级反应器和二级反应器之间的高度顺序为：人工光源>一级反应器>二级反应器，一级反应器和二级反应器的高度差异，可以避免光遮挡，最大限度地利用自然光
20 和人工光源。在一个实施方案中，所述一级反应器的中心位置设置有人工光源，所述人工光源为多个排列为圆束状的灯管。在一个实施方案中，其中所述人工光源可以根据微藻的细胞密度来调节光照强度。在一个实施方案中，所述人工光源在培养过程中连续打开或根据接种的藻株和藻液的浓度差异选择部分或全部将人工光源关闭。在一个实施方案中，在一级反应器的接种初期，将人工光源全部关闭，单纯依靠自然光生
25 长；在接种的 3-6 小时后，部分打开人工光源；在接种 7-10 小时后，全部打开人工光源，这样能达到人工光源的最有效地利用，同时也节约成本。在一个实施方案中，其中一级反应器采用易透光的玻璃材质，这样既可以清洗方便，又能够充分地透光，让二级反应器也接受部分人工光源，促进细胞生长。

30 该反应器的主要优势为：

(1) 一级反应器的中空处添加一独立的人工光源，该人工光源既能达到反应器内置光源的效果，防止中心处因光源衰减而造成光强不足，同时因为是独立放置，人工光源材料可选用一般材料，成本比使用防水材料的反应器内置光源低很多。

(2) 该人工光源可以根据藻细胞的浓度，调节光照强度。当藻细胞浓度很低，在接
5 种初期，可将人工光源全部或部分关闭。

(3) 一级反应器中，实行半连续培养，从而保证微藻始终处于对数生长期，生物量积累迅速。

(4) 一级反应器和二级反应器的高度差异，可以使光线得到最大限度地利用。既可以使一级反应器接受部分自然光，同时，一级反应器的人工光源也可以透过反应器
10 而照射到二级反应器中，从而促进二级反应器中的藻细胞生长。

(5) 藻液从一级反应器到二级反应器的转移是通过三通在重力的作用下进行的，操作简单方便，节省能耗。

具体而言，整个发明如图 4 所示，在一级反应器中实现半连续培养，每天补入按体积计 20-80% 的新鲜培养液，并收集按体积计 20-80% 的藻液，其中按体积计 20-80%
15 的量是通过一级反应器中初始藻液和剩余藻液的高度差来实现的，这样可以保证微藻一直处于对数生长期，生长速度在 1-3 倍/天。另外，在培养过程中，由于细胞生长较迅速，从而使 pH 值上升很快，在此同时通入 CO₂，调节 pH 值，以保持最佳生长 pH 环境，并补充生长所需的碳源。将收获的藻液加入到二级反应器中，以实现藻的对数期和稳定期的生长，培养 3-5 天，对藻液进行浓缩，然后补入缺氮的培养液，将其放
20 入三级反应器中，三级反应器可选择板式或跑道池等开放式反应器，本发明选用的是敞开式的跑道池反应器，这样受光面积大，可以最大限度地利用自然光，促进油脂的快速累积。

本发明与现有技术相比的优势

25

1. 本发明在三步法培养微藻的不同阶段采用不同的光生物反应器，每一阶段反应器的设计都合理地考虑到了该阶段的微藻最佳培养条件，以实现高密度培养和产品快速积累。
2. 本发明采用三步培养法，细胞生长和产品累积相结合。充分利用微藻在对数时期生长较快的优点，通过间歇式地补充营养液，创造连续的对数生长期，可以快速有效
30

实现生物量的积累。再次，在对数末期辅以氮胁迫，来保证产物地快速转化，减少了污染几率，且完全依靠自然光照等，经济可行。

3. 本发明采用一种新型的光生物反应器系统，可以实现藻种培育和微藻扩养相结合，操作简单。

5 4. 本发明，将补光系统圆束状排列，与反应器结构相似，可以最大限度地利用人工光源，且与普通的内置人工光源效果相近，但无需防水材料，大大地降低成本。

5. 在一级培养和二级培养之间，靠三通在重力作用下进行藻液转移，节约能耗，降低成本。

10 6. 选择硅藻类的牟氏角毛藻，其生长快、温度适用性广、细胞内油脂含量高，很适合用来制备液态燃料或油脂。

7. 本发明一级培养用半连续培养法，夜间补光，使细胞维持在对数生长期，藻种优良。

8. 本发明通过浓缩藻液和重新补加缺氮培养液相结合，既可以在产品转化期，保证细胞微生长，同时又能消耗掉残余的氮源，可以大大缩短转化时间，同时也降低了污染几率。

15

附图说明

图 1 为本发明的光生物反应器系统中的一级反应器（柱式反应器）和二级反应器（柱式反应器）：

1 为放置人工光源区，2 为一级反应器区，3 为二级反应器区。

20 图 2 为一级反应器中所使用的人工光源分布图。选的灯管为 T8，长度为 120cm，功率为 36 瓦，是培养微藻的专用灯管。将其多个排列为圆束状，可以使反应器最大限度地利用该人工光源。

图 3 为图 1 的平视图：

1 为一级反应器，2 为二级反应器，3 为人工光源区，4 为三通转移区。

25 从一级反应器到二级反应器，藻液的转移，是通过三通在重力的作用下进入到二级反应器的，转移体积是通过一级反应器初始藻液和剩余藻液的高度差来调节的，具体情况见图 3，在一级反应器中，首先将培养体系接种到高度 A 处，将培养藻液放出到刻度线 B 处时，即为 30%的量，同理，将培养藻液放出到刻度线 C 处时，即为 50%。

图 4 为用本发明的培养方法培养藻液的培养流程图。

30 图 5 为一级反应器半连续培养与传统培养的牟氏角毛藻的生长曲线对比图。

图 6: 用本发明方法培养与传统培养法得到的牟氏角毛藻的总脂含量对照图。

图 7: 为一级反应器半连续培养与传统培养的荒漠栅列藻的生长曲线比对图。

图 8: 跑道形状反应器的俯视图。

跑道形状反应器通过搅拌转子实现藻液流动。

5 图 9: 为根据本发明另一个实施方案的光生物反应器系统中的一级反应器（内侧，板式反应器）和二级反应器（外侧，柱式反应器）的俯视图：

其中 1 为藻液培养区、2 为补光区、3 为空隙补光区。

图 10: 为根据本发明另一个实施方案的光生物反应器系统中的一级反应器（内侧，板式反应器）和二级反应器（外侧，板式反应器）的俯视图：

10 其中 1 为藻液培养区、2 为补光区、3 为空隙补光区。

图 11: 为根据本发明另一个实施方案的光生物反应器系统中的一级反应器（内侧，柱式反应器）和二级反应器（外侧，柱式反应器）的俯视图：

其中 1 为藻液培养区、2 为补光区、3 为空隙补光区。

图 12: 为根据本发明另一个实施方案的光生物反应器系统中的一级反应器的改进。

15 在一级反应器上，安装上反光镜，可以根据太阳光的位置和光强，转动，从而起到聚光和给死角区加光的作用，示例排布如图 12，首先将太阳的照射角度输入计算机，然后设置转动角度，已保证最佳光照，这样可以最大限度地利用自然光源，其中 1 为支撑柱、2 为反光镜、3 为转动轴。

20 **具体实施方式**

实施例 1 三步培养法和氮胁迫在牟氏角毛藻培养中的应用

本发明所用的培养液配方：

改良的 f/2 培养液配方：

营养物质	浓度（mg/L）
NaNO ₃	37.5
尿素	15
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5.66
Na ₂ HPO ₄	5.15

FeCl ₃ .6H ₂ O	3.162
Na ₂ .EDTA	3.419
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.023
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.012
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.07
VB1	0.1
VB12	0.5×10^{-3}
生物素	0.5×10^{-3}
MgCl ₂ .7H ₂ O	7.5
海水晶（是一种常用模拟海水的物质，购自天津中盐海洋生物科学有限公司	30

缺氮培养液配方: NaH₂PO₄.2H₂O 5.66 mg/L, Na₂HPO₄ 5.15 mg/L, FeCl₃.6H₂O 3.162 mg/L, Na₂.EDTA 3.419 mg/L, 海水晶为 30 mg/L。

- 5 牟氏角毛藻 (*Chaetoceros mualleri*) (FACHB-862) 购自武汉中科院水生所。将所述牟氏角毛藻接入到一级反应器中，用改良的 f/2 培养液，接种对数生长期的藻液（接种的比率为 3:1），初始 OD₇₅₀ 为 0.512。在前 3 个小时，人工光源全部关闭，在 4-7 个小时，人工光源开启一半，剩余时间连续光照下培养，光照为本发明设计的灯束，连续光照，光强为 $126 \pm 10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，培养温度为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 。从一级反应器的底部通过曝气头通入空气和 CO₂ 的混合气体，通气量为 2.5L/min, CO₂ 的百分含量为 5%，连续培养
- 10 时间为 11 天。具体的生长情况见图 5。在一级反应器中，采用半连续培养，通过监测 750nm 下 OD 值，可以看出藻细胞的生物量可以每天倍增 1-3 倍，是传统培养（传统培养法，是指和对照组培养条件和一级反应器一致，只是培养方式采取传统的批次培养法，在一个反应器中进行完整的细胞的延滞期、对数期、稳定期和衰退期）的 2.133
- 15 倍。

藻细胞的浓度达到 750nm 吸光度为 1.0-1.5 时，将三通打开，在重力的作用下，按体积计 20-80% 的藻液流入二级反应器，然后在独立的潜水泵的作用下，将同体积的改

良的 f/2 培养液放进一级反应器中。

如上所述, 通过图 3 中的 4 三通, 在重力的作用下, 将一级反应器中的藻液, 接种到二级反应器中, 二级反应器的培养液依然为改良的 f/2, 光照为自然光和透过一级反应器通过的人工光源, 温度、通气量、CO₂ 含量同一级反应。在二级反应器培养 4 天后, 通过过滤浓缩, 培养液体积浓缩为原体积的 50%, 将得到的藻液全部放入跑道池反应器(即三级反应器)中, 并加入原体积 1/2 的缺氮培养基, 进行氮胁迫, 温度为 30±10℃, 光照为人工光源, 并通过螺旋桨进行搅拌, 从而实现快速累积。在三级反应器中, 牟氏角毛藻培养了 2 天后, 通过差重法测定总脂含量, 氮胁迫组总脂含量为 14.38% 比对照组 6.63% 增加 2.169 倍, 在三级反应器中培养 4 天, 氮胁迫组总脂含量达到 29.84%。具体结果见图 6。

差重法: 取一定体积的藻液, 5000r/min 离心 5min, 再用灭过菌的清水清洗 3 次, 经冷冻干燥后, 用珠磨机破壁 5min, 采用氯仿: 甲醇提取法得出各微藻中总脂含量。计算公式为:

$$X=(M_1-M_0)/M_2\times 100\%$$

其中 X:干藻粉中总脂的含量, %;

M₁:玻璃瓶和总脂的质量, g;

M₀:玻璃瓶的质量, g;

M₂:干藻粉的质量, g

20 实施例 2 三步培养法和氮胁迫在荒漠栅列藻培养中的应用

荒漠栅列藻 (*Scenedesmus deserticola*) 购自暨南大学。将所述荒漠栅列藻接入到一级反应器中, 用 BG11 培养基, 接种对数生长期的藻液(接种的比率为 5:1), 初始 OD₇₅₀ 为 0.583。在连续光照下培养, 光照为本发明设计的灯束, 光强为 126±10μmol/(m².s), 培养温度为 25±5℃。从一级反应器的底部通过曝气头通入空气和 CO₂ 的混合气体, 通气量为 2.5L/min, CO₂ 的百分含量为 5%, 连续培养时间为 10 天。具体的生长情况见图 7。在一级反应器中, 采用半连续培养, 通过监测 750nm 下 OD 值, 可以看出藻细胞的生物量可以每天倍增 1-3 倍, 是传统培养(传统培养法, 是指和对照组培养条件和一级反应器一致, 只是培养方式采取传统的批次培养法, 在一个反应器中进行完整的细胞的延滞期、对数期、稳定期和衰退期)的 1.754 倍。

藻细胞的浓度达到 750nm 吸光度为 1.0-2.0 时，将三通打开，在重力的作用下，将 50%的藻液流入二级反应器，然后在独立的潜水泵的作用下，将同体积的 BG11 培养液放进一级反应器中。

如上所述，通过图 3 中的 4 三通，在重力的作用下，将一级反应器中的藻液，接
 5 种到二级反应器中，二级反应器的培养液依然为 BG11，光照为自然光和透过一级反应器的人工光源，温度、通气量、CO₂ 含量同一级反应。在二级反应器培养 5 天后，通过过滤浓缩（培养液体积浓缩为原体积的 50%），将得到的藻液全部放入跑道池反应器（即三级反应器）中，并加入原体积 1/2 的缺氮 BG11 培养基，进行氮胁迫，温度为 30±10℃，光照为自然光，并通过螺旋桨进行搅拌，从而实现快速累积。在三级反应器
 10 中，荒漠栅列藻培养了 7 天后，通过差重法测定总脂含量，氮胁迫组总脂含量为 35.43% 比对照组 16.035%增加 2.21 倍。

BG11 培养基的配方如下表：

名称	浓度 (mg/L)
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄	39
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75mg
CaCl ₂	27mg
柠檬酸	6mg
柠檬酸铁	6mg
EDTA	1mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	58 mg
H ₃ BO ₃	2.86 mg
MnCl ₂	1.81 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.391 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 mg
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494 mg

权 利 要 求

1. 一种生产油脂的微藻培养方法，所述方法包括下列步骤：

5 (a) 在一级反应器中将微藻生长保持在对数期，优选通过半连续培养将微藻生长保持在对数期；

(b) 将步骤(a)中收获的藻液在二级反应器中继续进行微藻的对数期和稳定期生长；

(c) 对步骤(b)中得到的藻液进行浓缩，然后在三级反应器中进行营养和/或环境胁迫诱导，以促进微藻中的油脂积累，优选所述营养胁迫是在缺氮的培养基中进行氮胁迫培养来进行的。

10 2. 权利要求 1 的方法，其中所述一级反应器其中心位置为空心，空心处设置有人工光源，可包括所有形式的反应器，优选所述一级反应器为空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器等。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述二级反应器包括所有种类的反应器，优选空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器。

15 4. 权利要求 2 或 3 的方法，其中所述一级反应器和二级反应器呈同心圆分布，二级反应器内径大于一级反应器外径，优选在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源。

5. 权利要求 4 的方法，其中二级反应器和一级反应器的体积比为 8-6: 1。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述三级反应器为开放式反应器。

20 7. 权利要求 6 的方法，其中所述三级反应器为跑道形状（跑道池反应器）或者是板式反应器或是袋式反应器。

8. 权利要求 1 的方法，在一级反应器中进行半连续培养，每天补入按体积计 20-80% 的新鲜培养液，并将按体积计 20-80% 的藻液转移至所述二级反应器。

25 9. 权利要求 8 的方法，其中按体积计 20-80% 的量是通过一级反应器中初始藻液和剩余藻液的高度差来实现的。

10. 权利要求 1 或 8 的方法，其中在一级反应器的培养过程中，同时通入 CO_2 ，调节 pH 值至适合微藻生长的范围，并补充生长所需的碳源。

11. 权利要求 2 的方法，其中将藻液在二级反应器中培养 3-5 天。

30 12. 权利要求 1 或 5 的方法，其中藻液从一级反应器到二级反应器的转移是通过三通在重力的作用下进行的。

13. 权利要求 2 的方法, 其中所述人工光源在培养过程中连续打开, 或根据接种的藻株和藻液的浓度差异选择部分或全部将人工光源关闭。

14. 权利要求 1、2、3、5、6、7、8、9 或 11 的方法, 所述藻选自硅藻门、绿藻门、金藻门和红藻门等多种藻, 优选为小球藻、硅藻或栅藻。

5 15. 权利要求 14 的方法, 所述藻选自牟氏角毛藻、三角褐指藻、小球藻、雨生红球藻、拟微绿球藻、荒漠栅列藻等多种藻。

16. 一种用于权利要求 1-15 任一项的方法的光生物反应器系统, 包括一级反应器和二级反应器, 其特征在于: 一级反应器为柱式反应器、板式反应器或袋式反应器, 其中心位置为空心的, 空心处设置有人工光源, 二级反应器为空心的柱式反应器、板式
10 反应器或袋式反应器, 一级反应器和二级反应器呈同心圆分布, 一级反应器和二级反应器通过三通连接, 其中二级反应器内径大于一级反应器外径。

17. 权利要求 16 的光生物反应器系统, 还包括独立设置的三级反应器。

18. 权利要求 17 的光生物反应器系统, 其中所述三级反应器为跑道形状的三级反应器或者是板式反应器。

15 19. 权利要求 16-18 任一项的光生物反应器系统, 其中所述二级反应器和所述一级反应器的体积比为 8-6:1。

20. 权利要求 16-18 任一项的光生物反应器系统, 其中所述人工光源、一级反应器和二级反应器之间的高度顺序为: 人工光源>一级反应器>二级反应器。

20 21. 权利要求 16-18 任一项的光生物反应器系统, 所述人工光源为多个排列为圆束状的灯管。

22. 权利要求 21 的光生物反应器系统, 其中根据微藻的细胞密度来调节所述人工光源的光照强度。

23. 权利要求 16-18 任一项、或权利要求 22 的光生物反应器系统, 其中一级反应器、二级反应器和/或三级反应器采用易透光的玻璃材质。

25 24. 权利要求 16 的光生物反应器系统, 其中在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源以补充微藻生长所需要的光源。

经修改的权利要求
国际局收到日：2011年4月15日(15.04.2011)

权利要求

1. 一种生产油脂的微藻培养方法，所述方法包括下列步骤：
 - (a) 在一级反应器中将微藻生长保持在对数期；
 - 5 (b) 将步骤(a)中收获的藻液在二级反应器中继续进行微藻的对数期和稳定期生长；
 - (c) 对步骤(b)中得到的藻液进行浓缩，然后在三级反应器中进行营养和/或环境胁迫诱导，以促进微藻中的油脂积累。
2. 权利要求1的方法，其中在步骤(a)中通过半连续培养将微藻生长保持在对数期。
3. 权利要求1的方法，其中在步骤(c)中所述营养胁迫是在缺氮的培养基中进行氮
10 胁迫培养来进行的。
4. 权利要求1的方法，其中所述一级反应器其中心位置为空心，空心处设置有人工光源，可包括所有形式的反应器。
5. 权利要求4的方法，其中所述一级反应器为空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器。
- 15 6. 权利要求1的方法，其中所述二级反应器包括所有种类的反应器。
7. 权利要求6的方法，其中所述二级反应器包括空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器。
8. 权利要求4或6的方法，其中所述一级反应器和二级反应器呈同心圆分布，二级反应器内径大于一级反应器外径。
- 20 9. 权利要求8的方法，其中在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源。
10. 权利要求8的方法，其中二级反应器和一级反应器的体积比为 8-6: 1。
11. 权利要求1的方法，其中所述三级反应器为开放式反应器。
12. 权利要求11的方法，其中所述三级反应器为跑道形状（跑道池反应器）或者是板式反应器或是袋式反应器。
- 25 13. 权利要求1的方法，在一级反应器中进行半连续培养，每天补入按体积计 20-80%的新鲜培养液，并将按体积计 20-80%的藻液转移至所述二级反应器。
14. 权利要求13的方法，其中按体积计 20-80%的量是通过一级反应器中初始藻液和剩余藻液的高度差来实现的。
- 30 15. 权利要求1或13的方法，其中在一级反应器的培养过程中，同时通入 CO₂，调节 pH 值至适合微藻生长的范围，并补充生长所需的碳源。

16. 权利要求 4 的方法，其中将藻液在二级反应器中培养 3-5 天。
17. 权利要求 1 或 10 的方法，其中藻液从一级反应器到二级反应器的转移是通过三通在重力的作用下进行的。
18. 权利要求 4 的方法，其中所述人工光源在培养过程中连续打开，或根据接种的藻株和藻液的浓度差异选择部分或全部将人工光源关闭。
19. 权利要求 1、4、6、10、11、12、13、14 或 16 的方法，所述藻选自硅藻门、绿藻门、金藻门和红藻门等多种藻。
20. 权利要求 19 的方法，其中所述藻为小球藻、硅藻或栅藻。
21. 权利要求 19 的方法，所述藻选自牟氏角毛藻、三角褐指藻、小球藻、雨生红球藻、拟微绿球藻、荒漠栅列藻等多种藻。
22. 一种用于权利要求 1-21 任一项的方法的光生物反应器系统，包括一级反应器和二级反应器，其特征在于：一级反应器为柱式反应器、板式反应器或袋式反应器，其中心位置为空心的，空心处设置有人工光源，二级反应器为空心的柱式反应器、板式反应器或袋式反应器，一级反应器和二级反应器呈同心圆分布，一级反应器和二级反应器通过三通连接，其中二级反应器内径大于一级反应器外径。
23. 权利要求 22 的光生物反应器系统，还包括独立设置的三级反应器。
24. 权利要求 23 的光生物反应器系统，其中所述三级反应器为跑道形状的三级反应器或者是板式反应器。
25. 权利要求 22-24 任一项的光生物反应器系统，其中所述二级反应器和所述一级反应器的体积比为 8-6:1。
26. 权利要求 22-24 任一项的光生物反应器系统，其中所述人工光源、一级反应器和二级反应器之间的高度顺序为：人工光源>一级反应器>二级反应器。
27. 权利要求 22-24 任一项的光生物反应器系统，所述人工光源为多个排列为圆束状的灯管。
28. 权利要求 27 的光生物反应器系统，其中根据微藻的细胞密度来调节所述人工光源的光照强度。
29. 权利要求 22-24 任一项、或权利要求 28 的光生物反应器系统，其中一级反应器、二级反应器和/或三级反应器采用易透光的玻璃材质。
30. 权利要求 22 的光生物反应器系统，其中在所述一级反应器和二级反应器之间的间隙中设置有另外的人工光源以补充微藻生长所需要的光源。

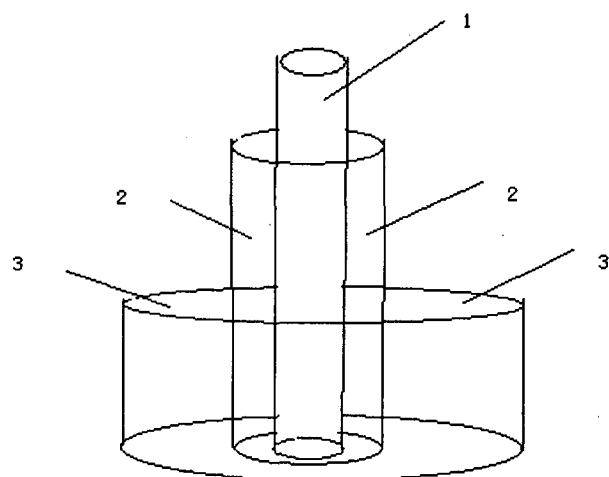


图 1

2/9

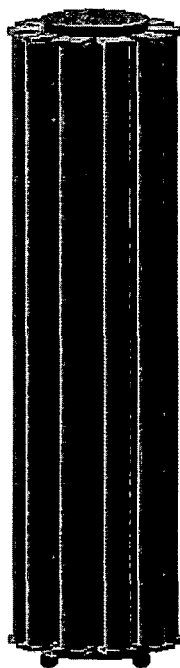


图 2

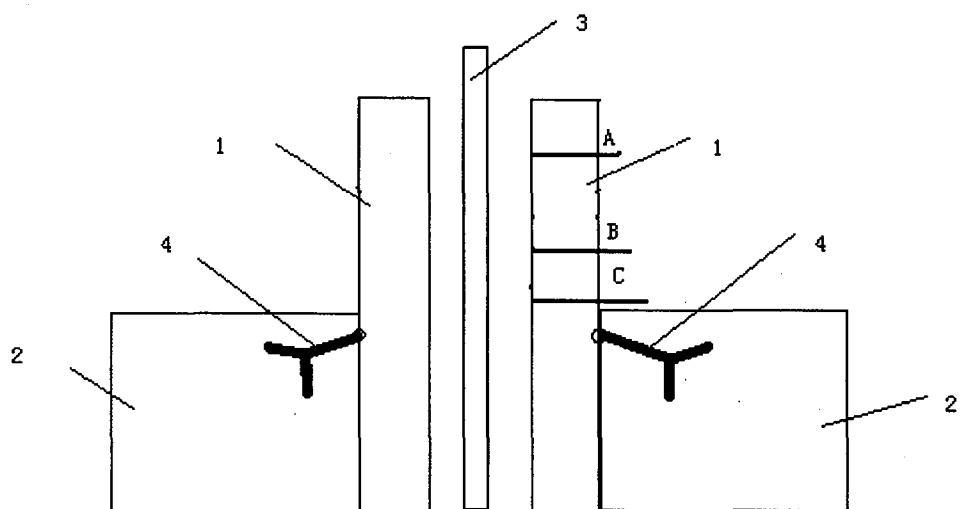


图 3

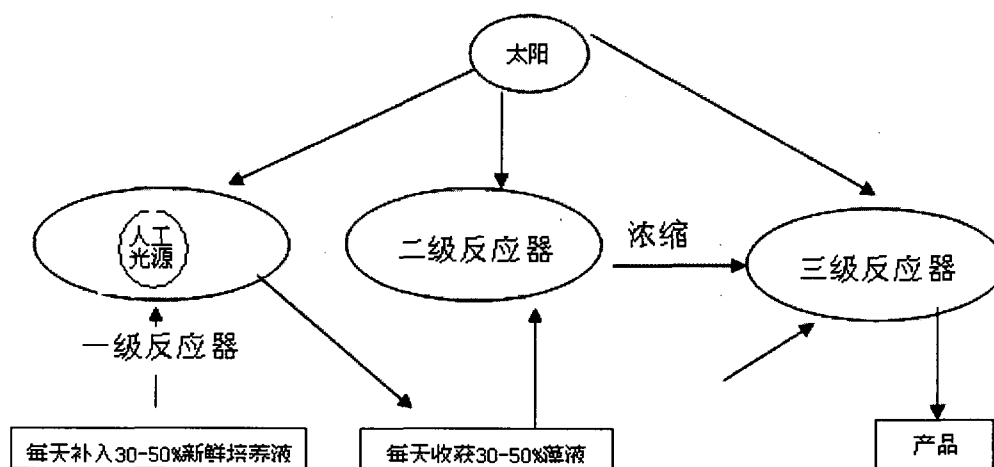


图 4

5/9

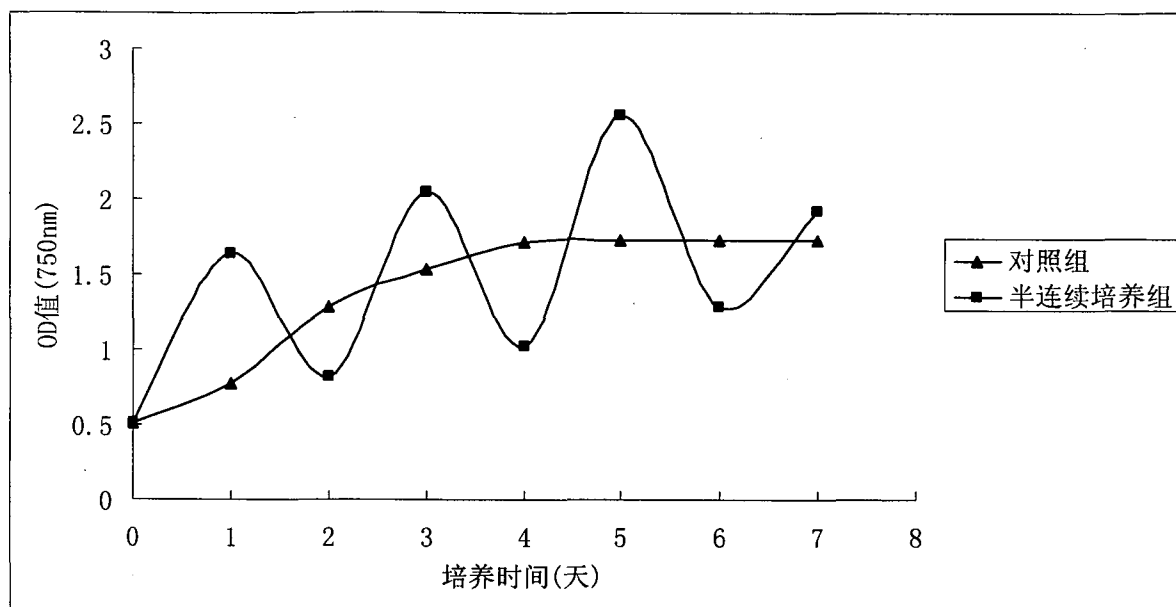


图 5

6/9

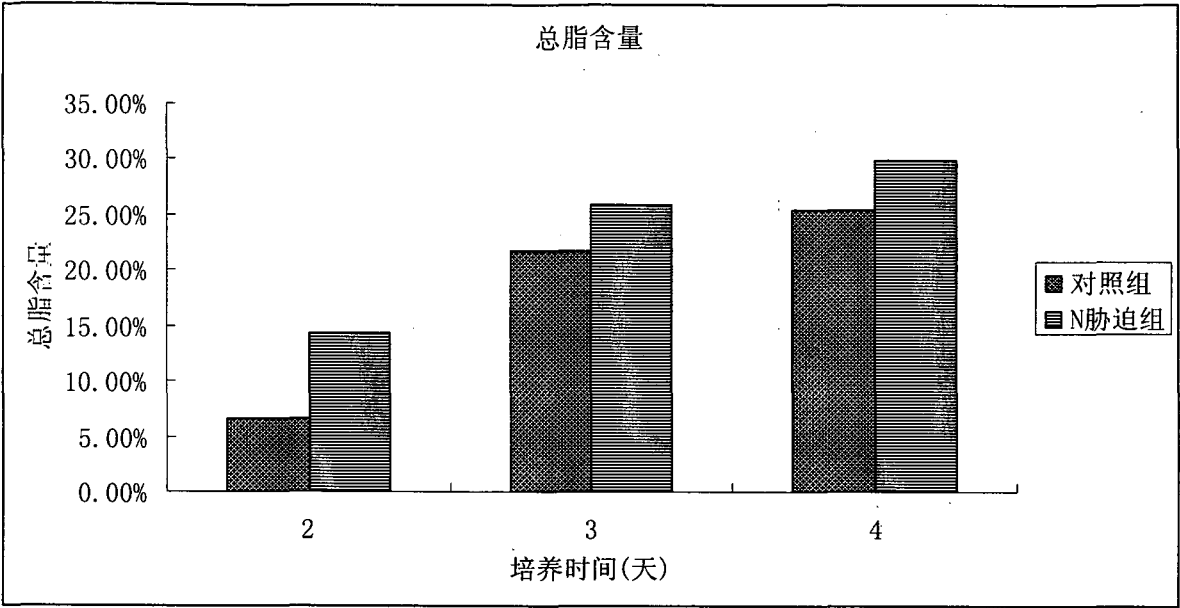


图 6

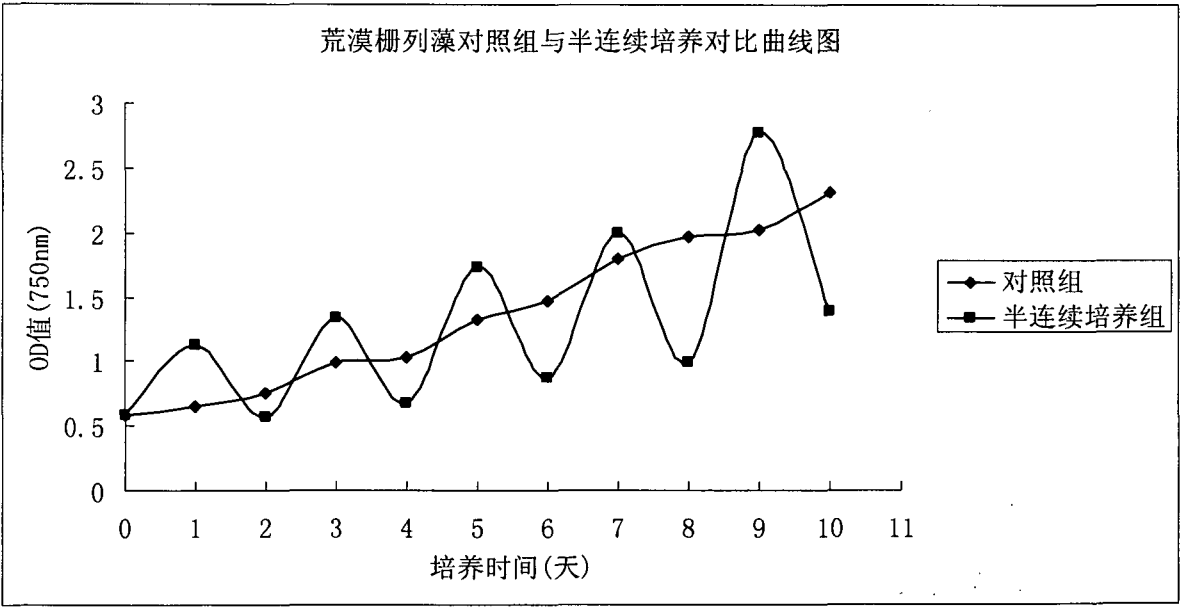


图 7

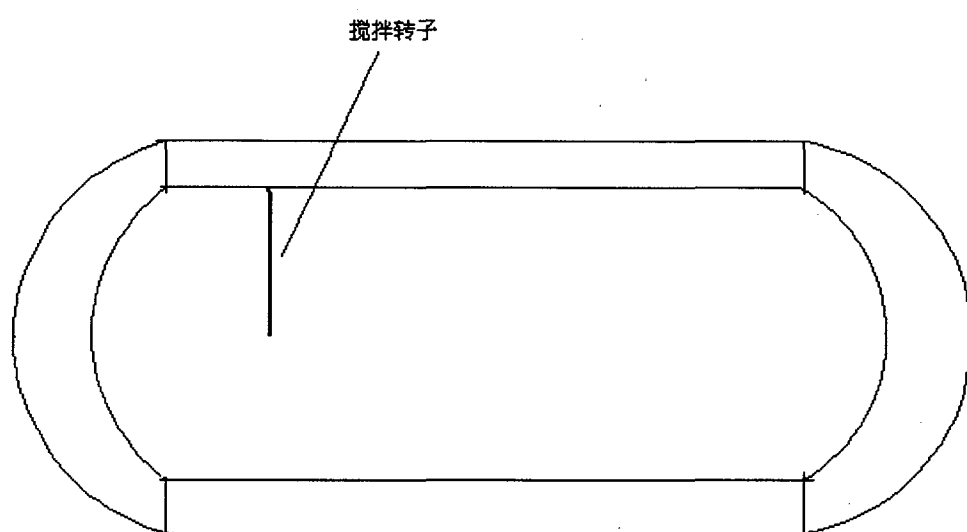


图 8

8/9

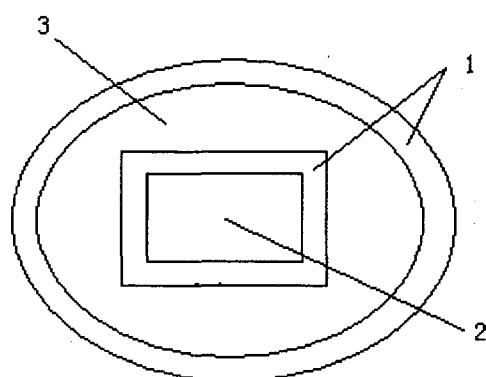


图 9

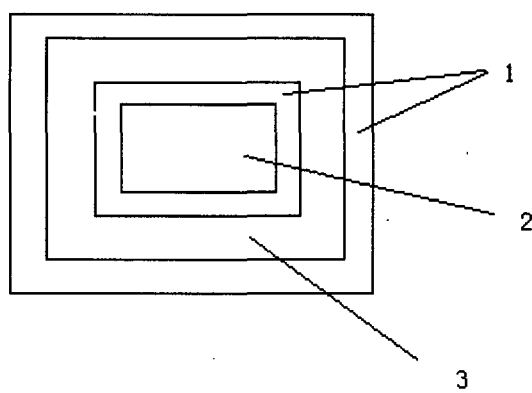


图 10

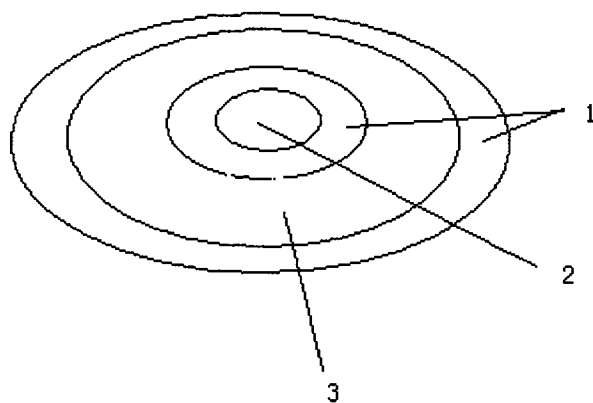


图 11

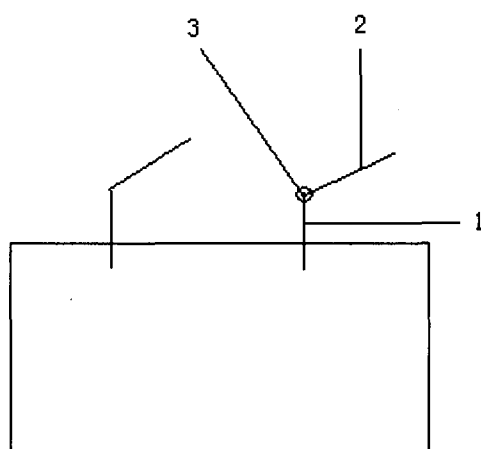


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001715

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: C12N; C12M; 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; MEDLINE and keywords: reactor, bioreactor, photobioreactor, microalgae, algae, concentric, stage, level, scale, scale up, multiplication, amplification, culture, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 20090209014 A1 (CHEN S) 20 Aug. 2009 (20.08.2009) page 4, right column, lines 31-38, page 5, left column, lines 6-7, 16-17, 21-24 and 28-32, page 7, left column, lines 7-10 of the description, claim 1	1-3, 6-15
A	the whole document	4, 5, 16-24

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

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
24 Jan. 2011 (24.01.2011)Date of mailing of the international search report
17 Feb. 2011 (17.02.2011)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. 86-10-62019451Authorized officer
YANG, Zhenyu
Telephone No. (86-10)62411111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001715

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101280328 A (UNIV QINGHUA) 08 Oct. 2008 (08.10.2008) claim 1	1-3, 6-15
A	the whole document	4, 5, 16-24
Y	CN 1563346 A (UNIV NINGBO) 12 Jan. 2005 (12.01.2005) abstract, claims 1 and 2, page 4, lines 1-9 of the description	1-3, 6-15
A	the whole document	4, 5, 16-24
Y	CN 1880442 A (UNIV EAST CHINA SCI & TECHNOLOGY) 20 Dec. 2006 (20.12.2006) claim 1	2, 3, 6, 7, 10-11,13-15
A	the whole document	1, 4, 5, 8, 9, 12,16-24
P,X	CN 101696389 A (ENN TECHNOLOGIES CO LTD) 21 Apr. 2010 (21.04.2010) claims 1-23	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/001715

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 20090209014 A1	20.08.2009	NONE	
CN 101280328 A	08.10.2008	US2009298159 A1 WO2009143680 A1	03.12.2009 03.12.2009
CN 1563346 A	12.01.2005	CN1272429C	30.08.2006
CN 1880442 A	20.12.2006	CN100587054C	03.02.2010
CN 101696389 A	21.04.2010	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001715

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12 (2006.01) i

C12M 1/00 (2006.01) i

C12R 1/89 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/001715

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N; C12M; 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: 反应器, 生物反应器, 光生物反应器, 微藻, 藻, 同心, 级, 扩大, 增殖, 扩增, 培养, 等

WPI; EPODOC; MEDLINE 和关键词: reactor, bioreactor, photobioreactor, microalgae, algae, concentric, stage, level, scale, scale up, multiplication, amplification, culture, 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
Y	US 20090209014 A1 (CHEN S) 20.8 月 2009 (20.08.2009) 说明书第 4 页右栏第 31-38 行, 第 5 页左栏第 6-7、16-17、21-24 和 28-32 行, 第 7 页左栏第 7-10 行, 权利要求 1,	1-3, 6-15
A	全文	4, 5, 16-24

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引
用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了
理解发明之理论或原理的在后文件“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的
发明不是新颖的或不具有创造性“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,
要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

24.1 月 2011 (24.01.2011)

国际检索报告邮寄日期

17.2 月 2011 (17.02.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

杨振宇

电话号码: (86-10) 62411111

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
Y	CN 101280328 A (清华大学) 08.10 月 2008 (08.10.2008) 权利要求 1	1-3, 6-15
A	全文	4, 5, 16-24
Y	CN 1563346 A (宁波大学) 12.1 月 2005 (12.01.2005) 摘要, 权利要求 1 和 2, 说明书第 4 页第 1-9 行	1-3, 6-15
A	全文	4, 5, 16-24
Y	CN 1880442 A (华东理工大学) 20.12 月 2006 (20.12.2006) 权利要求 1	2, 3, 6, 7, 10-11,13-15
A	全文	1, 4, 5, 8, 9, 12,16-24
P,X	CN 101696389 A (新奥科技发展有限公司) 21.4 月 2010 (21.04.2010) 权利要求 1-23	1-24

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/001715

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US 20090209014 A1	20.08.2009	无	
CN 101280328 A	08.10.2008	US2009298159 A1	03.12.2009
		WO2009143680 A1	03.12.2009
CN 1563346 A	12.01.2005	CN1272429C	30.08.2006
CN 1880442 A	20.12.2006	CN100587054C	03.02.2010
CN 101696389 A	21.04.2010	无	

主题的分类

C12N 1/12 (2006.01) i

C12M 1/00 (2006.01) i

C12R 1/89 (2006.01) n