

(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
2016 年 5 月 19 日 (19.05.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/074409 A1

(51) 国际专利分类号:

C12P 7/64 (2006.01) *C10L 1/02* (2006.01)
C12N 11/08 (2006.01) *C10B 53/02* (2006.01)
C11B 1/04 (2006.01) *C05F 11/00* (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01) *C12R 1/38* (2006.01)
C11C 3/10 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/074904

(22) 国际申请日: 2015 年 3 月 23 日 (23.03.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201410649119.1 2014 年 11 月 14 日 (14.11.2014) CN

(71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin
300072 (CN)。

(72) 发明人: 陈冠益 (CHEN, Guanyi); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 齐云 (QI, Yun); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 赵刘 (ZHAO, Liu); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 刘静 (LIU, Jing); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 胡毡 (HU, Zhan); 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。

(74) 代理人: 天津市北洋有限责任专利代理事务所 (BEI&OCEAN); 中国天津市南开区鞍山西道时代公寓 A 座 603, Tianjin 300193 (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, 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))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING VEHICLE BIOLOGICAL FUEL OIL, BIOGAS AND FERTILIZER BY UTILIZING MICROALGAE FULL COMPOSITION

(54) 发明名称: 微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法

(57) Abstract: Provided are a method for preparing vehicle biological fuel oil, biogas and fertilizer by utilizing a microalgae full composition, comprising the following steps: cultivation of algae; flocculation of algae; extraction of algae oil; preparation of an immobilized whole-cell biocatalyst; preparation of vehicle biological fuel oil via grease conversion; precipitation and pyrolysis of algae and utilization of gas, liquid and solid compositions.

(57) 摘要: 提供了一种微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法, 其包括以下步骤: 藻体的培养; 藻体絮凝; 藻油的提取; 固定化全细胞催化剂的制备; 油脂转化制备车用生物燃油; 藻沉淀热解及气液固组分利用。



WO 2016/074409 A1

微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法

技术领域

本发明属于藻类制取生物燃油及资源化应用领域，具体涉及一种微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法。

5 背景技术

传统能源的大量消耗使得石油替代品的需求不断加大，开发可替代石油资源的液体燃料已经成为亟需解决的能源问题。生物柴油作为一种新型燃料，具有良好的润滑性、燃料性、安全性和启动性等特点，并且具有无毒、无害、可生物降解环保优点，是替代传统燃料的最佳选择。生产生物燃油的原料中，微藻被认为是唯一可以完全替代化石燃料的生物柴油的原料。但是在实现微藻产油产业化的过程中，存在诸多问题。

首先微藻藻种的筛选及培育。目前，对微藻制取生物柴油方面的工作主要集中在藻种的筛选方面，但是由于实验室的条件与户外的条件差异很大，在温度、营养、通气以及有害生物防治方面都会存在困难。因此需要对天然的微藻进行进一步的优化，使其能适应较宽的温度变化以及较好的抗逆性，并保持高油脂含量、短生长周期特点，以降低微藻培养成本。

其次，由于微藻个体微小，且在培养液中的浓度很低，决定了其采收难度很大。对于工业规模的微藻养殖，从藻液中采收微藻一直是个瓶颈。有资料表明，微藻采收的成本占其养殖成本(包括培养和采收)的20%~30%。因此，寻求一种高效率、低成本的采收方法是当前亟需解决的问题。目前，采用传统的采收过程中加入无机及有机高分子絮凝剂，如铁盐、铝盐等，虽然可以达到絮凝效果，但是由于引入了新的离子，对水体造成严重影响，增加了水体处理费用。

此外，在油脂转酯化制备生物柴油过程中，常常采用液体酸碱或者固体酸碱催化剂，但是这些催化剂对存在工艺复杂，设备要求高，醇消耗量大，产物不易回收以及环境污染大等问题。而甘油作为转酯化的副产物而不再利用等现象不仅增加了环境风险，而且造成了资源的浪费。

藻类经油脂提取后的藻粉的常规处理是作为废弃物丢弃，但是由于藻类的体内还含有大量的含碳化合物等营养物质，仍具有再利用的价值。

虽然微藻尤其是含油微藻具有很多利用价值，但是目前对微藻的利用大部分局限于利用藻体内的脂肪酸，如不饱和脂肪酸作为保健品，或者通过转酯化制备生物柴油等，以及利用藻体内的蛋白质作为食品或者色素等，或者利用藻粉/藻液作为饲料及肥料等。但是在藻类的全组分利用方面技术很少，因此造成大量的浪费以及环境的污染等问题。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法。

本发明的技术方案概述如下：

微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，包括如下步骤：

(1)藻体的培养:将微藻接种到培养液中,使微藻的质量浓度为8-12mg/L,在温度20-35℃,光照12-17h培养;当油脂含量超过干重30%时,停止培养,得微藻培养液;

(2)藻体絮凝:将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为2-100mg/L,在200-400r/min搅拌5-10分钟,静置沉淀10-120分钟,弃去上清液,采收微藻;

5 (3)藻油的提取:将微藻干燥,破碎,按照1g:1-5mL的比例,向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂,在200-400r/min转速下搅拌20-40min,离心,得到含藻油的液体和藻沉淀,含藻油的液体经过蒸馏得到藻油;所述提取混合溶剂为体积比为2:1的氯仿和甲醇;

(4)固定化全细胞催化剂的制备:

10 ①按重量百分比称取:0.5%-1.5%的干重门多萨假单胞菌、88.5%-93.5%的LB液体培养基和5%-10%的聚氨酯泡沫颗粒;

②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到LB液体培养基上,加入聚氨酯泡沫颗粒,在30℃-35℃,100-200r/min恒温摇床中培养2-5天;过滤,得到固定有门多萨假单胞菌菌株的聚氨酯泡沫颗粒,水洗,干燥,加入到0.1-0.3wt%戊二醛水溶液中使浓度为50-100mg/L混合均匀,过滤,滤渣放入pH=6.5的磷酸缓冲液中,100-200r/min振荡5-10min,过滤、水洗,干燥,得到固定化全细胞催化剂;

15 (5)油脂转化制备车用生物燃油:将摩尔比为1:1-1.5的藻油和甲醇混合得混合液,向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为1-10wt%,25℃-35℃,100-200r/min震荡进行催化转酯化反应,每隔20h-30h加入与混合液中同体积的甲醇,共加入3-5次,继续以100-200r/min震荡20h-30h得到车用生物燃油1;

20 (6)藻沉淀热解及气液固组分利用:

将步骤(3)获得的藻沉淀,干燥,通过生物质热裂解制油装置,在400~600℃,压力控制在0.1-0.2MPa,进料率为0.4~0.7kg/h进行热解,得到车用生物燃油2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。

微藻优选为硅藻,栅藻,绿藻,金藻,丝藻,盘星藻、鱼腥藻、扁藻和衣藻至少一种。

25 培养液优选f/2培养液、E3培养液或BG11培养液。

本发明的优点:

1.本发明的方法可使用所有海洋微藻及淡水微藻等原料,适应性极强。

2.本发明所用藻体收集方法采用天然高分子絮凝剂,减少了无机絮凝剂外加金属盐对环境及产物的污染。

30 3.本发明反应的副产物为气体产物和藻渣,其中气体产物富含CO、H₂和CH₄,可作为天然气直接使用;藻渣可以作为肥料或通过加工制成生态缓释肥,达到藻类全组分利用之目的。

4.本发明所用藻油转酯化催化剂为固定化全细胞脂肪酶产生菌,具有高效、稳定、重复性高、对环境无污染优势,为新型环保催化剂。

5.本发明的方法可应用于工业化大装置的生产。

35 6.本发明的方法流程简单、效率高、成本低、产品质量高、所有原料及产品均有效利用、环境友好。

附图说明

图 1 为固定化全细胞催化剂用量对油脂转化率的影响。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

5 下述微藻购于中国科学院淡水藻种库。

硅藻（菱形藻）*Nitzschia Nitzschia* sp. FACHB-206；

绿藻（小球藻）*Chlorella Chlorella* sp. FACHB-231；

金藻（小定鞭金藻）*Prymnesium Prymnesium parvum* FACHB-923；

丝藻 *Ulothrix Ulothrix* sp. FACHB-494；

10 盘星藻 *Pediastrum Pediastrum* sp. FACHB-520；

扁藻 *Platymonas Platymonas* sp. FACHB-557；

衣藻 *Chlamydomonas Chlamydomonas* sp. FACHB-715；

栅藻 *Scenedesmus Scenedesmus* sp. FACHB-1229；

斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* FACHB-416；

15 普通小球藻 *Chlorella vulgaris* FACHB-30；

鱼腥藻 *Anabaena* sp. 1105 FACHB-179。

本发明各实施例所采用的门多萨假单胞菌，保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所，保藏号为 CGMCC No. 7644，保藏日期为 2013 年 5 月 27 日，建议分类命名为门多萨假单胞菌

20 *Pseudomonas mendocina*。

实施例 1

微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，包括如下步骤：

（1）藻体的培养：将微藻接种到 f/2 培养液中，使微藻的质量浓度为 8mg/L，在温度 20℃，光照 17h 培养；当油脂含量超过干重 32%时，停止培养，得微藻培养液；

25 （2）藻体絮凝：将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为 10mg/L，在 200r/min 搅拌 10 分钟，静置沉淀 40 分钟，弃去上清液，采收微藻；

（3）藻油的提取：将微藻干燥，破碎，按照 1g:2mL 的比例，向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂，在 200r/min 转速下搅拌 40min，离心，得到含藻油的液体和藻沉淀，含藻油的液体经过蒸馏得到藻油；所述提取混合溶剂为体积比为 2:1 的氯仿和甲醇；

30 （4）固定化全细胞催化剂的制备：

①按重量百分比称取：0.5%的干重门多萨假单胞菌、89.5%的 LB 液体培养基和 10%的聚氨酯泡沫颗粒；

②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到 LB 液体培养基上，加入聚氨酯泡沫颗粒，在 30℃，100r/min 恒温摇床中培养 5 天；过滤，得到固定有门多萨假单胞菌菌株的聚氨酯泡沫颗粒，水洗，干燥，加入到 0.1wt%戊二醛水溶液中使浓度为 50mg/L 混合均匀，过滤，滤渣放入 pH=6.5 的磷酸缓冲液中，100r/min 振荡 10min，过滤、水洗，干燥，得到固定化全细胞催化剂；

35

(5) 油脂转化制备车用生物燃油:将摩尔比为 1:1 的藻油和甲醇混合得混合液,向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为 4wt%, 25℃, 100r/min 震荡进行催化转酯化反应,每隔 24 h 加入与混合液中同体积的甲醇,共加入 3 次,继续以 100r/min 震荡 24h 得到车用生物燃油 1;

5 利用本步骤的方法,用固定化全细胞催化剂加入量为 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 和 8%, 和用转脂酶 Novozym435 加入量为 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 和 8%, 所获得的甲酯的产率见图 1。

(6) 藻粉热解及气液固组分利用:

10 将步骤(3)获得的藻沉淀,干燥,通过生物质热裂解制油装置(中国专利申请号 201320672968.X),在 400,压力控制在 0.2MPa,进料率为 0.4kg/h 进行热解,得到车用生物燃油 2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。本实施例所用的微藻为栅藻 *Scenedesmus Scenedesmus* sp FACHB-1229。

车用生物燃油 1 的收率 37.45%。车用生物燃油 2 收率 35.60%。生物气的产率 16.53%。藻渣收率为 10.42%。

15 车用生物燃油的成分,主要是烃类物质,酸类,醛类,酮类等。生物气的成分,主要是 CO、H₂ 和 CH₄、C₂H₄、C₂H₆、C₃H₆ 等。车用生物燃油和藻渣具体元素分析如下:

名称	C (wt%)	H (wt%)	O(wt%)	N (wt%)	S (wt%)
车用生物燃油 1	58.46	9.76	30.92	0.69	0.17
车用生物燃油 2	60.68	9.71	27.55	1.92	0.14
藻渣	73.45	2.63	23.06	0.67	0.19

实施例 2

20 微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法,包括如下步骤:

(1) 藻体的培养:将微藻接种到 E3 培养液中,使微藻的质量浓度为 12mg/L,在温度 30℃,光照 15h 培养;当油脂含量超过干重 45%时,停止培养,得微藻培养液;

(2) 藻体絮凝:将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为 80mg/L,在 400r/min 搅拌 5 分钟,静置沉淀 80 分钟,弃去上清液,采收微藻;

25 (3) 藻油的提取:将微藻干燥,破碎,按照 1g:5mL 的比例,向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂,在 400r/min 转速下搅拌 20min,离心,得到含藻油的液体和藻沉淀,含藻油的液体经过蒸馏得到藻油;所述提取混合溶剂为体积比为 2:1 的氯仿和甲醇;

(4) 固定化全细胞催化剂的制备:

30 ①按重量百分比称取:1.5%的干重门多萨假单胞菌、93.5%的 LB 液体培养基和 5%的聚氨酯泡沫颗粒;

②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到 LB 液体培养基上,加入聚氨酯泡沫颗粒,在 35℃,200r/min 恒温摇床中培养 3 天;过滤,得到固定有门多萨假单胞菌菌株的聚氨酯泡

沫颗粒，水洗，干燥，加入到 0.3wt%戊二醛水溶液中使浓度为 100mg/L 混合均匀，过滤，滤渣放入 pH=6.5 的磷酸缓冲液中，200r/min 振荡 5min，过滤、水洗，干燥，得到固定化全细胞催化剂；

5 (5) 油脂转化制备车用生物燃油：将摩尔比为 1:1.5 的藻油和甲醇混合得混合液，向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为 10wt%，35℃，200r/min 震荡进行催化转酯化反应，每隔 26 h 加入与混合液中同体积的甲醇，共加入 5 次，继续以 200r/min 震荡 20h 得到车用生物燃油 1；

(6) 藻粉热解及气液固组分利用：

10 将步骤 (3) 获得的藻沉淀，干燥，通过生物质热裂解制油装置（同实施例 1），在 600℃，压力控制在 0.1MPa，进料率为 0.5kg/h 进行热解，得到车用生物燃油 2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。本实施例所用的微藻为鱼腥藻 *Anabaena sp.* 1105 FACHB-179。

车用生物燃油 1 的收率 36.77%。车用生物燃油 2 收率，34.86%。生物气的产率 16.19%。藻渣收率为 12.18%。

15 用盘星藻 *Pediastrum Pediastrum sp.* FACHB-520 替代本实施例中的鱼腥藻，其它同本实施例，其车用生物燃油 1 的收率 36.77%。车用生物燃油 2 收率，34.86%。生物气的产率 16.19%。藻渣收率为 12.18%。

实施例 3

微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，包括如下步骤：

20 (1) 藻体的培养：将微藻接种到 f/2 培养液中，使微藻的质量浓度为 10mg/L，在温度 35℃，光照 12h 培养；当油脂含量超过干重 30%时，停止培养，得微藻培养液；

(2) 藻体絮凝：将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为 2mg/L，在 200r/min 搅拌 10 分钟，静置沉淀 120 分钟，弃去上清液，采收微藻；

25 (3) 藻油的提取：将微藻干燥，破碎，按照 1g:1mL 的比例，向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂，在 300r/min 转速下搅拌 30min，离心，得到含藻油的液体和藻沉淀，含藻油的液体经过蒸馏得到藻油；所述提取混合溶剂为体积比为 2:1 的氯仿和甲醇；

(4) 固定化全细胞催化剂的制备：

①按重量百分比称取：1.5%的干重门多萨假单胞菌、88.5%的 LB 液体培养基和 10%的聚氨酯泡沫颗粒；

30 ②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到 LB 液体培养基上，加入聚氨酯泡沫颗粒，在 32℃，200r/min 恒温摇床中培养 2 天；过滤，得到固定有门多萨假单胞菌菌株的聚氨酯泡沫颗粒，水洗，干燥，加入到 0.2wt%戊二醛水溶液中使浓度为 80mg/L 混合均匀，过滤，滤渣放入 pH=6.5 的磷酸缓冲液中，200r/min 振荡 8min，过滤、水洗，干燥，得到固定化全细胞催化剂；

35 (5) 油脂转化制备车用生物燃油：将摩尔比为 1:1.2 的藻油和甲醇混合得混合液，向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为 1wt%，30℃，200r/min 震荡进行催化转酯化反应，每隔 20h 加入与混合液中同体积的甲醇，共加入 4 次，继续以 200r/min 震荡 25h 得到车用生

物燃油 1;

(6) 藻粉热解及气液固组分利用:

将步骤(3)获得的藻沉淀,干燥,通过生物质热裂解制油装置(同实施例1),在500℃,压力控制在0.1MPa,进料率为0.7kg/h进行热解,得到车用生物燃油2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。本实施例所用的微藻是质量比为1:1的绿藻和丝藻的混合藻。

绿藻(小球藻) *Chlorella Chlorella* sp. FACHB-231;

丝藻 *Ulothrix Ulothrix* sp. FACHB-494。

车用生物燃油1的收率35.67%。车用生物燃油2收率,34.52%。生物气的产率16.48%。藻渣收率13.33%

10

实施例4

微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法,包括如下步骤:

(1) 藻体的培养:将鱼腥藻接种到BG11培养液中,使微藻的质量浓度为10mg/L,在温度32℃,光照17h培养;当油脂含量超过干重30%时,停止培养,得微藻培养液;

15

(2) 藻体絮凝:将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为100mg/L,在300r/min搅拌5分钟,静置沉淀10分钟,弃去上清液,采收微藻;

(3) 藻油的提取:将微藻干燥,破碎,按照1g:3mL的比例,向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂,在300r/min转速下搅拌30min,离心,得到含藻油的液体和藻沉淀,含藻油的液体经过蒸馏得到藻油;所述提取混合溶剂为体积比为2:1的氯仿和甲醇;

20

(4) 固定化全细胞催化剂的制备:

①按重量百分比称取:1.5%的干重门多萨假单胞菌、90%的LB液体培养基和8.5%的聚氨酯泡沫颗粒;

25

②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到LB液体培养基上,加入聚氨酯泡沫颗粒,在32℃,200r/min恒温摇床中培养2天;过滤,得到固定有门多萨假单胞菌菌株的聚氨酯泡沫颗粒,水洗,干燥,加入到0.2wt%戊二醛水溶液中使浓度为80mg/L混合均匀,过滤,滤渣放入pH=6.5的磷酸缓冲液中,200r/min振荡8min,过滤、水洗,干燥,得到固定化全细胞催化剂;

30

(5) 油脂转化制备车用生物燃油:将摩尔比为1:1.3的藻油和甲醇混合得混合液,向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为5wt%,30℃,200r/min震荡进行催化转酯化反应,每隔30h加入与混合液中同体积的甲醇,共加入4次,继续以200r/min震荡30h得到车用生物燃油1;

(6) 藻粉热解及气液固组分利用:

35

将步骤(3)获得的藻沉淀,干燥,通过生物质热裂解制油装置(同实施例1),在600℃,压力控制在0.1MPa,进料率为0.5kg/h进行热解,得到车用生物燃油2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。

本实施例所用微藻是质量比为1:1:1的硅藻,金藻和扁藻;

其中：硅藻（菱形藻）*Nitzschia Nitzschia* sp. FACHB-206；
金藻（小定鞭金藻）*Prymnesium Prymnesium parvum* FACHB-923；
扁藻 *Platymonas Platymonas* sp. FACHB-557。

车用生物燃油 1 的收率 36.42%。车用生物燃油 2 收率，34.93%。生物气的产率 17.07%。

5 藻渣收率为 11.58%

藻渣还可以用常规技术制备生态缓释肥。

实验证明，用 1：1：1:1 的盘星藻、衣藻、斜生栅藻、普通小球藻的混合藻替代本实施例的混合藻，其它同本实施例，可以获得与本实施例相似的效果。

10 上面的实施例所采用的微藻仅是为了说明本发明，但并不对本发明作任何限制，实验证明，凡是能产油的微藻都可以用于本发明。

权利要求

1. 微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，其特征是包括如下步骤：

5 (1) 藻体的培养：将微藻接种到培养液中，使微藻的质量浓度为 8-12mg/L，在温度 20-35℃，光照 12-17h 培养；当油脂含量超过干重 30%时，停止培养，得微藻培养液；

(2) 藻体絮凝：将胍基壳聚糖加入到微藻培养液中使浓度为 2-100mg/L，在 200-400r/min 搅拌 5-10 分钟，静置沉淀 10-120 分钟，弃去上清液，采收微藻；

10 (3) 藻油的提取：将微藻干燥，破碎，按照 1g:1-5mL 的比例，向破碎的微藻细胞中加入提取混合溶剂，在 200-400r/min 转速下搅拌 20-40min，离心，得到含藻油的液体和藻沉淀，含藻油的液体经过蒸馏得到藻油；所述提取混合溶剂为体积比为 2:1 的氯仿和甲醇；

(4) 固定化全细胞催化剂的制备：

①按重量百分比称取：0.5%-1.5%的干重门多萨假单胞菌、88.5%-93.5%的 LB 液体培养基和 5%-10%的聚氨酯泡沫颗粒；

15 ②将门多萨假单胞菌作为脂肪酶产生菌接种到 LB 液体培养基上，加入聚氨酯泡沫颗粒，在 30℃-35℃，100-200r/min 恒温摇床中培养 2-5 天；过滤，得到固定有门多萨假单胞菌株的聚氨酯泡沫颗粒，水洗，干燥，加入到 0.1-0.3wt%戊二醛水溶液中使浓度为 50-100mg/L 混合均匀，过滤，滤渣放入 pH=6.5 的磷酸缓冲液中，100-200r/min 振荡 5-10min，过滤、水洗，干燥，得到固定化全细胞催化剂；

20 (5) 油脂转化制备车用生物燃油：将摩尔比为 1:1-1.5 的藻油和甲醇混合得混合液，向混合液中加入固定化全细胞催化剂使加入量为 1-10wt%，25℃-35℃，100-200r/min 震荡进行催化转酯化反应，每隔 20h-30 h 加入与混合液中同体积的甲醇，共加入 3-5 次，继续以 100-200r/min 震荡 20h-30 h 得到车用生物燃油 1；

25 (6) 藻沉淀热解及气液固组分利用：将步骤 (3) 获得的藻沉淀，干燥，通过生物质热裂解制油装置，在 400~600℃，压力控制在 0.1-0.2MPa，进料率为 0.4~0.7kg/h 进行热解，得到车用生物燃油 2、作为燃气使用的生物气及可用作肥料的藻渣。

2. 根据权利要求 1 所述的微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，其特征是所述的微藻为硅藻，栅藻，绿藻，金藻，丝藻，盘星藻、鱼腥藻、扁藻和衣藻至少一种。

30 3. 根据权利要求 1 所述的微藻全组分利用制备车用生物燃油、生物气及肥料的方法，其特征是所述的培养液为 f/2 培养液、E3 培养液或 BG11 培养液。

附图

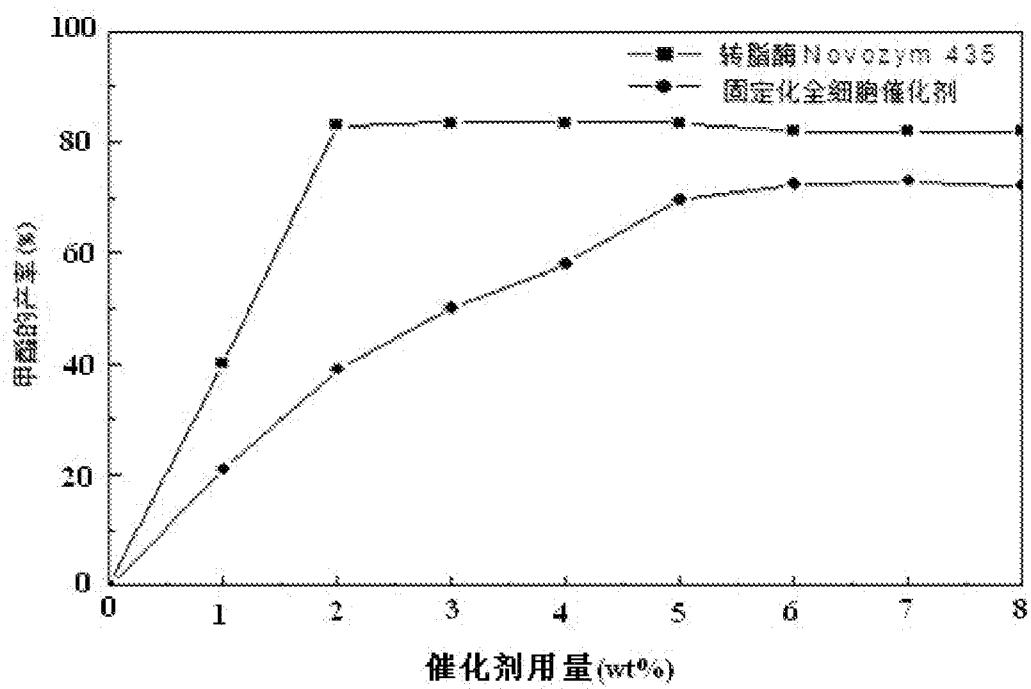


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/074904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/64 (2006.01) i; C12N 11/08 (2006.01) i; C11B 1/04 (2006.01) i; C11B 1/10 (2006.01) i; C11C 3/10 (2006.01) i; C10L 1/02 (2006.01) i; C10B 53/02 (2006.01) i; C05F 11/00 (2006.01) i; C12R 1/38 (2006.01) i; C12R 1/89 (2006.01) i
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)

C12P; C12N; C11B; C11C; C10L; C10B; C05F

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)

CPRSABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER and search terms: microalgae, biofuel, biogas, guanidine chitosan, flocculant, lipase, Pseudomonas mendocina, polyurethane, grease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104372044 A (TIANJIN UNIVERSITY) 25 February 2015 (25.02.2015) see claims 1-3	1-3
Y	CN 103642579 A (XINGHUO SCI & TECHNOLOGY INST MANZHOU LI) 19 March 2014 (19.03.2014) see the abstract, and claims 1-8	1-3
Y	CN 103756907 A (TIANJIN UNIVERSITY) 30 April 2014 (30.04.2014) see the abstract	1-3

☒ 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 28 July 2015	Date of mailing of the international search report 05 August 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer HE, Rui Telephone No. (86-10) 62411106

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2015/074904

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 103421716 A (TIANJIN UNIVERSITY) 04 December 2013 (04.12.2013) see claims 1-10, description, paragraph [0003]	1-3
Y	CN 103849410 A (TIANJIN UNIVERSITY) 11 June 2014 (11.06.2014) see claims 1-4	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/074904

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104372044 A	25 February 2015	None	
CN 103642579 A	19 March 2014	None	
CN 103756907 A	30 April 2014	None	
CN 103421716 A	04 December 2013	CN 103421716 B	29 April 2015
CN 103849410 A	11 June 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/074904

A. 主题的分类

C12P 7/64(2006.01)i; C12N 11/08(2006.01)i; C11B 1/04(2006.01)i; C11B 1/10(2006.01)i; C11C 3/10(2006.01)i; C10L 1/02(2006.01)i; C10B 53/02(2006.01)i; C05F 11/00(2006.01)i; C12R 1/38(2006.01)i; C12R 1/89(2006.01)i

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)

C12P, C12N, C11B, C11C, C10L, C10B, C05F

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))

CPRSABS; CNKI; CNTXT和检索词: 微藻, 生物燃油, 生物气, 胍基壳聚糖, 絮凝剂, 脂肪酶, 门多萨假单胞菌, 聚氨酯, 油脂等 DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER和检索词: microalgae, biofuel, biogas, guanidine chitosan, flocculant, lipase, Pseudomonas mendocina, polyurethane, grease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
PX	CN 104372044 A (天津大学) 2015年 2月 25日 (2015 - 02 - 25) 参见权利要求1-3	1-3
Y	CN 103642579 A (济南开发区星火科学技术研究院) 2014年 3月 19日 (2014 - 03 - 19) 参见摘要, 权利要求1-8	1-3
Y	CN 103756907 A (天津大学) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见摘要	1-3
Y	CN 103421716 A (天津大学) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见权利要求1-10, 说明书第[0003]段	1-3
Y	CN 103849410 A (天津大学) 2014年 6月 11日 (2014 - 06 - 11) 参见权利要求1-4	1-3

☐ 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

2015年 7月 28日

国际检索报告邮寄日期

2015年 8月 5日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

何睿

电话号码 (86-10)62411106

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/074904

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	104372044	A	2015年 2月 25日	无	
CN	103642579	A	2014年 3月 19日	无	
CN	103756907	A	2014年 4月 30日	无	
CN	103421716	A	2013年 12月 4日	CN 103421716	B 2015年 4月 29日
CN	103849410	A	2014年 6月 11日	无	