



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103459585 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201280015125.0

(22)申请日 2012.01.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103459585 A

(43)申请公布日 2013.12.18

(30)优先权数据

1101487.5 2011.01.28 GB

1101489.1 2011.01.28 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/050194 2012.01.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/101459 EN 2012.08.02

(83)生物保藏信息

CCAP817/1 2011.01.25

CCAP 222/98 2011.01.25

(73)专利权人 奥格赛特斯有限公司

地址 英国肯特郡

(72)发明人 约翰·多德 巴拉索罗·马萨莱克

米罗斯拉夫·沃萨提克

纳齐尔·巴希尔

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王朋飞 刘成春

(51)Int.Cl.

C12N 1/12(2006.01)

C12N 13/00(2006.01)

C12P 7/64(2006.01)

C05D 9/00(2006.01)

C12M 1/04(2006.01)

C12P 19/04(2006.01)

C12N 1/36(2006.01)

C12R 1/89(2006.01)

(56)对比文件

王翠 等.pH 值对沼液培养的普通小球藻生长及油含量积累的影响.《生物工程学报》.2010,第26卷(第8期),摘要.

邓光 等.温度、光照和pH 值对锥状斯氏藻和塔玛亚历山大藻光合作用的影响及光暗周期对其生长速率和生物量的影响.《武汉植物学研究》.2004,第22卷(第2期),摘要.

刘春光 等.“!”值对淡水藻类生长和种类变化的影响.《农业环境科学学报》.2005,第24卷(第2期),全文.

李玉祥 等.进行条件促进太湖蓝藻厌氧发酵产挥发性脂肪酸.《环境工程学报》.2010,第4卷(第1期),摘要.

审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书17页 附图8页

(54)发明名称

微藻、蓝藻及其代谢物的生产方法

(57)摘要

本发明涉及用于生产微藻、蓝藻和/或其代谢物的方法,本文描述了一种方法,涉及使用施加到微藻或蓝藻培养物的刺激来提高一种或多种代谢产品的生产。本文还描述了用于生产微藻和/或蓝藻的方法,其包括适应阶段,其中使藻/蓝藻培养物在工艺用水原料中和/或在发射光波长在400nm-700nm之间的发光二极管(LED)下生

长;以及生产阶段,其中使微藻或蓝藻在与适应阶段所用相同的工艺用水原料中和/或在与适应阶段所用相同的光照条件下生长。本发明还涉及具体微藻藻株。

1. 用于提高a) 选自绿蛇藻和*Trachydiscus* sp.的微藻中的二十碳五烯酸;或b) 选自摄食胶网藻的微藻中的胞外多糖生产的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 在生产阶段培养微藻藻株;

(ii) 将所述微藻培养物暴露在刺激下,其中所述刺激包括:(a) 将pH从pH7-pH9降低至pH5-pH6,随后将pH增加至pH7-pH9,及(b) 将LED送递的辐照度从50-200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 增加至400-2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产阶段对应于指数生长期。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产阶段包括使所述微藻在允许指数生长的条件下生长。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产阶段包括使所述微藻在光生物反应器中生长。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产阶段包括使所述微藻在LED下生长,所述LED发射的红光和蓝光的两个峰位于400-700nm PAR光谱内。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中不将所述培养物暴露在自然日光下。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述微藻培养物在指数生长期的峰值和/或稳定生长期的起始时暴露在刺激下。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述刺激还包括添加碳源。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中通过添加CO₂启动所述pH的降低。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述pH在约30分钟至2小时的期间内降低到约pH5-pH6,且所述期间在所述光辐照度增加之前。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述微藻暴露在刺激下后,在收获代谢物之前,再将所述微藻培养约48小时。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述绿蛇藻的微藻藻株是保藏在藻类与原生动物培养物保藏中心,保藏号为CCAP817/1的阿洛格绿蛇藻(*Chlorogibba allorgei*)藻株。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述摄食胶网藻的微藻藻株是保藏在藻类和原生动物培养物保藏中心,保藏号为CCAP 222/98的摄食胶网藻藻株。

微藻、蓝藻及其代谢物的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产微藻、蓝藻和/或其代谢物的方法。尤其是,本发明涉及一种方法但并非仅限于此,其中将微藻或蓝藻培养物暴露在刺激下,以增强一种或多种代谢物的生产。本文还描述了用于生产微藻和/或蓝藻的方法,包括适应阶段,其中使藻类/蓝藻培养物在工艺用水原料中和/或在发射光波长在400nm-700nm之间的发光二极管(LED)下生长;以及生产阶段,其中使微藻或蓝藻在与适应阶段所用相同的工艺用水原料和/或相同的光照条件下生长。

[0002] 本发明集成了优选在光生物反应器系统内、露天池塘中培养形成脂质的微藻或蓝藻的方法或其他培养方法。本发明提供了用于生产藻类生物质并转化成高价值副产品如EPA或生物燃料的集成和连续的方法。还描述了本发明所用的具体藻株,其在本文中称为ALG02。

[0003] 本发明描述了提高独特的微藻藻株(摄食胶网藻(*Dictyosphaerium chlorelloides*) ALG03)的胞外多糖(EPS)生产的方法,所述微藻藻株在培养过程中被预调/适应,用于随后使用限定的LED照明光谱和作为在光生物反应器(PBRs)中生长的营养物质和能量的工业废物CO₂和水进行大规模生产。此外,本文提供了用于在碳水化合物提取前/后生产藻类生物质的集成和连续的方法,所述藻类生物质可用于其他下游用途,例如,提高养分利用率和地下滴灌灌溉的植物根区的土壤粘附;作为厌氧消化单位或生物乙醇工厂或生产沼气的生物质。还描述了本发明所用的具体藻株,其在本文中称为ALG03。

背景技术

[0004] 藻类是地球上增长最快的生物体之一。它们可以在几个小时内再生(旺盛)。无论在淡水、废水或海水中,只要有CO₂和光它们就能成长。此外,在工艺用水中养分(主要是氮和磷酸盐)的水平升高以及其他化合物的增加,能促进藻类(a)生物质增加。

[0005] 在全球范围内正在进行的研究中,藻类正在成为未来燃料和废水处理解决方案的目标,这是因为在藻类燃料的生产方法中,藻类可以封存工业源的CO₂以及帮助封存在经部分处理后的工艺用水(b,c)内的养分(和一些重金属)。

[0006] 藻类和蓝藻的同样也是有价值的代谢产物来源,例如脂肪酸,包括肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸、硬脂酸、花生四烯酸和二十碳五烯酸。此外,微藻和蓝藻的胞外聚物质(天然多糖)所具备的独特生化特性使它们从生物技术的角度来看显得颇具吸引力。蓝藻产生复杂的胞外多糖,它们在食品和非食品行业的应用包括食品涂抹剂、乳化剂和胶凝剂、絮凝剂、增粘剂和保湿剂。在医疗保健(d)中,它们还有作为软组织粘合剂的新化合物的潜在用途。在生物修复领域,胞外多糖(EPSs)可以去除被污染土壤和水域中的有毒重金属(e,f),以及废水中回收的养分和其他元素。

[0007] 由以上描述可得知,藻类和蓝藻在许多不同技术领域都是宝贵的资源,因此,本发明寻求开发这类微生物生长和生产的新方法。

[0008] 发明概述

[0009] 根据本发明的第一个方面,提供了用于提高微藻和/或蓝藻的一种或多种代谢物生产的方法,所述方法包括以下步骤:

[0010] (i) 在生产阶段培养微藻或蓝藻藻株;

[0011] (ii) 将微藻或蓝藻培养物暴露在刺激下培养,其中所述刺激包括:(a) 将pH降低至不超过约pH6,随后将pH增加至不低于约pH7,及(b) 将光辐照度增加到至少 $400\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。

[0012] 根据本发明的第二个方面,提供了用于生产或生长微藻和/或蓝藻或生产由其衍生的一种或多种代谢物的方法,所述方法包括:

[0013] (i) 适应阶段,包括将微藻或蓝藻培养于:

[0014] (a) 工艺用水原料中,并选择能够在工艺用水原料中生长的微藻或蓝藻,和/或

[0015] (b) 发光二极管(LED)下,所述发光二极管(LED)所发射的红光和蓝光的2个峰位于光波长为约400–700nm的光谱内;

[0016] (ii) 生产阶段,包括在与适应阶段所用相同的工艺用水原料中和/或在与适应阶段所用相同的光照条件下培养(i)中所选择的微藻或蓝藻。

[0017] 本发明还提供了一种微生物,其是保藏在藻类和原生动物培养中心、保藏号为CCAP817/1的阿洛格绿蛇藻(*Chlorogibba allorgei*)藻株或是由其衍生的突变藻株,或具有所述藻株的识别特征。保藏号为CCAP817/1的阿洛格绿蛇藻藻株在本文中也称为ALG02藻株。

[0018] 本发明还提供了一种微生物,其是保藏在藻类和原生动物培养中心、保藏号为CCAP222/98的摄食胶网藻藻株,或是由其衍生的突变藻株,或具有所述藻株的识别特征。保藏登记号为CCAP222/98的摄食胶网藻藻株在本文中也称为ALG03藻株。

[0019] 本文提供的方法可以用于提高含有以下物质的微藻的生产:具有商业价值的生物蛋白、脂质及代谢产物,包括二十碳五烯酸(EPA)、肉豆蔻酸、棕榈酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -亚麻酸以及硬脂酸。所述方法采用优化的光波长,来优选在光生物反应器中培养和生产富含脂质的微藻藻株,如绿藻门中并选自肋胞藻科(*Pleurochloridaceae*)的微藻。工业副产品,如废工艺用水和 CO_2 ,用作养分和碳的再生源,来调整藻类/使藻类适应,以利用这些输入提高生长。

[0020] 本发明还提供了独特的两阶段方法,其用于优化藻类、特别是摄食胶网藻的具有商业价值的胞外多糖的生产,并且所述方法可以应用于特定微藻藻株。所述方法在光生物反应器系统(PBR)中进行。所述方法利用工业过程中的二氧化碳(CO_2)/水来在规模扩大的PBR系统中在类似的条件下培养藻类并增加生长率。所述方法使用藻类预适应培养来调整生物体,使之适应工艺用水/ CO_2 和LED照明的规模扩大的应用。这反过来又使藻类所生产的具有商业价值的藻胞外多糖水平升高。装载碳水化合物的藻类生物质可作为富含营分的高碳肥料用于灌溉农作物,或者用于下游能源生产(生物乙醇生产或其他能源生物质系统,如厌氧消化池或发酵容器)。

[0021] 本发明提供了由摄食胶网藻ALG03的适应藻株生产高产量胞外多糖的新方法,所述藻株已经演变为在二级处理污水源中、在调整的LED光下高速生长。在生长的迟滞期观察到,这种处理使胞外多糖的产率从38%翻倍至77%。所产生的高百分比多糖可移动到下游过程,来提取用于各种用途的聚合物。提取碳水化合物后的剩余废生物质可以用于动物饲

料(如果在生物反应器中使用纯水)或用于能量生产,例如,在厌氧消化池、发酵工艺或热解系统。

[0022] 因此,本发明还涉及属于胶网藻科(Dictyosphaeriaceae),特别是胶网藻属(Dictyosphaerium),更具体是属于摄食胶网藻的一种具体(分离)藻类藻株。该藻株保藏于藻类和原生动物培养中心,保藏号CCAP222/98,并于2011年1月25日被接受。本文所示的所述藻株对于特定代谢物的生产是有用的。

[0023] 本发明还提供了使用地下滴灌系统(SDIs)将所产生的藻类生物质作为具体土壤调理剂的新方法。修复水内生长的生物质进入灌溉存储器(irrigation holding tank),准备与正常灌溉水和其他兼容化学品混合。早已吸收了废气或工艺水的磷酸盐和硝酸盐以及其他营养物质的送递剂量的藻类细胞,有助于向植物的根区送递“天然缓释”肥料。这也增加了土壤中的碳,并有助于在植物正发展的根部周围聚集土壤颗粒,防止水土流失,这在干旱区是至关重要的。

[0024] 这些和其他目的,根据下面的详细描述会变得显而易见,并已经通过本发明人的发现而实现,即通过调控藻类藻株的预培养和在PBRs内生长期间进行管理,预调/适应的藻类藻株的胞外多糖的形成能够使富含碳水化合物的生物聚合物的产量翻倍。

附图说明

[0025] 图1 LED光照适应-FAME谱

[0026] 与荧光光照预先暴露在PAR LED光照(400-700nm的)下6个月并经6个周期的传代培养的栅藻属(Scenedesmus)种类(ALG05)相比,在调整的LED光下HPLC FAME谱增强。

[0027] 从藻类藻株获得的HPLC (FAME) 谱,所述藻类藻株以24小时为周期仅利用LED PAR光照培养了6个月(6代传代培养)。注意分子量较高的脂肪酸(右图中箭头所指),相比用相同辐照度的荧光光照下(左图)生长的藻株的外观;

[0028] 图2预培养时,在已处理的工艺水中的生长增强

[0029] 通过暴露于已处理的工艺水和调整的PAR LED光(27℃和24小时光照)进行6个月(6个周期)预培养,Trachydiscus sp. (ALG01)、小球藻(Chlorella sp.) (ALG04)以及栅列藻(Scenedesmus sp.) (ALG05)的生长增长;

[0030] 使已适应的细胞在来自加工厂(二次处理)的水中生长6个月,以及每4周再培养于新工艺用水中;将非适应的细胞培养于标准的100%ZBB生长培养基中,每4周在新ZBB生长培养基中重新培养;然后,使这两种藻株在新的工艺用水中生长9天(直至稳定期)。结果表明预适应的细胞明显适应工艺用水环境和LED光照。

[0031] 图3不同藻株的脂质含量

[0032] 比较藻株在指数生长期生产的碳水化合物/脂质/蛋白和生物质的热值。在指数增长阶段收获培养物。

[0033] 图4绿蛇藻(Chlorogibba sp.) (ALG02)藻株内二十碳五烯酸(EPA)的生产

[0034] 通过毛细管色谱分析并在次优生长条件下(不添加二氧化碳或PAR辐照)生产的生物质样品中主要脂肪酸的百分含量。和使用PAR灯源和添加二氧化碳生长的这种藻株和Trachydiscus sp. ALG01的其他分析显示,EPA的百分比在总脂肪酸含量的30-38%范围内。在控制的PAR光照下,检测到分析物中显著水平的棕榈酸和肉豆蔻脂肪酸。

[0035] 图5A及B的图表分别显示了关于本发明开展的实验工作结果并说明养分浓度和光水平与摄食胶网藻藻株ALG03生长之间的关系。

[0036] 5A低养分水平要求

[0037] 藻类在Bold's Basal (BB) 培养基生长4天显示藻类在27℃和最佳光辐照度下的最佳生长需要相对降低的养分水平。

[0038] 5B用于生长的LED光辐照度水平

[0039] 图表显示藻类在低光照下、在27℃的25%BB培养基中超过7天生长最好。

[0040] 图6是根据本发明生产用于灌溉的藻类生物聚合物的系统的示意图；

[0041] 图7是一个示出了连续收获摄食胶网藻ALG03的曲线图；生物质由在PBR中表示为光密度(680nm处)读数显示，每天以50%的速率收获，使得当补足了新的生长培养基后，能在24小时内再生摄食胶网藻ALG03的相同生物质。

[0042] 图8显示了藻株对废水和LED光照的适应，从而与非适应的藻株相比，使得生长速率增加；

[0043] 暴露于废水和调整的PAR LED光(27℃和24小时光照)下，经6个月(6个周期)和生理适应提高了摄食胶网藻的生长；

[0044] 图9示出了第二阶段培养结束后EPS翻倍(右图)；

[0045] 图10示出3个生物体中碳水化合物/脂质/蛋白质细胞含量和热值的比较；

[0046] 摄食胶网藻ALG03藻株在对数生长期内产生的碳水化合物/脂质/蛋白质产物和生物质热值的比较。在指数增长阶段收获培养物；

[0047] 图11显示了在温室试验中使用滴灌使韭菜在贫瘠的沙质土壤中生长超过12个周的结果。

[0048] 发明详述

[0049] 在本发明的第一个方面，提供了用于提高微藻和/或蓝藻的一种或多种代谢物生产的方法，所述方法包括以下步骤：

[0050] (i) 在生产阶段培养微藻或蓝藻藻株；

[0051] (ii) 将微藻或蓝藻培养物暴露在刺激下培养，其中所述刺激包括：(a) 将pH降低至不超过约pH6，随后将pH增加至不低于约pH7，及(b) 将光辐照度增加到至少 $400\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。

[0052] 在本发明的上下文中，术语“培养”是用来表示使一种或多种微藻或蓝藻藻株在任何合适的培养基中生长。这种培养基可包括本领域技术人员熟知的标准生长培养基，例如BB培养基或同等物。在一个优选的实施方案中，使微藻或蓝藻藻株在工艺用水中生长，其中的术语“工艺用水”包括来自工业系统和家庭废水的工艺用水。所述工艺用水可以在使用前处理(例如，消毒或不消毒)和补充养分，使得营养物的水平在标准生长培养基的范围内。

[0053] 在某些实施方案中，所述的培养可以是分批培养、补料分批培养或至少部分连续培养(在稳定期之前)。

[0054] 生产阶段

[0055] 在生产阶段中微藻或蓝藻藻株通常会以指数速率增长，因此，在某些实施方案中，生产阶段对应于培养物的指数生长期。

[0056] “指数期”，也被称为“log期”或“对数期”，为微生物包括微藻和蓝藻细胞分批培养

过程中的确定时期,其特征为细胞倍增。每单位时间出现的新生物体的数量与现有群体成比例。如果生长不受限制,将继续以恒定的速率倍增,因此细胞的数量和和群体增加的比率在每一个连续的时间段翻倍。实际生长速率可能会有所不同,这取决于所使用的微生物株和/或生长条件。

[0057] 在生产阶段中,使用的环境或培养条件可具体选择,以使得正在使用的微藻或蓝藻藻株呈指数生长。

[0058] 在某些实施方案中,在稳定期开始之前,在呈指数增长开始停止时即指数生产期最后微藻或蓝藻藻株的细胞密度,应不小于 10^8 个细胞/ml培养基,优选为 10^7 - 10^8 个细胞/ml。用于实现培养物的最佳生长或培养物指数增长的培养条件可以选自下列各项:

[0059] -波长为约400nm至700nm之间的持续人造光,和/或

[0060] - $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 至 $200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 之间的持续人造光;和/或

[0061] -约 20°C 至 40°C 之间的温度;和/或

[0062] -约500mV至800mV之间的含氧量,和/或

[0063] -约pH6-pH9之间的pH值。

[0064] 本领域技术人员应当理解,培养条件可以依据生长的微藻或蓝藻而改变。本文讨论了用于本发明具体藻株的具体条件,并且所述条件也可以作为应用于其他藻株的指导,这是本领域技术人员所能够理解的。

[0065] 在本发明的优选实施方案中,在生产阶段微藻或蓝藻藻株的培养或生长在光生物反应器(PBR)中进行。如本文所采用的,光生物反应器指的是并入一个或多个光源向反应器中提供光子能量的生物反应器。在优选的实施方案中,使微藻或蓝藻生长在对(外部)环境关闭的系统中。优选的光源包括发光二极管(LED),特别是发PAR光的LED(400-700nm范围的光合有效辐射)。在某些实施方案中,可以配置PBR,以便包括旨在自生物反应器中心提供360度照明的(高度调整的)LED光源,从而使光源周围不同藻类或蓝藻藻株的生长最大化。在优选的实施方案中,光是由LED发射的,所述LED发射的红、蓝光的2个峰位于400-700nm光谱范围内。在优选的实施方案中,光是由LED发射的,所述LED发射的红光峰在约500-665nm范围内,优选为约660nm,且所发射的蓝光峰在约440-500nm范围内,优选为约460nm。

[0066] 其中,生产阶段是在PBR内进行,在生产阶段开始时,微藻或蓝藻藻株的密度应不小于10%(v/v)的PBR体积。在相同或替代的实施方案中,不将微藻或蓝藻培养物暴露在自然光下。

[0067] 刺激

[0068] 在本发明方法的第二个步骤中,将微藻或蓝藻培养物暴露在刺激下,其中所述刺激包括、基本上由下述组成或由下述组成:(a)将pH降低至不超过约pH6,随后将pH增加至不低于约pH7,及(b)将光辐照度增加到至少 $400\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。

[0069] 在生产阶段,培养物的pH通常在pH7-pH9的范围内,因此所述刺激可以包括pH从约pH7-pH9降低至约pH3-pH6,优选为约pH5-pH6。通过本领域技术人员所知的任何适宜的方式,可将培养物中的pH值降低并随后使其增加,只要不损害培养物的生存力即可。在一个优选的实施方案中,通过二氧化碳的加入降低pH。

[0070] 在生产阶段,递送到培养物的光辐照度通常在 50 - $200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 的区域内,因此所述刺激可以包括将光辐照从约 50 - $200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 增加至约 400 - $2000\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。光源

优选包括一个或多个LED、基本上由或由一个或多个LED组成。

[0071] 一旦微藻或蓝藻培养物已到达指数期生长峰值,通常将所述培养物暴露在刺激下。此峰值在稳定期开始之前立即出现。稳定期是微生物包括微藻和蓝藻分批培养过程中一个定义非常明确的时期,其中培养物的生长速率放缓,这通常是由于有毒物质积累和养分耗竭。在这个阶段,微生物的生长速率通常等于微生物的死亡速率。本领域技术人员应当理解,任何微藻或蓝藻培养物都经历从指数生长峰值到稳定期的过渡。培养物可以在指数期生长峰值的任何时间或从指数期过渡到稳定期的任何时间内暴露在刺激下。

[0072] 可以在整个生产阶段监测微藻或蓝藻的生长速率,例如使用采样技术,如细胞计数,或通过测量培养物的叶绿素a的水平。细胞数可使用分光光度测定培养物的取样来确定,例如,通过在约OD680nm处读数。这些措施可以用来确定指数生长期、指数期生长的峰值和培养物开始进入稳定生长期的时间,任何合适的技术都可以采用。

[0073] 所述刺激最低限度包括pH降低至不超过约pH6,随后pH增加至不低于约pH7,以及光辐照度增加至至少400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 。所述的刺激还可以包括添加碳源,其中碳源为各种形态的CO₂。

[0074] 在优选的实施方案中,pH值的降低和随后的增加发生在光辐照度增加之前。可以在约30分钟至约2小时的期间内,将pH降低至不超过约pH6,优选在约pH5-pH6之间。随后可以将pH增至约pH6-pH9之间,优选在约pH7-pH9之间。可以利用任何合适的方式升高pH,只要不损害培养物的生存力即可。通常,将pH恢复到刺激前水平。

[0075] 在某些实施方案中,在暴露于刺激下开始后,再将微藻或蓝藻培养物培养至少约12、24、36、48等小时的生长期。在实施方案中,其中在约30分钟至2小时之间的一段时间内降低pH,并随后升高至例如刺激前的水平,暴露于刺激后的培养期,可以由初始pH值下降的时间或由恢复pH及随后增加辐照度的时间计算。

[0076] 代谢物的生产

[0077] 将微藻或蓝藻藻株暴露在刺激下的一个作用是,诱发或促进微藻或蓝藻特定代谢物的生产。本发明人已经注意到,将某些微藻和/或蓝藻藻株暴露在如本文所定义的刺激下,会导致产生大量特定代谢物,这种特定代谢物依赖于所使用的微生物株。因此,实施上述所要求保护的方法的目的是,提高微藻和/或蓝藻细胞的一种或多种代谢物的生产。通常在培养物已经暴露于刺激后的另一生长期后收获这类代谢物。代谢物可使用本领域技术人员知晓的任何合适的方式收获、纯化和/或分析,例如,Bligh,EG和Dyer,W.J.1959.A rapid method for total lipid extraction and purification(一种用于快速提取总脂和纯化的方法).Can.J.Biochem.Physiol.37:911-917所记载的方式。

[0078] 脂类也可以根据工业标准程序收获/分析,如超临界CO₂、溶剂提取的变型、分馏和层析,或根据以下方案:

[0079] 如果用于在培养管中进行GC-MS测量,则将25mg藻类产物样品与内部标准品混合,添加1.5ml 0.5N氢氧化钠的甲醇溶液,给培养管盖上盖子,并在100℃下加热约5分钟。使其冷却并添加2ml BF₃/甲醇试剂,盖管,混合并在100℃加热30分钟。使其冷却并加入2ml 异己烷+BHT,然后5ml饱和氯化钠,盖管,并剧烈震荡30秒。冷却至室温并使其分层,将上面的异己烷层通过无水硫酸钠短柱并收集。将含水层用2ml 异己烷+(二丁基羟基甲苯)BHT萃取,使上面的异己烷层通过无水硫酸钠柱,并收集溶剂与其他样品。将所述柱用2ml 异己烷+BHT洗

涤,并且也放置在相同的样品管中。

[0080] 多糖可通过本技术领域技术人员可用的层析技术进行分析。微藻生物质提取物中的碳水化合物和糖醇的分析,可通过高pH阴离子交换层析法(HPAE),接着通过并行的电化学检测(IPAD)和质谱检测分析来进行。在一个优选的实施方案中,样品提取物采用耦合到MSQ Plus质谱仪的模块化ICS-5000系统进行分析。分析物在CarboPac MA1柱上使用等度条件分离。经柱分析后,流出物被分割,从而一半流过实现了集成和脉冲安培检测(IPAD)的电流分析室(amperometry cell),而另一半则是使用膜基脱盐装置(ASRS)连续脱盐。随后将中和的流出物与氯化锂水溶液混合,以促进碳水化合物作为锂加合物在MS中的检测。

[0081] 废生物质反过来可用于各种各样的应用,包括但不限于:反刍动物饲料、牛饲料、水产养殖、家禽饲料、生物质的生物乙醇制品碳水化合物级分以及从蛋白质中提取有价值的氨基酸。

[0082] 本文所述的方法可用于以提高任何发现于微藻和/或蓝藻藻株内的代谢物的生产。在本发明的某些实施方案中,所述方法用于增强脂质的生产,包括但不限于选自下组的脂肪酸:肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -和 γ 亚麻酸、硬脂酸、花生四烯酸和二十碳五烯酸。在优选的实施方案中,本发明的方法用于提高二十碳五烯酸(EPA)的生产。本文所述的方法尤其可用于获得培养的微藻或蓝藻藻株的期望的脂肪酸组成(profile),例如,以优化产EPA藻株的EPA生产。通过本文所述的方法生产的脂肪酸可以例如用于食品行业中,用于液体生物燃料生产中,用于化妆品组分。

[0083] 在本发明的某些实施方案中,所述方法用于提高碳水化合物的生产。在优选的实施方案中,本发明所述的方法用于提高胞外多糖(EPS)的生产。

[0084] 微藻/蓝藻

[0085] 与本发明方法配合使用的微藻类或蓝藻可以选自任何合适的藻类或蓝藻藻株。合适的微藻藻株可选自下组:绿微藻、淡水微藻、绿藻门、肋胞藻科、Trachydiscus sp.、绿蛇藻以及摄食胶网藻。合适的蓝藻藻株可以选自下组:色球藻目(Chroococcales)、集胞藻属(Synechocystis)或聚球藻属(Synechococcus)。

[0086] 在所述方法用于增强二十碳五烯酸的生产的实施方案中,优选微藻藻株选自Trachydiscus sp.和绿蛇藻,并且特别是,保藏在藻类和原生动物培养保藏中心、保藏号为CCAP817/1(本文中也称为ALG02)的阿洛格绿蛇藻藻株,或是由其衍生的突变藻株。

[0087] 在所述方法用于增强胞外多糖生产的实施方案中,优选微藻藻株选自摄食胶网藻,并且尤其是保藏在藻类和原生动物培养保藏中心、保藏号为CCAP222/98(本文中也称为ALG03)的摄食胶网藻藻株,或是由其衍生的突变藻株。

[0088] 如本文所用术语“突变藻株”是指来自于最初的微藻和/或蓝藻的藻株,其保留了原藻株的特征,考虑到当根据上述本发明的方法,所述最初的微藻和/或蓝藻藻株的特征与根据本发明将其暴露于刺激下时所产生的代谢物组成有关。

[0089] 与本发明所述的方法配合使用的微藻和/或蓝藻可能已经经过预选择,如基于在与生产阶段所用相同的培养条件下的最佳生长。这个预选择或者适应阶段可在上文详述的方法步骤之前,依据下文描述的本发明的第二个方面,对其进行了更详细的描述。下文中描述的所有实施方案适用于本发明。

[0090] 因此,根据本发明的第二个方面,提供了用于生产或生长微藻和/或蓝藻或生产由

其衍生的至少一种代谢物的方法,所述方法包括:

[0091] (i) 适应阶段,包括将微藻或蓝藻培养于:

[0092] (a) 工艺用水原料中,并选择能够在工艺用水原料中生长的微藻或蓝藻,和/或

[0093] (b) 发光二极管(LED)下,所述发光二极管(LED)所发射的红光和蓝光的2个峰位于光波长为约400-700nm的光谱内;

[0094] (ii) 生产阶段,包括在与适应阶段所用相同的工艺用水原料中和/或在与适应阶段所用相同的光照条件下培养(i)的所选择的微藻或蓝藻。

[0095] 适应

[0096] 工艺用水原料可来源于工业处理系统或家庭废水系统。重要的藻类生长养分,如硝酸盐和磷酸盐,通常是存在于所述原料中。其他藻类刺激物也可能存在,如微量元素及维生素。食品、软性饮料和啤酒行业有很多这样的合适的工艺用水流。当添加的养分等同于标准生长培养基所用的水平时,也可用其他营养较不丰富的淡水资源。

[0097] 通常在适应阶段将微藻或蓝藻培养于工艺用水原料水中在最佳培养条件下,所述最佳条件包括但不限于:

[0098] -波长在约400nm至700nm之间的持续人造光,和/或

[0099] -在 $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 至 $200\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 之间的持续人造光;和/或

[0100] -在约 20°C 至 29°C 之间的温度;和/或

[0101] -在约pH7至pH9的之间的pH。

[0102] 可对工艺用水进行预处理,例如,为了减少颗粒。在适应阶段微藻或蓝藻的生长可以使用三角烧瓶(100-500ml)或制备型光生物反应器进行。光可由LED光源或其他非自然光发射。在一个优选的实施方案中,光由LED发射,所述LED发射的红光和蓝光的2个峰位于光波长为约400-700nm的PAR光谱内。在又一个优选的实施例中,通过发光二极管发射的红光的峰值在约500-665nm之间,优选为约660nm,所发射的蓝光的峰值在约440-500nm之间,优选为约460nm。

[0103] 在某些实施方案中,适应阶段的目的是,确定能在生产阶段过程的工艺用水原料中生长的微藻或蓝藻藻株。

[0104] 可选地,或另外地,光可以用来使微藻或蓝藻适应或“适合”生产阶段使用的条件,优选以优化在生产阶段的生长。在一个优选的实施方案中,适应阶段包括藻类和/或蓝藻在LED下生长,所述LED发射的红光和蓝光的2个峰位于400-700nm的PAR光谱内。在进一步优选的实施方案中,光由LED发射,所述LED发射的红光的峰值在约500-665nm范围内,优选为约660nm,且所发射的蓝光的峰值在约440-500nm范围内,优选为约460nm。

[0105] 适应阶段可包括将微藻或蓝藻藻株培养至少约2、3、4、5、6个月,优选至少约3个月。适应阶段包括将微藻或蓝藻藻株培养至少2、3、4、5、6、7、8代的生长,优选至少约6代生长。在使微藻或蓝藻生长数月或至少2代生长的实施方案中,微藻或蓝藻可传代培养,其中传代培养是指将培养物中的部分或全部转移到新生长培养基。在优选的实施方案中,使微藻或蓝藻每月或每4周进行一次传代培养。

[0106] 一旦微藻或蓝藻藻株已根据上述适应阶段被选择出来,方法的第二步就是生产阶段,该生长阶段包括使用与适应阶段所用相同的工艺用水原料和/或在与适应阶段所用相同的光条件下培养所选的微藻或蓝藻。

[0107] 术语“相同的”工艺用水原料是指来自于同一批次即具有相同特征、用于适应阶段的工艺用水,而不是适应阶段用于细胞生长的完全相同的培养基。

[0108] 本发明第二个方面的生产阶段可根据上文针对所述方法的第一方面所述的生产阶段的任何实施方案来进行。例如,适应的微藻或蓝藻藻株的生长,可以在允许指数生长的条件下进行。此外,生产阶段的生长优选在上述定义的光生物反应器中进行。在生产阶段使用的条件可反映适应阶段所用的条件。因此,除了利用工艺用水作为原料,所述适应可外延到其他环境条件,如上文所述(光波长、辐照度水平、温度、pH值等)。更具体地,适应可使用如本文所述的LED光照。在一个优选的实施方案中,适应是在400-700nm PAR光谱内的红光和蓝光的2个峰送递的LED光照。在进一步优选的实施方案中,光是LED发射的,所述LED发射的红光峰值在约500-665nm范围内,优选为约660nm,以及所发射的蓝光峰值在约440-500nm范围内,优选为约460nm。

[0109] 在某些实施例中,生产阶段之后的步骤可包括将微藻或蓝藻培养物暴露在刺激下,以提高代谢物生产。在本发明上下文中第一个方面所述的刺激的所有实施方案可比照适用于本发明第二个方面的方法中。此外,用于本发明第二个方面方法中的微藻和/或蓝藻藻株可选自上文已经描述的任意微藻和/或蓝藻门、目、科和/或种。

[0110] 本发明的第二个方面的方法可用于提高微藻和/或蓝藻生物质的生产。这样的生物质可用于如下文所述的应用如生产生物燃料、生物柴油、汽油、煤油,或用作土壤调理剂或生物肥料,包括用于地下灌溉系统。可选地,或另外地,所述方法可用来生产代谢物,包括但不限于提高脂质和/或碳水化合物的生产。在优选的实施方案中,所述方法用于提高二十碳五烯酸生产。在进一步优选的实施方案中,所述方法用于提高胞外多糖的生产。

[0111] 在本发明的再一个方面,提供了一种微生物,其是保藏在藻类和原生动物培养中心、保藏号为CCAP817/1的阿洛格绿蛇藻藻株,或是由其衍生的突变藻株,或具有所述藻株的识别特征。

[0112] 在本发明的又一个方面,提供了一种微生物,其是保藏在藻类和原生动物培养中心、保藏号为CCAP222/98的摄食胶网藻藻株,或是由其衍生的突变藻株或具有所述藻株的识别特征。

[0113] 本发明描述了由属于肋胞藻科(例如Trachydiscus sp.和绿蛇藻)的藻类生产脂质和代谢物二十碳五烯酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -亚麻酸、硬脂酸等类似物的方法。因此,本发明提供了用于制备和选择可用于生产藻类生物质产物所用的生物反应器和/或其他培养条件的所述藻类培养物的适应细胞的方法,所述藻类生物质产物含有本文所述的脂质和代谢物。更具体地说,本发明提供了用于生产和/或提高某些含脂肪酸脂质产量的方法。该方法可以包括通过提高光合效率、调整养分和代谢活性,制备属于肋胞藻科且含有上述脂质和脂肪酸的藻类,用于生产下游产品生物柴油、汽油、煤油和其他高价值化学品方法。另外,本发明提供了从形成二十碳五烯酸的藻类藻株中获得所需脂肪酸谱的方法。所述方法允许通过调节生长培养基中的某些养分水平(包括氮肥和硫)以及改变光辐照度水平来优化二十碳五烯酸的生产,用于食品行业或饱和脂肪酸或脂肪酸-肉豆蔻酸、棕榈酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -亚麻酸、硬脂酸等,用于液体生物燃料(S)生产或化妆品成分。本发明还提供了通过增加光合效率和代谢活性制备来自于蓝藻蓝球藻目(Chroococcales)的集胞藻属和聚球藻属的含有一些或所有上述脂质和脂肪酸的物种的方

法。本发明通过利用连续光,在存在光合成有效辐射(PAR)波长内的选择频段的情况下,调整光合效率,还提供了获得的脂质中脂肪酸特异性产物的方法。

[0114] 本发明还涉及到一个属于肋胞藻科具体为绿蛇藻属藻类的特定(分离)藻株,更具体为阿洛格绿蛇藻的藻株。所述藻株保藏在藻类和原生动物培养中心,保藏号为CCAP817/1,并于2011年1月25日被接受。本文表明,本发明显示所述藻株可用于特定代谢物的生产。

[0115] 本发明进一步提供了生产含有二十碳五烯酸和上述脂质、脂肪酸及其代谢物的藻类生物质产物的方法,适合下游产品生物柴油、汽油、煤油及其他这类液体生物燃料和高价值的工业化学品的生产,包括以下步骤:

[0116] a) 上游培养阶段,其用于使用调整连续PAR波长和工艺用水应力来分离、传代培养并制备调整的藻类,所述藻类属于绿藻门的物种,包括特别是富含EPA的肋胞藻科和蓝球藻目集胞藻属和聚球藻属。属于肋胞藻科和蓝球藻目集胞藻属和聚球藻属的藻类,现在可使用类似的光发射和水源在生物反应器中扩大培养。结果表明,与相同培养物在正常水、添加养分和日光或日光灯照明下生长相比,预计不同的藻株间生长速率增加两倍。

[0117] b) 光生物生物反应器阶段(Photobioreactor stage),其中,将属于绿藻门肋胞藻科或蓝球藻目集胞藻属和聚球藻属的藻类生长于工业工艺用水、+/-养分(100%的标准BB生长培养基,包括 NaNO_3 (0.25g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.075g/L); K_2HPO_4 (0.075g/L); NaCl (0.025g/L); KH_2PO_4 (0.175g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.98mg/L); H_2SO_4 (0.01 μl /L); H_3BO_3 (0.1142g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00882g/L); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.00144g/L); MoO_3 (0.00071g/L); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.00157g/L); $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.00049g/L); EDTA (0.005g/L); KOH (0.031g/L))中,在指数生长期维持连续流动系统中特定的PAR光波长和辐照度水平,以允许每日收获的特定比例的生物质。生物质产品含上述脂质、脂肪酸及其代谢物和属于肋胞藻科和蓝球藻目聚球藻属和集胞藻属的生物蛋白。生物反应器装满了工艺用水或用养分改良的工艺用水,使藻类细胞密度在下一个收获季节前恢复到指数生长阶段。

[0118] 相对于干燥的藻类的总重量,藻类通常含有约7-60%(重量/重量)的脂质含量。在藻类属于肋胞藻科的情况下,二十碳五烯酸包括脂质中25~40%的总脂肪酸,剩余的脂肪酸主要是上述的饱和或不饱和脂肪酸。因此,属于肋胞藻科的藻类拥有比来自鱼油的传统来源更大量的EPA。

[0119] 根据本发明的实施方案,属于肋胞藻科的脂类和代谢物二十碳五烯酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、山萘酸、月桂酸、亚油酸、 α -亚麻酸、硬脂酸等被发现可以作为游离脂肪酸和/或原位存在于生长培养基中和/或从湿藻类生物质产物和/或藻类匀浆物和/或冷冻干燥或空气干燥后的藻类得到,并在合适的有机溶剂的存在下和/或超声或超临界 CO_2 提取。

[0120] 在本发明的某些实施方案中,当带有藻类的生长培养基(用水修复或养分改良的水)流过生物反应器时,所述培养基被暴露于调整的多组LED灯库下,所述多组LED灯库位于生物反应器内部或外部,并包括发射红光和蓝光二极管(LED)独特模式,根据藻类藻株,将其设置为以不同波长运行。优化LED的角度以将辐照度最大化地递送到生长于PBR中的藻类培养物,以促进和维持藻类的指数生长期。不但监测藻类生物质的细胞密度,而且还监测其脂质/脂肪酸含量,以检查它们是否已经达到了目标水平。然后将生物质脱水并传递到合适的下游工艺,用于提取生物燃料或高价值脂肪酸。剩余的废生物质可用于动物饲料(如在生物反应器使用纯水)或用于在厌氧沼气池(AD)或热解系统进行能源生产。

[0121] 生物反应器

[0122] 本发明提供了一种集成方法,其使用标准或可再生能源的任意组合,来向光生物反应器提供动力并产生持续的高产率藻类生物质,所述能源如太阳能、风能、水能、地热、热和/或其他可再生能源。通过使用高效和有成本效益的方法,进一步精制藻类生物质来生产生物柴油、生物煤油、汽油、乙醇和其他有价值的副产品。

[0123] 所述系统包括高度调整的LED光源,其设计为使不同藻类藻株的生长最大化。所述系统包括但不限于,高度调整的LED光源,其设计为从生物反应器中心提供360度照明,从而使不同类藻株的生长最大化(在光源周围生长)。

[0124] 能量来源

[0125] 所述系统可以使用来自太阳能、风能、水能、地热和热和/或可再生能源的能量自供能。这些不同的能量源通过商业电力管理系统来管理,所述电力管理系统利用通过一个可扩展的存储设备(如蓄电池组)来存储和供应能量。

[0126] 所述方法的温度通过两种方式来控制:通过供应天然来自工业系统或家庭废水的工艺用水,加热水,由温控器或换热器调节或通过自动化处理控制单元管理。

[0127] 低能光源

[0128] 所述方法使用多种由标准和/或可再生能源组合提供动力的低压灯(如LED以及其他独特的发光源),其中将灯调整为优化藻类的生长,而不损害脂质或其他有商业价值的副产品。

[0129] 在优选的实施方案中,一组灯配备于PBR的外部或内部,所述灯以精确的光束发射角发射的光涵盖的波长位于400-700nm的光合有效辐射(PAR)波长范围内。这有助于刺激藻类,从而以具有成本效益的生产速率使生物质生长最大化。

[0130] 从现有环境自适应条件,采用特定的光源和波长、工艺用水、温度和pH值管理,选择藻类,以产生能在能源输入降低的情况下生长最佳的藻株。

[0131] 在一个实施方案中,本发明提供了在任意光生物反应器系统内提高摄食胶网藻ALG03藻类的胞外多糖(EPS)的新方法。这包括:(a)预培养,以使藻株适应光合有效辐射(PAR)波长内的调整的LED光照和工业工艺用水条件(如二级处理的工艺用水);(b)使形成EPS的藻株生长于PBR中,所述PBR补充了调整的LED PAR(光合有效辐射400-700nm)光照,以便每天在任何地方为藻类提供1-24小时的持续照明,(c)在指数生长期峰值后,将一部分例如约50%的产量移动到温和通风(环境空气,未添加CO₂)的静态照明容器系统中,超过3-4天,以提高的EPS的形成;(d)使藻类糊状物(paste)脱水,用于提取生物聚合物或如上所述的其他用途,或用于通过乙醇发酵或其他方法生产能源(如厌氧消化或生物质气化)。

[0132] 适合在本发明中使用的凝胶涂层微藻藻株的实例,可在绿藻门中并选自胶网藻科。

[0133] 适应的藻类藻株

[0134] 在标准烧瓶培养中,将用于EPS生产的微藻藻株维持在工业生产用水的异质供应物中,并通过低能LED设备以调整的光模式供应PAR光照。所述光在PBR的内部或外部供应。每个月将培养物进行传代培养,以选择适应废水成分和LED光照的细胞。这种表型选择方法包括在每一次传代培养时检查EPS生产的评估步骤。将母本培养物维持在这些生长条件下,以继续该适应过程。

[0135] 藻类在光生物反应器 (PBRs) 的生长

[0136] 为了发展生产微型藻类 (G) 的小规模PBRs,已经做了大量工作。商业规模的PBRs (>100,000L) 应该有大体积容量,并且占用空间而言应具有小足迹。此外,它们应该有透明的表面、高质量转移速率并且应该能够生产大的生物质产量。此外,任何PBR设计都应考虑采取个别微藻藻株的独特需求,并且应当是低成本维护和稳健的。

[0137] 有人曾提出,PBRs也可以作为室外池塘生长系统的培养容器。鉴于户外PBRs通常是利用太阳光自然照明,生物质生产力将取决于当地现行的全年环境条件。在已经测试的大部分地区(通常沙漠环境),全年存在温度和日光季节性变化,因此在这类地区难以一年到头在室外进行大量藻类培养。公共领域存在正被商业出售的PBRs设计,在学术文章中也有许多PBRs设计,但不存在确定的“最佳实践”标准模型。

[0138] 在第一组实施方案中,可以使用任何PBR设备(气升管设计或扁容器),所述设备具有每天排空或收获细胞的装置,该装置可以采用LED(内部或外部)光照的PAR波长部分连续一天24小时照亮。藻类生长情况由连接的进程控制装置测量OD680nm的值来检测,该值通过事先推算与细胞数量有关并允许由PBR调试确定指数增长峰值。所述系统包括但不限于,包括高度调整的LED光源,所述光源设计为从生物反应器中心提供360度的照明,以使不同藻类藻株的生长最大化(在光源周围生长)。

[0139] 到达指数生长峰值后,每天将50%的细胞收获到一个单独批次的存储罐(holding tank),其具有连接的通风装置(aeration)(环境空气混合)和LED光照24/7。为了生产EPS,藻株在规定的条件下生长3-4天,每天在显微镜下可视化监视从所述存储罐中取出的样品。最后,将这些细胞通过脱水提取用于碳水化合物提取或前面描述的用途。

[0140] 光源

[0141] 藻类培养系统可以由人工灯、日光或两者照明。在封闭的PBR中控制高生物质微藻生产的最重要因素之一是,送递的光谱质量和光辐照度。如果PBR位于户外,它可以受限于白天和夏季几个月期间见到的高光水平,但这会因地域而不同。自然日光中紫外光(“UV”)的水平也能在一天某些时间引起藻类的光抑制,因此缺乏对使用人造光的PBR生长的潜在控制。

[0142] 一个可以提供特定的光波长的主要光源是发光二极管(“LED”),其目前正在由几个主要的灯制造商开发。LEDs能节约能源且预期寿命很长。它们的电气效率有助于最大限度地减少热量产生。这种高效率和尖锐的光谱已经消除了冷却系统和过滤器的需要,因此显著降低了能量输入的要求。这些因素开拓了优化用于特定微藻藻株的光送递的潜能。

[0143] 已知哪部分光合有效辐射(PAR)光谱(400-700nm之间,涵盖了红色和蓝色的频谱两端)通常有助于使藻类的有效光合作用最大化,但少量数据存在(在公共领域)这种光辐照在用于对于生长于PBR内、人造光源下的不同藻类藻株而言,(在公共领域)有关这类光辐照度与生物燃料前体(脂质/碳水化合物)的生长和生理状态的相互作用的数据很少。申请人已经发现了红/蓝色LED要求和为一系列微藻和本文EPS生产的双阶段方法送递的辐照度水平。

[0144] PBR系统的可持续能量输入

[0145] “废水”流的潜在用途一直在文献中被连篇累牍地争论,纯净的烟气为用作藻类生长的营养培养基的改良的工艺用水提供CO₂。目前存在几个已经确立的有意义的或成功的

示范项目。据估计,使用混合系统,藻类可用于回收电力行业20%的二氧化碳排放量。如果可以开发捕获二氧化碳的新型和便宜来源,这会降低PBRs的成本和能量需求。

[0146] 使藻类在工业工艺用水中生长的方法,能将养分水平降低至通过世界各地逐步形成严格的立法目标而对水排放至环境尤其是特定贮水池所潜在要求的水平。

[0147] 申请人已发现在控制的温度和光辐照度水平下,本文所述藻类有成本效益地生长所需的最佳养分水平。

[0148] 藻类生物质和生物聚合物

[0149] 海藻多糖目前已被商业应用(d),人们已知土壤藻类分泌多种胞外聚合物(EPS),尤其是多糖,其对藻类的生命功能发挥了重要作用(e)。形成胞外多糖(EPS)的藻类藻株还具有用于水中来通过将潜在的有毒元素隔离在分批阶段和分批阶段之前所形成的EPS中修复的优点。有明确的证据证明,如同铜的元素可以被这些粘液化合物(I)约束。如果以下游排放和使用作为水清理的主要目的,则这具有明确的价值。对EPS组成进行的碳水化合物分析表明94-95%的中性单糖和约5-6%的糖醛酸。后者对重金属的结合特别重要。

[0150] 已知的是,土壤藻类增强土壤形成和水分保持、稳定土壤、增加附近生长的植物的养分的有效性以及减少水土流失。它们作为土壤调理剂在许多国家得到介绍,并且它们也被建议用作生物肥料(J)。

[0151] 在使用灌溉系统的以色列,降低'甜'水供应,会增加使用再生水的需要,并且二级处理水已用于市场新鲜蔬菜和水果生产。然而,对于其广泛使用,在许多国家确实需要修订法规,即使使用SDI,其中处理水没有达到作物的可食用部分(地上)。

[0152] 传统的滴灌见于地上,但最近许多生产滴灌系统的公司发明并实施了地下滴灌(SDI)系统。为了更长的寿命,该线路被埋入地面以下。地下灌溉允许将水、养分和其他农用化学品直接精确应用到植物根区。这允许农民优化生长环境并产生更高质量的作物产量。

[0153] 如果正确管理,SDI是灌溉植物最有效的方法之一,其效率>90%。与其他方法相比,应用水的节约可高达50%。可供灌溉的水量预计将在未来几十年下降,因此对水的保护更重要。这是SDI通过延长含水层寿命而体现其关键性之处。其用于生物燃料作物有很大的潜力,并且在贫瘠的土壤中已经证明,使用SDI能使甘蔗产量增加一倍,在保留70%的用水需求的同时糖含量增加(k)。摄食胶网藻ALG03的适应藻株的胞外多糖,也可用于使用所提取的碳水化合物进行生物乙醇的下游生产。剩余的碳水化合物和蛋白质可用于其他副产物,例如食品添加剂和动物饲料。

[0154] 通过参考以下非限制性实施例,会进一步理解本发明。

实施例

[0155] 实施例1

[0156] 将属于肋胞藻科或蓝球藻目集胞藻属和聚球藻属的藻类在养分改良的水和连续PAR光照条件下(400-700nm的波长内)预培养6个月的时期,并以有规律的间隔进行传代培养。将分离的培养物进一步传代培养,使它们进入指数生长期,并用于一系列50L的生物反应器中。传代培养的藻类被转移到含有养分改良水的50L生物反应器中,并允许在持续PAR光照条件存在下(波长在400-700nm之间)达到指数生长期,取自所述传代藻类的接种物的起始细胞密度为每毫升 10^6 个细胞。控制所述方法的各种参数,包括:pH值(保持在6-9之

间)、温度(保持在20-40℃之间)、通风(0.02~1.0v/v/m(体积/体积/分钟)-空气体积/液体体积/每分钟)和/或CO₂(启动时0%,第一次收获完成至少0.7%,但在系统内随时间可以达到5%);O₂(保持在500-800mV之间);在PBR通风的第一室最大的光辐照度(600μmol m⁻²s⁻¹),CO₂(在开始时添加的CO₂为0%,通过收获上升到0.7%),细胞密度,温度(27℃平均)和光送递(每天24小时)。在到达最大指数生长附近后,从反应器中取出500g湿藻类生物质产物。加入含有甲醇/乙酰氯/己烷的溶剂混合物,生产天然脂质酸的甲基酯。通过层析使用己烷和丙酮溶液分离该甲基酯,随后蒸发,获得1.6g二十碳五烯酸。层析还提供了肉豆蔻酸、棕榈酸山萆酸、月桂酸、亚油酸、α-亚麻酸、硬脂酸等的纯样品。

[0157] 实施例2

[0158] 50.08g生物质在105℃干燥6小时。在容器中冷却后,将样品在烘箱中于105℃下放置1小时,再次称重。在索氏提取器(S Soxhlet extraction device)中,将干燥生物质在提取容器(extraction capsule)中用260ml石油醚提取8小时。在真空旋转蒸发器中蒸发掉溶剂后,通过使氮气细流在样品上通过,进一步干燥样品,再次冷却后称重。为了获得脂质,将样品溶解于50ml己烷,并分为两半。向第一个样品中加入10g活性炭,将溶液过滤,再次蒸发、流出氮气并称重。仍然存在一些颜色,因此第二个样品使用20g活性炭。

[0159] 样品分析使用安捷伦科技(Agilent Technologies) 6890N和柱HP88,氰丙基-长度:100m-直径:0.25mm,层宽度:0.20μm。

[0160] 表1. 来自3个不同批次PBR周期的、代谢途径连接的3种脂肪酸百分比的分析结果

[0161]

脂肪酸	阿洛格绿蛇藻内脂肪酸 ME 在总脂中的百分比		
	对数期生长即将结束	对数生长后部分应激(收获第一天)	完全应激后(第3天-稳定期)
γ-亚麻酸(GLA)	18.0	11.0	0.7
花生四烯酸(ARA)	2.4	3.7	0.0
二十碳五烯酸(EPA)	20.0	23.5	27.0

[0162] 结果清楚地表明,从GLA经由ARA至EPA的转变,因为如上文所述,藻株生长而后被诱导进入刺激后稳定期。这表明本文所述的方法直接管理感知的代谢途径,其允许淡水微藻内γ-亚麻酸和二十碳五烯酸之间经由花生四烯酸互换转化。

[0163] 实施例3

[0164] 使摄食胶网藻(ALG03)在BB培养基中生长4天以上。附图5a显示了藻类在27℃、最佳光辐照度下的最佳生长需要相对较低的养分水平。附图5b显示在27℃下,在25%的BB培养基中,在低光下,藻类的生长最好,超过7天。

[0165] 在一个连续的生产过程中,每天连续收获摄食胶网藻(ALG03)。生物量以PBR的光密度(680nm处)读数显示,图7显示,当补足了新的生长培养基时,每天以50%的速率收获能使摄食胶网藻(ALG03)的同样生物质在24小时内再生。

[0166] 使生理适应的细胞在来自市政工厂废水(二级处理)中生长6个月,并每四周再培养到新废水中。将非适应的细胞在标准的ZBB生长培养基中培养,并每四周在新ZBB培养基中再培养。然后使这两个藻株在新废水中生长9天(直到稳定期)。结果(图8)显示,预适应的细胞对废水环境和LED光照明显适应。图9显示在2个阶段PBR方法后,EPS的产量加倍。

[0167] 所述方法的后续步骤包括纯化、利用HCl甲醇和三氟乙酸分离EPS以及水解样品。

[0168] 胞外多糖包括94-95%的中性单糖与5-6%糖醛酸。一些中性单糖是部分甲基化的。主要的糖是:

[0169] 半乳糖(约20-21%)

[0170] 葡萄糖(约20-21%)

[0171] 未经确认的己糖(约12-13%)

[0172] 鼠李糖(约12%)

[0173] 未经确认的甲基化己糖(约9-10%)

[0174] 未经确认的甲基化己糖(约7-8%)

[0175] 甘露糖(约6-7%)

[0176] 木糖(约3-4%)

[0177] 阿拉伯糖(约1-2%)

[0178] 未知单糖(约高至0.5%)

[0179] 未知单糖(约0.5-1.0%)

[0180] 糖醛酸(约5-6%)。

[0181] 水解EPS的干燥凝胶和冻干样品中的糖摩尔比显示在表2中。

[0182] 表2

[0183]		糖的摩尔比 (%)	
		F1	F2
	岩藻糖	2,73	0,81
	鼠李糖	10,20	15,54
	阿拉伯糖	5,34	8,28
	半乳糖	9,83	15,10
[0184]	葡萄糖	65,31	51,12
	甘露糖	4,32	6,86
	木糖	2,27	2,29

[0185] 实施例3

[0186] 从图11的图像可以看出,温室试验中,利用滴灌使韭菜在贫瘠的沙质土壤中生长超过12周的时间段的结果。从左到右依次为:没有藻类的对照;菌根真菌共生体(球囊霉(*Glomus* sp.)的混合物)用于种植;每周使用的藻类;藻类和菌根真菌共生体。结果清楚地

表明,摄食胶网藻ALG03细胞每周两次加入对韭菜生长和养分的生长促进效果。观察到藻类细胞与适应的菌根真菌共生体混合物一起使用的协同作用。

[0187] 另外,本发明的范围并不限于本文所述的具体实施方案。事实上,根据前面的描述和附图,除了本文所述的以外,本发明的各种修改对本领域技术人员来说是显而易见的。这样的修改都将落入所附权利要求书的范围内。此外,本文所描述的本发明的所有方面和实施方案都被认为是广泛适用的,并可与任何且所有其他兼容的实施方式合并,包括酌情取自本发明的其他方面(包括分离)的实施方案。

[0188] 本文引用了各种出版物,其公开的内容通过引用整体并入。

[0189] 参考文献

[0190] a.Chisti Y-2007-Biodiesel from microalgae (来自微藻的生物柴油).Biotechnol.Adv.25(3):294-306.

[0191] b.Olaizola M-2005Microalgal removal of CO₂from flue gases:Changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures (微生物除去烟气中的CO₂:培养基pH和烟气组成的变化似乎不影响微藻培养物的光化学产率).The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering8:60-367.

[0192] c.Braun AR-1996Reuse and Fixation of CO₂in Chemistry,Algal Biomass and Fuel Substitutions in the Traffic Sector (在化学、藻类生物量以及交通部门燃料替代这种的再利用和固定).Energy Convers Manage.,37:1229-1234.

[0193] d.Bitton R&Bianco-Peled H-2008Novel Biomimetic Adhesives Based on Algae Glue (基于藻类胶的新的仿生粘合剂).Macromolecular Bioscience8:393-400.

[0194] e.Otero A&Vincenzini M-2003Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity (利用受氮源和光强度影响的念珠藻合成细胞外多糖).J.Biotechnol.102:143-152.

[0195] f.Gonzalez-Chavez C.,D'haen J,Vangronsveld J.&Dodd JC-2002Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different Glomus spp.of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the same polluted soil (分离自同一污染土壤的丛枝菌根的不同球囊霉菌的根外菌丝对铜的吸附和积聚).Plant and Soil240:287-297.

[0196] g.Ugwu CU,Aoyagi H and Uchiyama H-2008Photobioreactors for mass cultivation of algae (藻类大量培养的光生物反应器).Bioresource Technology,99, 4021-4028.

[0197] h.Choul-Gyun Lee-1999Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors Biotechnol (光生物反应器技术汇总光穿透深度的计算).Bioprocess Eng.,4,78-81.

[0198] i.García-Meza,JV,Barrangue C&Admiraal W-2005Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings (通过藻类的生物膜形成作为在尾矿上存活的机制).Environ.Toxic.&Chemistry.24:573-581.j.Painter TJ-1993Carbohydrate polymers in desert reclamation-the potential of microalgal

biofertilizers (沙漠开垦中的碳水化合物多聚体-微藻生物肥料的潜力). Carbohydrate Polymers, 20, 77-86.

[0199] k.<http://www.netafim.com/article/sugarcane--philippines>.

[0200] (1) Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., 2002. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater eustigmatophyte *Monodus subterraneus* (十二碳五烯酸淡水黄绿藻蒜头藻 (*Monodus subterraneus*) 中的生物合成). J. Phycol. 38, 745-756.

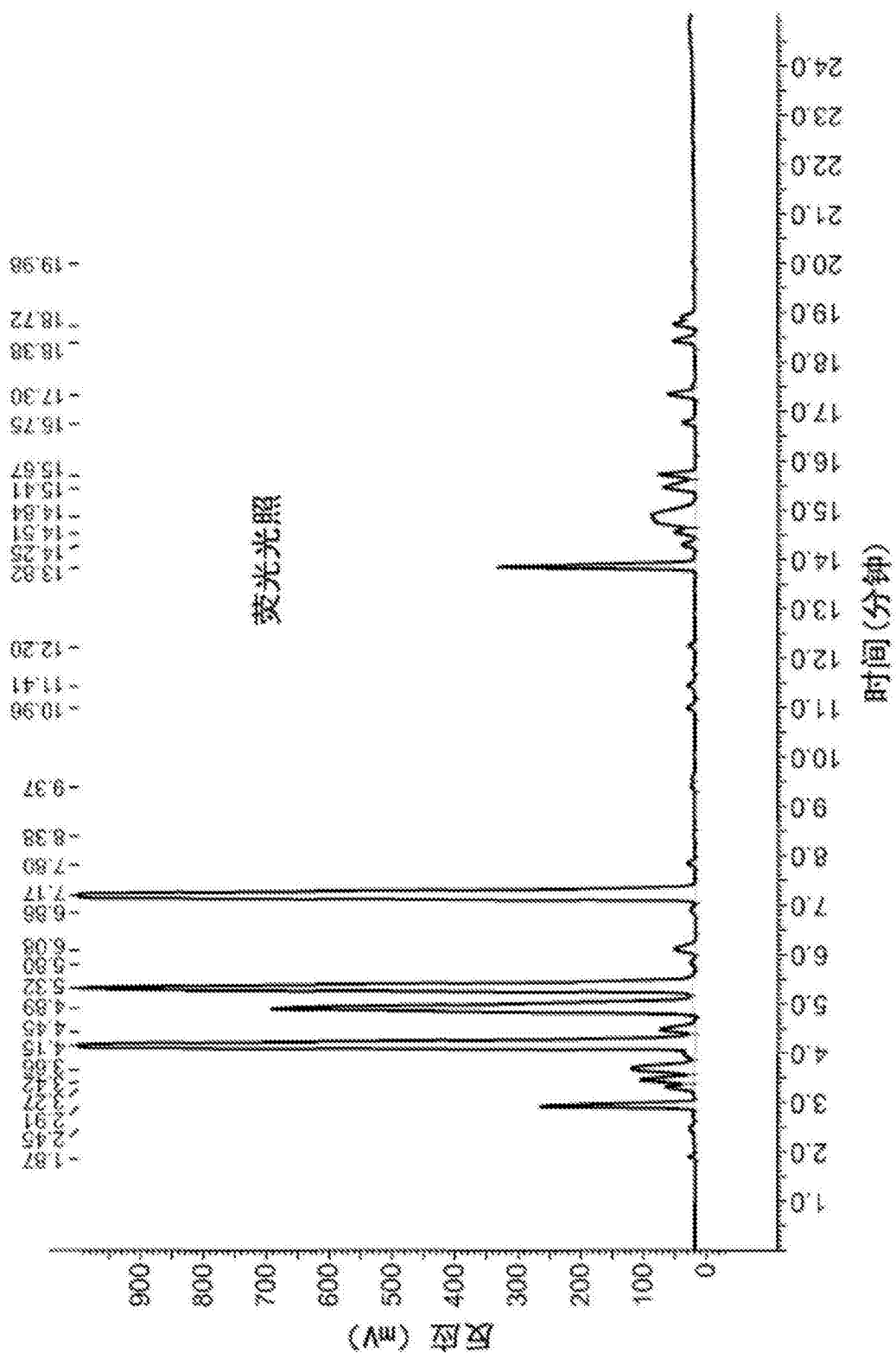


图1

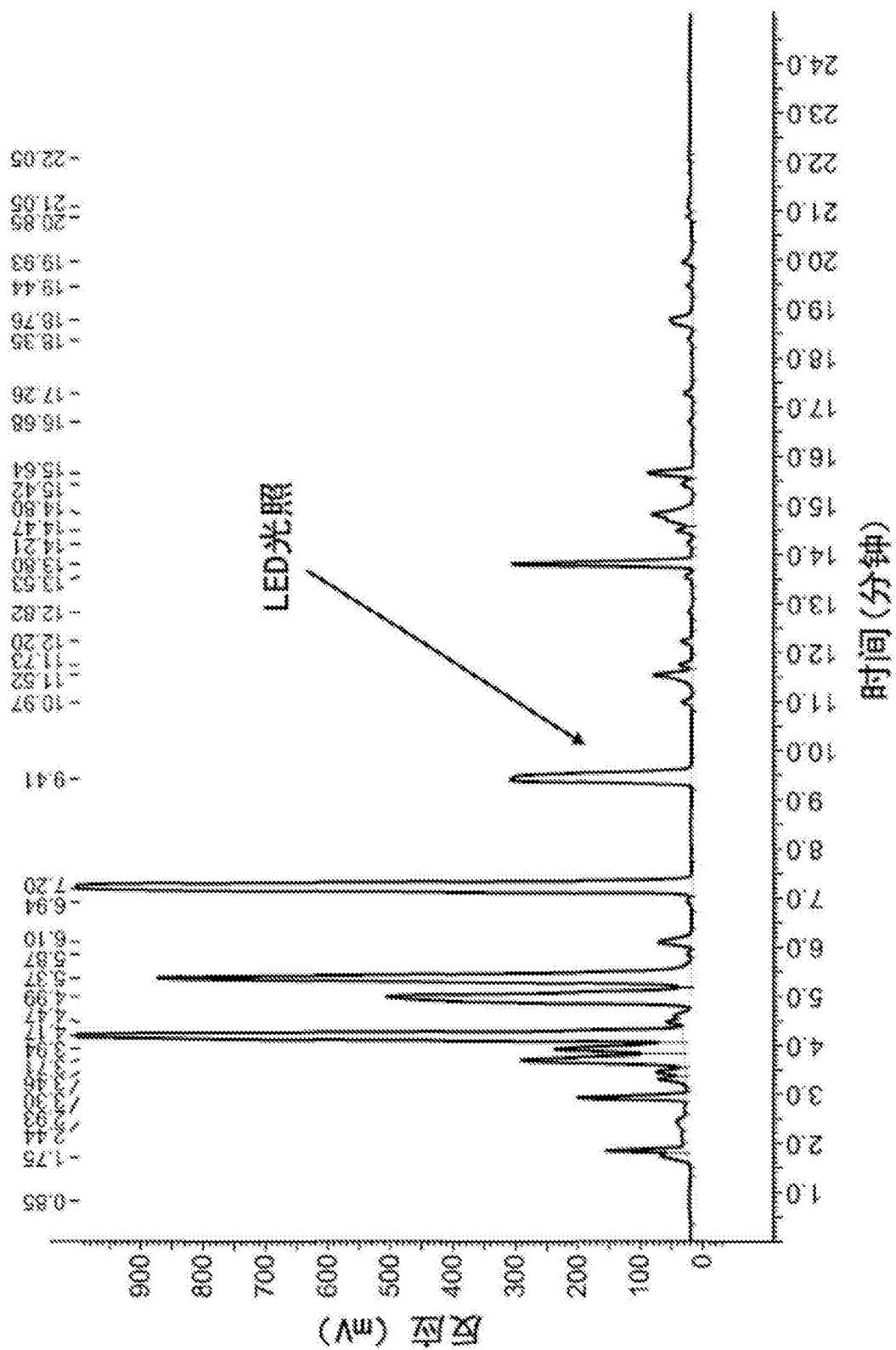


图1(续)

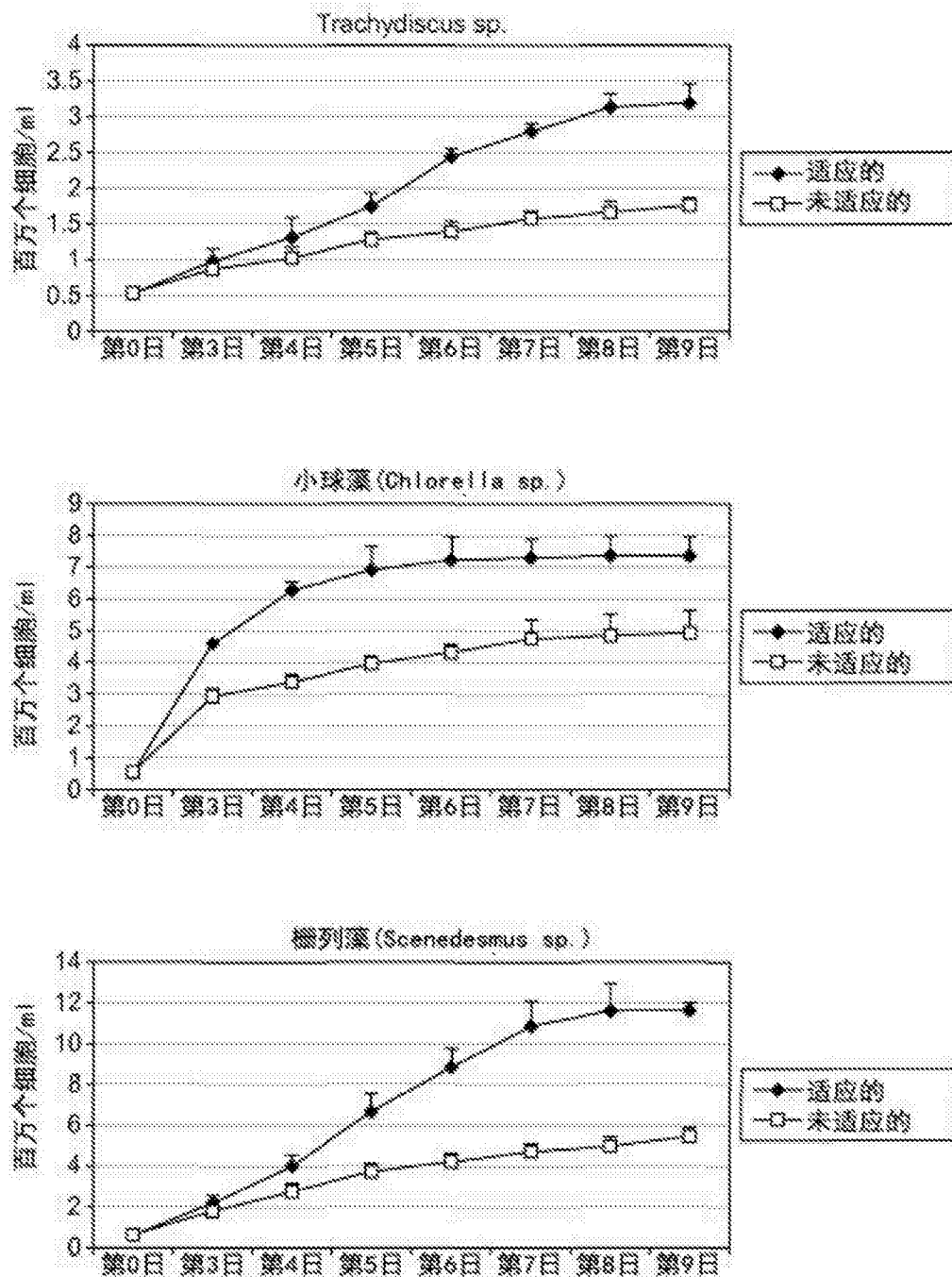


图2

微藻/蓝藻	碳水化合物	脂质	蛋白质	燃烧热
小球藻 ALG04	29±3%	7±2%	53±6%	22.14MJ/Kg
栅列藻 ALG06	13±2%	10±1%	66±6%	20.19MJ/Kg
Trachydiscus sp. ALG01	27±4%	24±4%	43±8%	22.56MJ/Kg

图3

脂肪酸	%占总脂肪酸含量
月桂酸 C12:0	5.5
肉豆蔻酸 C14:0	23.4
棕榈酸 C16:0	10.1
硬脂酸 C18:0	2.0
亚油酸 C18:2n6	4.3
α -亚油酸 C18:3n3	2.6
二十碳五烯酸 C20:5n3	27.0
山萘酸 C22:0	7.1

图4

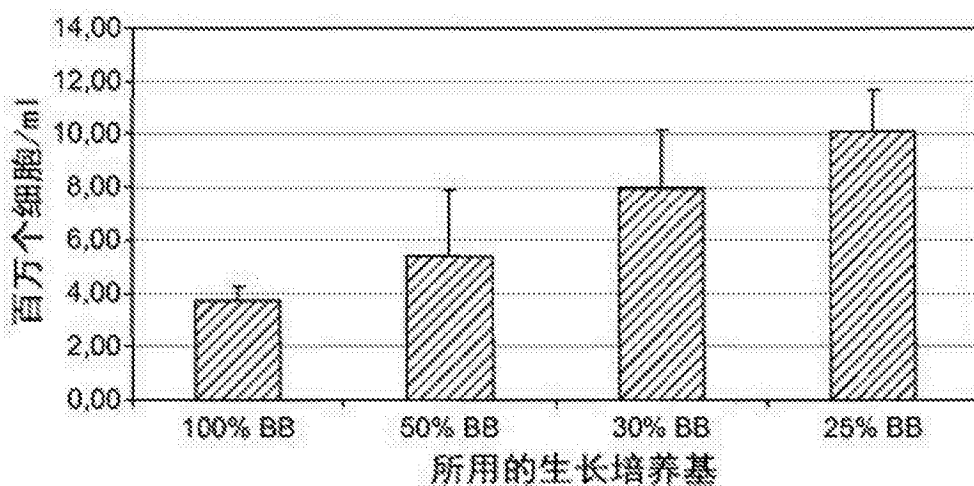


图5A

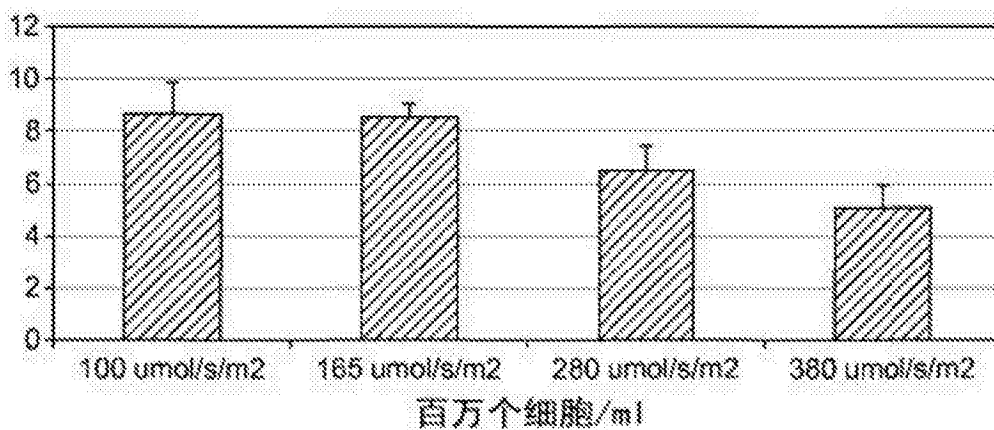


图5B

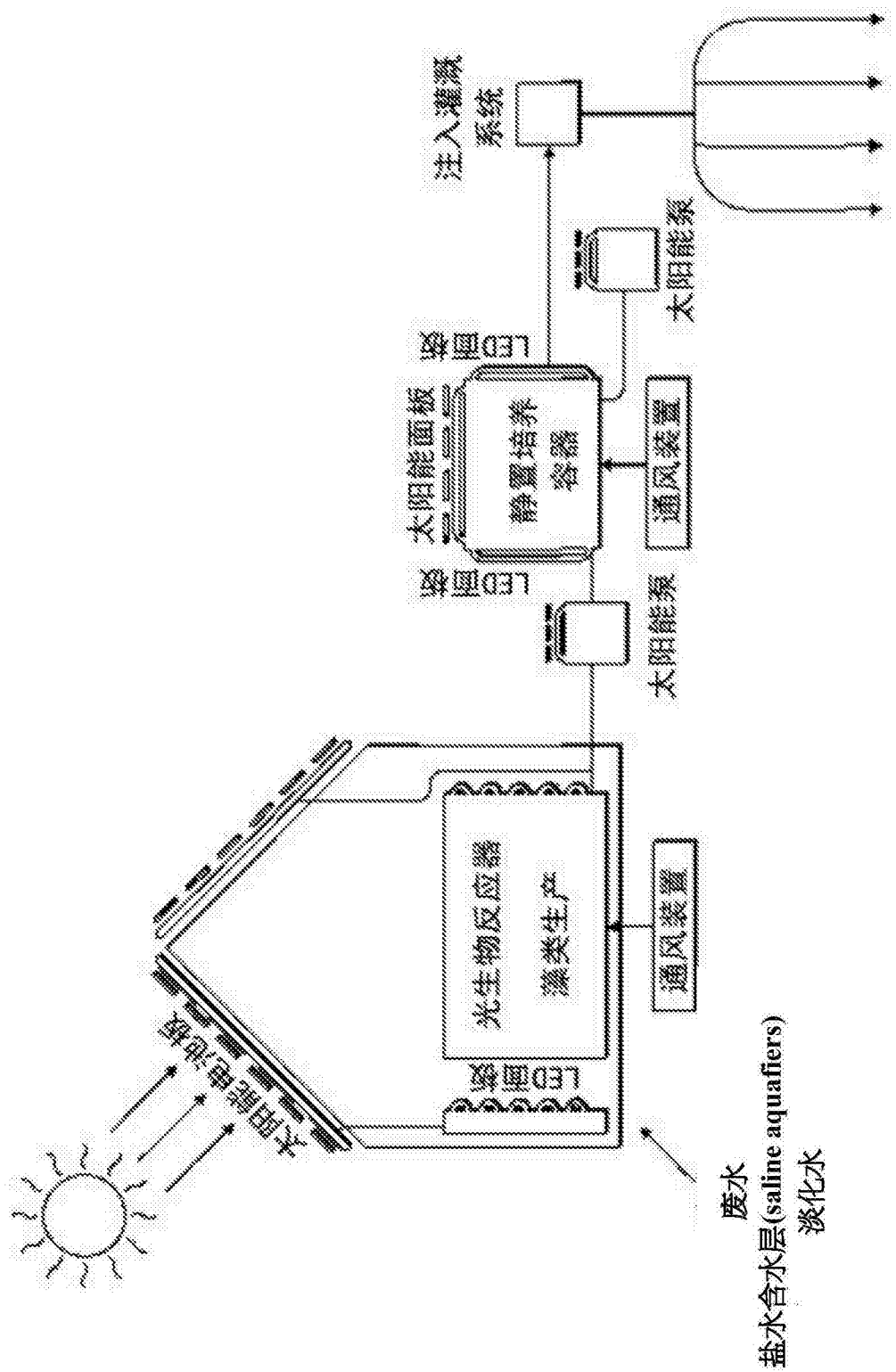


图6

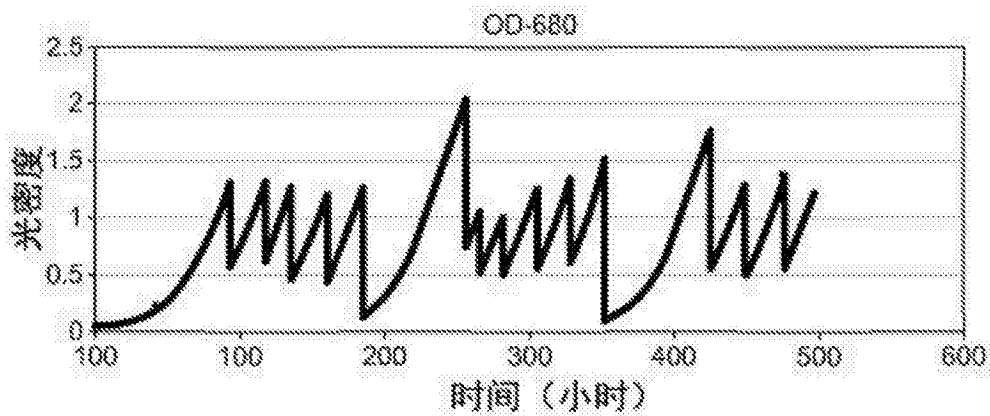


图7

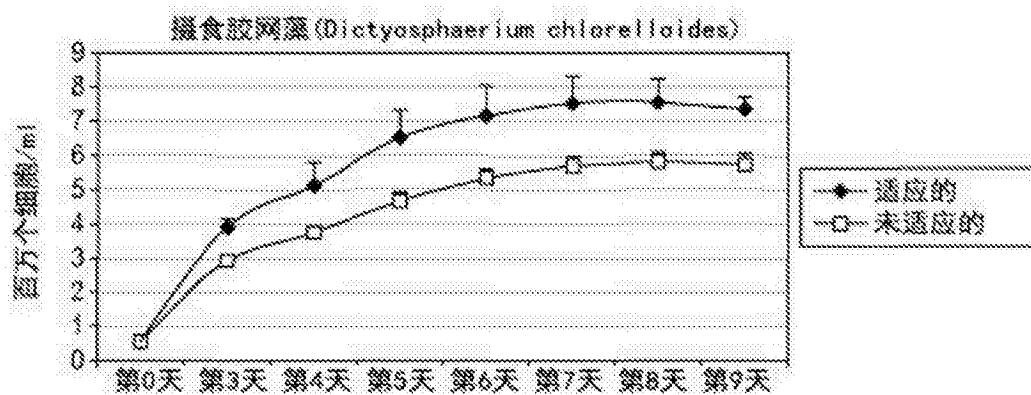


图8

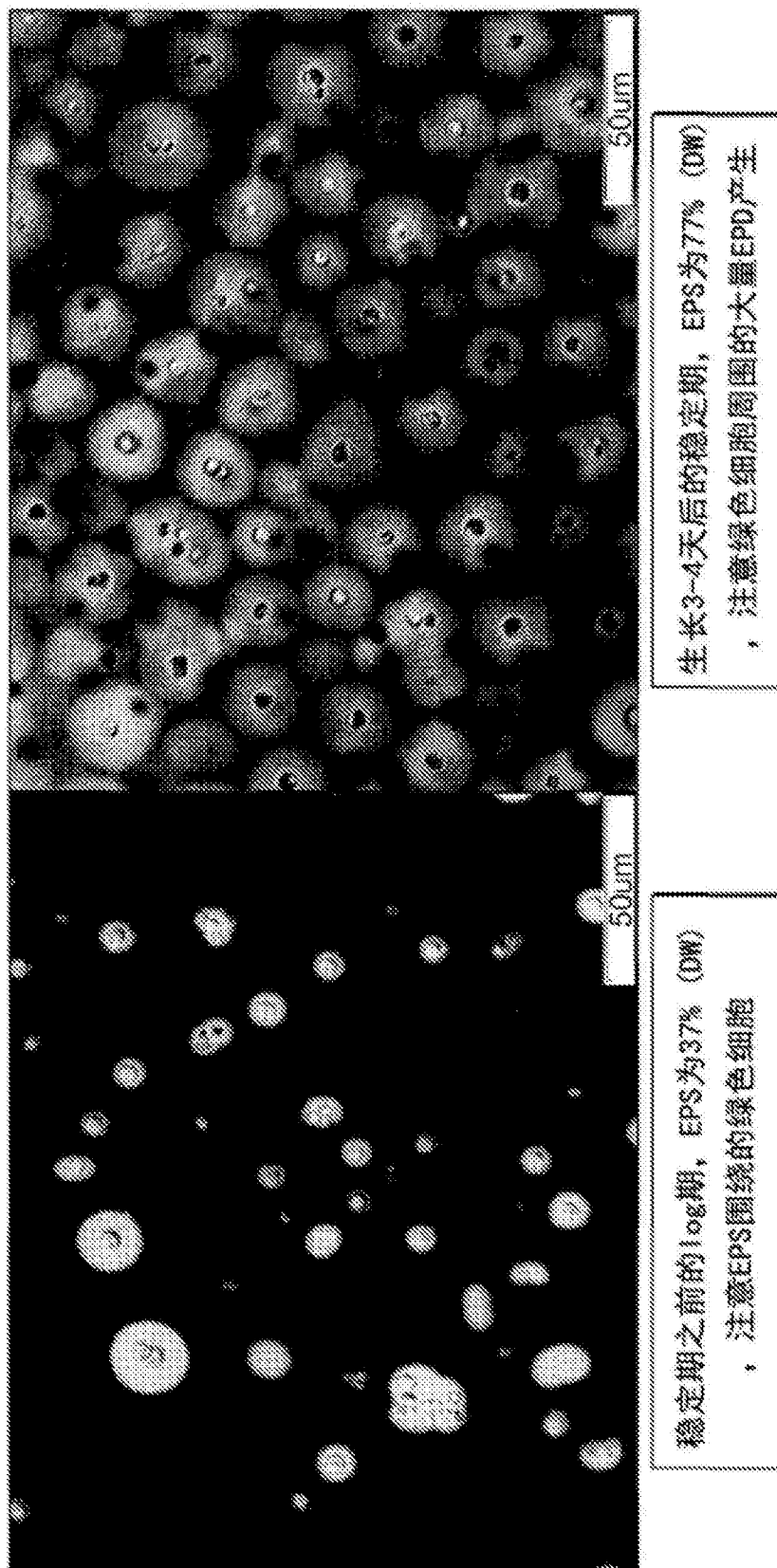


图9

微藻/蓝藻	碳水化合物	脂质	蛋白质	燃烧热
小球藻 ALG04	29±3%	7±2%	53±6%	22.14MJ/Kg
摄食胶网藻 ALG03	38±4%	5±2%	41±7%	20.10MJ/Kg
集胞藻 ALG06	13±2%	10±1%	66±6%	20.19MJ/Kg

图10

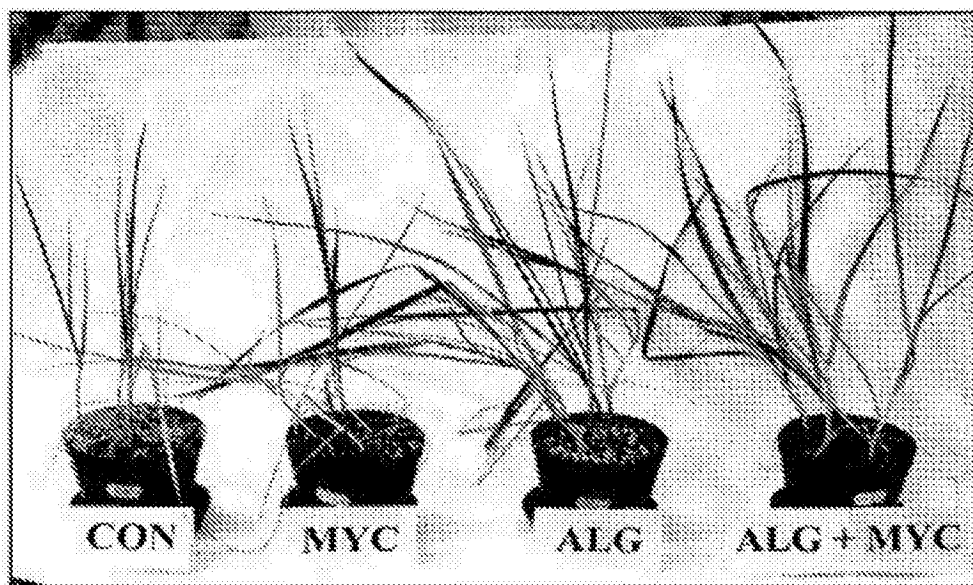


图11A

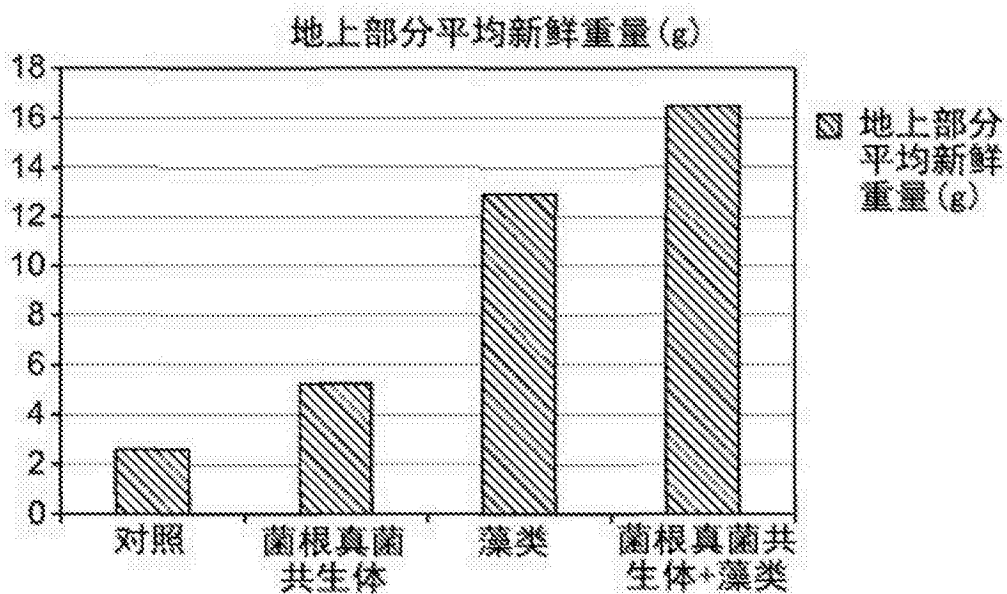


图11B