



(21) 申请号 202110188801.5

(22) 申请日 2021.02.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113278576 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(30) 优先权数据
10-2020-0020846 2020.02.20 KR

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145

(72) 发明人 沈相俊 俞炳先 成咏俊 洪珉义

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
专利代理师 马爽 臧建明

(51) Int.Cl.

C12N 1/38 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106566775 A, 2017.04.19

CN 108410939 A, 2018.08.17

Wanida Pan-utai.Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis: Organic and inorganic.Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.2017,152-158.

审查员 吕健

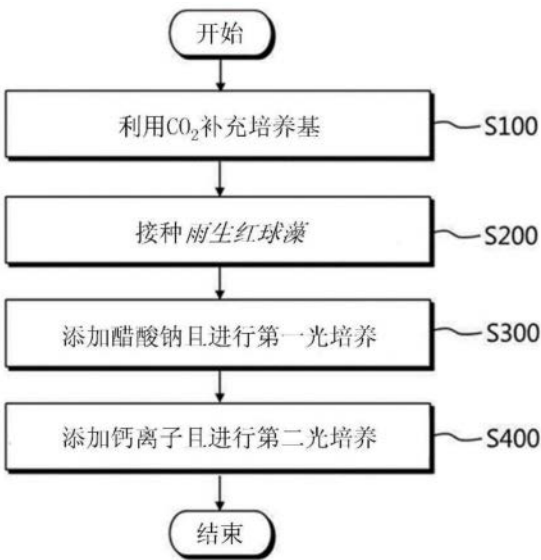
权利要求书1页 说明书10页 附图19页

(54) 发明名称

用于使用生物矿化来生成雨生红球藻的方法

(57) 摘要

本发明公开一种用于使用生物矿化来生成雨生红球藻的方法。根据一个实施例,方法包含:(a) 利用二氧化碳补充培养基以形成碳酸氢根离子(HCO_3^-) (步骤S100); (b) 将雨生红球藻接种于补充有二氧化碳的培养基中 (步骤S200); (c) 向接种有雨生红球藻的培养基添加醋酸钠,紧接着进行第一光培养 (步骤S300); 以及 (d) 向添加有醋酸钠的培养基添加钙离子(Ca^{2+}) 以形成碳酸钙(CaCO_3),紧接着进行第二光培养 (步骤S400)。



1. 一种用于生成雨生红球藻的方法,其杀灭附着于雨生红球藻细胞的表面的由细菌、真菌以及除雨生红球藻以外的微藻中选出的微生物,并培养雨生红球藻,包括:

- (a) 利用二氧化碳补充培养基以形成碳酸氢根离子 HCO_3^- ;
 - (b) 将雨生红球藻接种于补充有所述二氧化碳的所述培养基中;
 - (c) 向接种有所述雨生红球藻的所述培养基添加醋酸钠,紧接着进行第一光培养;以及
 - (d) 向添加有所述醋酸钠的所述培养基添加钙离子 Ca^{2+} 以形成碳酸钙 CaCO_3 ,紧接着进行第二光培养,
- 其中在步骤(d)中,以8mM到18mM的浓度添加所述钙离子,
- 其中当在步骤(c)中雨生红球藻细胞的密度为1.0克/升或大于1.0克/升时进行步骤(d)。

2. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中在步骤(c)中,以5mM到15mM的浓度添加所述醋酸钠。

3. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中在步骤(d)中,通过利用氯化钙 CaCl_2 补充所述培养基来添加所述钙离子。

4. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中由细菌、真菌以及除雨生红球藻以外的微藻中选出的至少一种微生物,所述微生物在步骤(a)到步骤(c)中的至少一个中产生且通过利用所述碳酸钙 CaCO_3 的包封而被杀灭。

5. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中雨生红球藻的电动电势在步骤(c)中为自-30电子伏特到-34电子伏特,且雨生红球藻的电动电势在步骤(d)中为自-6电子伏特到-10电子伏特。

6. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中形成于雨生红球藻细胞的表面上的所述碳酸钙 CaCO_3 诱导雨生红球藻的大小增加,且所述碳酸钙 CaCO_3 与大小增加的雨生红球藻细胞的表面分离。

7. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,其中在步骤(d)中,向所述培养基添加碱性溶液以将所述培养基的pH维持在7.5到8.5。

8. 根据权利要求1所述的用于生成雨生红球藻的方法,进一步包括在步骤(d)之后将所培育的雨生红球藻与所述碳酸钙 CaCO_3 分离。

用于使用生物矿化来生成雨生红球藻的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于使用生物矿化来生成雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 的方法,且更具体地涉及一种在雨生红球藻的兼养培育期间基于通过生物矿化进行的污染控制来生成含有高细胞密度和大量虾青素的生物质的技术。

背景技术

[0002] 由使用化石燃料而引起的大规模的温室气体排放导致了全球变暖现象。根据这些情形,全世界都在积极地研发用于二氧化碳减少的碳捕获和封存 (carbon capture and sequestration; CCS) 技术。CCS 技术是指将自各种碳源 (包含热电厂) 释放的大量二氧化碳聚集、捕获且注入至地下或海床中以将所述二氧化碳与大气隔离的方法。CCS 技术在较短时间内减少大量二氧化碳方面为有效的,但存储不稳定、位置选择困难和安装成本高的问题使 CCS 技术实质上难以实现。因此,用于在工业应用中直接利用二氧化碳或将二氧化碳转换成高附加值材料而非封存二氧化碳的碳捕获和利用 (CCU) 技术近年来已受到比 CCS 技术更多的关注。在韩国,也已对研发用于将二氧化碳转换成高附加值材料的工艺进行了尝试。特定来说,用于利用微藻光合微生物的二氧化碳转换的生物工艺已作为能够生成各种高附加值材料 (如生物燃料、生物塑料以及生物药品) 同时实现二氧化碳减少的经济技术而受到关注。微藻 (称作浮游植物) 是进行光合作用的水生单细胞生物。由于微藻具有生成能源和工业材料并减少温室气体的能力,因此微藻作为高潜力的生物质资源而越发受到关注。将来,出于以下原因,微藻的效用价值预计将在工业领域 (特定来说能源、化学以及环境领域) 中有所提高。

[0003] 在能源领域中,微藻在所有生物柴油生成作物当中具有最高的产油率。大豆、芥花、葵花、油棕等的培育周期为4到8个月,而由于微藻具有在一天中增殖若干次的能力,因此微藻可每日进行培育。因为微藻每单位重量具有较高的油脂含量,所以微藻的年产油量至少是大豆的年产油量的100倍。此外,微藻是将食品资源转换成能源的不含争议的生物资源,且可生成具有与石化柴油类似的物理性质的生物燃料。

[0004] 在化学领域中,微藻可生成大量有价值的物质。目前,微藻已主要在食品领域进行了工业化,且将来将在各种应用 (如生物化学品和生物塑料) 中进行工业化。

[0005] 在环境领域中,如上文所描述,微藻由于其具有减少二氧化碳的能力而受到最多的关注,且微藻的相关研究已经在世界范围内持续进行。微藻可吸收约为生物质重量的两倍的量的二氧化碳,这对应于比陆地植物的吸收效率高10到50倍的吸收效率。此外,在不考虑特定土壤或水质的情况下培育微藻。相关公司正在推广试验,以利用微藻进行二氧化碳减少和工业废水净化。

[0006] 自养模式、异养模式和兼养模式用于微藻培育。自养条件下的培育将固定的二氧化碳用作碳源和光能来合成有机化合物。这种培育模式的优点是可生成含有大量脂质的生物质,但缺点是培育周期较长。异养条件下的培育需要额外碳源作为能量源。这种培育模式的优点是培育周期较短,这表明生产率较高,但在获得大量高附加值材料方面存在限制并

且容易受到污染,如细菌和真菌污染。兼养条件是指自养条件与异养条件的组合。兼养条件下的培育有利于在较短时间内生成含有大量高附加值材料的生物质,但容易受到污染,从而限制了其规模化。这些培育模式根据微藻的条件而加以采用,但由于生物工艺的特性而受到每单位面积的二氧化碳减少率较低的限制。因此,微藻类生物质生成工艺中的二氧化碳减少能力是释放大量温室气体且应当处理二氧化碳排放的公司的重要考虑因素。

[0007] 微藻由于其具有生成高附加值产品的能力而为二氧化碳减少工艺带来了经济价值。微藻生成的高附加值产品在下游工艺中被提取和分离,且可用于各种商用应用(包含药品、保健功能食品以及化妆品)中。虾青素是可从微藻物质雨生红球藻中提取的类胡萝卜素。特定来说,虾青素具有较高抗氧化活性,且由于其生物活性(3S,3S')形式而可用于人类。从经济的角度来看,虾青素也是非常有利的。因此,为了使来自雨生红球藻的虾青素的收率最大化,已经对雨生红球藻的生物学性质和培育工艺以及虾青素生成的下游工艺进行了大量研究。

[0008] 然而,用于培育雨生红球藻的常规工艺具有由在培育期间不可避免地共存的微生物(如病毒和真菌)导致的污染问题,从而导致生物质和虾青素含量的损失。

[0009] 因此,迫切需要一种在雨生红球藻的培育期间基于污染控制来生成含有大量虾青素的高密度纯生物质的途径。

发明内容

[0010] 本发明已致力于解决现有技术的问题,且本发明的一个方面是提供一种用于生成雨生红球藻的方法,在雨生红球藻中可通过引入兼养条件以用于雨生红球藻的培育且通过生物矿化去除污染因子来获得含有大量虾青素的纯生物质以及碳酸钙。

[0011] 根据本发明的一个实施例的一种用于生成雨生红球藻的方法包含:(a)利用二氧化碳补充培养基以形成碳酸氢根离子(HCO_3^-);(b)将雨生红球藻接种于补充有二氧化碳的培养基中;(c)向接种有雨生红球藻的培养基添加醋酸钠,紧接着进行第一光培养;以及(d)向添加有醋酸钠的培养基添加钙离子(Ca^{2+})以形成碳酸钙(CaCO_3),紧接着进行第二光培养。

[0012] 在所述方法的步骤(c)中,可以5mM到15mM的浓度添加醋酸钠。

[0013] 在所述方法的步骤(d)中,可以8mM到18mM的浓度添加钙离子。

[0014] 在所述方法的步骤(d)中,可通过利用氯化钙(CaCl_2)补充培养基来添加钙离子。

[0015] 在所述方法中,当在步骤(c)中雨生红球藻细胞的密度为1.0克/升或大于1.0克/升时可进行步骤(d)。

[0016] 在所述方法中,由细菌、真菌以及除雨生红球藻以外的微藻中选出的至少一种微生物可在步骤(a)到步骤(c)中的至少一个中产生且可通过利用碳酸钙的包封而被杀灭。

[0017] 在所述方法中,雨生红球藻的电动电势在步骤(c)中可为自-30电子伏特到-34电子伏特,且在步骤(d)中可为自-6电子伏特到-10电子伏特。

[0018] 在所述方法中,形成于雨生红球藻细胞的表面上的碳酸钙可诱导雨生红球藻的大小的增加且可与大小增加的雨生红球藻细胞的表面分离。

[0019] 在所述方法的步骤(d)中,可向培养基添加碱性溶液以将培养基的pH维持在7.5到8.5。

[0020] 所述方法可进一步包含在步骤(d)之后将所培育的雨生红球藻与碳酸钙分离。

[0021] 本发明的特征和优点将自参考随附附图的以下描述而变得显而易见。

[0022] 在本发明的详细描述之前,应理解,鉴于发明人可恰当地定义术语和词语的概念以便以最佳方法描述其发明的原则,本说明书和权利要求中使用的术语和词语不应被解释为具有公共和词典含义,而应被解释为具有对应于本发明的技术精神的含义和概念。

[0023] 用于雨生红球藻的培育的常规方法由于污染问题而在商业上仍然是不成功的。通过本发明的使用生物矿化的方法克服了这种失败,与常规的光培养方法相比,本发明的方法能够大批量生成含有大量虾青素的纯生物物质且可以高效地减少二氧化碳。

[0024] 此外,根据本发明的方法,可将通过生物矿化形成的碳酸钙与生物物质分离。因此,根据利用分离的碳酸钙预期进一步的经济效应。

附图说明

[0025] 根据结合随附附图进行的实施例的以下描述,本发明的这些和/或其它方面和优点将变得显而易见且更易于了解,在随附附图中:

[0026] 图1和图2分别是示出根据本发明的一个实施例的用于生成雨生红球藻的方法的流程图和附图。

[0027] 图3是示出根据本发明的一个实施例的在用于生成雨生红球藻的方法中的生物矿化的示意图。

[0028] 图4示出当在生长阶段中以不同浓度添加醋酸钠时的雨生红球藻生物物质的收率(克/升)。

[0029] 图5和图6示出当在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的雨生红球藻生物物质的收率(克/升)。

[0030] 图7示出当在生长阶段添加10mM的醋酸钠之后在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的雨生红球藻生物物质的收率(克/升)。

[0031] 图8示出当在生长阶段中添加10mM的醋酸钠之后在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的虾青素的积聚(克/升)和含量(%)。

[0032] 图9示出当在直接向量筒添加二氧化碳的气升模式下添加醋酸钠和不同浓度的氯化钙时的雨生红球藻生物物质的收率(克/升)。

[0033] 图10示出当在直接向量筒添加二氧化碳的气升模式下添加醋酸钠和不同浓度的氯化钙时的虾青素的积聚(克/升)和含量(%)。

[0034] 图11示出当在生长阶段中在自养条件和兼养条件下直接向雨生红球藻细胞添加污染因子时和当在添加污染因子之后诱导生物矿化时的生物物质的收率和虾青素的积聚和含量。

[0035] 图12示出当在诱导阶段中在自养条件和兼养条件下直接向雨生红球藻细胞添加污染因子时和当在添加污染因子之后诱导生物矿化时的生物物质的收率和虾青素的积聚和含量。

[0036] 图13示出被细菌、真菌以及褐藻污染的雨生红球藻的图像和在通过生物矿化杀灭污染因子之后生成的沉淀碳酸钙和雨生红球藻生物物质的图像。

[0037] 图14是表面覆盖有污染因子(真菌)的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜

(scanning electron microscopy;SEM) 图像。

[0038] 图15和图16是在生物矿化期间的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0039] 图17是在人工添加真菌之后的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0040] 图18是在未诱导生物矿化的情况下进行培养的诱导阶段中添加有图17中所示出的真菌的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0041] 图19是在诱导生物矿化时进行培养的诱导阶段中添加有图17中所示出的真菌的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0042] 图20示出显示由真菌诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0043] 图21示出显示由褐藻诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0044] 图22示出显示由细菌诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0045] 图23示出显示由细菌诱导的生物矿化的进程的显微镜 (SEM) 图像和荧光强度。

[0046] 图24示出用于使用珀可 (Percoll) 将雨生红球藻生物质与沉淀碳酸钙分离的工艺和分离的生物质和碳酸钙的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0047] 图25示出显示在自养条件下将图24中所示出的分离的纯雨生红球藻培育15天之后的生物质的收率(克/升)和虾青素的含量(%)的曲线图。

[0048] 图26示出用于使用大容量离心机将雨生红球藻生物质与沉淀碳酸钙分离的工艺和分离的生物质和碳酸钙的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。

[0049] 附图标号说明

[0050] S100、S200、S300、S400:步骤。

具体实施方式

[0051] 参考随附附图,本发明的其它目标、优点以及新颖特征将通过以下详细描述和优选实施例而变得更加显而易见。在附图中,相同的元件由相同的附图标号表示,即使所述元件描绘于不同的附图中。尽管可使用术语“第一”、“第二”等来描述各种元件,但这些元件不应受以上术语限制。这些术语仅用于将一个元件与另一元件区分开来。在本发明的描述中,在认为现有技术的详细解释可能不必要地混淆本发明的本质时省略对现有技术的详细解释。

[0052] 现将参考随附附图详细描述本发明的优选实施例。

[0053] 图1和图2分别是示出根据本发明的一个实施例的用于生成雨生红球藻的方法的流程图和附图,且图3是示出根据本发明的一个实施例的用于生成雨生红球藻的方法中的生物矿化的示意图。

[0054] 如图1和图2中所示出,方法包含:(a) 利用二氧化碳补充培养基以形成碳酸氢根离子(HCO_3^-) (步骤S100); (b) 将雨生红球藻接种于补充有二氧化碳的培养基中(步骤S200); (c) 向接种有雨生红球藻的培养基添加醋酸钠,紧接着进行第一光培养(步骤S300); 以及 (d) 向添加有醋酸钠的培养基添加钙离子(Ca^{2+}) 以形成碳酸钙(CaCO_3), 紧接着进行第二光培养(步骤S400)。

[0055] 本发明是关于一种用于通过培育微藻物质雨生红球藻来生成生物质的方法。随着由于全球变暖而对温室气体处理技术的需求日益增加,已在世界范围内进行了对使用微藻进行二氧化碳的生物转化的技术的研究。微藻由于其具有生成高附加值产品的能力而为二

氧化碳减少工艺带来了经济价值。特定来说,雨生红球藻生成具有高抗氧化活性的生物活性虾青素。雨生红球藻细胞富含营养且倾向于在弱光条件下频繁分裂。雨生红球藻细胞是游动性的鞭毛细胞。当缺乏营养且在强光胁迫下时,雨生红球藻细胞失去其游动性且形成硬胞囊。此时,虾青素(具有高抗氧化活性的类胡萝卜素)在雨生红球藻细胞中作为次生代谢产物积聚,以作为抵抗氧化应激的抵御机制。众所周知,在生长阶段中,类胡萝卜素含量与叶绿素含量的比率通常为约0.2,但在诱导阶段中,类胡萝卜素含量逐渐增加。

[0056] 在诱导阶段中,雨生红球藻细胞形成胞囊,含有积聚于其中的虾青素且形成细胞壁。雨生红球藻胞囊细胞的细胞壁由三层组成:最外层的三层外鞘,由抗乙酰水解的藻类构成;次生壁,由均匀排列的甘露糖和纤维素构成;以及三生壁,由不均匀排列的甘露糖和纤维素构成。

[0057] 已在自养条件下培育具有这些特性的雨生红球藻。然而,在自养条件下的培育期间不可避免地会受到微生物(如病毒、真菌以及其它微藻)的污染,从而导致生物质和虾青素含量的损失。本发明已致力于提供对现有技术的问题的解决方案。

[0058] 具体来说,本发明的方法包含:(步骤S100)供应二氧化碳;(步骤S200)接种雨生红球藻;(步骤S300)添加醋酸钠且进行第一光培养;以及(步骤S400)添加钙离子且进行第二光培养。

[0059] 在步骤S100中,利用二氧化碳补充培养基以对微藻物质雨生红球藻进行光培养。可在反应容器中填充培养基。可在不特定限制的情况下使用使得能够生长雨生红球藻的任何培养基。举例来说,培养基可以是缺碳的自养培养基。可通过供应含有4%到6%(v/v)的二氧化碳的空气或使用CO₂培养箱来实现二氧化碳供应。替代地,可向培养基供应废气。所供应的二氧化碳与培养基中的水反应以形成氢离子和碳酸氢根离子(HCO₃⁻)。可暂时地或持续地供应二氧化碳。可持续地供应二氧化碳,直到在后续步骤(步骤S400)中添加钙离子且进行第二光培养为止。

[0060] 在步骤S200中,将雨生红球藻接种于补充有二氧化碳的培养基中。

[0061] 进行添加醋酸钠且进行第一光培养的步骤(步骤S300)以使接种的雨生红球藻生长。在此步骤中,雨生红球藻细胞在光培养期间生长。添加醋酸钠作为能量源。在本发明的方法中,在兼养条件下培育雨生红球藻。兼养条件是指将固定的二氧化碳用作碳源的自养条件与使用额外能量源(醋酸钠)的异养条件的组合。因此,本发明的方法使得能够在较短时间内大批量生成含有大量虾青素的生物质。

[0062] 在生长阶段中,可以5mM到15mM的浓度向培养基添加醋酸钠。醋酸钠的浓度优选地是10mM。这种浓度范围在增加生物质和虾青素的收率方面是有效的。

[0063] 可通过利用强度为10微爱因斯/平方米/秒($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)到30微爱因斯/平方米/秒的光进行辐照来进行第一光培养。由于营养充裕且在生长阶段中维持弱光条件,因此雨生红球藻细胞是主动分裂的游动性的鞭毛细胞。

[0064] 在步骤S400中,添加钙离子且进行第二光培养。步骤S400对应于对雨生红球藻进行光培养的诱导阶段。与第一光培养相比,以相对较高的光强度进行第二光培养。作为实例,可通过利用强度为40微爱因斯/平方米/秒到60微爱因斯/平方米/秒的光进行辐照来进行第二光培养。如上文所描述,在诱导阶段中,可利用二氧化碳持续地补充培养基,但未向所述培养基添加醋酸钠。在营养耗尽且施加强光胁迫的诱导阶段中,雨生红球藻细胞

丧失其游动性并形成硬胞囊,并且可以诱导虾青素在细胞中的积聚作为抵抗氧化应激的防御机制。

[0065] 此处,可以通过观察在培养基中是否出现了雨生红球藻的形态的变化或氮饥饿来确定雨生红球藻进入诱导阶段。可在培养基中的雨生红球藻细胞的密度是1.0克/升或大于1.0克/升时进行诱导阶段。

[0066] 存在由细菌、真菌以及除雨生红球藻以外的微藻(例如褐藻)中选出的一种或多种微生物,这尤其是由于在诱导阶段之前,在兼养条件下在生长阶段中添加了醋酸钠的碳源。这些微生物是导致生物质和虾青素生成的损失的污染因子。在本发明的方法中,通过添加钙离子(Ca^{2+})诱导生物矿化来去除污染因子。微生物具有碳酸酐酶(carbonic anhydrase; CA),所述碳酸酐酶充当用于使水与二氧化碳反应以形成氢离子和碳酸氢根离子的催化剂。碳酸氢根离子与向培养基添加的钙离子反应以形成碳酸钙(CaCO_3)。如图3的(a)中所示出,污染因子(如真菌)在诱导阶段中粘附于雨生红球藻细胞的表面以抑制细胞的生长(顶部)且通过添加碳酸钙以诱导生物矿化而被杀灭(底部)。图3的(b)示出粘附于细胞表面的碳酸钙脱落的原理。参考图3,微生物(如真菌、细菌以及其它微藻)在诱导阶段中增殖。具体来说,主要粘附于雨生红球藻细胞的表面(参见图3的(a)的顶部)的真菌和细菌以及其它微藻与培养基中的雨生红球藻细胞共存以抑制细胞的生长。在本发明的方法中,通过添加钙离子来进行污染控制。此处,钙离子和碳酸氢根离子诱导生物矿化(即,结晶),且所得碳酸钙晶体包封微生物,如真菌。这种包封导致营养饥饿,最终导致微生物的死亡(参见图3的(a)的底部)。同时,雨生红球藻具有CA,但其死亡并非由生物矿化导致。这是因为雨生红球藻的电动电势在生长阶段中为自-30电子伏特到-34电子伏特,但在诱导阶段中改变为自-6电子伏特到-10电子伏特。电动电势的这种改变使得钙离子难以结合到雨生红球藻的表面,且因此,碳酸钙很难形成于雨生红球藻的表面上。尽管碳酸钙部分形成于细胞表面上,但细胞将碳酸钙视为应激因子且倾向于增厚细胞壁。因此,细胞表面不是稳定的,且将碳酸钙与所述细胞表面分离。也就是说,形成于细胞表面上的碳酸钙诱导雨生红球藻的大小的增加且最终从细胞表面脱落(参见图3的(b))。真菌识别存在于雨生红球藻的细胞壁中的糖蛋白且结合到细胞表面。当碳酸钙包封并杀灭真菌时,细胞与真菌之间的键断裂,且碳酸钙因此与细胞分离。此外,培养基中的细菌和其它微藻的死亡提高了雨生红球藻的光合效率以诱导雨生红球藻的大小的增加,从而促进结合到雨生红球藻细胞的表面的碳酸钙的分离。培养基中的碳酸钙将光反射在水中,从而有助于雨生红球藻的光合效率提升。总之,生物矿化导致除雨生红球藻以外的微生物的死亡,从而引起生物质的生成和所积聚的虾青素的量的增加。

[0067] 可通过供应氯化钙(CaCl_2)来提供用于生物矿化类污染控制的钙离子。然而,钙离子的源不必限制于氯化钙。可使用可被溶解以供应钙离子的任何已知的钙盐。此类钙盐的实例包含 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以及 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。以8mM到18mM(优选地为10mM)的浓度向培养基添加钙离子。

[0068] 氯化钙的添加生成了碳酸钙和水,从而导致培养基的pH下降。当溶解时,二氧化碳持续地生成碳酸氢根离子和氢离子,从而导致pH下降到约3到约4.5。由于生物矿化在7.5到8.5(优选地7.7到8.0)的pH处继续进行,因此向培养基添加碱性溶液以在诱导阶段中将培养基的pH维持在7.5到8.5。碱性溶液可以是由氢氧化钠(NaOH)、氢氧化钾(KOH)、氢氧化铵

(NH_4OH)、氢氧化钙($\text{Ca}(\text{OH})_2$)以及氢氧化镁($\text{Mg}(\text{OH})_2$)组成的族群中选出的至少一种碱的溶液。

[0069] 虾青素在诱导阶段中大量积聚于雨生红球藻细胞中且可以通过基于雨生红球藻与碳酸钙的不同密度来将雨生红球藻与碳酸钙分离来获得。作为实例,离心机可用于将雨生红球藻与碳酸钙分离。因为碳酸钙以晶体形式存在,所以可在不添加任何额外化学物的情况下将碳酸钙与雨生红球藻容易地分离。

[0070] 总体上,用于雨生红球藻的培育的常规方法由于污染问题而在商业上仍然是不成功的。通过本发明的使用生物矿化的方法克服了这种失败,与常规的光培养方法相比,本发明的方法能够大批量生成含有大量虾青素的纯生物物质且可以高效地减少二氧化碳。此外,根据本发明的方法,可将通过生物矿化形成的碳酸钙与生物物质分离。因此,根据利用分离的碳酸钙预期进一步的经济效应。

[0071] 将参考以下实验实例更具体地解释本发明。

[0072] 实验实例1:实验设定和方法

[0073] 为了找到主要的最佳条件,准备了二十五个250毫升的烧瓶。然而,由于只有有限量的二氧化碳可溶解于烧瓶中且应在气升模式中引入二氧化碳,因此在烧瓶中的优化实验之后准备了十四个500毫升的量筒(宽度:5厘米,高度:60厘米)。

[0074] 每个量筒配备有能够关闭开口的多功能硅胶塞,且气体注入和采样可通过所述多功能硅胶塞完成。将作为气体管线和采样管线的两根特氟龙(Teflon)管插入到形成于塞中的2毫米到3毫米的孔中。对应于量筒的高度切割管。用于供应含有5%的二氧化碳的空气中的石材鼓泡器连接到用于气体供应的特氟龙管的底端。针对烧瓶实验,在5%的 CO_2 培养箱中进行温育。

[0075] 在烧瓶中,将NIES-C用作培养基且将HEPES用作缓冲剂。在将250毫升的培养基引入到250毫升的烧瓶中的每一个中之后,在培养箱中进行温育。在将450毫升的培养基引入到量筒中的每一个中之后,进行通气。引入10mM的KOH溶液以将pH调整到7.5到8。由于KOH溶液的缓冲效应,尽管持续地供应二氧化碳,pH仍可维持在7.5与8之间。将雨生红球藻用作微藻物质。基于生物物质以0.05克/升的初始密度接种微藻物质。在生长阶段中利用300微爱因斯坦/平方米/秒的光辐照烧瓶和量筒6天到7天,且在诱导阶段中利用50微爱因斯坦/平方米/秒的光辐照烧瓶和量筒7天到8天。将每个量筒的最终培养体积调整为500毫升。

[0076] 每天在同一时间进行采样。需要不同方法来测量在每个样本中共存的生物物质和碳酸钙。这种问题如下解决。首先,使用离心机从每个样本(10毫升)去除培养基,紧接着利用蒸馏水(pH 8)清洗三次。在额外的离心之后。称取5毫升的含有生物物质和碳酸钙两者的沉淀物。对于剩余物(5毫升),去除上清液,且添加35毫升的蒸馏水,利用HCl将所述蒸馏水的pH调整为 ≤ 5 。在涡旋30秒到60秒的情况下允许碳酸钙与氢氯酸反应。由于反应,因此形成了 CaCl_2 和二氧化碳。使反应混合物离心以去除上清液,且利用蒸馏水(pH 8)清洗沉淀物以去除碳酸钙。

[0077] 实验实例2:在生长阶段中优化醋酸钠和氯化钙

[0078] 在接种细胞的同时,添加醋酸钠以引入使得能够在短时间内生成生物物质的异养培育的优点。为了找到最佳醋酸钠浓度,在将呈1mM到10mM的不同浓度的醋酸钠添加到烧瓶中时培养细胞,且分析生物物质的收率。

[0079] 图4示出当在生长阶段中以不同浓度添加醋酸钠时的雨生红球藻生物质的收率(克/升)。参考图4,在添加10mM的醋酸钠时获得生物质的最高收率。尽管在图4中未示出,但以高于10mM的浓度添加醋酸钠实际上抑制了细胞生长。此外,当应用于量筒时,生物质的收率在10mM的醋酸钠下达到最大值。

[0080] 在生长阶段中以不同浓度(0mM到30mM)添加 CaCl_2 以用于生物矿化,且观察生物质生长。图5和图6示出当在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的雨生红球藻生物质的收率(克/升)。参考图5,即使添加1mM的 CaCl_2 也会抑制生物质生长。参考图6,当在诱导阶段中添加10mM的 CaCl_2 时,在没有氮(N)饥饿的情况下观察最高生物质收率。因此,在诱导阶段中添加的 CaCl_2 的最佳浓度是10mM。

[0081] 实验实例3:在诱导阶段中优化氯化钙

[0082] 进行实验以找到在诱导阶段中向烧瓶添加的 CaCl_2 的最佳浓度。通过将生长阶段中的培养基中的醋酸钠的浓度固定在10mM并在生物质的收率为1.1克/升时以0mM到30mM的各种浓度添加 CaCl_2 来进行矿化。此时,添加KOH以将培养基的pH维持在7.7到8.0。结果显示于图7和图8中。图7示出当在生长阶段中添加10mM的醋酸钠之后在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的雨生红球藻生物质的收率(克/升)。图8示出当在生长阶段中添加10mM的醋酸钠之后在生长阶段中以不同浓度添加氯化钙时的虾青素的积聚(克/升)和含量(%)。如从图7和图8中可看出,当培养基中的醋酸钠的浓度在生长阶段中是10mM且 CaCl_2 的浓度在诱导阶段中是10mM时获得生物质的最高收率和虾青素的最高积聚和含量。

[0083] 如同在烧瓶实验中,当生物质的收率为1.1克/升时,在生长阶段中添加10mM的醋酸钠,且在诱导阶段中添加1mM、5mM以及10mM的 CaCl_2 。此后,分析量筒中的生物质和虾青素的含量,且结果显示于图9和图10中。图9示出当在直接向量筒添加二氧化碳的气升模式下添加醋酸钠和不同浓度的氯化钙时的雨生红球藻生物质的收率(克/升)。图10示出当在直接向量筒添加二氧化碳的气升模式下添加醋酸钠和不同浓度的氯化钙时的虾青素的积聚(克/升)和含量(%)。当醋酸钠的浓度在生长阶段中是10mM且 CaCl_2 的浓度在诱导阶段中是10mM时获得生物质的最高收率和虾青素的最高积聚(参见图10的(a))和含量(参见图10的(b))。结果与在烧瓶实验中获得的结果一致。

[0084] 在培育期间发现真菌和细菌物质。真菌物质被识别为出芽短梗霉(*Aureobasidium pullans*)和寄生真菌壶菌(*Paraphysoderma sedebokerensis*)。细菌物质被识别为代尔夫特菌(*Delftia tsurhatensis*)。向雨生红球藻添加这些物质,且进行生物矿化。首先,在生长阶段中在自养条件下添加污染因子。如在图11和图12中可看出,当不进行生物矿化时,在生物质的收率和虾青素的积聚和含量中出现了明显的损失。相比之下,在进行生物矿化时几乎观察不到损失。当在兼养条件下在生长阶段中添加污染因子且进行生物矿化时,几乎观察不到损失(参见图11)。当在自养条件下在诱导阶段中添加污染因子且进行生物矿化时且当在兼养条件下在诱导阶段中添加污染因子且进行生物矿化时,在生物质的收率和虾青素的积聚和含量中几乎没有出现损失(参见图12)。此处,可证实,当在无任何污染源的情况下在纯雨生红球藻培育期间进行矿化时,提高了生物质的收率和虾青素的积聚。考虑到由氯化钙诱导的细胞应激,在生长阶段中,在存在3mM的较低浓度的氯化钙的情况下进行矿化。在诱导阶段中,在存在10mM的氯化钙的情况下进行矿化。

[0085] 图13示出(左侧)在不进行生物矿化的情况下通过培育生成的雨生红球藻的图像

和(右侧)在进行生物矿化的情况下通过培育生成的雨生红球藻的图像。在自养条件下的培育之后收集到的生物质的量(参见图13的左侧图像)大于在利用生物矿化进行的培育之后收集到的生物质的量(参见图13的右侧图像)。在利用生物矿化进行的培育之后收集到的生物质中的碳酸钙的含量是0.074克/升。

[0086] 实验实例4:通过生物矿化确定污染控制

[0087] 在此实验实例中,确定是否通过生物矿化来控制真菌、细菌或褐藻的污染。为此目的,如同在实验实例3中,在生长阶段中添加10mM的醋酸钠但不添加 CaCl_2 ,随后在诱导阶段中任选地添加10mM的 CaCl_2 。在培育之后,进行离心。图13示出被细菌、真菌以及褐藻污染的雨生红球藻的图像和在通过生物矿化杀灭污染因子之后生成的沉淀碳酸钙和雨生红球藻生物质的图像。图13的左侧图像显示雨生红球藻细胞在缺乏 CaCl_2 的情况下被真菌、细菌以及褐藻污染。相比之下,图13的右侧图像显示当添加 CaCl_2 时,真菌在上清液中被杀灭且白色碳酸钙沉淀于底部。总之,生物矿化生成碳酸钙且导致营养饥饿(包封)以杀灭真菌、细菌以及其它微藻。

[0088] 在添加 CaCl_2 之前和之后使用扫描电子显微镜(SEM)来观察雨生红球藻细胞。图14是表面覆盖有污染因子(真菌)的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。图15和图16是在生物矿化期间的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。参考图14,粘附于雨生红球藻细胞的表面的真菌在生物矿化之前导致污染。细胞大小是31.2微米。图15的图像是在添加了 CaCl_2 的2天之后拍摄的。参考图15,粘附于雨生红球藻细胞的表面的真菌经过生物矿化以生成碳酸钙且从细胞表面脱落。细胞大小是41.4微米。图16的图像是在添加了 CaCl_2 的3天之后拍摄的。细胞大小增加到45.9微米,这表明真菌的去除引起细胞大小的增加。

[0089] 研究了真菌对雨生红球藻的影响和通过生物矿化进行的真菌结晶。为此目的,向雨生红球藻细胞人工添加真菌且利用扫描电子显微镜(SEM)观察真菌。图17是在人工添加真菌之后的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。观察到真菌粘附于雨生红球藻细胞的表面。图18是在未诱导生物矿化的情况下进行培养的诱导阶段中添加有图17中所示出的真菌的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。观察到真菌侵蚀雨生红球藻细胞。图19和图20是在诱导生物矿化时进行培养的诱导阶段中添加有图17中所示出的真菌的雨生红球藻细胞的扫描电子显微镜(SEM)图像。观察通过生物矿化进行的真菌结晶(图19),且观察真菌到碳酸钙的完全转变(图20)。此外,在无任何能耗的情况下将碳酸钙与雨生红球藻细胞分离(图20)。

[0090] 真菌、褐藻以及细菌经过生物矿化,且利用扫描电子显微镜(SEM)进行观察。图20示出显示由真菌诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜(SEM)图像,图21示出显示由褐藻诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜(SEM)图像,且图22示出显示由细菌诱导的生物矿化的进程的扫描电子显微镜(SEM)图像。图20到图22的图像显示通过真菌、其他微藻(褐藻)以及细菌进行的生物矿化的发生,这表明除雨生红球藻细胞以外的细胞已被去除并分离。

[0091] 图23示出显示由细菌诱导的生物矿化的进程的显微镜(SEM)图像和荧光强度。将细菌染色,并在添加或不添加氯化钙的情况下进行培养期间利用显微镜进行观察,以研究通过细菌进行的生物矿化的发生。因此,在缺乏氯化钙的情况下持续观察到细菌,但在存在

氯化钙的情况下通过生物矿化未观察到细菌。当在不进行矿化的情况下培养细菌时,荧光强度在细胞染色之后继续增加。相比之下,当发生矿化时,荧光强度收敛到零(0),这表明细菌的死亡。当在存在细菌和雨生红球藻的情况下发生矿化时,细菌的荧光强度收敛到零。

[0092] 实验实例5:生物质与碳酸钙的分离

[0093] 图24示出用于使用珀可将雨生红球藻生物质与沉淀碳酸钙分离的工艺和分离的生物质和碳酸钙的扫描电子显微镜(SEM)图像。参考图24,将8毫升的珀可注入到玻璃小瓶中,离心1小时,注入含有碳酸钙的雨生红球藻,且进行离心。将具有相对较低密度的雨生红球藻和具有相对较高密度的沉淀碳酸钙分离成上清液和下层。

[0094] 在自养条件下将分离的雨生红球藻培育15天,且测量所生成的生物质的收率。结果显示于图25中。图25示出显示在自养条件下将图24中所示出的分离的纯雨生红球藻培育15天之后的生物质的收率(克/升)和虾青素的含量(%)的曲线图。为了进行比较,在自养条件下在缺乏醋酸钠和氯化钙的情况下培育常规雨生红球藻,在相同条件下培育被细菌污染的雨生红球藻,且在相同条件下培育被真菌污染的雨生红球藻。测量所生成的生物质的收率。因此,当重新培育使用珀可分离的雨生红球藻时,获得生物质的最高收率和虾青素的最高含量。

[0095] 使用珀可的分离模式适合于少量生物质,且持续型离心机可用于分离大量生物质。图26示出用于使用大容量离心机将雨生红球藻生物质与沉淀碳酸钙分离的工艺和分离的生物质和碳酸钙的扫描电子显微镜(SEM)图像。参考图26,使用大容量离心机分离在量筒中生成的含有碳酸钙的雨生红球藻生物质。尽管在生物质与碳酸钙晶体中存在水,也可将生物质与碳酸钙晶体容易地分离。

[0096] 尽管本文中已参考具体实施例描述本发明,但这些实施例不用以限制本发明,而是出于说明性目的加以阐述。对于本领域的技术人员将显而易见的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可进行修改和改进。

[0097] 本发明的此类简单修改和改进属于本发明的范围,且本发明的具体范围将由所附权利要求明确地限定。

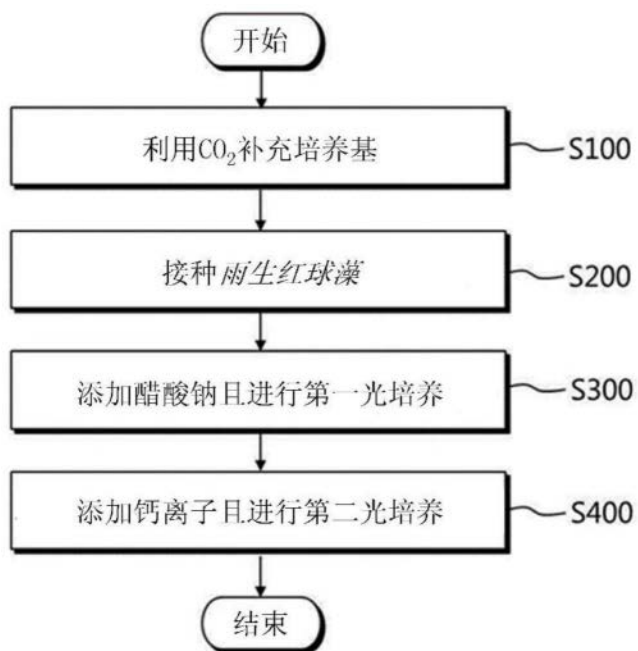


图1

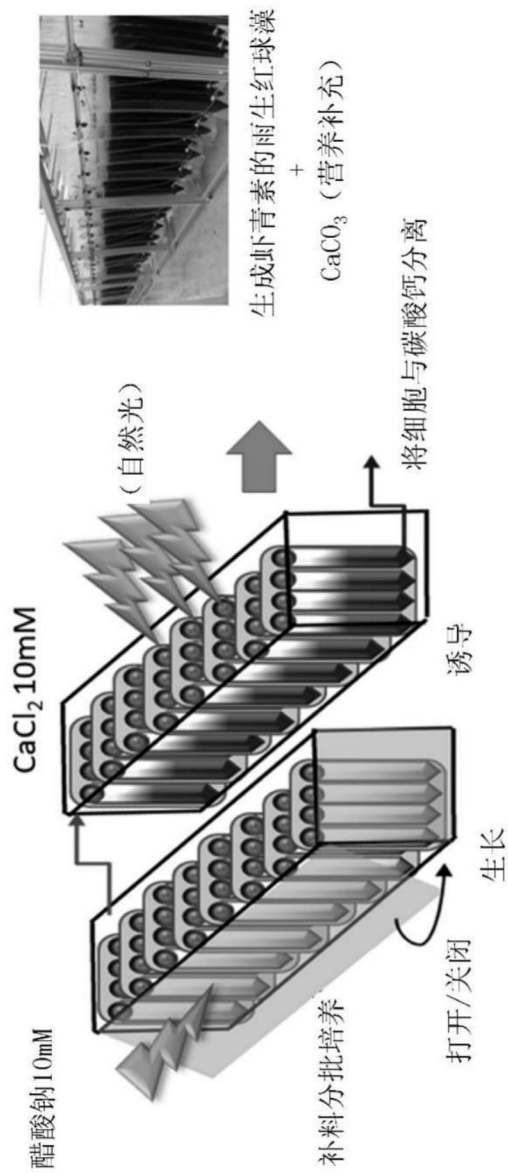


图2

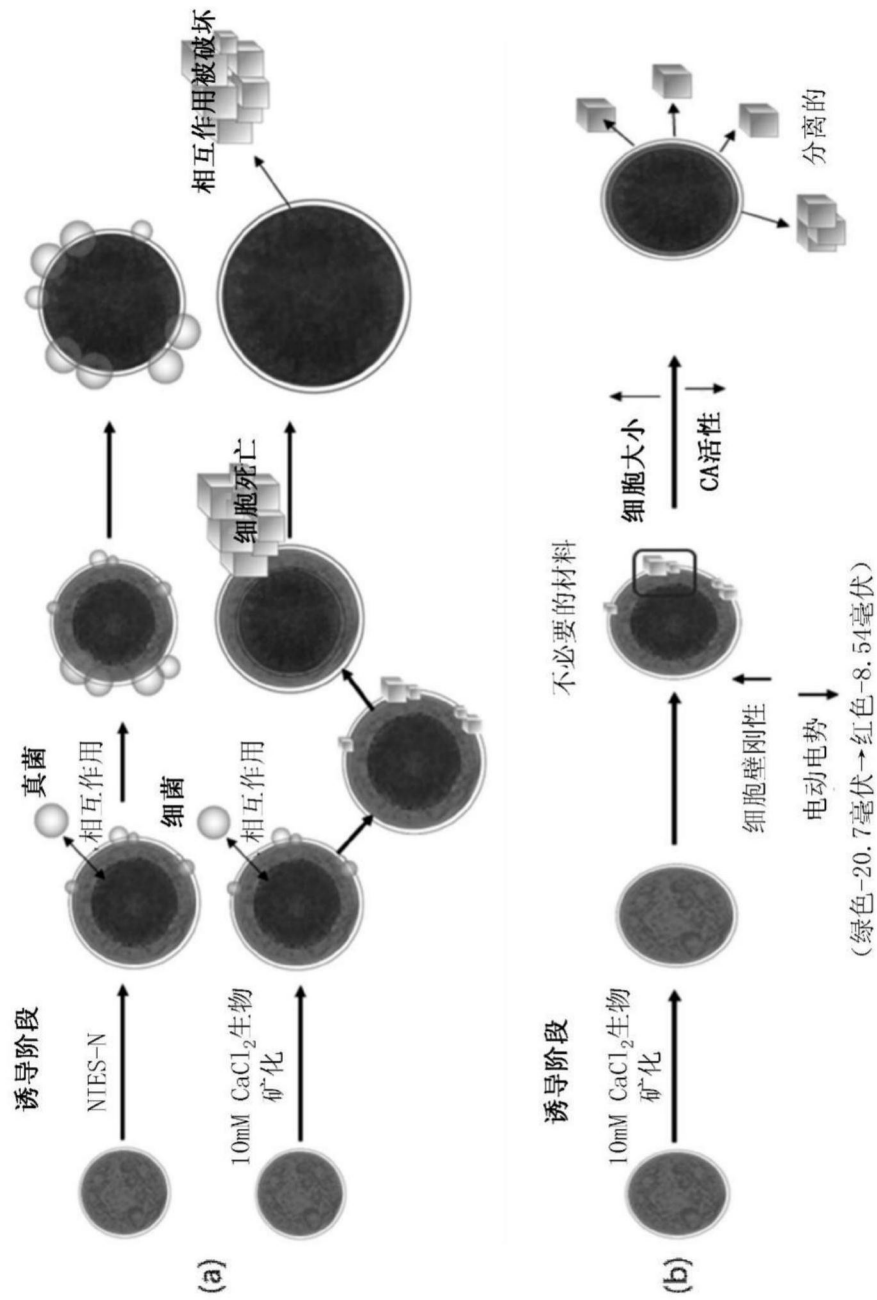


图3

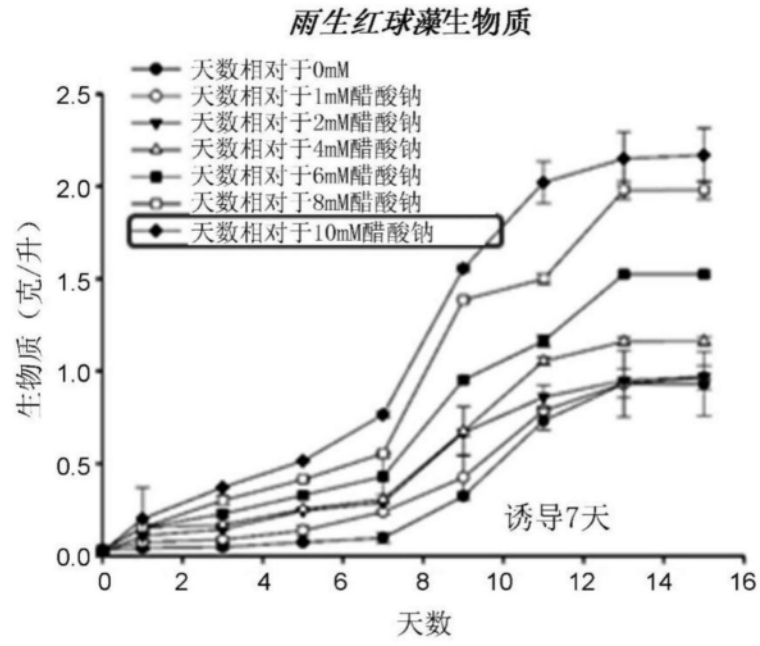


图4

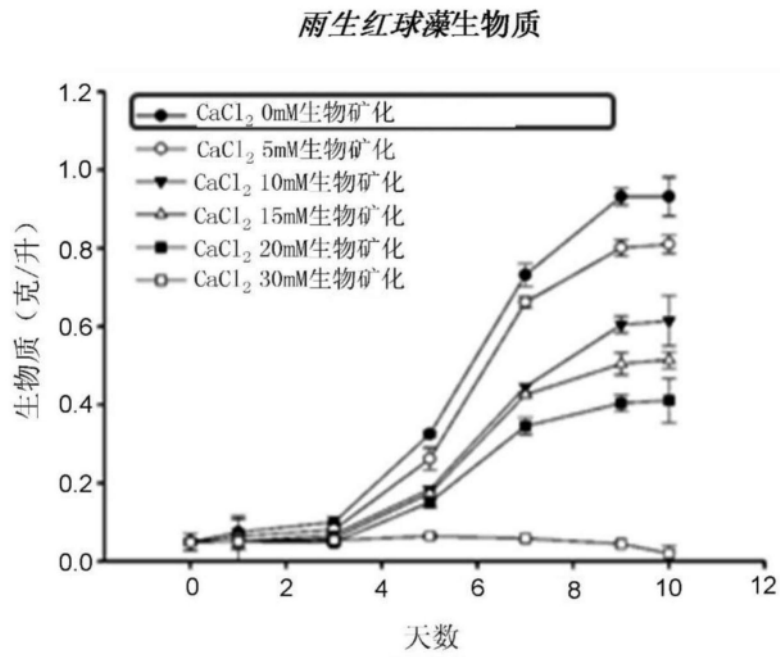


图5

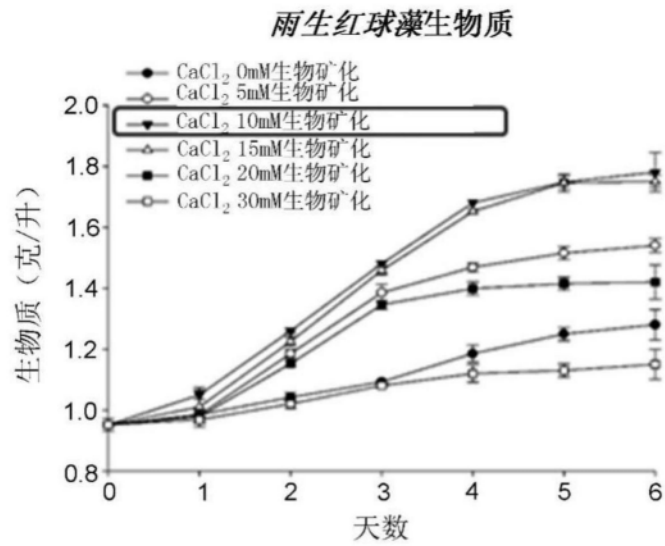


图6

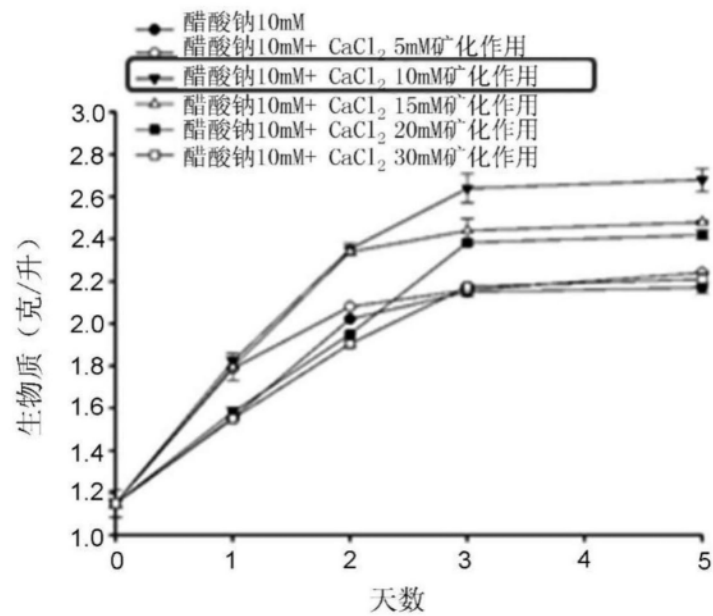


图7

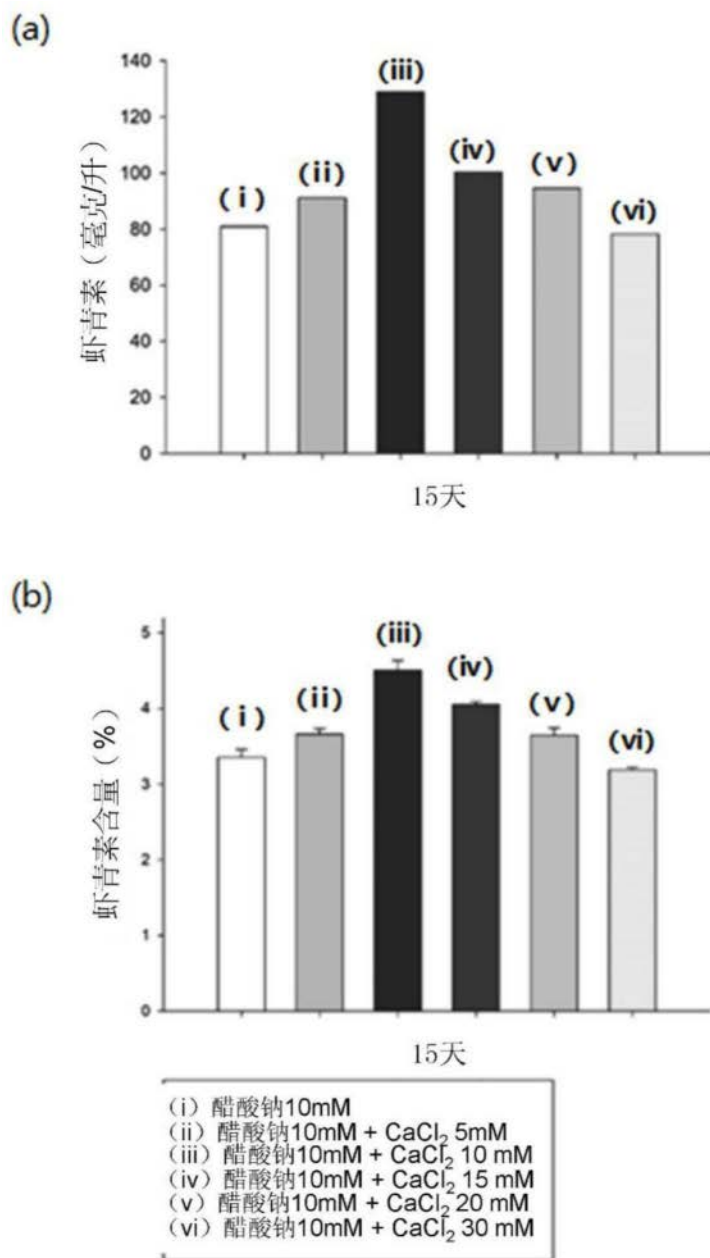


图8

质量筒中的红球藻生物质 (气升)

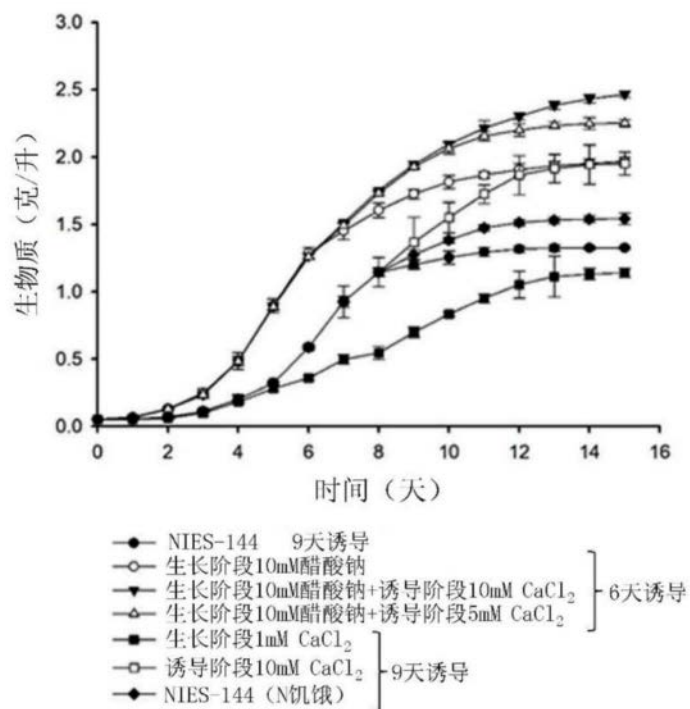


图9

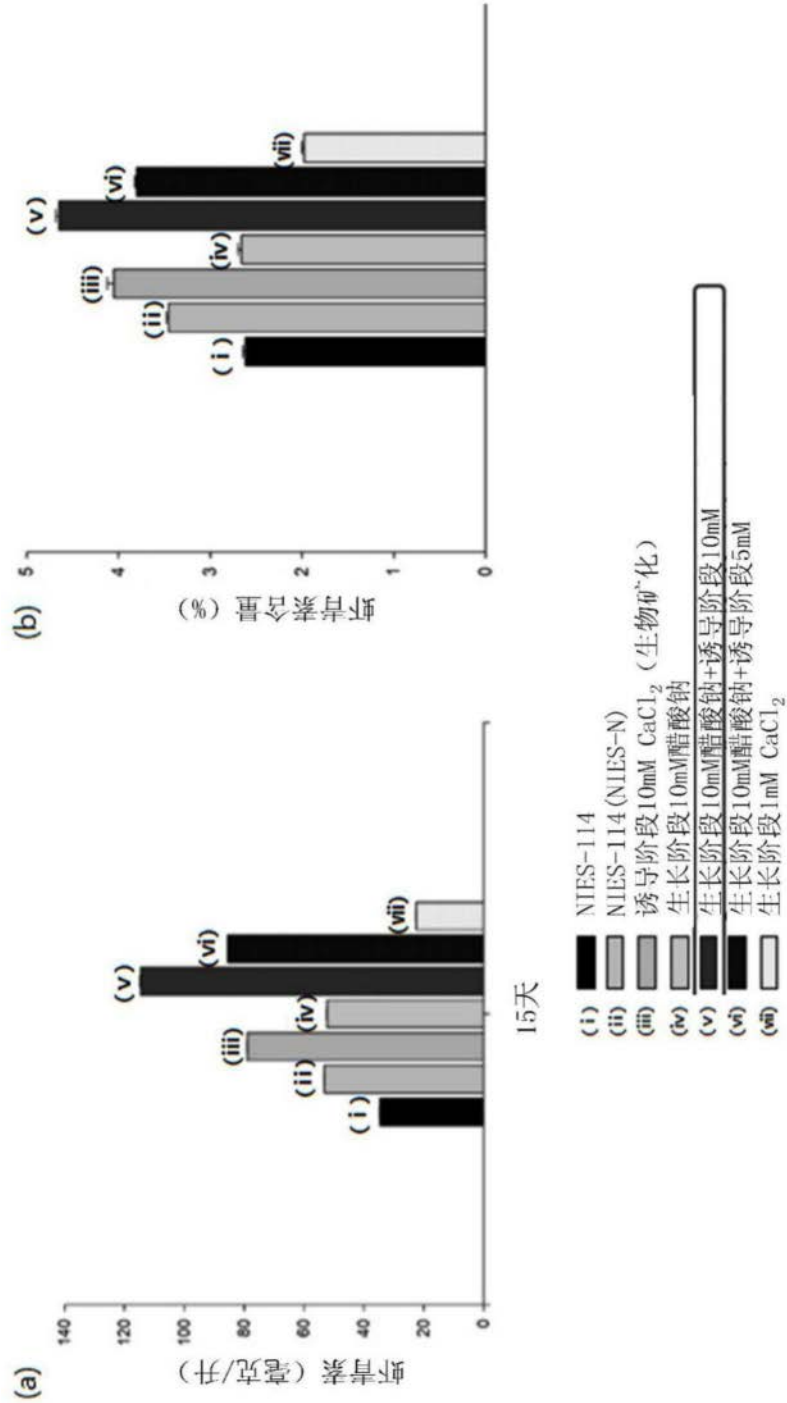


图10

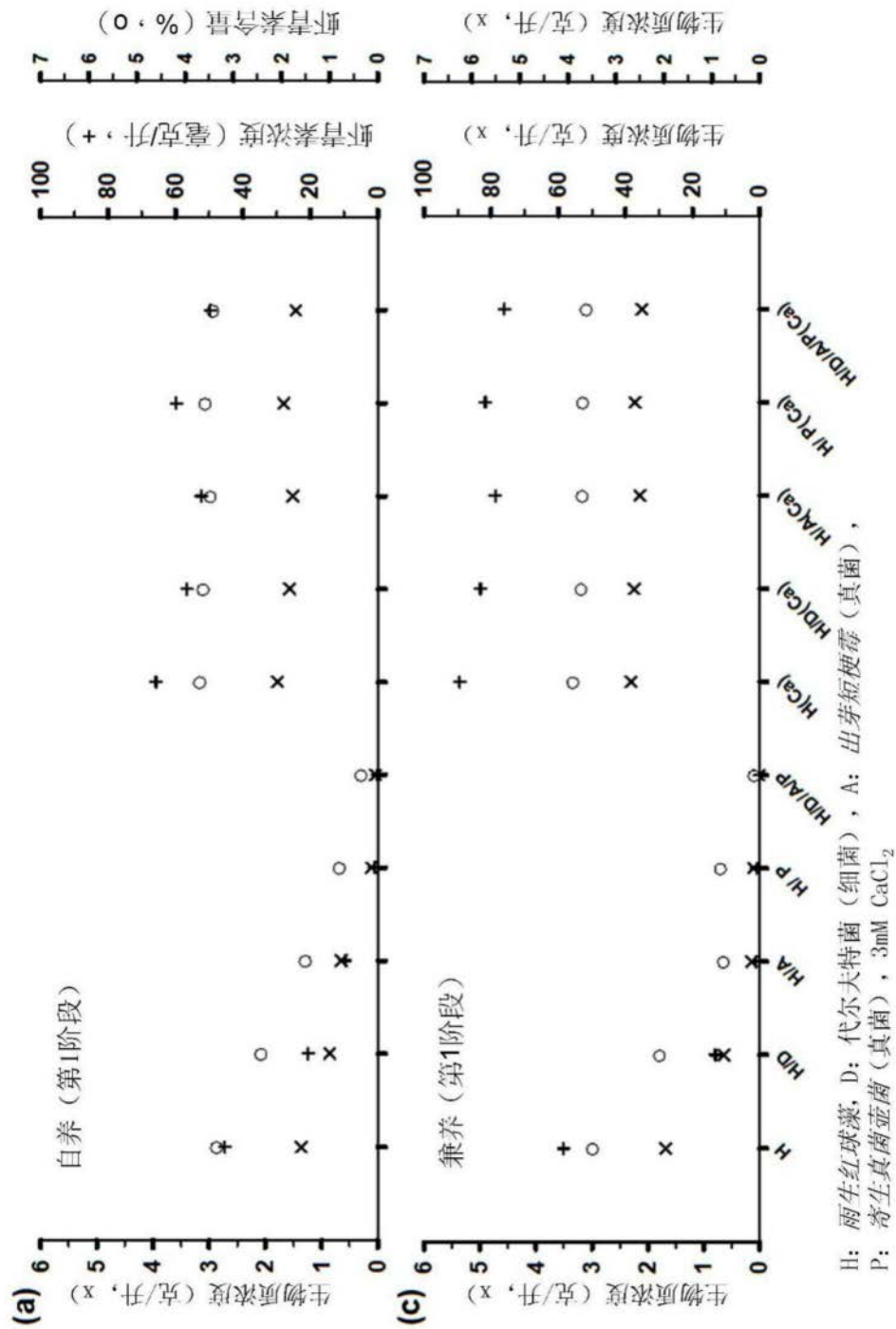


图11

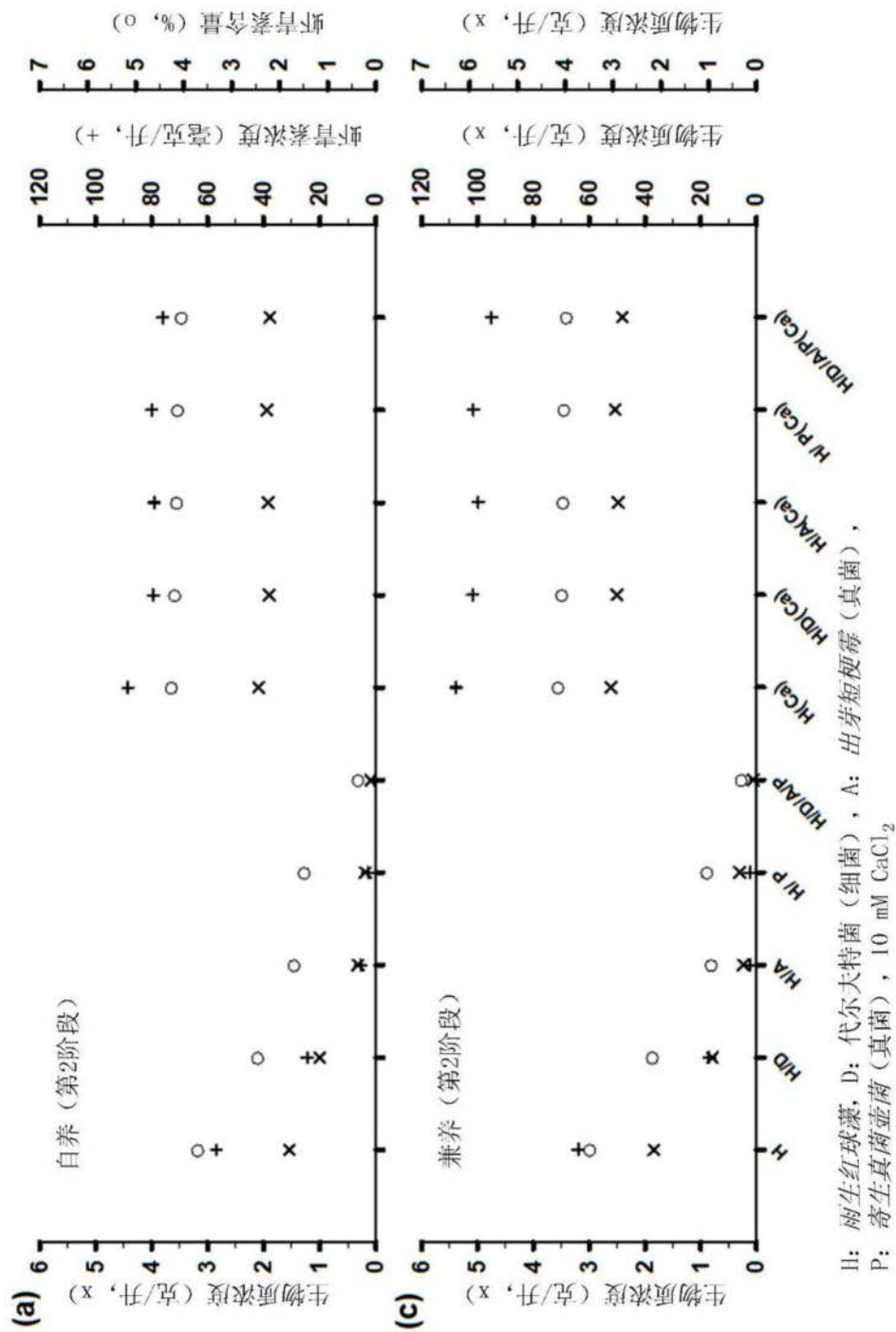


图12

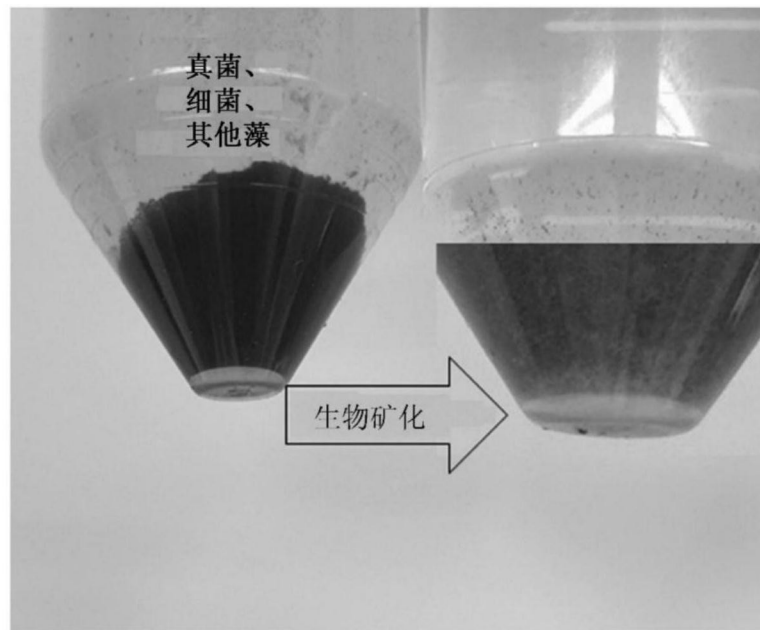


图13

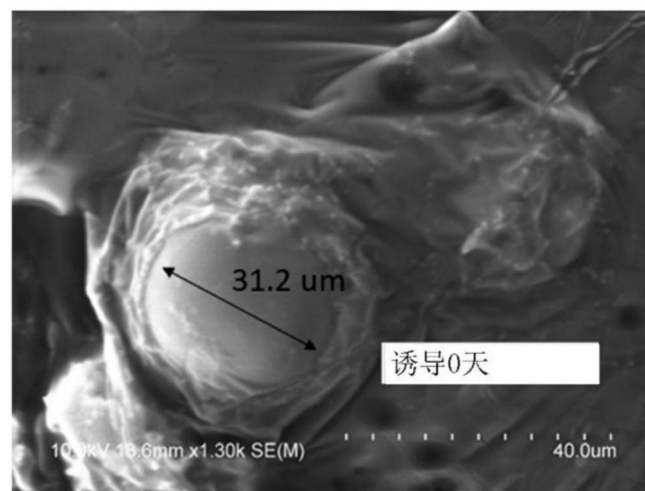


图14

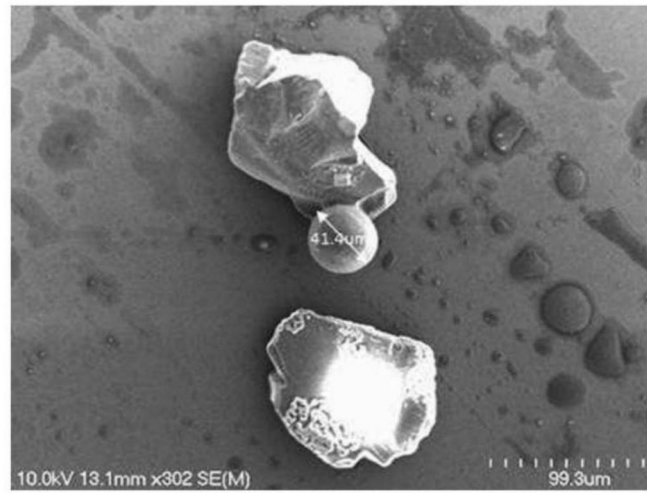


图15

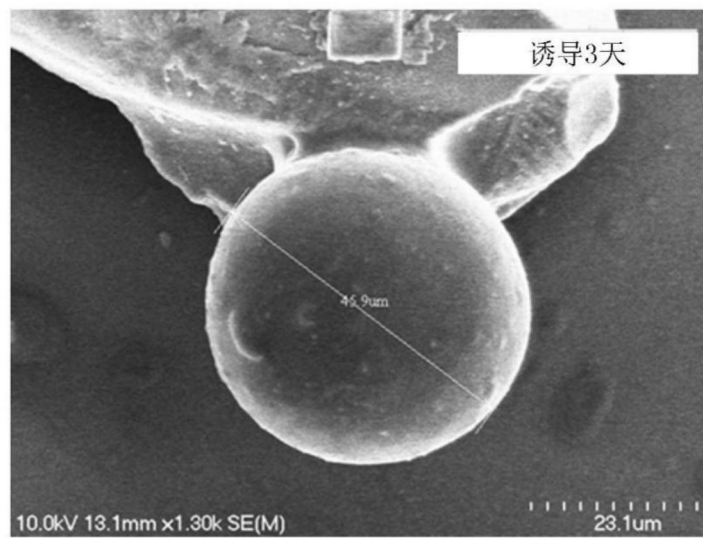


图16

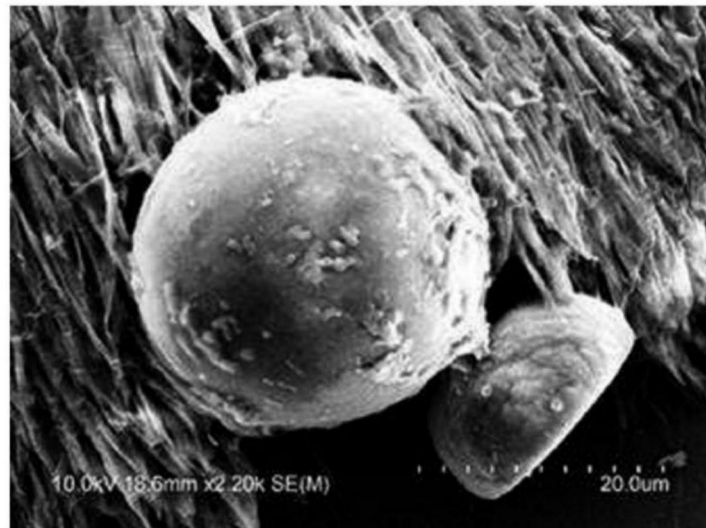


图17

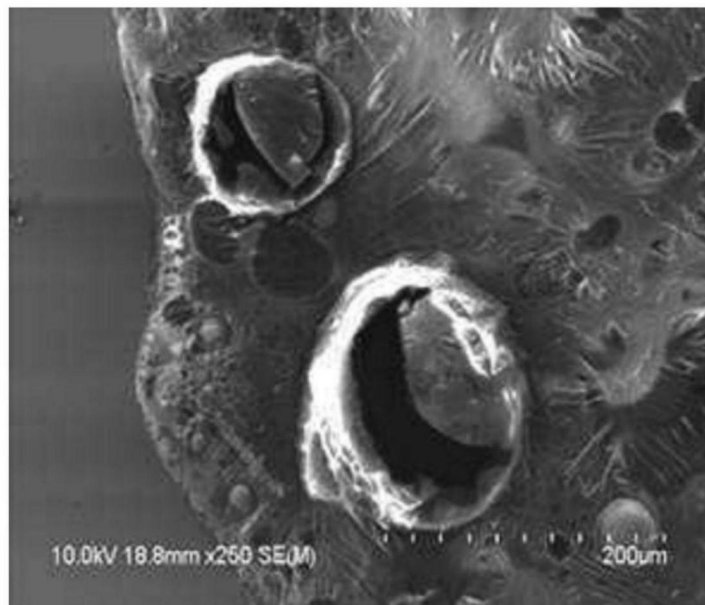


图18

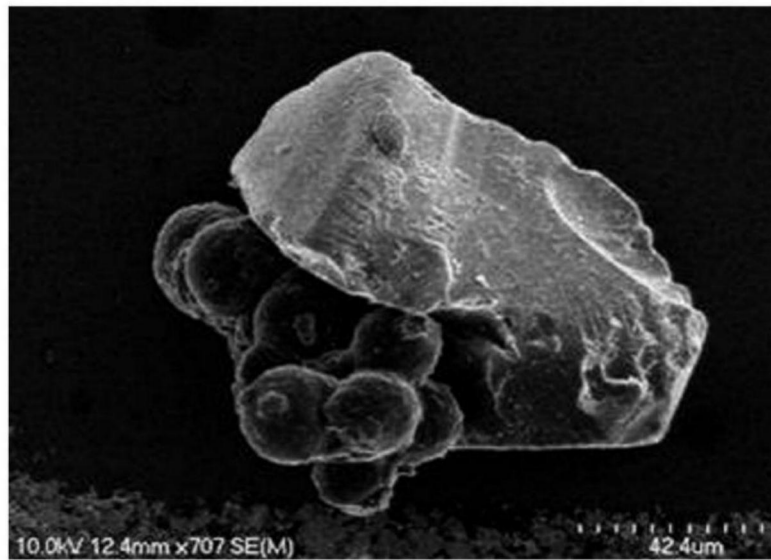


图19

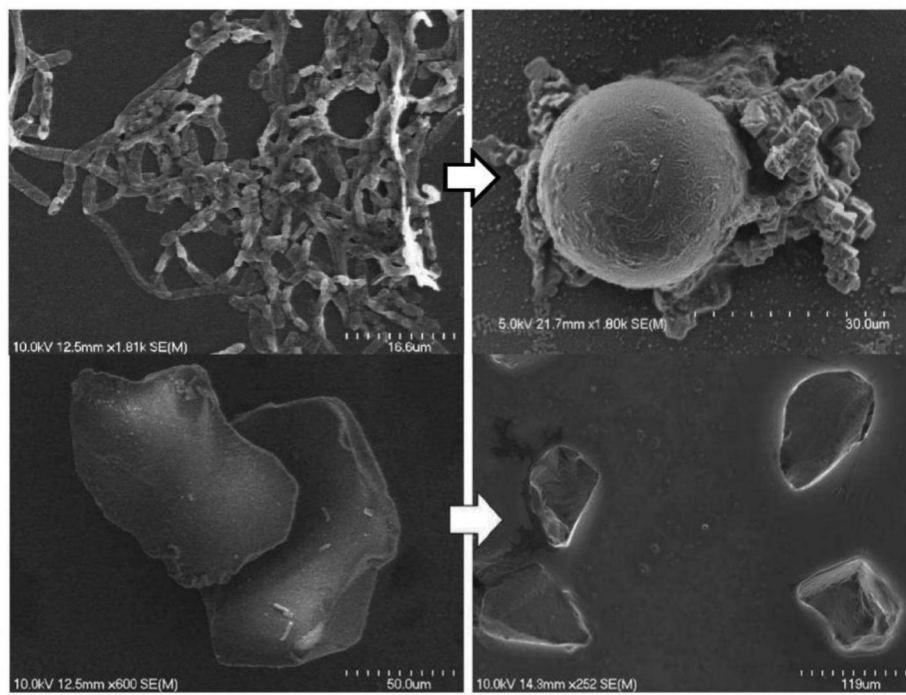


图20

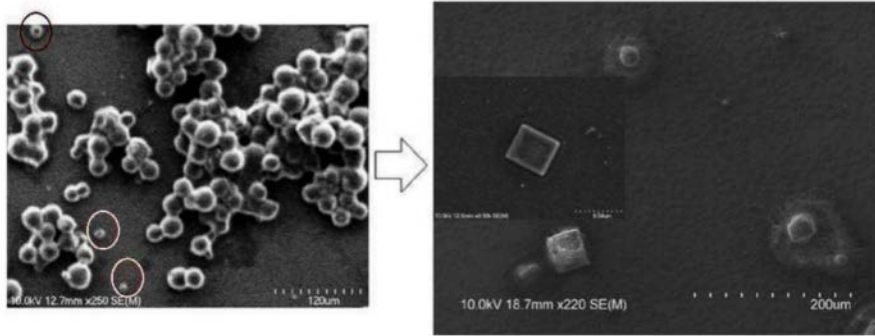


图21

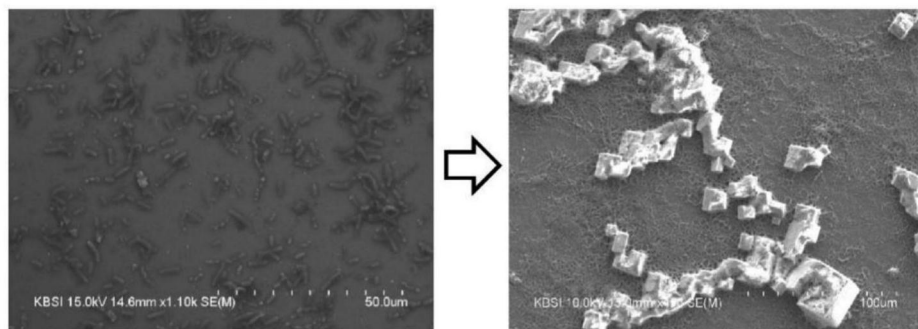


图22

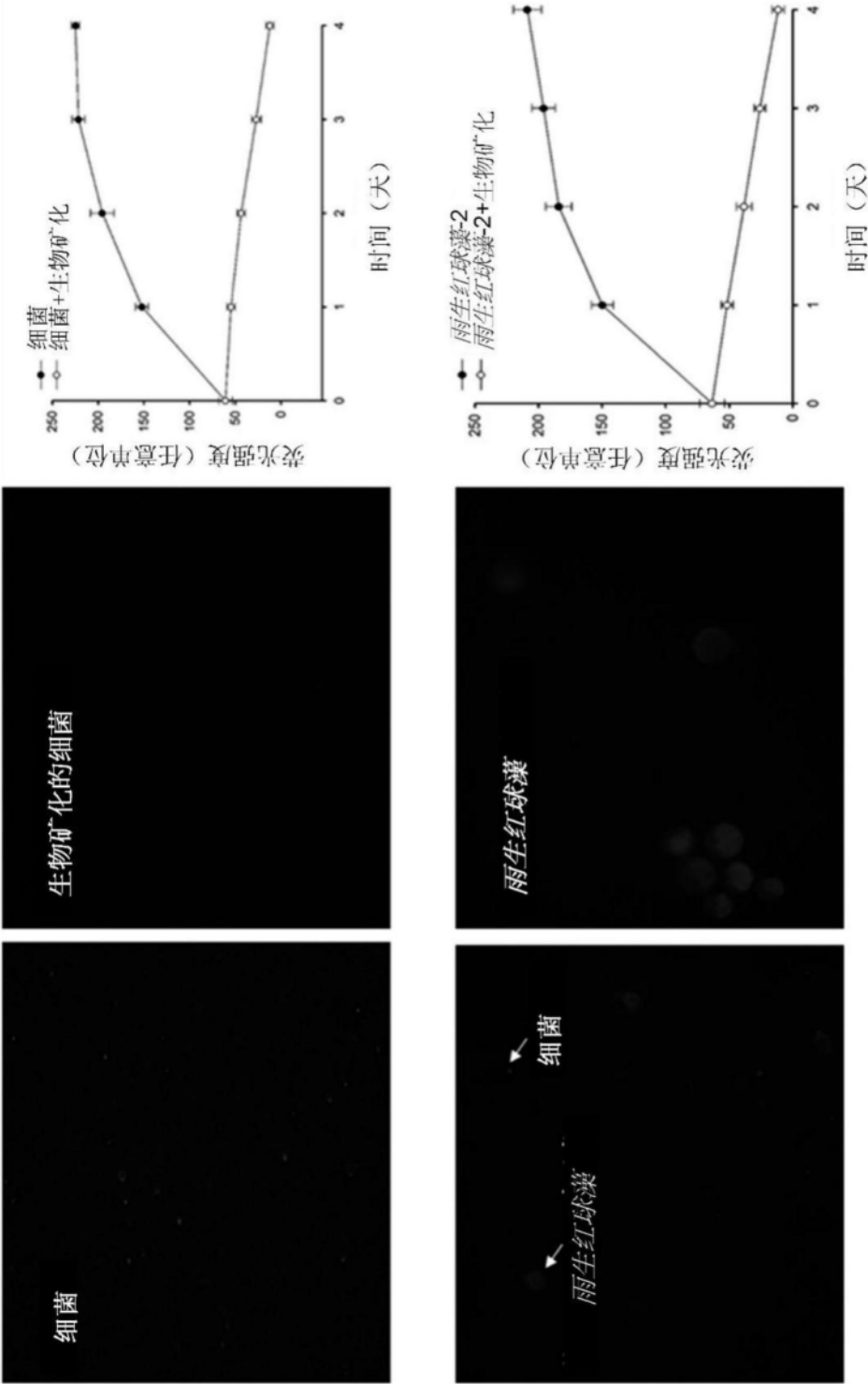


图23

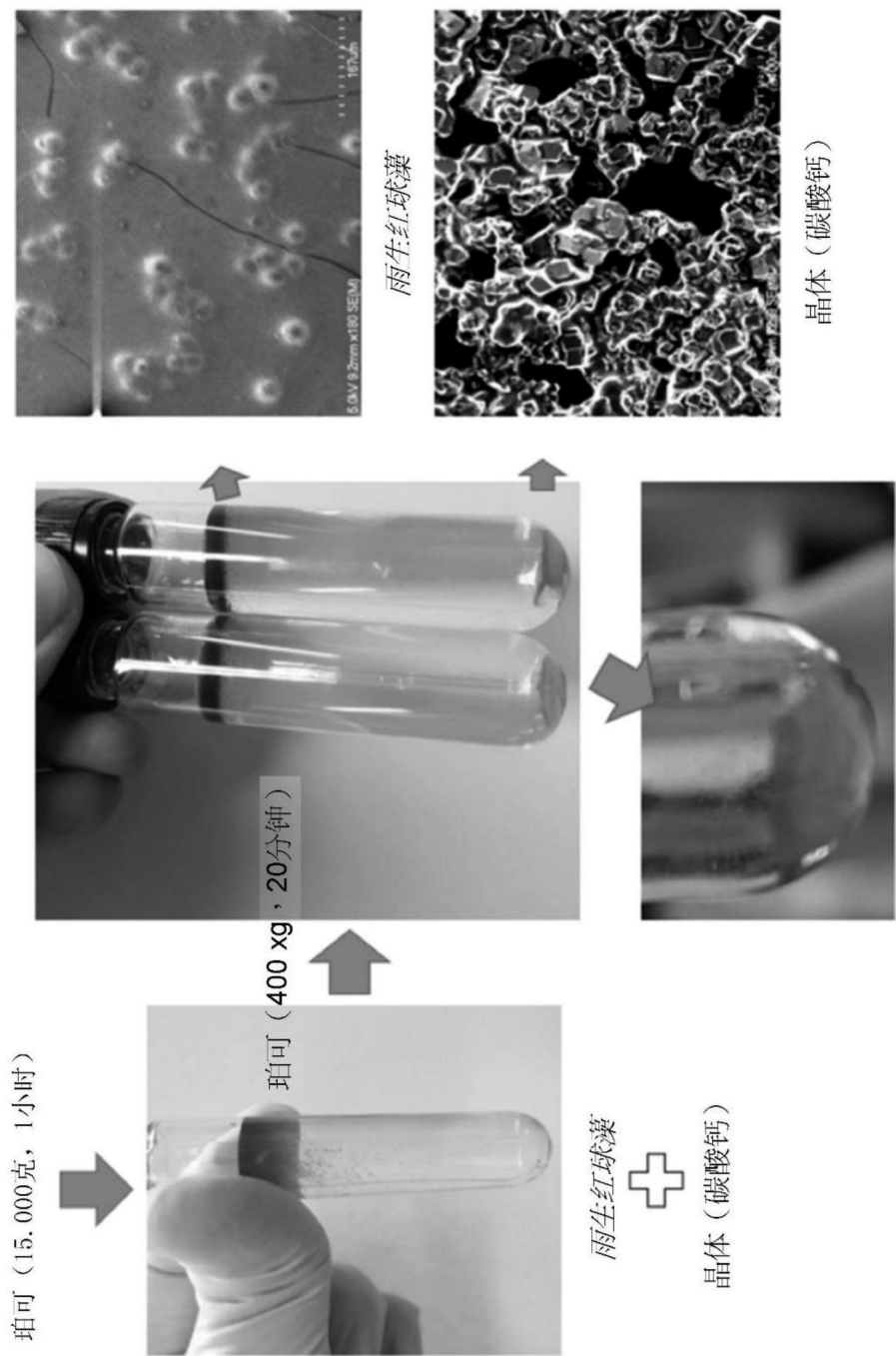


图24

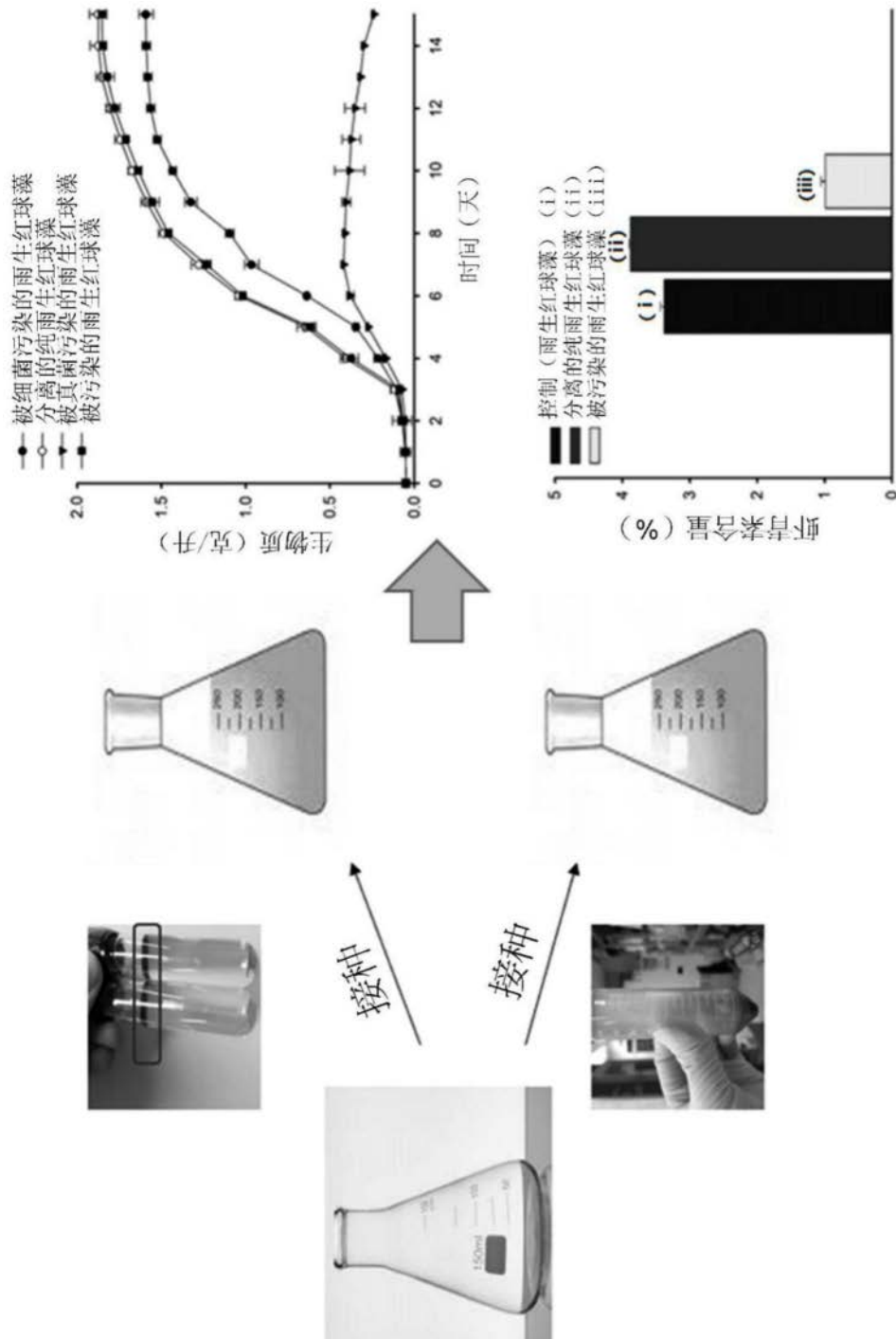


图25

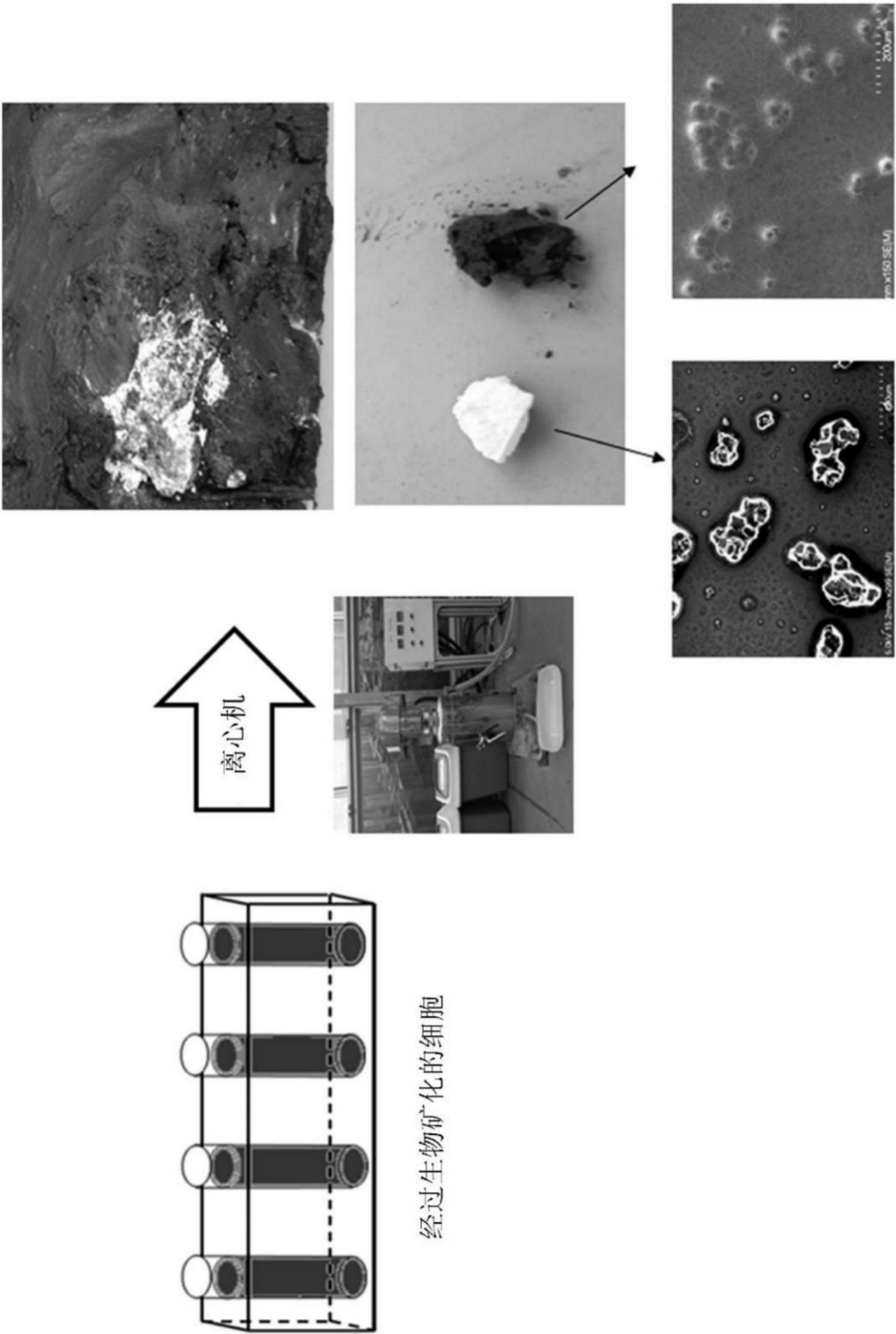


图26