



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102083957 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200980118334. 6

(22) 申请日 2009. 05. 22

(30) 优先权数据

10-2008-0047670 2008. 05. 22 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2009/002724 2009. 05. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/142459 KO 2009. 11. 26

(83) 生物保藏信息

KCTC 11336BP 2008. 05. 21

(73) 专利权人 伊科菲科技有限公司

地址 韩国庆尚北道

(72) 发明人 金美京 韩明洙 陈彦先 李哲均

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51) Int. Cl.

C12N 1/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5597400 A, 1997. 01. 28, 全文.

夏建荣等. CO₂ 浓度升高对斜生栅藻生长和光合作用的影响. 《植物生理学通讯》. 2002, 第 38 卷 (第 5 期), 第 431-433 页.

Michele Greque de Morais et al. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. 《Biotechnol Lett》. 2007, 第 29 卷 (第 9 期), 第 1349 - 1352 页.

审查员 马骞

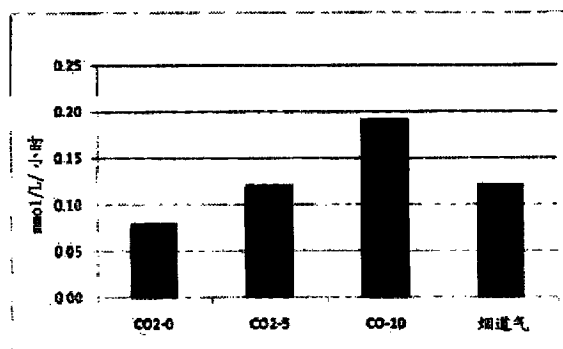
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

具有高效去除二氧化碳特征性的微藻及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种具有高效去除二氧化碳特征性的微藻及其用途, 尤其是二氧化碳固定率高的凸头状栅藻原变种微藻及其用途; 本发明微藻的二氧化碳固定率高, 同时对高浓度的二氧化碳、氧化硫 (SO_x)、氮氧化物 (NO_x) also 具有良好的耐性, 其生物量丰富, 可有效地用于去除二氧化碳的微藻制剂。



1. 一种凸头状栅藻原变种 (*Scenedesmus producto-capitatus*) 微藻, 其特征在于, 所述凸头状栅藻原变种微藻的二氧化碳固定率高, 保藏编号为 KCTC11336BP。

2. 根据权利要求 1 所述的凸头状栅藻原变种微藻, 其特征在于, 所述凸头状栅藻原变种微藻对氧化硫及氮氧化物具有耐性。

3. 一种二氧化碳去除用制剂, 其特征在于, 所述二氧化碳去除用制剂含有选自权利要求 1 中的所述微藻和所述微藻培养液组成的组中的至少一种。

4. 一种去除二氧化碳的方法, 其特征在于, 所述去除二氧化碳的方法利用权利要求 1 中所述的微藻的培养液来去除二氧化碳, 其中, 在微藻培养基注入培养液及微藻, 向培养藻照射光并供给二氧化碳, 以此去除二氧化碳。

具有高效去除二氧化碳特征性的微藻及其用途

技术领域

[0001] 本发明主张 2008 年 5 月 22 日申请的、韩国专利申请号为第 2008-0047670 号的优先权,含说明书的所有内容均参照上述优先权。

[0002] 本发明涉及一种具有高效去除二氧化碳特征性的微藻及其用途,尤其是二氧化碳固定率高的凸头状栅藻原变种微藻及其用途。

背景技术

[0003] 因产业发展,大量消耗矿石燃料,导致大气中的二氧化碳浓度增高,促成地球温暖化发生。地球温暖化导致的气候变化,其起因在于因生物圈的不均衡而使大气中的二氧化碳量不能通过碳素循环而得到一定的维持,这种状态将持续下去。汉森(Hansen)及莱比戴卫(Lebedeff)等报道过地球平均气温的上升,并通过 General Circulation Model(GCM)的预测,指出地球表面温度将持续上升。对此国际社会签订了以减少温室气体排放为主要内容的国际协议,韩国国内也针对高效去除二氧化碳的多种技术展开研究。

[0004] 陆地上的所有植物都能够在可见光的照射下,进行利用光合色素,将二氧化碳和水转化为有机物的光合作用(photosynthesis)。在欧洲一些主要的发达国家,通过利用光合作用的山林绿化来有效地去除二氧化碳,并将山林资源用于多种领域。但是利用陆地植物去除二氧化碳有很多难题,这主要是因为陆地植物光合作用的过程很慢,二氧化碳的固定率很低。

[0005] 对此,根据有关研究结果报告,利用水中浮游生物微藻去除二氧化碳时,单位面积的二氧化碳固定化速度可提高数倍甚至数十倍,依据这一研究结果,有关微藻培养及二氧化碳过滤及固定化的研究也活跃起来。

[0006] 但是为了使利用微藻培养工程来直接固定产业制造排放气体中的二氧化碳的工程更加实用化,首先需要解决以下的问题。首先,因产业制造而排放的气体中,虽然因使用的原料不同而有所不同,但是一般 LNG 燃烧气体或有烟碳素气体中含有约 10%左右的二氧化碳。对此为了利用微藻来去除二氧化碳,微藻须可在上述的二氧化碳范围内存活,并提高其二氧化碳的固定率。此外,上述排放气体中还包含可降低微藻存活率的氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)等,微藻须对上述成分有良好的耐性,方可存活,为了产业实用性,还要求其生物量丰富。

[0007] 为此,需要开发一种对高浓度的二氧化碳、氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)具有良好的耐性、二氧化碳固定率高、生物量丰富的微藻。

发明内容

[0008] 本发明的发明人发明一种微藻,其二氧化碳固定率高,同时对高浓度的二氧化碳、氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)具有良好的耐性,生物量丰富。为此,本发明所要解决的第一技术问题是提供一种凸头状栅藻原变种微藻,其二氧化碳固定率高,保藏编号为 KCTC11336BP。

[0009] 本发明所要解决的第二技术问题是提供一种二氧化碳去除用制剂,含所选择的、至少一个以上的所述微藻及所述微藻培养液及破碎液形成的种群。

[0010] 本发明所要解决的第三技术问题是提供一种去除二氧化碳的方法,该方法利用所选择的、至少一个以上的所述微藻及所述微藻培养液及破碎液形成的种群来去除二氧化碳。

[0011] 本发明专利的申请作为庆北海洋生物产业研究院的技术支援项目进行。

[0012] 本发明解决上述第一技术问题的第一技术方案如下:提供一种凸头状栅藻原变种微藻,所述凸头状栅藻原变种微藻的二氧化碳固定率高,保藏编号为 KCTC11336BP。

[0013] 本发明解决上述第二技术问题的第二技术方案如下:提供一种二氧化碳去除用制剂,含所选择的、至少一个以上的所述微藻及所述微藻培养液及破碎液形成的种群。

[0014] 本发明及决上述第三技术问题的第三技术方案如下:提供一种去除二氧化碳的方法,所述去除二氧化碳的方法利用所选择的、至少一个以上的所述微藻及所述微藻培养液及破碎液形成的种群来去除二氧化碳。

[0015] 接下来,就本发明进行更加详细地说明。

[0016] 本发明的凸头状栅藻原变种 (*Scenedesmus producto-capitatus*) 微藻于 2008 年 5 月 21 日向生物资源中心(位于韩国大田广域市儒城区科学路 111 番地韩国生命工学研究院)提出保藏,保藏编号为 KCTC11336BP。

[0017] 从形态特征来看本发明的微藻时,四个细胞形成群体,群体以直线或略微的交互相接,细胞的中间部略鼓,两端凹陷,其最大的特征就是各细胞的细胞壁变厚,或像针一样变尖的细胞末端略微鼓出,根据培养条件,细胞模样变成交互的群体或变成椭圆形的单一细胞(Komarek J. and Fott, B., 1983. Verl., Stuttgart, 1044pp)。

[0018] 从菌学特征看本发明的微藻时,属于含有叶绿素 a 和 b 的绿藻类,是单一细胞,也可形成群体,可吸取大气中的太阳光能和二氧化碳,合成糖,可进行自给营养的光合作用(Hegewald, E. and C. Silva, 1988. Bibl. Phycol., 587pp)。

[0019] 本发明的微藻是淡水藻类中含有叶绿素 a 和 b 浓度最高的藻类,因所述叶绿素 a 是光合作用中的光反应中心复合物(reaction center complex)的主要成份,所述微藻可有效地固定在光合作用中所需的二氧化碳。(参照<实施方式 1-2>)依据本发明微藻的叶绿素 a 的光合作用效率的测定结果,本发明的微藻是淡水藻类中效率最高的。(参照<实施方式 1-3>)依据本发明微藻生长率的测定结果,本发明的微藻是淡水藻类中生长率最高的。(参照<实施方式 1-4>)依据本发明发明者的判断,本发明的微藻在淡水藻类中,是最有效地固定二氧化碳,且生物量丰富的藻类。

[0020] 为了详细地评价本发明微藻的固定二氧化碳的特征性,进行二氧化碳浓缩机制(Carbon concentrating mechanisms, CCM)实验,制成 P-I curve。上述实验结果与衣藻属(*Chlamydomonas*)微藻的实验进行比较,其结果显示:本发明微藻在浓度为 10% 左右的二氧化碳中也可生成存活,并可进行有效的光合作用。本发明微藻以 1 日为准,在每升培养基中最多可去除 0.88mg 的二氧化碳,即每吨培养基中可去除 880g 的二氧化碳(参照<实施方式 2>)。

[0021] 观察本发明微藻的二氧化碳固定及相关的碳酸脱水酶的蛋白质表达变化,其结果显示:本发明的微藻与二氧化碳的浓度无关,可表达同一程度的碳酸脱水酶。本发明的微藻

即使在高浓度的二氧化碳中,也可以有效地培养(参照<实施方式 3>)。

[0022] 利用光生物反应器,大量培养本发明微藻,对其固定二氧化碳的特征性进行评价的结果显示:本发明微藻在高浓度的二氧化碳中也可固定二氧化碳,随着二氧化碳的浓度增高,本发明微藻的生物量也随之增加,即使在含有氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)的气体中,本发明的微藻也不会受到大的影响(参照<实施方式 4>)。

[0023] 由此可见,本发明微藻的二氧化碳固定率高,对于高浓度的二氧化碳、氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)具有良好的耐性,而且生物量丰富。

[0024] 本发明的二氧化碳去除用制剂,含所选择的、至少一个以上的所述微藻及所述微藻培养液及破碎液形成的种群,可有效地用于二氧化碳的去除。

[0025] 因本发明微藻具有卓越的二氧化碳固定性,含有本发明微藻或含有所述微藻的培养液或破碎液的本发明的二氧化碳去除用制剂,也可有效地去除二氧化碳。

[0026] 上述本发明的二氧化碳去除用制剂可以多种形态制成,虽无限制,但最好为食品、化妆品或饲料形态。本发明的二氧化碳去除用制剂虽不局限于此,但是最好是可含有 $10^6 \sim 10^8$ cells/mL 的本发明的微藻。

[0027] 本发明的凸头状栅藻原变种微藻,所述微藻培养液及所述微藻破碎液可用于去除二氧化碳,可用于培养所述微藻,去除二氧化碳的方法。

[0028] 本发明微藻的二氧化碳固定性及其他活性如前所述。

[0029] 为了利用本发明的微藻、其培养液或破碎液去除二氧化碳,虽不局限于此,但在所述微藻培养基中注入培养液和微藻,阳光照射培养藻并供给二氧化碳,从而可去除二氧化碳。

[0030] 所述微藻培养基是该领域技术人员公知的培养基,但不局限于此,在微藻培养时最好使用光生物培养基。

[0031] 尤其是为了培养本发明的微藻,适用于微藻培养的培养基及培养条件均可,但本发明不局限于此,为了有效地去除二氧化碳,本发明的微藻最好是在 BG-11 培养基上,接种 1×10^6 cell/mL,在 20 摄氏度下,供给 $125 \mu \text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的光度。另外,为了大量培养本发明的微藻,并将其应用于产业生产中,通常使用光生物反应器。本发明的实施方式使用广泛使用的 30 升的光生物反应器(Lifluf GP, Biotron, 韩国)(参照<实施方式 4>)。本发明的微藻制剂可用于去除二氧化碳,也可用于去除二氧化碳的方法。

[0032] 本发明的微藻制剂的活性如前所述。

[0033] 本发明微藻的二氧化碳固定率高,对于高浓度的二氧化碳、氧化硫(SO_x)、氮氧化物(NO_x)具有良好的耐性,而且生物量丰富;也可应用于二氧化碳去除用微藻制剂。

附图说明

[0034] 图 1 是本发明微藻在 BG11 培养基上培养的照片(A, 1000 倍)及在 BM80%培养基上培养的照片(B, 400 倍);

[0035] 图 2 是淡水藻类含有的叶绿素 a 的浓度测定及比较结果的示意图;(1:Anabaena variabilis(BG-11 培养基), 2:Arthrospira sp. (BG-11 培养基), 3:Calothrix sp. (BG-11 培养基), 4:Chlorella ellipsoidea(CHU-10 培养基), 5:Chlorogloeopsis sp. (BG-11 培养基), 6:Coelastrum microporum(BG-11 培养基), 7:Coelastrum reticulatum

var. cubanum(BG-11 培养基),8:Leptolyngbya sp. (BG-11 培养基),9:Monoraphidium contortum(CHU-10 培养基),10:Scenedesmus acutus(BG-11 培养基),11:Scenedesmus bernardii(BG-11 培养基),12:Scenedesmus obliquus(BG-11 培养基),13:Scenedesmus producto-capitatus(BG-11 培养基),14:Spirulina maxima(CHU-10 培养基),15:Stigeoclonium sp. (CHU-10 培养基),16:Tetradasmus wisconsinensis(BG-11 培养基));

[0036] 图 3 是淡水藻类的光合作用效率的测定及比较结果示意图;(1:Anabaena variabilis(BG11),2:A. variabilis(BG11+BM3 %),3:Chlorogloeopsis sp. (BG11),4:C. sp. (BG11+BM3 %),5:Scenedesmus bernardii(BG11),6:S. bernardii(BG11+BM3 %),7:Scenedesmus producto-capitatus(BG11),8:S. producto capitatus(BG11+BM3 %),9:Tetradasmus wisconsinensis (BG-11),10:T. wisconsinensis(BG-11+BM3%));

[0037] 图 4 是本发明的凸头状栅藻原变种微藻在二氧化碳浓度下吸收二氧化碳程度的测定结果显示图;

[0038] 图 5 图示了为了测定本发明微藻的碳酸脱水酶的表达变化,而利用碳酸脱水酶抗体,进行蛋白免疫印迹的结果;((1):SDS-PAGE(a:0% CO₂, b:5% CO₂, c:5% CO₂), (2):利用碳酸脱水酶抗体的结果(a:0% CO₂, b:5% CO₂, c:5% CO₂));

[0039] 图 6 图示了为了测定本发明微藻的碳酸脱水酶的表达变化,利用 α-碳酸脱水酶抗体,进行蛋白免疫印迹的结果;

[0040] 图 7 是利用光生物反应器培养本发明微藻,并测定细胞数及细胞重量的结果示意图。

具体实施方式

[0041] 以下就本发明的实施方式进行详细地说明。

[0042] 以下实施方式只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0043] <参考例 1>

[0044] 本发明中所使用的培养基的组成

[0045] <1-1>BG-11 培养基配方

[0046] [表 1]

[0047] BG-11 培养基配方

[0048]

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	30 g/200 mL dH ₂ O	17.6 mM
2	K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH ₂ O	0.22 mM
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	10 mL/L	0.15 g/200 mL dH ₂ O	0.03 mM
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O (Fisher 79)	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH ₂ O	0.2 mM
5	Citric Acid·H ₂ O (Fisher A 104)	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.03 mM
6	Ammonium Ferric Citrate	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O	0.02 mM
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH ₂ O	0.002 mM
8	Na ₂ CO ₃ (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH ₂ O	0.18 mM
9	BG-11 Trace Metals Solution	1 mL/L		
10	Sodium Thiosulfate (agar media only, sterile)	24.8 g/100 mL		1 mM

[0049] <1-2>CHU-10 培养基配方

[0050] [表 2]

[0051] CHU-10 培养基配方

[0052]

#	Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
1	Chu Stock Solution	10 mL/L		
2	NaHCO ₃ (Fisher S 233)	1 mL/L	1.26 g/90 mL	0.17 mM

[0053] <1-3>BG-11+BM 3%培养基配方

[0054] 在上述 BG-11 培养基中添加 3% BM, 可配成上述培养基。BM 可发酵畜牧废水, 净化处理水, 在韩国专利第 0500333 号及第 0799065 号中已有详细的公开内容。

[0055] <实施方式 1>

[0056] 分离具有良好的二氧化碳固定性的微藻

[0057] <1-1> 本发明中使用的淡水藻类

[0058] 作为一种叶绿素含量高, 具有良好的生命力的淡水藻类 *Anabaena variabilis* (KPCCI 管理号码:P-F-38), *Arthrospira* sp. (KPCCI 管理号码:P-F-32), *Calothrix* sp. (KPCCI 管理号码:P-F-33), *Leptolyngbya* sp. (KPCCI 管理号码:P-F-36), *Spirulina maxima* (KPCCI 管理号码:P-F-88), *Chlorelaelipsoidea* (KPCCI 管理号码:P-F-57), *Chlorogloeopsis* sp. (KPCCI 管理号码:P-F-34), *Coelastrum microporum* (KPCCI 管理号码:P-F-11), *Coelastrum reticulatum* var. *cubantum* (KPCCI 管理号码:P-F-27), *Monoraphidium contortum* (KPCCI 管理号码:P-F-62), *Scenedesmus acutus* (KPCCI 管理号码:P-F-4), *S. bernardi* (KPCCI 管理号码:P-F-16), *S. obliquus* (KPCCI 管理号码:P-F-10), *S. producto-capitatus* (KPCCI 管理号码:P-F-7), *Stigeoclonium* sp. (KPCCI 管理号码:P-F-78), *Tetradismus wisconsinensis* (KPCCI 管理号码:P-F-8) 从岭南大学海洋科学研究中心韩国产业浮游生物银行 (KPCCI) 取得, 并按微藻类进行分离。

[0059] <1-2> 淡水藻类叶绿素 a 的浓度测定

[0060] 对上述<实施方式 1-1>中分离的淡水藻类所含有的叶绿素 a 的浓度, 进行测定。

[0061] 为了更加具体地计算上述叶绿素 a 的浓度, 使用吸光光度计 (Parsons T. R. et

al., J. Mar. Res., 1963, 155-163, 21)。将上述微藻在 CHU-10 上, 接种 1.4×10^8 cells/mL, 在 20 摄氏度下, 供给 $125 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光度进行培养, 取其培养物 3 毫升, 使用玻璃纤维过滤纸 (GF/C, 45mm) 过滤, 在过滤液中加入 10 毫升的丙酮和水的混合液 (丙酮: 水 = 9 : 1), 进行离心分离 (4000rpm, 20 分); 接下来, 置于 4 摄氏度的暗处, 保管一夜。上述离心分离后, 象征液的一部分放入吸收栏, 利用吸光光度计 (Cary 50Conc, Varian, 美国) 测定吸光度。此时将丙酮和水的混合液 (丙酮: 水 = 9 : 1) 作为对照液, 在 633nm、645nm、630nm 及 750nm 中测定吸光度, 利用计算公式 1, 以 Standards Methods (APPA1995) 为基准计算叶绿素 a 的浓度 (Kim and Chang 2006, J. Microbiol. Biotechnol. 16 : 1947-1953)。按照微藻类别分别测定叶绿素 a 的浓度, 并将其结果记在图 2 中。

[0062] [计算公式 1]

[0063]

$$\text{叶绿素 a (g L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{上清液的量(ml)}}{\text{过滤后的样品的量(L)}}$$

[0064] $Y_s = \text{叶绿素 a 的量} (\mu \text{g ml}^{-1}) = 11.64x_1 - 2.16x_2 + 0.10x_3$

[0065] $X_1 = \text{OD}_{663} - \text{OD}_{750}$

[0066] $X_2 = \text{OD}_{645} - \text{OD}_{750}$

[0067] $X_3 = \text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}$

[0068] 如图 2 所示, 凸头状栅藻原变种微藻与培养时间无关, 叶绿素 a 的浓度最高, 因叶绿素 a 浓度高, 加之叶绿素 a 是光合作用中的光反应中心复合物 (reaction center complex) 的主要成份 (Juneau, P., A. El Berdey, and R. Pppovic. 2002. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42 : 155-164), 所以本发明微藻可有效地固定在光合作用中所需的二氧化碳。

[0069] <1-3> 淡水藻类叶绿素 a 的光合作用效率

[0070] 根据将上述 <实施方式 1-1> 中的淡水藻类放入 BG-11 培养基及 BG-11+BM 3% 培养基中培养, 这一所公开的方法, 利用荧光分析仪 (Phyto-PAM, Walz, 德国) 测定光合作用。具体来说是在 470nm 中测定 PSII (photosystem II) 的光合作用效率。进一步具体地说, 上述光合作用的效率是以下述计算公式 2, 通过计算荧光度最大值 (maximum value of fluorescence ; F_m) 与最大变形荧光度 (maximum variable fluorescence ; F_v) 的比例 (F_v/F_m) 来计算的。上述 F_v/F_m 比例越大, 光合作用的效率就越卓越, 上述结果如图 3 所示。

[0071] [计算公式 2]

[0072] $F_v/F_m = (F_m' - F_t)/F_m' = dF/(F_t + dF)$

[0073] F_v/F_m : PSII 中计算的荧光值的临界值

[0074] dF : 荧光效率增加值

[0075] F_t : 瞬间荧光率

[0076] F_m : 最大荧光率

[0077] 如图 3 所示, 凸头状栅藻原变种微藻与培养时间无关, 光合作用的效率最高, 由此可见, 微藻可有效固定光合作用时所需要的二氧化碳。

[0078] <1-4> 淡水藻类的生长率测定

[0079] 在上述〈实施方式 1-2〉的 CHU-10 培养基或〈实施方式 1-3〉的 BG-11 培养基, 亦或是 CHU-10 培养基中, 加入 5% 的生物活性水 (花岗岩、浮石、腐蚀土及用微藻发酵的 BMW, bacteria mineral water), 接种上述〈实施方式 1-2〉的淡水藻类。将上述接种的淡水藻类按照一定的明暗周期 (14h/L, 10h/D), 在 22 摄氏度下, 供给 $140 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光度进行培养, 在培养的每 2 天或 3 天, 用分光光度计, 在 750nm 中测定吸光度, 并利用下列计算公式, 计算细胞分裂率 (r)。上述测定结果如图 4 所示。

[0080] [计算公式 3]

$$[0081] \quad r = \frac{\log_2(N_1/N_0)}{t_1 - t_0}$$

[0082] N_0 : 初期 750nm 的吸光度

[0083] N_1 : 最终 750nm 的吸光度

[0084] t_0 : 初期培养日

[0085] t_1 : 最终培养日

[0086] [表 3]

[0087] 13 日间所培养的微藻细胞生长变化比较 (- : 不足 0.01)

[0088]

Species	Media	Growth rates*	Chl. a (mg/L)	Quantums
<i>Anabaena variabilis</i>	BG-11	0.45	9.77	0.45
<i>Arthrospira</i> sp.	BG-11	0.21	7.62	0.55

[0089]

Calothrix sp.	BG-11	-	2.45	0.27
Chlorella ellipsoidea	CHU-10	-	1.58	0.06
Chlorogloeopsis sp.	BG-11	0.27	9.13	0.51
Coelastrum microporum	BG-11	-	2.98	0.54
Coelastrum reticulatum var. cubanum	BG-11	0.05	3.94	0.58
Leptolyngbya sp.	BG-11	-	2.88	0.05
Monoraphidium contortum	CHU-10	-	3.97	0.37
Scenedesmus acutus	BG-11	0.2	7.2	0.52
Scenedesmus bernardii	BG-11	0.31	9.54	0.38
Scenedesmus obliquus	BG-11	0.34	6.04	0.5
Scenedesmus producto-capitatus	BG-11	0.82	15.11	0.59
Spirulina maxima	CHU-10	-	3.95	0.1
Stigeoclonium sp.	CHU-10	-	2.62	0.1
Tetradasmus wisconsinensis	BG-11	0.42	9.78	0.38

[0090] [表 4]

[0091] 11 日间所培养的微藻细胞生长变化比较 (- : 不足 0.01)

[0092]

Species	Media	Growth rates	Chl <i>a</i> (mg/L)
<i>Anabaena variabilis</i>	BG-11	0.44	7.55
<i>Anabaena variabilis</i>	BG-11+ BM5%	0.71	13.2
<i>Chlorogloeopsis</i> sp.	BG-11	0.18	2.71
<i>Chlorogloeopsis</i> sp.	BG-11+ BM5%	0.54	3.07
<i>Scenedesmus bernardii</i>	BG-11	0.77	5.59
<i>Scenedesmus bernardii</i>	BG-11+ BM5%	--	3.3
<i>Scenedesmus producto-capitatus</i>	BG-11	0.96	18.6
<i>Scenedesmus producto-capitatus</i>	BG-11+ BM5%	0.87	10.91
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i>	BG-11	--	8.78
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i>	BG-11+ BM5%	0.64	7.3

[0093] 如图3及图4所示,本发明的凸头状栅藻原变种微藻与其它淡水藻类相比,叶绿素a的浓度高、叶绿素a的光合作用效率也很高,具有良好的二氧化碳固定性,同时其细胞生长率也很高,具有较高的产业应用性。

[0094] <1-5> 本发明的凸头状栅藻原变种微藻的标定及保藏

[0095] 一、标定方法

[0096] 栅藻属中的微藻是栖息在水坑、河川、洼地甚至是潮湿的土壤中的微藻,外形呈月牙状或椭圆状,由2个、4个、8个细胞互相连成一行,或交互地排列成两列。尤其各个细胞较滑,细胞末端有长刺,在各个细胞上有薄刺,还有突起部及隆起部(ridge)等。

[0097] 凸头状栅藻原变种微藻,由四个细胞形成群体,群体以直线或略微的交互相接,细胞的中间部略鼓,两端凹陷,其最大的特征就是各细胞的细胞壁变厚,或像针一样变尖的细胞末端略微鼓出,根据培养条件,细胞模样变成交互的群体或变成椭圆形的单一细胞。

[0098] 通过上述的形态特征,本发明者在显微镜上设置反射镜,将在试纸上的微藻模样抓拍下来,并将其与上述特征进行比较,从而来标定本发明凸头状栅藻原变种微藻。上述本发明微藻在光学显微镜下的照片如图1所示,图1的A(1000倍)是BG11培养基中营养源丰富时的照片;图1的B(400倍)是BM80%培养基中营养源不足时,单一细胞形成群体,呈月牙状变形的照片。

[0099] 二、保藏

[0100] 上述分离及标定的凸头状栅藻原变种微藻于2008年5月21日向生物资源中心(位于韩国大田市儒城区渔隐洞)提出保藏,保藏编号为KCTC11336BP。

[0101] <实施方式2>

[0102] 本发明微藻二氧化碳的固定性评价

[0103] 为了利用微藻有效地去除二氧化碳,有必要测定二氧化碳浓度下进行的光合作用的速度。本发明者为了确认上述问题,进行了二氧化碳浓度下二氧化碳吸收程度及二氧化碳浓缩机制(Carbon concentrating mechanisms, CCM)实验,并制成P-I curve。

[0104] <2-1> 按照二氧化碳浓度评价二氧化碳的固定性

[0105] 根据光合作用时所需的二氧化碳浓度,人为地按浓度类别注入二氧化碳,在非人为注入的对照区(0%)及在注入5%、10%的二氧化碳时,本发明微藻可依据已公开的以往

技术来测定其二氧化碳吸收程度,其测定结果如图 4 所示。

[0106] 如上述图 4 所示,本发明微藻在高浓度(10%)的二氧化碳中,更可有效地吸收二氧化碳,并将其固定。

[0107] <2-2>CCM 实验

[0108] 本发明的凸头状栅藻原变种微藻接种在 BG11 培养基上,在 25 摄氏度下,通过 12 小时的明暗周期进行电培养。此时二氧化碳的浓度分别为 0.035%、5%、10%,为了完全去除上述电培养微藻的二氧化碳,进行圆心分离,然后将上述微藻接种在完全没有二氧化碳的 BG11 培养基上,并喷注 60 毫升的氧气瓶。在完成上述喷注后,进行 3 个小时的培养,并测定培养前后的氧气浓度。此时为了使无机碳素的浓度为 0、0.2、0.6、1.2、4mM,通过上述测定的培养前后的氧气浓度来测定光合作用的速度,其测定结果如表 5 所示。

[0109] [表 5]

[0110] CCM 实验结果

[0111]

CO ₂ condition	0.035%	5%	10%
V _{max} (mgO ₂ /mgchl. a/hr.)	19.64	33.92	36.56
K _m (DIC)(mM)	0.02	0.03	0.31
CCM Switch(ON or OFF)	ON	ON	OFF

[0112] 如上述表 5 所示,电培养时的二氧化碳的浓度较高的话,V_{max} 数值也变高;此外,在二氧化碳的浓度为 0.035~5%时,K_m 数值相同;在二氧化碳浓度为 10%时,K_m 数值则非常高。由此结果可知,本发明微藻在二氧化碳浓度为 0~5%时,可被 CCM 表达;但在浓度为 10%时,无法被表达。尤其是 CCM 是调节二氧化碳固定酶的仪器,作为可调节维持二氧化碳吸收临界值的调节装置(L.E.Fridlyand 1997 Biosystems,44:41-57),在二氧化碳的浓度较高时,本发明微藻不启动 CCM,吸收临界值以上的二氧化碳,并将其去除(J.Beardall 1989, Aquatic Botany,34:105-130)。

[0113] <2-3>P-I curve

[0114] 为了制成 P-I curve,按照光度类别测定光合作用的速度。上述光合作用速度的测定是利用 60 毫升的氧气瓶,依据 winkler 法,对氧气产生量进行测定(Hale and Melia 1913. Ind. Eng. Chem. 5:976-980)。将本发明的凸头状栅藻原变种微藻分为 3 个,分别进行 3 个小时的培养,并测定氧气产生量;此时光条件为 0、30、60、120、220、340 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 。并取本发明的凸头状栅藻原变种微藻培养液 50 毫升,用 GF/F 滤纸过滤,用 90% 的丙酮在光暗条件下进行 24 小时的保管,保管温度为 4 摄氏度,并利用分光光度计测定叶绿素(Chl. a)(Jeffrey and Humphrey 1975

[0115] Biochem. Physiol. Pflanz 167:191-194)。上述光合作用的速度依据 Platt's

[0116] model(Platt et al., 1980, J. Mar. Res. 38:687-701),以饱和光量评价。

[0117] [表 6]

[0118] P-I curve 结果

[0119]

CO ₂ condition	0.035%	5%	10%
Max. rate(mgO ₂ /mgchl. a/hr)	38.89	36.03	55.59
Alpha slope([mgO ₂ /mgchl. a/hr]/[$\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$])	0.80	1.22	3.44
Beta slope([mgO ₂ /mgchl. a/hr]/[$\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$])	0.04	0.07	-0.06

[0120] [0120] 如上述表 6 所示,本发明的凸头状栅藻原变种微藻的光合率在 $80 \sim 120 \mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 中饱和 (Platt et al., 1980, J. Mar. Res. 38 :687-701)。

[0121] <2-3> 二氧化碳固定性评价

[0122] 为了利用上述<实施方式 2-2>及<实施方式 2-3>的结果,评价本发明的凸头状栅藻原变种微藻的二氧化碳固定性,利用衣藻属 (*Chlamydomonas*) 作为实验对象,并对其 $V_{\max}$ 及 K_m 数值进行比较,其结果如表 7 所示。

[0123] [表 7]

[0124] 本发明的微藻及衣藻属微藻的光合作用参数比较

[0125]

CO ₂ condition		0.035%	5%	10%	
V _{max} (mgO ₂ /mgchl.a/hr)	<i>Chlamydomonas</i> (10℃)	7.88	8.05	-	
	<i>Scenedesumus</i> (25℃)	19.64	33.92	36.56	
K _m (DIC)(mM)	<i>Chlamydomonas</i> (10℃)	0.10	1.30	-	
	<i>Scenedesumus</i> (25℃)	0.02	0.03	0.80	

[0126] 如上述表 7 所示,本发明的凸头状栅藻原变种微藻在较高浓度的二氧化碳中,也可以表达 CCM,其 $V_{\max}$ 数值较高。通过上述结果,测定本发明微藻以 1 日为准,所能去除的二氧化碳的量。其结果显示,以 1 日为准,在每升培养基中最多可去除 0.88mg 的二氧化碳,即在每吨培养基中,可去除 880g 的二氧化碳。

[0127] <实施方式 3>

[0128] 本发明微藻的碳酸脱水酶 (carbonic anhydrase) 的表达变化

[0129] 通过观察微藻的二氧化碳固定及相关碳酸脱水酶的蛋白质表达变化,可进一步地确定本发明微藻的二氧化碳固定性。上述酶表达变化通过利用杜氏藻 (*Dunaliella* sp.) 为实验微藻来确定。

[0130] 进一步,利用上述杜氏藻微藻的 EST (expressed sequence tag), 获得碳酸脱水酶序列,并利用其制造碳酸脱水酶抗体。为了利用上述制成的抗体,来观察碳酸脱水酶的表达样态,进行 Western Blotting。首先,利用 SDS-PAGE 将蛋白质按照大小分离开,内参照 (loading control) 是考马 斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue) 染色,并用约 50kDa 的蛋白质定量。上述 Western Blotting 的进行结果如图 5 所示。

[0131] 如上述图 5 所示,二氧化碳浓度为 5% 时,本发明微藻的碳酸脱水酶表达骤减;在供给大量的二氧化碳时,无需碳酸脱水酶的表达。

[0132] 为了利用上述提取蛋白质,观察碳酸脱水酶的表达样态,添加进行 Western Blotting。首先,利用 SDS-PAGE 将蛋白质按照大小分离开,内参照 (loading control) 利用 bradford 溶液定量,利用 BSA (bovine serum albumin) 制成标准曲线 (standard curve)。上述定量的蛋白质参照各值。此外上述 Western Blotting 的进行结果如图 6 所示。

[0133] 如上述图 6 所示,杜氏藻微藻的 α -碳酸脱水酶抗体使用探测器时,可测到本发明微藻的碳酸脱水酶的蛋白质带。尤其是通过上述实验结果可知,不受二氧化碳浓度的影响,

α - 碳酸脱水酶抗体可持续表达。

[0134] 如上所述,本发明微藻不受二氧化碳浓度的影响,可表达同样程度的碳酸脱水酶,如上述<实施方式 2-1>的实验结果所示,随二氧化碳浓度的变化,Km 数值会有明显差异,本发明微藻即使在高浓度的二氧化碳中,也可以有效地培养。

[0135] <实施方式 4>

[0136] 本发明微藻大量培养下的二氧化碳固定性评价

[0137] 向广泛使用的 30 升规模的光生物反应器(Liflusi GP,Biotron,韩国)中供入 0%、5%、及 10% 的二氧化碳,且采集并供入含 10% 二氧化碳的 flue gas。此时,培养基设定为 BG-11, flowrate, 0.1 VVM, 在 20 摄氏度下,光度为 25 μ E/(m²s)。

[0138] 本发明微藻的初期接种浓度为 1×10^6 cells/mL,在上述培养过程中,根据二氧化碳的浓度来测定细胞数及细胞重量,其测定结果如图 7 所示。

[0139] 如上述图 7 所示,随着二氧化碳浓度的增加,细胞数及细胞重量的比例也随之增加。在 flue gas 中,供给相同浓度的二氧化碳时,63% 的细胞数生长,生物体重量约 80%。由此可见,在含氧化硫或氮氧化物的 flue gas 中,细胞的生长不受大影响。

[0140] 另外,在上述培养过程中,依据二氧化碳的浓度,二氧化碳固定率 的测定结果如表 8 所示。

[0141] [表 8]

[0142] 利用光生物反应器大量培养时的二氧化碳的固定性(单位:mmol/L/hr)

[0143]

实验次数	CO2-0%	CO2-5%	CO2-10%	Flue gas
1	0.146	0.231	0.282	0.302
2	0.191	0.076	0.454	0.105
3	0.042	0.057	0.167	0.074
4	0.091	0.112	0.200	0.221
5	0.010	0.114	0.241	0.091

[0144] 如上述表 8 所示,即使利用光生物反应器大量培植本发明微藻,其二氧化碳固定率也非常高,由此可见,本发明微藻在实际产业生产中可有效地应用于二氧化碳的去除。

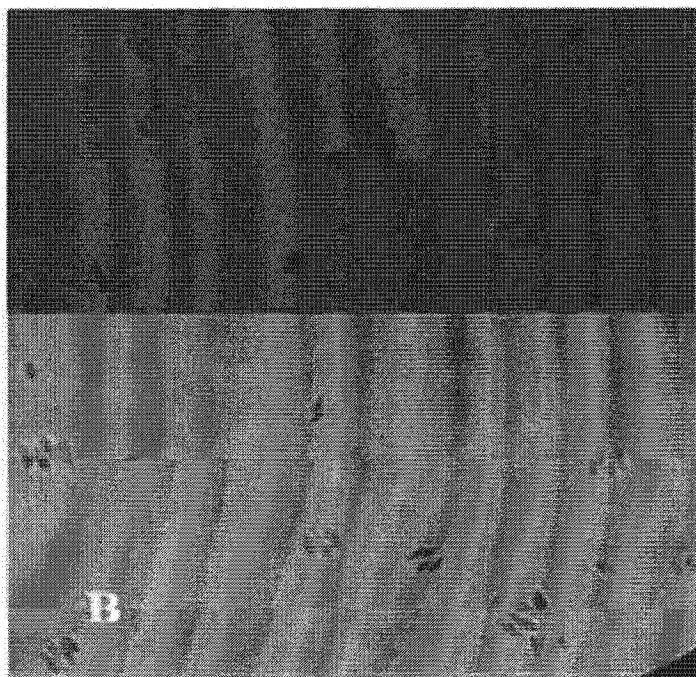


图 1

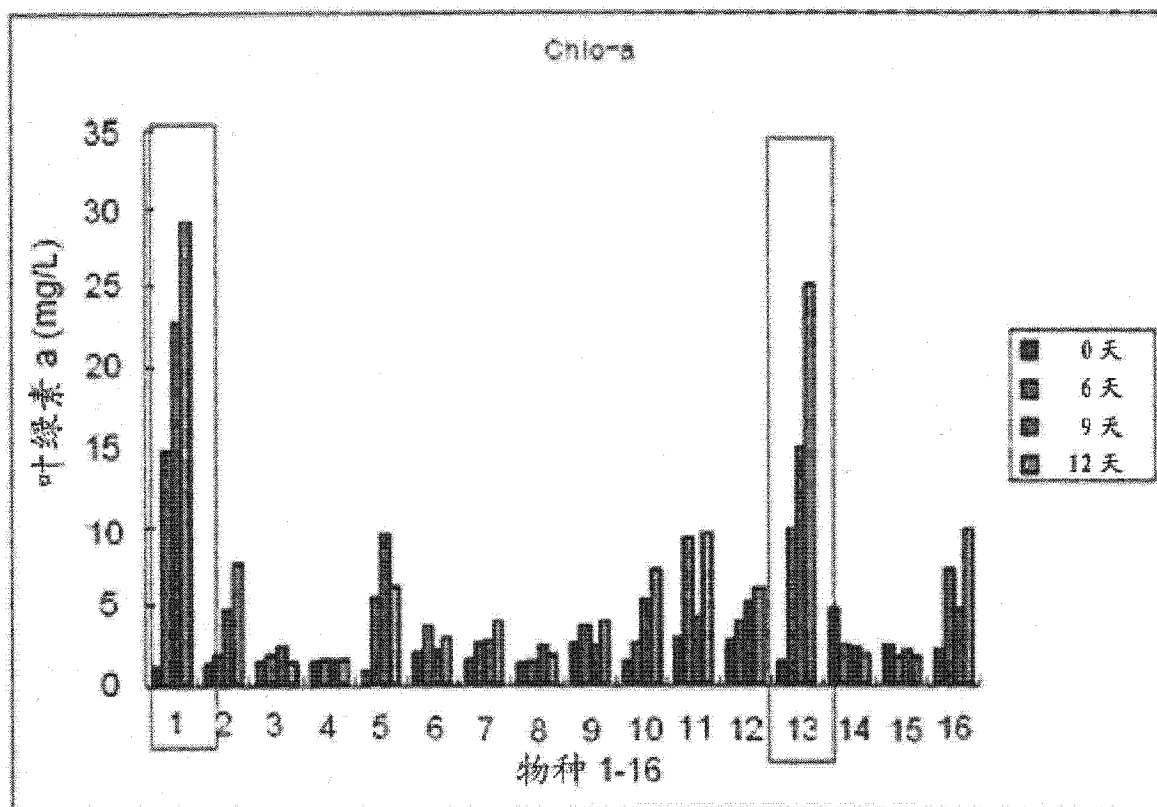


图 2

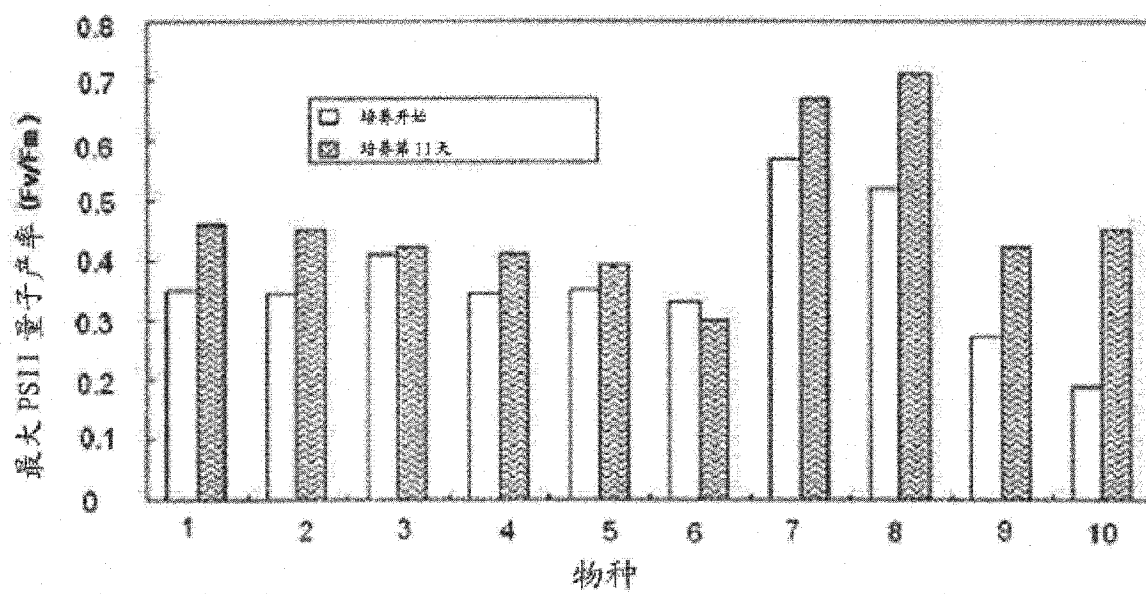


图 3

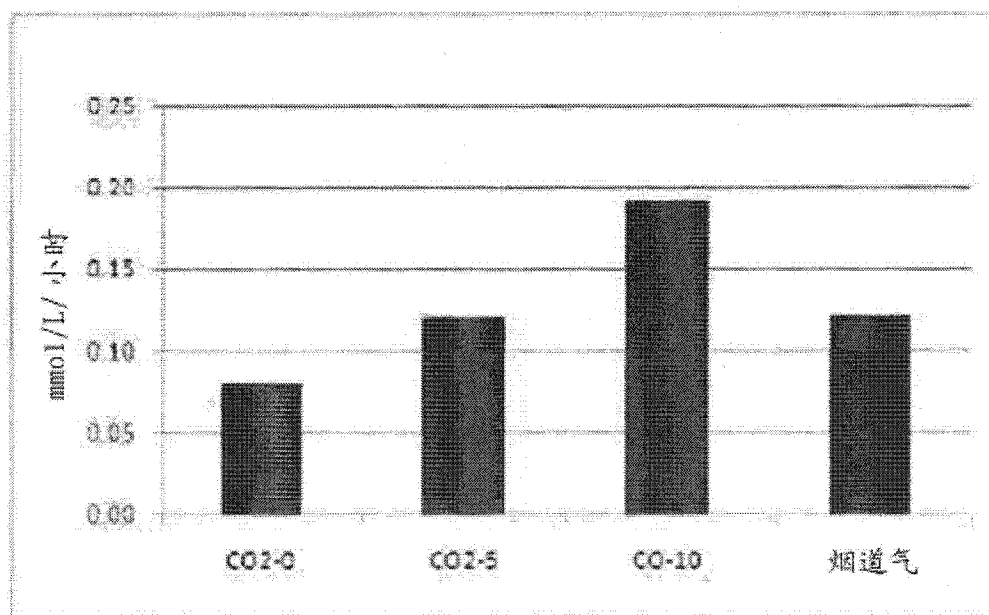


图 4

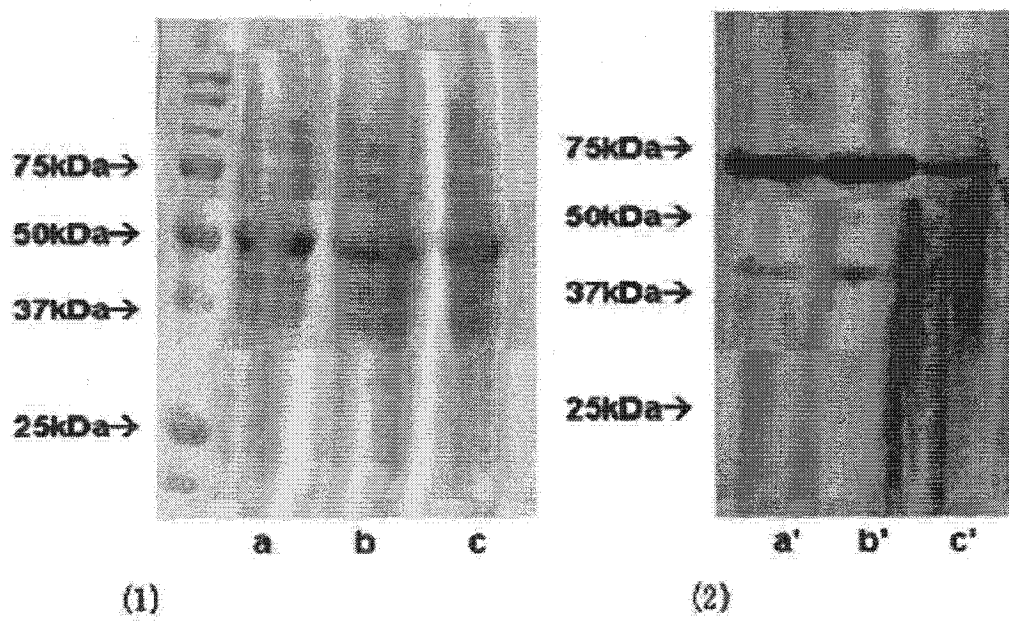


图 5

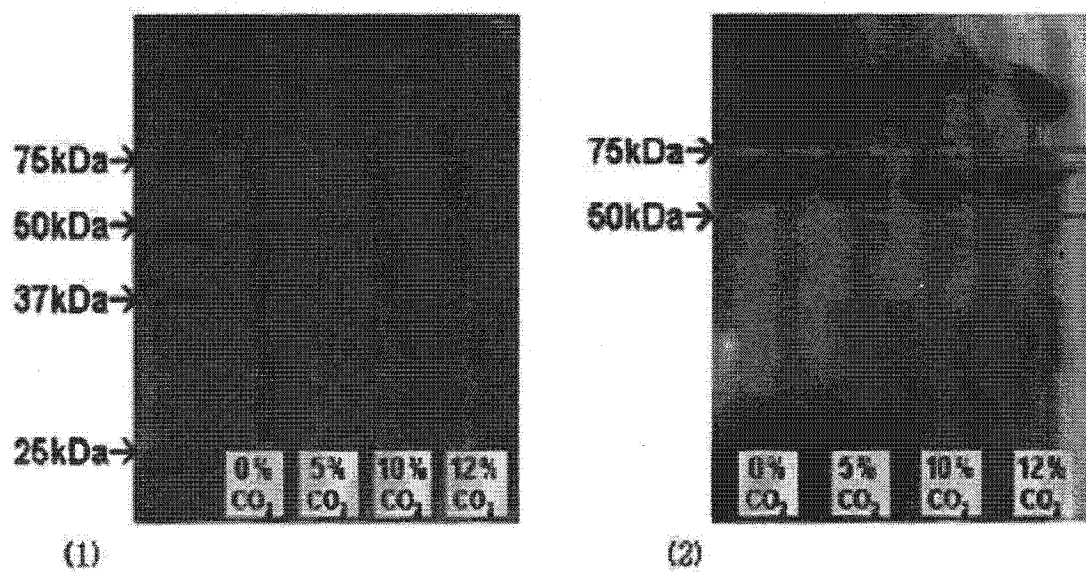


图 6

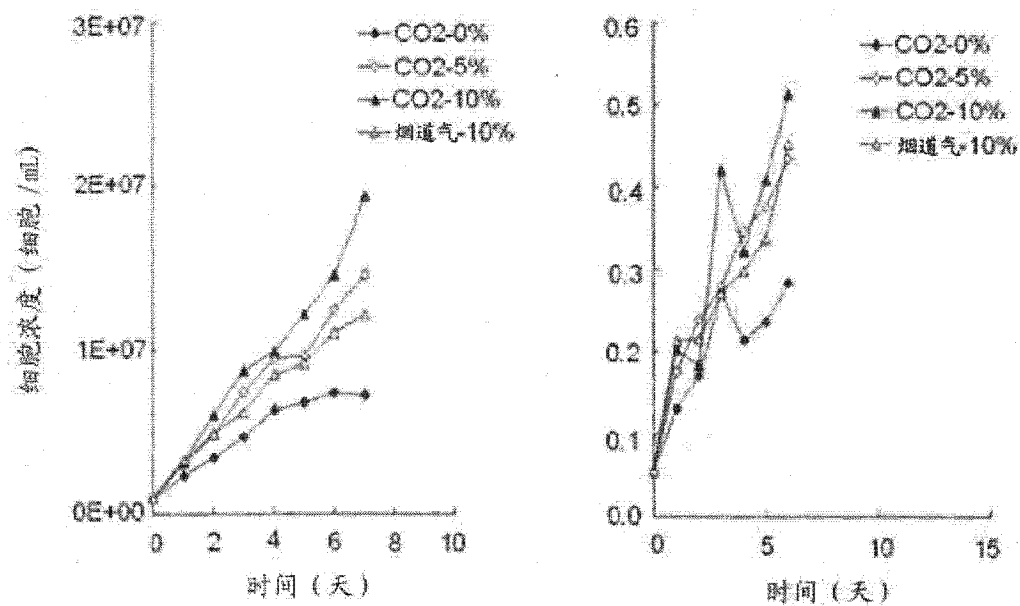


图 7