

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

藍綠菌生產糖或纖維素之研究

**Study on the Production of Sugar or Cellulose by Cyanobacteria**

計畫編號：1002001INER075

受委託機關(構)：輔英科技大學生物技術系

計畫主持人：周德珍

聯絡電話：07-7811151 轉 7907

E-mail address：dr008@mail.fy.edu.tw

核研所聯絡人員：周聖忻

報告日期：100年11月28日

## 目 錄

目 錄 .....	I
中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	2
壹、計畫緣起與目的 .....	3
一、計畫緣起 .....	3
二、計畫目的 .....	3
貳、研究方法與過程 .....	5
一、藻株培養 .....	5
二、 <i>Synechococcus</i> SP. PCC7942 共轉殖 <i>acsAB</i> 與 <i>ictB</i> 基因及轉殖株的篩選 .....	7
三、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>acsABCD</i> 轉殖載體之建構 .....	7
四、 <i>Synechococcus</i> SP. PCC7942 轉 <i>acsABCD</i> 及轉殖株的篩選 .....	8
五、海水藍綠菌 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 GFP 表達載體建構 .....	8
六、海水藍綠菌 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 <i>acsAB</i> 表達載體之建構 .....	9
七、海水藍綠菌 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 的轉殖與轉殖株篩選 .....	9
八、Colony PCR 檢測轉殖藍綠菌是否帶有目標基因 .....	9
九、RNA 萃取與 RT-PCR 分析 .....	10
十、Calcofluor white 染色及顯微鏡分析 .....	10
十一、顯微鏡觀察 <i>Synechococcus</i> SP. PCC7002 之 GFP 樣品 .....	10
十二、Glucose 含量分析 .....	11
十三、生長速率測定 .....	11
十四、光合作用測定( $O_2$ 釋放速率) .....	11
十五、氣舉式光反應器 .....	13
十六、V 型槽光反應器 .....	14

參、主要發現與結論 .....	15
一、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 轉殖藻株之建構 .....	15
(一) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 共轉殖 <i>ictB</i> 及 <i>acsAB</i> .....	15
1. 共轉殖 <i>ictB</i> 及 <i>acsAB</i> .....	15
2. <i>ictB</i> 及 <i>acsAB</i> 共轉殖株之 PCR 分析.....	16
(二) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 轉殖 <i>acsABCD</i> 基因 .....	18
1. <i>acsABCD</i> 基因轉殖載體之建構.....	18
2. <i>acsABCD</i> 轉殖株之 Colony PCR 與 RT-PCR 分析.....	20
二、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 轉殖藻株之建構.....	21
(一) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 轉殖 <i>GFP</i> 基因 .....	22
1. <i>GFP</i> 基因轉殖載體之建構.....	22
2. <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 <i>GFP</i> 轉殖株之 Colony PCR 分 析.....	24
(二) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 轉殖 <i>acsAB</i> 基因 .....	25
1. <i>acsAB</i> 基因轉殖載體之建構.....	25
2. <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 <i>acsAB</i> 轉殖株之 Colony PCR 與 RT PCR 分析.....	25
三、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>acsABCD</i> 轉殖株之 Calcofluor white 染色及顯微鏡分析 .....	26
四、CO <sub>2</sub> 濃度對 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>ictB</i> 轉殖株生長及光 合作用的影響 .....	29
五、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>ictB</i> 及 <i>acsAB</i> 共轉殖株之分析	31
(一) 轉殖株之生長分析.....	31
(二) 纖維素水解與葡萄糖分析 .....	32
六、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 <i>GFP</i> 轉殖株之 Fluorescence Microscopy 觀察 .....	33
七、 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 <i>acsAB</i> 轉殖株之葡萄糖含量分析	34
八、藍綠菌 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 及 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>acsAB</i> 氣舉式醱酵槽培養探討.....	35

九、建構 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 50 L V 型槽光反應器.....	36
肆、參考文獻.....	38

## 中文摘要

微藻纖維素或糖可作為生質酒精生產，而如何提高微藻大量培養之效率及增加纖維素或糖為主的生質產量是以微藻生產纖維素或糖的開發關鍵。本研究目的為建立微藻為纖維素及糖類的生產平台，目前已分別建構淡水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7942 與海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 之纖維素生產藻株，及建立 *Synechococcus* sp. PCC7942 V 型槽光反應器大量培養系統。由實驗結果，*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖 *ictB* 基因，與共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，不僅光合作用與細胞之生長速率提高，纖維素之產量亦明顯提高，所以提高 *acsAB* 轉殖株的  $C_i$  (inorganic C) 的利用是增加生物量的可行方法之一。以 Calcofluor white 染色檢測纖維素，發現 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 轉殖株細胞外物質染色後螢光明顯高於 *acsAB* 轉殖株。海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB* 轉殖藻經 celluclast 水解後之葡萄糖含量亦較 wild type 提高 2.3 倍。本研究不僅藉由基因轉殖達到提高微藻生長與增加微藻纖維素及糖產量的成效，並以光反應器建立藍綠菌之生長條件，此研究結果未來亦可提供微藻生產生質能產業化技術之依據。

## **Abstract**

Cellulose and sugar from microalgae can be utilized for the production of biofuel ethanol. Increasing cellulose and sugar synthesis capacity is key for high yield production of this biofuel. The objective of this project is to develop transgenic microalgae for high-yield production of cellulose and sugars. Currently, we have established the V-shape photobioreactor culture system for *Synechococcus* sp. PCC7942, and also established the transgenic cyanobacteria strains for producing cellulose, the freshwater cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7942 and the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. Our results demonstrate that overexpression *acsAB* and *ictB* genes in *Synechococcus* sp. PCC7942 result in the increase of cellulose production and cell growth. Cellulose hydrolysis with cellulast demonstrated that glucose yield increased 2.3 folds in *acsAB*-transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 in comparison with the wild type strains. Furthermore, increased extracellular production of cellulose as a result of *acsABCD* expression in *Synechococcus* sp. PCC7942 has been detected with Calcofluor white staining in comparison with the *acsAB* transgenic strain. In summary, we established the genetic modifications that lead to increased cellulose and sugar yield, and improved mass production of metabolically engineered microalga. The findings from the studies will not only provide a solid basis for potential commercialization of the technology but also open a novel avenue for developing microalgae as a renewable resource for energy.

## 壹、計畫緣起與目的

### 一、計畫緣起

藻類作為生質能開發的材料優點為：(一) 具有較高的光子轉換效率 (photon conversion efficiency) (以每一公頃的生物量為比較基準 biomass yields per hectare); (二) 全年生長，提供較可靠及全年的供應; (三) 可利用廢水及海水作為生長介質; (四) 可作為 CO<sub>2</sub> 吸收利用，減少溫室效應; (五) 生產的生質能為無毒害及高度可分解的特性; (六) 種類生物多樣性高。第一代生質能所利用的植物多為作物，生質能的利用造成人類糧食及畜牧飼料的排擠。藻類可在不適合作物生長之邊緣地區栽培，對於人類社經衝擊較輕。如開發高效率低成本的纖維素合成酶基因轉殖藍綠藻大規模生產乙醇，所需培養面積僅為玉米種植面積的 3.5%，可以減少耕地佔用，緩解森林濫伐壓力。此外這種纖維素合成酶基因 *acsAB* 轉殖藍綠藻的優點還包括：低成本的培養生產方式，因為藍綠藻為光合自營生物，可以行光合作用，利用人類與農作物用不著的廢水進行培養；且藍綠藻光合作用亦能進行空氣中二氧化碳之固定，達到減碳之效果；與由農作物中提取糖分時不同，可省去利用木材生產時所需的加工過程，可以在不影響藍綠藻正常生長的情況下，連續收集所分泌之纖維素與糖類；而有些藍綠藻能固定大氣層中的氮，故生長時無須添加氮肥。

### 二、計畫目的

微藻纖維素或醣可作為生質酒精生產料源，而如何提高微藻大量培養之效率及增加纖維素或醣為主的生質產量是以微藻生產纖維素或

醣的開發關鍵。本計畫將藉由轉殖 *Acetobacter xylinum* 纖維素合成酶基因增加微藻纖維素及糖產量，轉殖 *ictB* 基因提高微藻光合作用效率、建立 *acsAB* 轉殖藍綠菌之最佳生長條件以生產大量之轉殖微藻用於生質酒精生產。將分別以下列三種方式進行：

(一).以轉殖纖維素合成酶 *acsAB* 基因方式提高微藻之纖維素及糖含量，建構微藻之 *acsAB* 基因表達載體，藉由轉形或 conjugation 將 *acsAB* 基因表達載體轉入藍綠藻中，以生產微藻纖維素及醣類。比較與分析不同藻株纖維素及醣類產量之差異，以作為未來量產纖維素及醣類之材料。此外由於海水微藻具有可利用海水大量培養及不與農作物爭水的產業開發優勢，故本計畫將建構海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 之基因轉殖系統，以期可以海水大量培養生產纖維素及醣類。

(二).將能提高細胞 CO<sub>2</sub> 濃度之 *ictB* 基因（來自 *Synechococcus* sp. PCC7942)置入藻類基因組，以增進微藻的光合作用固碳效率，期能有效減少二氧化碳，並轉成生質物(Biomass)。使轉殖藍綠菌生質能增加，而進一步提高之纖維素及糖產量。

(三).微藻光反應器培養：建構微藻大量培養之 V 型光反應器系統，並利用氣舉式光反應器栽培建立微藻之最佳生長條件，再藉由最適化程序來求得最佳連續培養的操作策略，並將以光反應器的栽培結果作為改進轉殖藻類的依據。

## 貳、研究方法與過程

### 一、藻株培養

*Synechococcus* PCC7942 靜置培養於添加 10 mM EPPS 之 BG-11 培養基 (Stainer et al. 1971)，BG-11 培養基配方如 Table 1。  
*Synechococcus* sp. PCC7002 以 ASNIII 培養基培養 (Table 2)。  
*Synechococcus* PCC7942、*Synechococcus* sp. PCC7002 皆以 12h 光照 /12h 黑暗培養，培養溫度為 28°C。

表一、BG-11 培養基之組成。

Ingredient	g L <sup>-1</sup>	mM
NaNO <sub>3</sub>	1.5	17.65
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.04	0.18
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075	0.30
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036	0.25
Citric acid	0.006	0.03
Ferric ammonium citrate	0.006	0.03
EDTA (disodium magnesium)	0.001	0.003
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	0.19
Trace metal mix A5+Co	1 mL	
Deionized water	to 1 L	
pH after autoclaving and cooling: 7.4		

### Trace metals A5+Co

Ingredient	g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.390
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.049

表二、 ASNIII 培養基之組成。

Ingredient	g L <sup>-1</sup>	mM
NaCl	25.0	427
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.0	9.8
KCl	0.5	6.7
NaNO <sub>3</sub>	0.75	8.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.02	0.09
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.5	14.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5	3.4
Citric acid	0.003	0.015
Ferric ammonium citrate	0.003	0.015
EDTA (disodium magnesium)	0.0005	0.0015
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	0.19

Trace metal mix A5+Co                      1 ml  
Deionized water                              to 1 l  
pH after autoclaving and cooling: 7.5

### Trace metals A5+Co

Ingredient	g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.390
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.049

## 二、*Synechococcus sp.* PCC7942 共轉殖 *acsAB* 與 *ictB* 基因及轉殖株的篩選

將 *ictB* 轉殖載體藉由轉形轉殖於 *Synechococcus sp.* PCC7942 之 *acsAB* 轉殖藻細胞 (pPrbcL::*acsAB*)，並以抗生素 chlorophenicol 及 spectinomycin 進行共轉殖藻的篩選。

## 三、*Synechococcus sp.* PCC7942 *acsABCD* 轉殖載體之建構

將 pNS-PrbcL-*acsAB* 質體的 *acsAB* 基因以限制酵素 *Bam*HI 切除，與以 *Bam*HI 從質體 yT&A-*acsABCD* 切下之 *Acetobacter xylinum* *acsABCD* 基因，以 T<sub>4</sub> DNA ligase 進行黏合反應後，再以電穿孔轉形 *E.*

*coli*，建構為 *Synechococcus sp.* PCC7942 *acsABCD* 表達載體

pNS-PrbcL-*acsABCD*。質體的抽取、酶切、DNA 片段回收、DNA 片段連接、大腸桿菌轉形等實驗均參照文獻 (Sambrook et al, 1989)。

#### 四、*Synechococcus sp.* PCC7942 轉殖 *acsABCD* 及轉殖株的篩選

將 *acsABCD* 轉殖載體 pNS-PrbcL-*acsABCD* 藉由轉形轉殖於 *Synechococcus sp.* PCC7942 wild type 細胞，以 Spectinomycin 抗生素進行轉殖藻篩選。離心收集 10 mL *Synechococcus sp.* PCC7942 細胞，以 1 mL 添加 10 mM EPPS 之 BG-11 液體培養基懸浮藻細胞，並加入 2  $\mu\text{g}$  之 plasmid DNA，置於 28°C 黑暗震盪培養過夜後，隔天照光培養 6 小時後，以 14000rpm 離心 2 分鐘收集藻細胞，再以添加 10 mM EPPS 之 BG-11 液體培養基懸浮藻細胞後，取 100  $\mu\text{L}$  塗於添加 10 mM EPPS 及含 Spectinomycin (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) 之 BG-11 固體培養基，置於 28°C，照光培養，直到藻 colonies 生長。將固體培養基上長出之 colonies 以無菌牙籤挑選至含 Spectinomycin 之固體培養基上，照光培養後，將生長較好之藻株培養至添加 Spectinomycin 之液體培養基培養後，進行 Colony PCR 檢測藻株中是否帶有 *acsABCD* 基因。

#### 五、海水藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7002 GFP 表達載體建構

根據 pAM1956 的 GFP 序列設計引子，利用 PCR 方法以萃取自 pAM1956 的 plasmid DNA 為模板，依照設計之引子 *SmaI*-GFP-f、*BamHI*-GFP-r 擴增 GFP 片段。利用 TA Cloning 將擴增之 GFP 基因片段插入 T vector 中。以電穿孔方式把 ligation 的 DNA 轉入 *E. coli*。經定序

確認 *GFP* 片段後，將 *GFP* 基因片段切下，插入 pDESB 質體的 *Sma*I site 中，再以電穿孔轉形 *E. coli* 後，再將 *rbcL* promoter 基因置於 *GFP* 的上游處，建構成 pDESB-*PrbcL-GFP*，得到海水藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7002 *GFP* 表達載體之建構。質體的抽取、酶切、DNA 片段回收、DNA 片段連接、大腸桿菌轉形等實驗均參照文獻 (Sambrook et al, 1989)。

#### 六、海水藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7002 *acsAB* 表達載體之建構

將 pDESB-*PrbcL-GFP* 質體的 *GFP* 基因以限制酵素 *Bam*HI 切除，與以 *Bam*HI 從質體 yT&A-*acsAB* 切下之 *acsAB* 基因，以 T<sub>4</sub> DNA ligase 進行黏合反應後，再以電穿孔轉形 *E. coli*，建構為藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7002 *acsAB* 表達載體 pDESB-*PrbcL-ac*sAB。質體的抽取、酶切、DNA 片段回收、DNA 片段連接、大腸桿菌轉形等實驗均參照文獻 (Sambrook et al, 1989)

#### 七、海水藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7002 的轉殖與轉殖株篩選

將 *acsAB*、*GFP* 轉殖載體藉由轉形，轉殖於 *Synechococcus sp.* PCC7002，分別以含抗生素 Spectinomycin ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 之固體培養基進行轉殖藻篩選。

#### 八、Colony PCR 檢測轉殖藍綠菌是否帶有目標基因

培養轉殖株於含抗生素之培養基，取約 1 mL 的藍綠藻液，以 colony PCR 檢測具藍綠藻是否具有 *acsAB* 及 *ictB* 的基因。取藻 pellet

以 TE-triton solution (TE, pH 8.0 + 1% Triton X-100) 懸浮細胞後，以 95°C 處理 3.5 min，再以 chloroform 萃取兩次後，取上清液並以專一性引子進行 PCR 反應，檢測轉基因藍綠藻是否具有目標基因。

## 九、RNA 萃取與 RT-PCR 分析

離心收集培養兩星期的藻細胞 15 ml，打破細胞後，以 GENEMARK plant total RNA miniprep purification kit (cat#:TR02) 萃取 RNA。取 100 ng 萃取的 RNA，以 GENEMARK One-step RT PCR KIT (cat#:PR01-50) 進行 RT PCR。

## 十、Calcofluor white 染色及顯微鏡分析

將 *Synechococcus sp.* PCC7942 *acsABCD* 轉殖株及 *Synechococcus sp.* PCC7942 wild-type 培養液以 0.1% (w/v) 之 Fluorescent Brightener 28 (Sigma F3543) 與 15% (w/v) KOH 染液染色後，分別以 phase contrast microscope 與 Fluorescence microscope (LEICA DM2500, Ex. 377 ± 25 nm, Em. 447 ± 30 nm) 觀察。

## 十一、顯微鏡觀察 *Synechococcus sp.* PCC7002 之 GFP 樣品

將 *Synechococcus sp.* PCC7002 GFP 轉殖株與 wild type 在螢光顯微鏡 (LEICA DM2500 microscope equipped with epi-fluorescence, and phase contrast optics.)，分別以 phase contrast 與 Fluorescence microscope (Ex. 450 - 490 nm, Em. 510 - 550 nm) 下觀察。

## 十二、Glucose 含量分析

以 OD750 測量藻濃度後，離心後將 pellet 以 1 ml buffer (50 mM sodium acetate, pH 5) 回溶，分成兩管，其中一管加纖維素水解酶 celluclast 1.5L 及 Novozyme188 水解，另外一管不加 celluclast 1.5 L 作為對照組 (Nobles and Brown, 2008)。

兩管分別加入 0.2 g 海砂，以 minibead beater 打破細胞後，實驗組加入 24  $\mu$ l celluclast 與 4  $\mu$ l 188 (以 0.22  $\mu$ m filter 過濾)，對照組則加入 28  $\mu$ l buffer，置於 50°C 反應 48 小時。加入 1 ml 80% 的酒精在 65°C 下反應 3 小時萃取糖分，以 14800 rpm 離心 2 分鐘，將上清液移至新的 tube，pellet 以 0.3 ml 80% 的酒精在 65°C 下反應半小時，再以 14800 離心 2 分鐘，結合兩次的上清液置於 80°C 半小時。取 20  $\mu$ l 酒精萃取液至 96 well plate，加入 150  $\mu$ l PG.O 試劑 (50 mM HEPES, 3 mg/ml p-hydroxybenzoic acid, 0.1 mg/ml 4-aminoantipyrine, 0.5 units peroxidase, and 1.5 units glucose oxidase, pH 7.0) 反應 15 分鐘，測量 OD<sub>490</sub>。以序列稀釋後不同濃度的 glucose 作為 standard curve (Ou-Lee and Setter, 1985; Cheng, 1994)。

## 十三、生長速率測定

細胞以分光光度計測定其生長情形。取 1 mL 藻液以分光光度計 (Chromtech CT-5600) A<sub>750</sub> 測量 *Synechococcus* sp. PCC7942 之吸光值，並帶入標準曲線反算出 Biomass 含量。

## 十四、光合作用測定(O<sub>2</sub> 釋放速率)

氧電極是為測定水中溶氧含量而設計的一種極譜電(polarographic electrode)。目前通用的是薄膜氧電極(Clark 電極)，由鑲嵌在絕緣材料上的銀極(陽極)和鉑極(陰極)構成，電極表面覆蓋一層厚約 20 -25  $\mu$ m 的聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethene, PTFE)或聚乙烯薄膜 (polyethylene, PE)，電極和薄膜之間以飽和 KCl 溶液作為電解質。由於水中溶氧能透過薄膜而電解質(離子)不能透過，因而排除了被測溶液中各種離子電極反應的干擾，成為測定溶解氧的專用電極。氧電極具有靈敏度高，反應快、可連續測量記錄，能夠追蹤反應的動態變化過程等特點，因此常使用於葉綠體及線粒體懸浮液及水中植物的光合放氧和呼吸耗氧速率測定。

光合作用及呼吸作用以之氧電極(DW3, Hansatech, Norfolk, England)測水體氧氣含量之變化(陳，1998)。

(一)、溶氧電極校正：

利用零點及滿點的兩點校正，測定水中最大及最小溶氧量，並根據此兩數值求得斜率以做為計算之公式，換算樣品放入後水體的氧氣變化量。

(二)、零點校正：

校正溶氧電極零點時，加入適量之 Sodium hydrosulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )(Sigma, Missouri, USA)，等 Hansatech 系統之溶氧測定值穩定後，確認溶氧值為零，若無則重複上述動作直到溶氧值為零，即設為零點。

(三)、滿點校正：

校正溶氧電極滿點時，取 100 mL 之 30‰ 不含  $\text{NaHCO}_3$  之

ASW，倒入 500 mL 血清瓶打氣 5 分鐘取 15 mL ASW 置於系統，待 Hansatech 系統之溶氧測定值穩定後，確認溶氧值為滿點，即完成滿點校正。

#### (四)、溶氧測定：

每一時間點進行三重複，每一瓶為一重複，處理溫度為 23-25°C，藥劑於光照處理前 1 小時開始處理，光照後 0、0.5、1、2 及 3 小時取樣，共有光照前 1 小時(-1 小時)，光照後，0、0.5、1、2 及 3 小時樣點。

取 OD 0.2-0.3 之藻液 15 ml (cell number  $\approx 0.5 \times 10^6$  cell/ml)，置於 O<sub>2</sub> electrode chamber，光照強度為 200  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，測定時再加入 NaHCO<sub>3</sub> 最終濃度為 3 mM，光照(Halogen Deko-Lampen, SYLVANIA, Tokyo, Japan) 1-2 分鐘，測定其單位時間內釋出的氧氣量，此為淨光合作用速率(net photosynthetic rate)；隨後換新的藻體待其氧氣消耗速率穩定後(約需 5-10 分鐘)，在不照光下計算其單位時間內消耗的氧氣量，此為呼吸作用速率(respiration rate)，兩者相加值是總光合作用速率(gross photosynthetic rate)。

### 十五、氣舉式光反應器

氣舉式光反應器的優點是：造價低、易操作、實用性強，可長期運轉；占地面積小，光能利用效率和產量高；結構簡潔，可防止藻類附壁、纏繞和形成死角，有利於長期培養；循環混合溫和均勻，剪切力小，不損傷藻類，迴圈速度高並形成湍流，提高光能利用效率，可實現高密度培養；以及培養液無氧飽和，溫度不會異常升高，不需要附加去

氧裝置，不需要採用附加的降溫裝置和措施。以氣舉式醱酵槽結合光罩系統，開發改良式藻類光合反應器進行微藻醱酵試驗，以取得微藻所適生長條件如：光、溫度、pH、生長周期等條件，再依試驗狀況進行試驗條件改良，以得最適之生長條件。

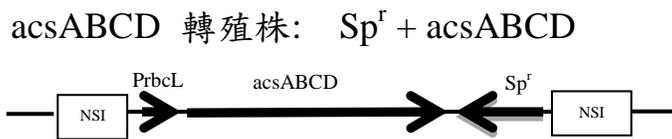
## 十六、V型槽光反應器

V型槽光反應器的優點是：易操作、實用性強，可長期運轉；占地面積小，光能利用效率和產量高；結構簡潔，有利於長期培養；提高光能利用效率，可實現高密度培養；以及培養液無氧飽和，溫度不會異常升高，不需要附加去氧裝置，不需要採用附加的降溫裝置和措施，另對於轉殖藻菌在於培養場地上，並不會去與大自然原生物種進行感染。以V型槽醱酵槽結合光反應器，開發改良式藻類光合反應器進行微藻醱酵試驗，以取得微藻所適生長條件如：光、溫度、pH、生長周期等條件，再依試驗狀況進行試驗條件改良，以得最適之生長條件。

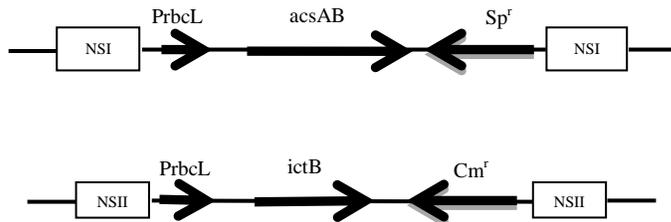
## 參、主要發現與結論

### 一、*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖藻株之建構

目前已獲得 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖株為：*acsABCD* 轉殖株、*acsAB* + *ictB* 共轉殖株。實驗中所用的 PCC7942 轉殖藻株示意圖如圖一。



*acsAB* + *ictB* 共轉殖株:  $Sp^r + acsAB + Cm^r + ictB$



圖一、實驗中所用的 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖藻株示意圖

#### (一)、*Synechococcus* sp. PCC7942 共轉殖 *ictB* 及 *acsAB*

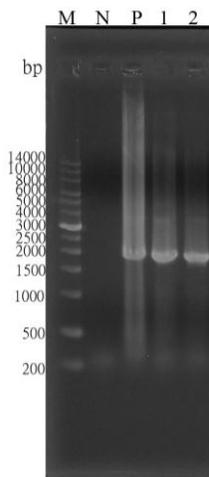
##### 1. 共轉殖 *ictB* 及 *acsAB*

*Synechococcus* sp. PCC7942 之 *ictB* 與 *acsAB* 共轉殖是以篩選出之 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB* 轉殖株(轉殖  $PrbcL::acsAB$  載體)，用於轉殖 *ictB* 載體( $PrbcL::ictB$  載體)，目前已獲得 *Synechococcus* sp.

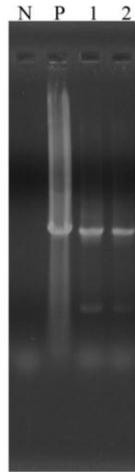
PCC7942 *ictB* 及 *acsAB* 之共轉殖藻株。

## 2. *ictB* 及 *acsAB* 共轉殖株之 PCR 與 RT-PCR 分析

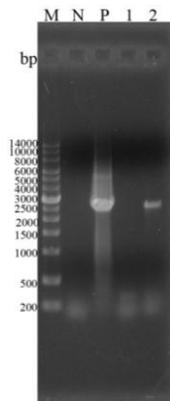
Colony PCR 檢測兩株 *Synechococcus* sp. PCC7942 之 *ictB* 與 *acsAB* 共轉殖株 (PrbcL-*acsAB*-*ictB*-1、PrbcL-*acsAB*-*ictB*-2)，兩株共轉殖藻株，以 primer PrbcL-For、*ictB*-Rev 進行 PCR 後，獲得片段大小約為 1.8 kb 與預期相同(圖二)，以 primer PrbcL-For、*acsA*-Rev 進行 PCR 後，獲得片段大小約為 2.5 kb 與預期相同(圖三)，且轉殖株皆能穩定存活於含 Spectinomycin 與 Chloramphenicol 抗生素的培養基中，抽取 RNA，分別利用 PrbcL-F 及 *acsA*-R、PrbcL-F 及 *ictB*-R 引子進行 RT-PCR 分析，分別獲得片段大小分別為 2.8 kb 與 1.8 kb，與預期相同，RT-PCR 分析結果顯示 *ictB* 與 *acsAB* 共轉殖株 PrbcL-*acsAB*-*ictB* 能表現 *acsAB* 基因與 *ictB* 基因 (圖四、圖五)。



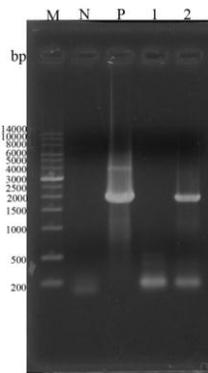
圖二、Colony PCR檢測*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*ictB*基因。Primers: PrbcL-For、*ictB*-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O)，P. positive control (PrbcL::*ictB* plasmid)，1. 轉殖株 PrbcL-*acsAB*-*ictB* -1，2.轉殖株PrbcL-*acsAB*-*ictB* -2。



圖三、Colony PCR檢測*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*acsAB*基因。Primers: PrbcL-For、acsAB-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O)，P. positive control (PrbcL::*acsAB* plasmid)，1.轉殖株 PrbcL-*acsAB*-*ictB* -1，2.轉殖株PrbcL-*acsAB*-*ictB* -2。



圖四、RT PCR檢測*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*acsAB*基因。Primers: PrbcL-For、acsA-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O)，P. positive control (PrbcL::*acsAB* plasmid)，1.PCC7942 wild type，2.轉殖株PrbcL-*acsAB*-*ictB* -1。



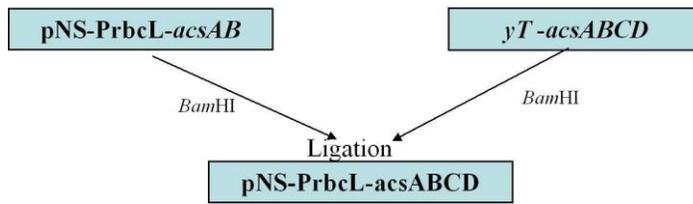
**圖五、RT PCR檢測*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*acsAB*基因。** Primers: PrbcL-For、*ictB*-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O)，P. positive control (PrbcL::*ictB* plasmid)，1.PCC7942 wild type，2.轉殖株PrbcL-*acsAB*-*ictB* -1。

## (二)、*Synechococcus* sp. PCC7942轉殖*acsABCD*基因

### 1. *acsABCD* 基因轉殖載體之建構

微藻 *acsABCD* 轉殖載體之建構部份，將 pNS-PrbcL-*acsAB* 中的 *acsAB* 基因以先前獲得之 *acsABCD* 基因置換後，建構完成 pNS-PrbcL-*acsABCD*，如 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 流程圖(圖六) 與表達載建構圖(圖七)。

目前已得到 pNS-PrbcL-*acsABCD* 選殖株，經 PCR 分析，發現 pNS-PrbcL-*acsABCD* 選殖株獲得的片段與預期符合(圖八)。由限制酶切圖譜分析，發現 pNS-PrbcL-*acsABCD* 選殖株之限制酶切片段與預期符合(圖九)。

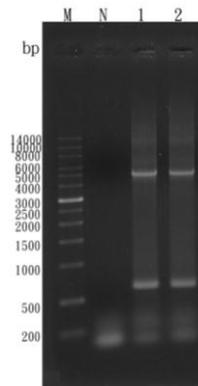


圖六、*Synechococcus sp.* PCC7942 *acsABCD* 表達載體建構流程圖

pNS-PrbcL-*acsABCD*



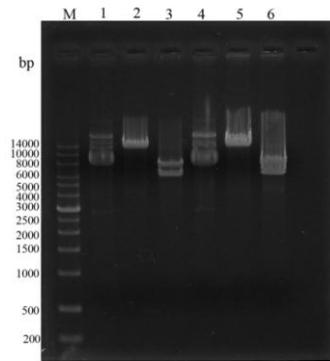
圖七、*Synechococcus sp.* PCC7942 之 *acsABCD* 基因轉殖載體



圖八、pNS-PrbcL-*acsABCD* 之 PCR 分析

Primer: *acsCD-F* 、 *acsCD-R* 。 N. Negative control

1. 選殖株 pNS-PrbcL-*acsABCD* -E5 。 2. 選殖株 pNS-PrbcL-*acsABCD* -E6 。

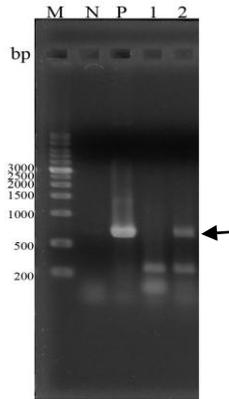


圖九、pNS-PrbcL-acsABCD 之限制酶切圖譜

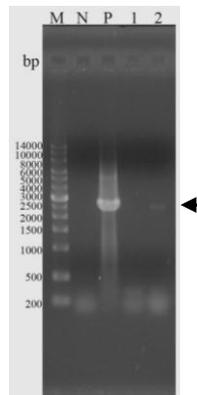
1. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E5 uncut , 2. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E5 NheI 切 , 3. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E5 BamHI 切 , 4. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E6 uncut , 5. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E6 NheI 切 , 6. 選殖株 pNS-PrbcL-acsABCD -E6 BamHI 切。

## 2. acsABCD 轉殖株之 Colony PCR 與 RT-PCR 分析

目前已獲得 *Synechococcus* sp. PCC7942 纖維素合成酶基因 *acsABCD* 轉殖株，PCC7942 之 PrbcL -*acsABCD* 轉殖株且轉殖株能存活於 2 $\mu$ g/ml Spectinomycin 抗生素中。Colony PCR 分析結果檢測出 PrbcL -*acsAB* 轉殖株具有 *acsAB* 基因（圖十），抽取 RNA，分別利用 PrbcL-F 及 *acsA*-R 引子進行 RT-PCR 分析，獲得大小為 2.8 kb 的片段，與預期相同，RT-PCR 分析結果顯示 *acsABCD* 轉殖株能表現 *acsABCD* 基因（圖十一）。



圖十、Colony PCR 檢測 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 轉殖株。  
Primer: *acsA* 1501-F 、 *acsA*-R 。 M. DNA Marker (0.2~14kb) ， N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O) ， P. positive control (*pNS-PrbcL-acsABCD* plasmid) ， 1. *Synechococcus* sp. PCC7942 wild type ， 2.轉殖株PrbcL-acsABCD-3 。



圖十一、RT-PCR 檢測 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 轉殖株。  
Primer: *PrbcL*-F 、 *acsA*-R 。 M. DNA Marker (0.2~14kb) ， N. Negative control. (d.H<sub>2</sub>O) ， P. positive control (*pNS-PrbcL-acsABCD* plasmid) ， 1. *Synechococcus* sp. PCC7942 wild type ， 2.轉殖株PrbcL-acsABCD-3 。

## 二、*Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖藻株之建構

目前已獲得海水藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖株為 GFP 轉殖株與 *acsAB* 轉殖株。實驗中所用的 PCC7002 轉殖藻株示意圖如圖十二。

GFP 轉殖株:  $Sp^r + GFP$



acsAB 轉殖株:  $Sp^r + acsAB$

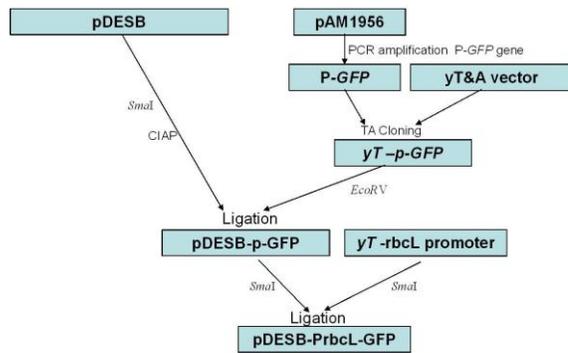


圖十二、實驗中所用的 *Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖藻株示意圖

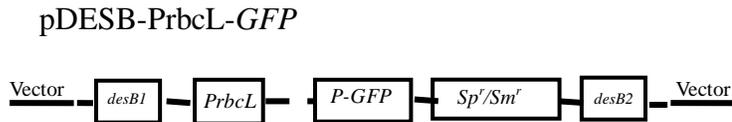
### (一)、*Synechococcus* sp. PCC7002轉殖GFP基因

#### 1. GFP 基因轉殖載體之建構

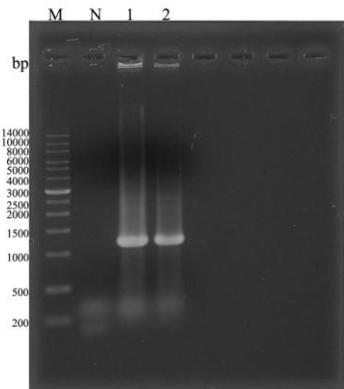
*Synechococcus* sp. PCC7002 GFP 轉殖載體之建構部份，將 *P-GFP* 基因選殖後，以 TA Cloning 方法分別放置於 yT&A Vector 中，再將 *P-GFP* 基因放置於 pAM1303-*T-desB1-Sp^r-desB2* 的  $Sp^r$  基因上游後，將 *rbcL* promoter 置於 *GFP* 基因上游，建構完成，PCC7002 *GFP* 表達載體 如 *Synechococcus* sp. PCC7002 *GFP* 流程圖(圖十三) 與 表達載建構示意圖(圖十四)。目前已得到 pDESB-PrbcL-*GFP* 選殖株，經 PCR 分析，發現 pDESB-PrbcL-*GFP* 選殖株獲得的片段與預期符合 (圖十五)。由限制酶切圖譜分析，發現 pDESB-PrbcL-*GFP* 選殖株之限制酶切片段與預期符合 (圖十六)。



圖十三、*Synechococcus sp.* PCC7002 GFP 表達載體建構流程圖

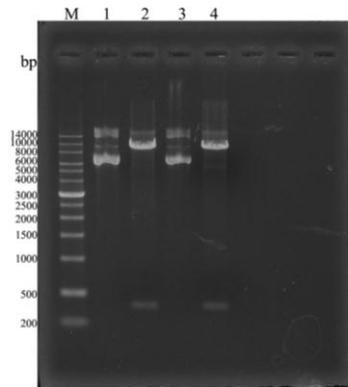


圖十四、*Synechococcus sp.* PCC7002 GFP 表達載體建構示意圖



圖十五、pDESB-PrbcL-GFP 之 PCR 分析

Primer: *PrbcL*-F 、 *GFP*-R 。 N. Negative control ， P. positive control ，  
 1. pDESB-PrbcL-GFP-A1 ， 2. pDESB-PrbcL-GFP-A4

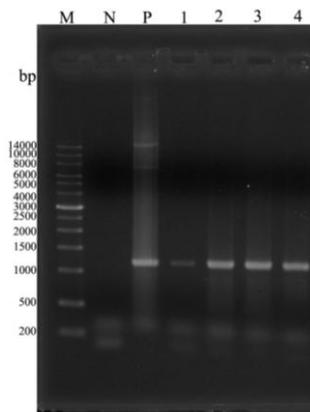


圖十六、pDESB-PrbcL-*GFP* 之限制酶切圖譜

1. pDESB-PrbcL-*GFP*-A1 uncut 2. pDESB-PrbcL-*GFP*-A1 *Sma*I 切 3. pDESB-PrbcL-*GFP*-A4 uncut 4. pDESB-PrbcL-*GFP*-A4 *Sma*I 切。

## 2. *Synechococcus* sp. PCC7002 *GFP* 轉殖株之 Colony PCR 分析

目前已獲得 PCC7002 之 PrbcL-*GFP* 轉殖株。以 rbcL-F、*GFP*-R 引子進行 PCC7942 *GFP* 轉殖株之 Colony PCR 分析，獲得片段大小為 1.2 kb，與預期相同（圖十七）。



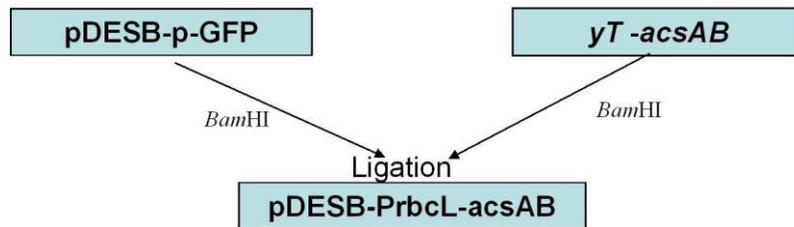
圖十七、PCC7002 PrbcL - *GFP* 之 Colony PCR 分析

Primer: rbcL-F、*GFP*-R。N. Negative control (dH<sub>2</sub>O)，P: Pastive control (PrbcL-*GFP* plasmid DNA)，1. PrbcL-*GFP* 選殖株 1 號，2. PrbcL-*GFP* 選殖株 2 號，3. PrbcL-*GFP* 選殖株 3 號，4. PrbcL-*GFP* 選殖株 5 號。

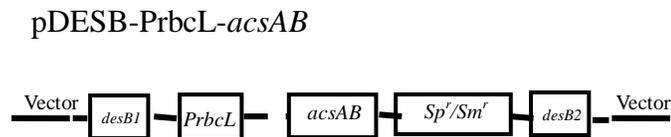
## (二) *Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖 *acsAB* 基因

### 1. *acsAB* 基因轉殖載體之建構

*Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB*轉殖載體之建構部份，pDESB-PrbcL-*GFP*中的*GFP* 基因以*acsAB*基因置換後，建構完成，PCC7002 *acsAB*表達載體 如*Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB*流程圖(圖十八)與表達載體建構圖(圖十九)。



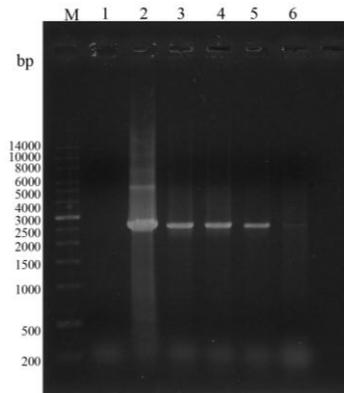
圖十八、海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 *GFP* 表達載體建構流程圖



圖十九、海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB* 表達載體建構圖

### 2. *Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB* 轉殖株之 Colony PCR 分析

目前已得到建構完成 PCC7002 之 *acsAB* 表達載體，進行電穿孔轉形後，獲得四管 PCC7002 *acsAB* 選殖株，經 PCR 分析，發現 PCC7002 *acsAB* 選殖株獲得的片段與預期符合 (圖二十)，且能生長於含有抗生素之培養液中 (圖二十一)。



圖二十、PCC7002 PrbcL - *acsAB* 之 Colony PCR 分析

Primer: PrbcL -F 、 *acsA* -R 。 1. Negative control , 2. positive control , 3. PrbcL-*acsAB* 轉殖株 1 號 , 4. PrbcL-*acsAB* 轉殖株 5 號 , 5. PrbcL-*acsAB* 轉殖株 6 號 , 6. PrbcL-*acsAB* 轉殖株 7 號。

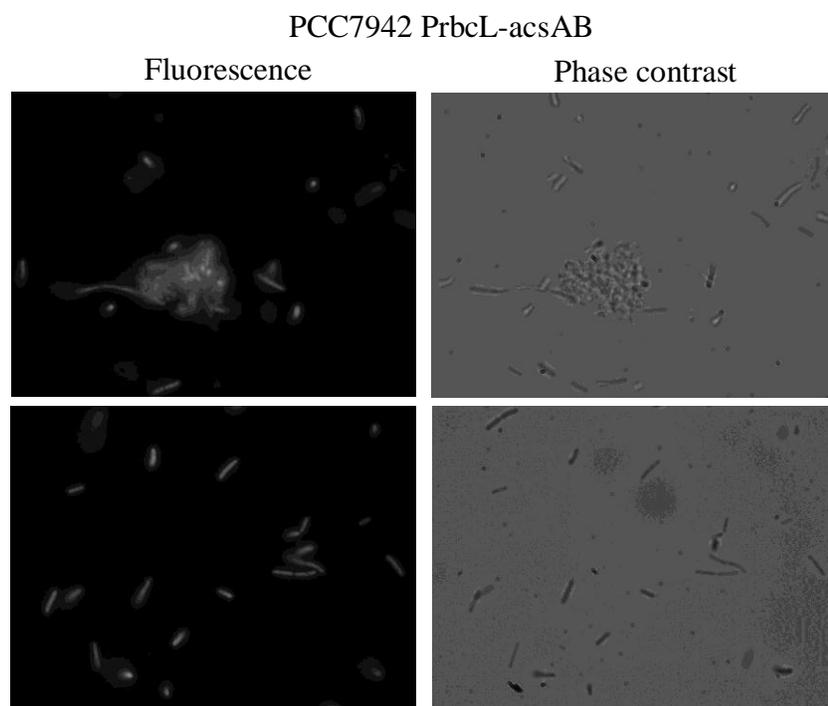


圖二十一、PCC7002 PrbcL - *acsAB* 轉殖株液體培養之生長情況

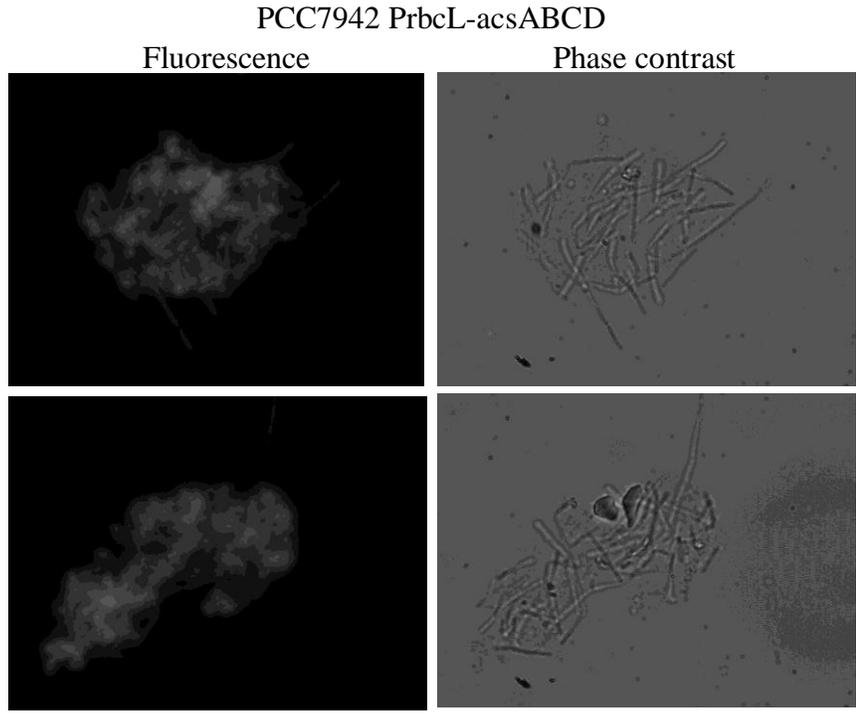
### 三、*Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 轉殖株之 Calcofluor white 染色及顯微鏡分析

將 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsABCD* 轉殖株、*acsAB* 轉殖株及 *Synechococcus* sp. PCC7942 wild-type 培養液以 Calcofluor white

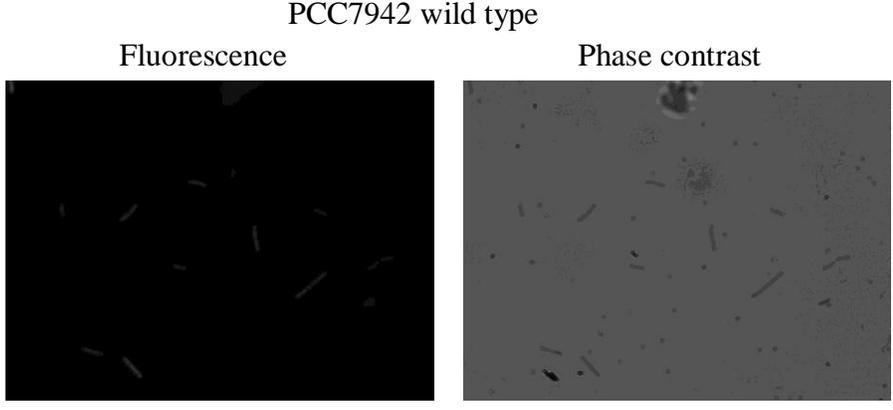
染色檢測纖維素，於螢光顯微鏡(LEICA DM2500, Ex. 352 - 402 nm、Em. 417 - 477nm)下觀察發現 *acsAB* 轉殖株染色後則發現細胞壁較 wild-type 厚，顯示 *acsAB* 基因轉殖株纖維素可能較多累積在藻細胞壁上(圖二十二)，而與 *acsAB* 基因轉殖株相比，*acsABCD* 轉殖株染色後出現較多細胞外物質，表示 *acsABCD* 轉殖株會分泌較多纖維素至細胞外(圖二十三)，wild-type 經染色後出現的螢光則較弱(圖二十四)，此結果顯示 overexpress *acsABCD* 可增加 *Synechococcus* sp. PCC7942 纖維素的胞外分泌。



圖二十二、 *Synechococcus* sp. *acsAB* 轉殖株之 Calcofluor white 染色顯微圖



圖二十三、 PCC7942 *acsABCD* 轉殖株之 Calcofluor white 染色顯微圖

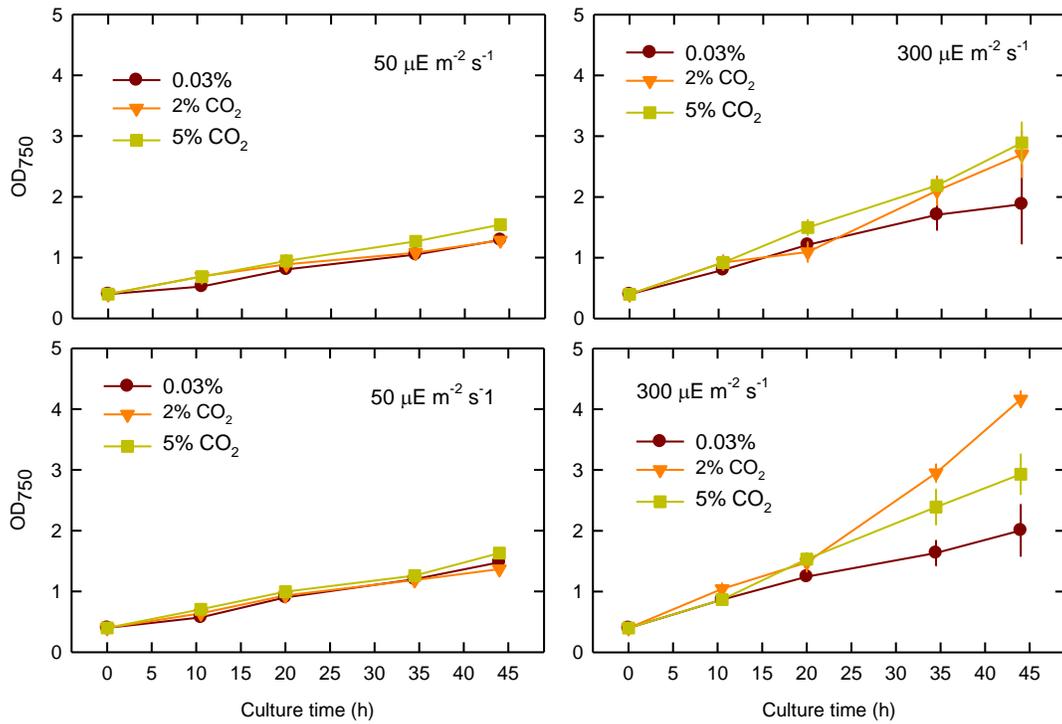


圖二十四、 PCC7942 wild type 之 Calcofluor white 染色顯微圖

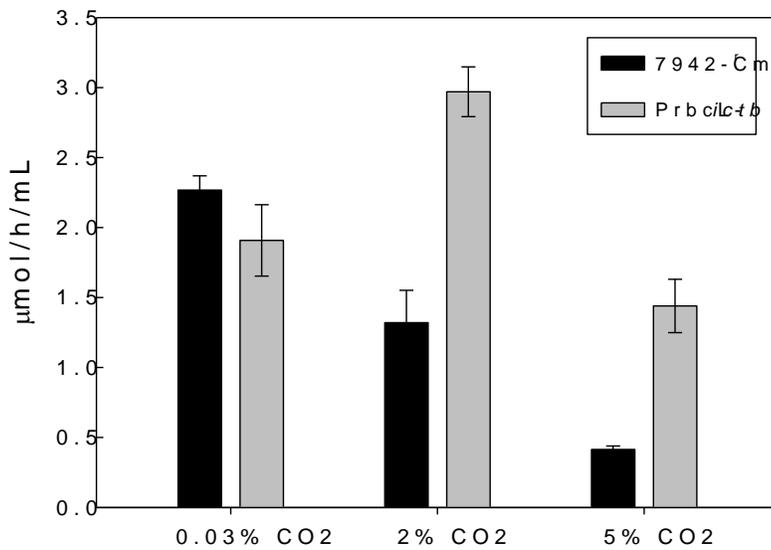
#### 四、CO<sub>2</sub> 濃度對 *Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB* 轉殖株生長及光合作用的影響

在 300 E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 光照下，觀察對照株及轉殖株通入空氣 (0.03% CO<sub>2</sub>) 或 2% CO<sub>2</sub> 或 5% CO<sub>2</sub> 之生長狀況 (OD<sub>750</sub>)，發現通入 2% CO<sub>2</sub> 所呈現出的生長速率在 20 小時後開始慢慢與空氣及 5% CO<sub>2</sub> 的生長速率有區分，生長 45 小時後，可明顯看出，通入 2% CO<sub>2</sub> 的轉殖株 OD<sub>750</sub> 已達到 4.0 左右，高於 5% CO<sub>2</sub> 之 3.0 及空氣之 2.0。證明轉殖株在 2% CO<sub>2</sub> 的環境，具有較高之生長力(圖二十五)。

光合作用速率是否與生長呈正比，以便粗略得知 *ictB* 轉殖株在 2% CO<sub>2</sub> 生長較高是否因光合作用速率增加而提高？所以，在生長期最快的直線期，測定光合作用速率。圖二十六 結果發現 PCC 7942 藻株實驗數據顯示，通入不同 CO<sub>2</sub> 濃度使藻株產生不同的光合作用速率，比較對照株及轉殖株看出，2% CO<sub>2</sub> 情況下，轉殖株明顯與另外 2 種濃度(0.03%、5%)有差異，以通入 2% CO<sub>2</sub> 的藻株來看，其轉殖株的光合作用速率是對照株的 2 倍，且明顯高於其他條件下的轉殖株。光合作用速率在通入 0.03% CO<sub>2</sub> 的對照株及轉殖株差異不大；通入 5% CO<sub>2</sub> 的對照株及轉殖株相比較，其轉殖株的光合作用速率較高，但卻沒有大於通入 0.03% CO<sub>2</sub> 的藻株。



圖二十五、The growth response (OD<sub>750</sub>) of the control (7942-Cm<sup>r</sup>) and transformant (PrbcL-ictB). Data are means±SD (n=3).



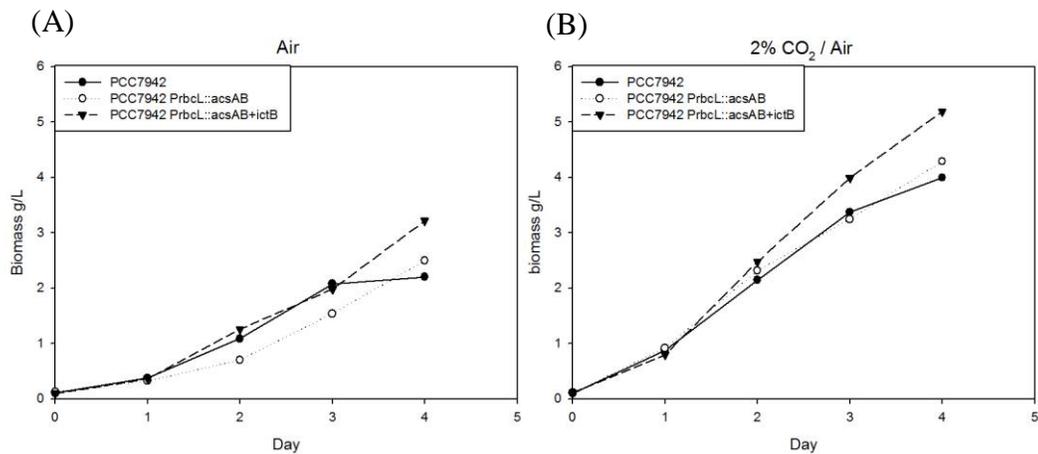
圖二十六、Net photosynthetic O<sub>2</sub> evolution rate of the control (7942-Cm<sup>r</sup>) and transformant (PrbcL-ictB).

## 五、*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*及*acsAB*共轉殖株之分析

### (一)、轉殖株之生長分析

*Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB*轉殖株PrbcL-*acsAB*-6、*acsAB*、*ictB*共轉殖株PrbcL-*acsAB*-*ictB*，及 PCC7942 wild type 分別接種於含抗生素的BG-11 pH 8.0 (Spectinomycin 2 µg/ml、chlamphenicol 7.5 µg/ml) 50ml 培養液各兩瓶，起始OD<sub>750</sub>約為0.1，以於光照度8000 Lux，28°C，分別通空氣與2% CO<sub>2</sub>/Air培養，通氣速率為0.4 vvm。每天測量OD<sub>750</sub>，並帶入標準曲線反算出Biomass含量，繪製轉殖株的生長曲線。

培養於 Air 狀態下，PCC7942 轉殖 *acsAB* 基因及共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，轉殖株的細胞生長均有增加，於培養第 4 天，*ictB* 與 *acsAB* 共轉殖株的 biomass 可達 3.2 g/L 生長較 wild type 的 biomass 2.2 g/L 高 1.45 倍(圖二十七 A)，培養於 2% CO<sub>2</sub>/Air 狀態下，PCC7942 轉殖 *acsAB* 基因及共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，轉殖株的細胞生長均可被促進。於培養第 4 天，*ictB* 與 *acsAB* 共轉殖株的 biomass 可達 5.2 g/L 生長較 wild type 的 biomass 4 g/L 高 1.3 倍(圖二十七 B)。

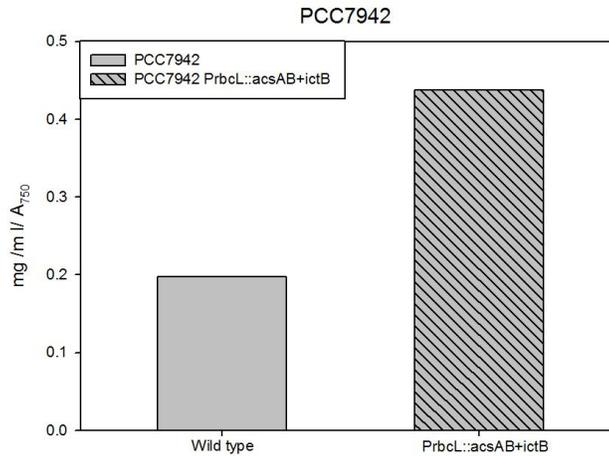


圖二十七、*Synechococcus* sp. PCC7942 wild type ( control ) 與 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB 、 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB-ictB 轉殖株培養之生長曲線，(A)Air 通氣培養、(B) 2% CO<sub>2</sub>/Air 通氣培養。

## (二)、纖維素水解與葡萄糖分析

*Synechococcus* sp. PCC7942 acsAB 、 ictB 共轉殖株

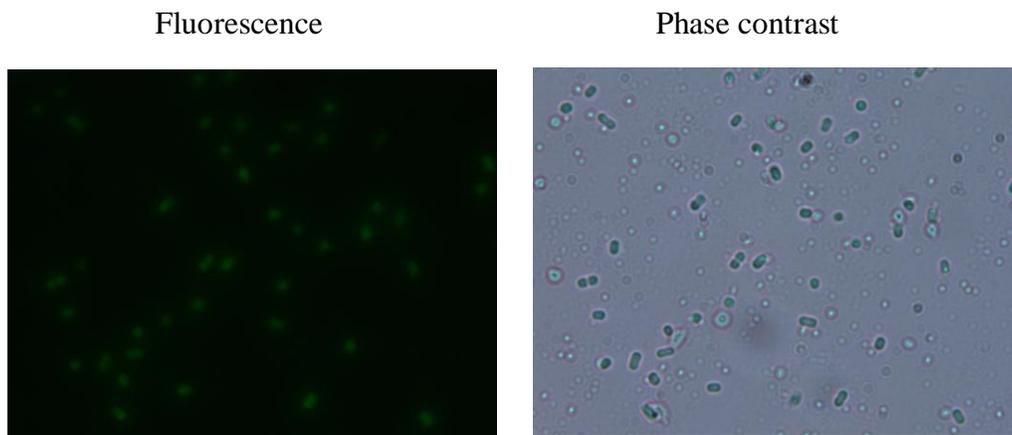
PrbcL::acsAB-ictB ，及 control PCC7942 分別培養於含抗生素的 BG-11 pH 8.0 ( Spectinomycin 2 μg/ml 、chlamphenicol 7.5 μg/ml ) 50ml 培養液，以於光照度 8000 Lux，28°C，通空氣培養，通氣速率為 0.4 vvm。每天測量 OD<sub>750</sub>，於培養第 4 天，離心收取藻細胞，進行 Celluclast 水解及葡萄糖含量分析。 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖株的葡萄糖含量分析結果， acsAB、 ictB 共轉殖株 ( PrbcL::acsAB-ictB ) 之 cellulose 水解之葡萄糖含量為 0.438 mg / m l / A<sub>750</sub> 是對照組 wild type 的 2.2 倍，顯示 *Synechococcus* sp. PCC7942 共轉殖 acsAB、 ictB 基因後，不僅促進生長，其纖維素亦明顯提高 ( 圖二十八 )。



圖二十八、*Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB-ictB 共轉殖株之葡萄糖含量分析。

#### 六. *Synechococcus* sp. PCC7002 GFP轉殖株之Fluorescence Microscopy觀察

*Synechococcus* sp. PCC702 轉殖 pDESB-PrbcL-GFP 之藻株，以螢光顯微鏡觀察發現篩選出之 GFP 轉殖株明顯出現螢光(圖二十九)。

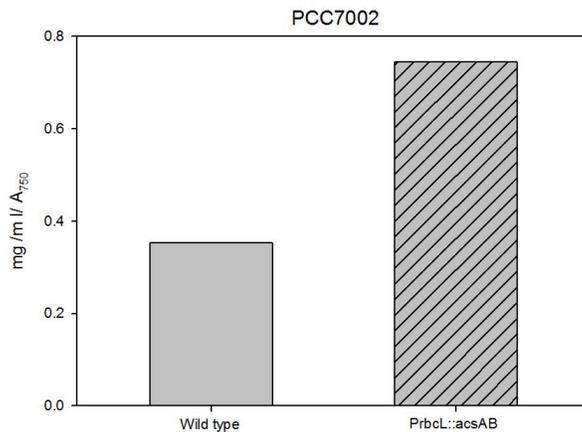


圖二十九、*Synechococcus* sp. PCC7002 PrbcL-GFP 螢光顯微圖

### 七、*Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB* 轉殖株之葡萄糖含量分析

*Synechococcus* sp. PCC7002 *acsAB* 轉殖株 PrbcL::*acsAB*，及 control PCC7002 分別培養於含抗生素的 BG-11 pH 8.0 (Spectinomycin 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 50ml 培養液，以於光照度 3800 Lux，33 $^{\circ}\text{C}$ ，靜置培養。於培養第 4 天，離心收取藻細胞，進行 Celluclast 水解及葡萄糖含量分析。

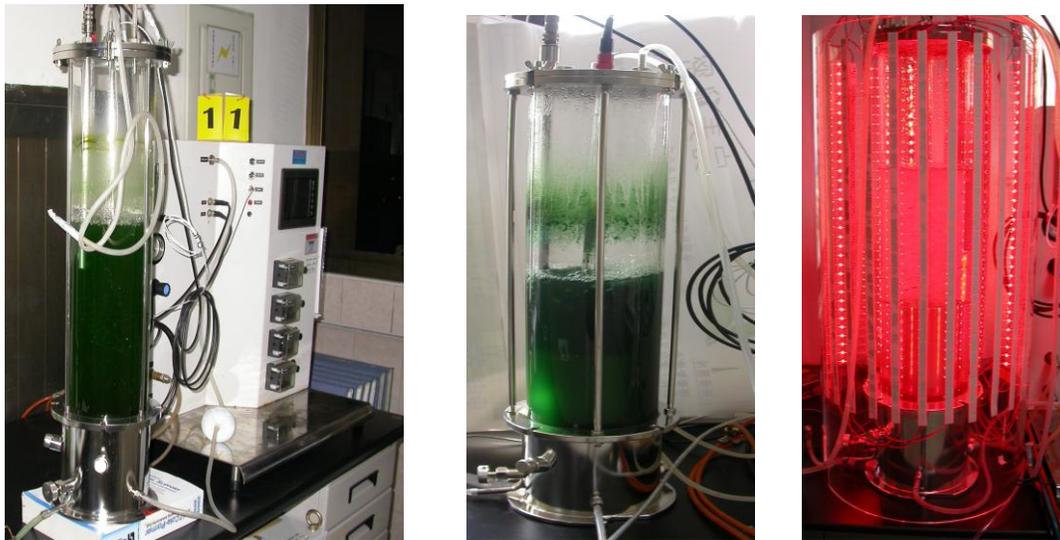
*Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖株的葡萄糖含量分析結果，*acsAB* 共轉殖株 (PrbcL::*acsAB-ictB*) 之 cellulose 水解之葡萄糖含量為 0.745 mg /m l/  $A_{750}$  是對照組 wild type 的 2.1 倍，顯示 *Synechococcus* sp. PCC7002 轉殖 *acsAB* 基因後，其纖維素亦明顯提高 (圖三十)。



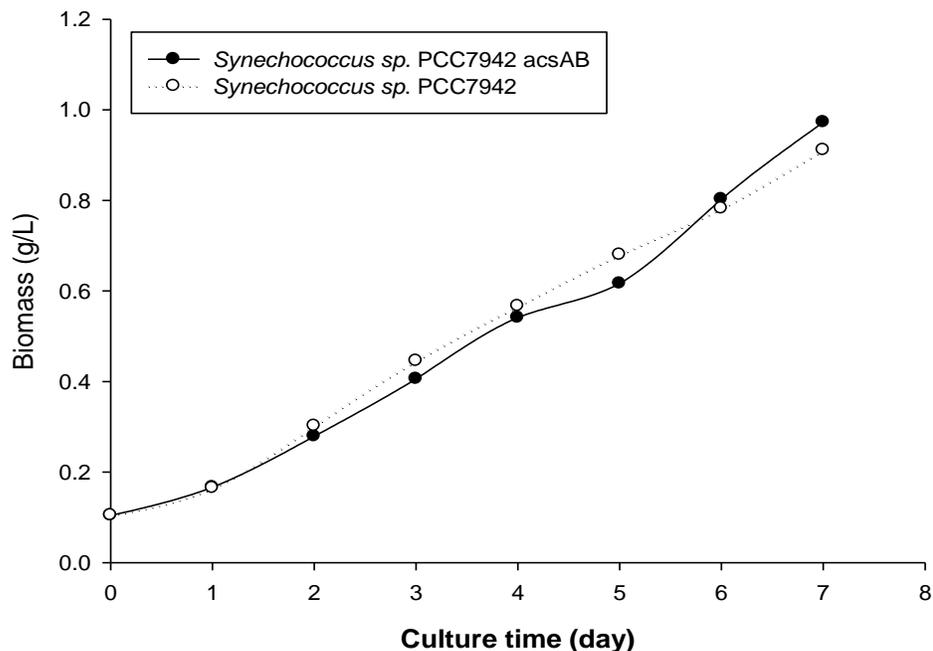
圖三十、*Synechococcus* sp. PCC7002 PrbcL::*acsAB* 轉殖株之葡萄糖含量分析。

## 八、藍綠菌 *Synechococcus sp.* PCC7942 及 *Synechococcus sp.* PCC7942 *acsAB* 氣舉式醱酵槽培養探討

利用 10L 氣舉式醱酵槽培養 *Synechococcus sp.* PCC7942 及 *Synechococcus sp.* PCC7942 *acsAB*，培養條件光源為 LED-紅光，光強度為 1200 lux，進氣量為 1vvm，溫度 28°C（如圖三十一所示），並於每天取樣測定生長濃度，以吸光值 OD<sub>750</sub> 測定，並回推藍綠菌生長濃度。培養至第七天，*Synechococcus sp.* PCC7942 生長濃度為 0.911 g/L，*Synechococcus sp.* PCC7942 *acsAB* 生長濃度為 0.973 g/L（如圖三十二所示）。



圖三十一、完成建構適用微藻專用的新式氣舉光單系統



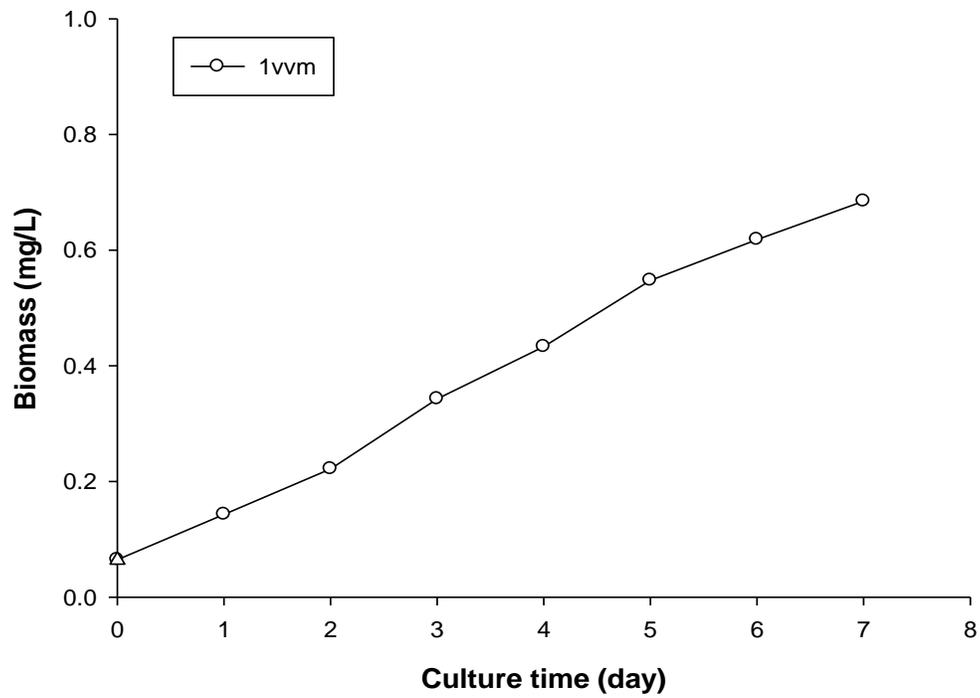
圖三十二、不同流速對 *Synechococcus sp. PCC7942* 及 *Synechococcus sp. PCC7942 acsAB* 培養於氣舉式醱酵槽培養探討

### 九、建構 *Synechococcus sp. PCC7942* 50 L V 型槽光反應器

建構完成 *Synechococcus sp. PCC7942* 50 L V 型槽光反應器大量培養，V 型槽光反應器系統以 *Synechococcus sp. PCC7942* 藍綠藻測試，V 型槽約可以培養 100L 藍綠藻液，此實驗將先針對一個 V 型槽光反應器，並配製 BG-11 培養液 50 L，另將原本放置外面照射光源 LED-紅光，改為放置 V 型槽光反應器系統內。其培養條件為：將 BG-11 培養液 50 L 加入 V 型槽光反應器系統內，在加入已培養 7 天 *Synechococcus sp. PCC7942* 藍綠藻 5 L，光源為 LED 紅光，光強度為 1200 lux，並於每天取樣測定生長濃度，以吸光值 OD<sub>750</sub> 測定，並回推藍綠藻濃度。培養至第七天，*Synechococcus sp. PCC7942* 生長濃度為 0.693 g/L (圖三十三、圖三十四)。



圖三十三、*Synechococcus* sp. PCC7942 培養於 50 L V 型槽光反應器



圖三十四、不同流速對 *Synechococcus* sp. PCC7942 培養於 50 L V 型槽光反應器

#### 肆、參考文獻

1. Becker, E.W.(1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. UK. p.1.
2. Carvalho A.P., L.A. Meireles, F. Malcata(2006). *Microalgal Reactors: A review of enclosed system designs and performances*. *Biotechnology Progress* 22:1490-1506.
3. Cheng, C.Y. 1994. *Role of Carbohydrate Supply and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid in Kernel Abortion of Maize (Zea mays)*. Master Thesis. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
4. Chisti, Y.(2007). *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
5. Chiu, S.Y., C.Y. Kaoa, M.T. Tsai, et al.(2009). *Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO<sub>2</sub> aeration*. *Bioresource* 21-23.
6. Dai, Wei, Shi, D.J., Zhang, H., Zhong, H., Ran, L., Peng, G.H., Gan, R.B., Chen, S.J., Lian, M.L. (2001) *Expression of human epidermal growth factor gene in cyanobacteria*. *Acta Botanica Sinica* 43(1) 1260-1264.
7. Kawano S, Tajima K, Uemori Y, Yamashita H, Erata T, Munekata M. and Takai M. (2002) *Cloning of cellulose synthesis related genes from Acetobacter xylinum ATCC23769 and ATCC53582: Comparison of cellulose synthetic ability between strains*. *DNA Research* 9: 149–156.
8. Kurano, N.I., H. Miyaashita, H. Hasegawa, et al.(1995). *Fixation and Utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis*. *Energy Concers. Mgmt.* 36: 689-692.

9. Lee Y.K.,C.S. Low(1992). Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 1119–1122.
10. Li, X.,H. Xu, Q. Wu(2007).Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*(98): 764-771.
11. Liu, Z.Y., G.C. Liu, et al.(2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Biorsource Technology*(99): 4717-4722.
12. Maillick, N(2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377-390.
13. Mazuca Sobczuk T, Garc ´a Camacho F, Camacho Rubio F, Acie ´n Ferna ´ndez FG, Grima EM(2000). Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 67(4): 465-475
14. Mouget J.L.,P. Rosa,G. Tremblin.(2006).Acclimation of *Hasleaostrearia* to light of different spectral qualities-confirmation of chromatic adaptation in diatoms. *Jurnal of photochemistry and photobiology B:biology*, 75:1-11.
15. Nobles DR, Brown RM Jr (2008) Transgenic expression of *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53582 cellulose synthase genes in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* strain UTCC 100. *Cellulose* 15: 691-701.
16. Ou-Lee, T.M. and T.L. Setter. 1985. Enzyme activities of starch and sucrose pathways and growth of apical and basal maize kernels. *Plant Physiol* 79: 848-851.

17. Sambrook, J, Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*.  
Now York: Cold Spring harbor Laboratory Press, (2nd).
18. Stainer, R.Y, R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-bazire. 1971.  
Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order  
Chroococcales). *Bact. Rev.* 35: 171-205.
19. Takagi, M., Karseno, and Yoshida, T., “Effect of Salt Concentration on  
Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine  
Microalgae *Dunaliella* Cells”, *Journal of Bioscience And  
Bioengineering*, 101, p.223-226, 2006.
20. Thiel, T. (1994) Genetic analysis of cyanobacteria, p. 581-611. *In*  
D.A. Bryant 9ed., *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer  
Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
21. Watanabe, Y., H. Saiki(1997).Development of a photobioreactor  
incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO<sub>2</sub> in stack gas. *Energy  
Conversion and Management* 38: 499-503.
22. Yun, Y.S., J.M Park(1997). Development of gas recycling  
photobioreactor system for microalgal carbon dioxide fixation. *Korean  
J. of Chem. Eng.*, 14(4), 297-300.