



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월01일
(11) 등록번호 10-1883985
(24) 등록일자 2018년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0053892

(22) 출원일자 2017년04월26일

심사청구일자 2017년04월26일

(56) 선행기술조사문헌

W02010123848 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

이태운

경기도 고양시 일산서구 중앙로 1557 1012호 (대
화동, 삼운트루아오피스텔)

홍카이

부산광역시 남구 용소로 45, 학생생활관 B-0818
(대연동)

고시원

부산광역시 남구 용소로 45, 학생생활관 B-0818
(대연동)

(74) 대리인

특허법인 신태양

전체 청구항 수 : 총 1 항

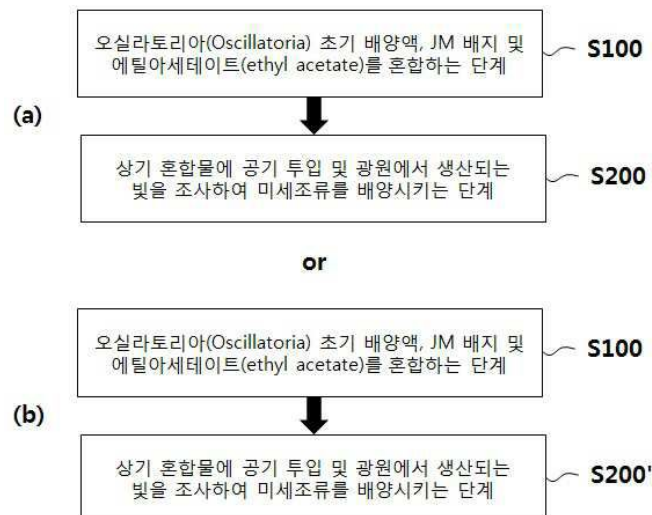
심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 미세조류인 오실라토리아를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류의 배양효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A11053120

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 멤베레인 모듈과 수중 LED를 이용한 클로렐라 지속적 농축배양 및 경제적 수확시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서,

오실라토리아(Oscillatoria) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및

상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200');를 포함하여 이루어지되,

상기 오실라토리아 초기 배양액은 초기 농도가 0.42 ~ 0.91 g/L이며,

상기 S100 단계는, 오실라토리아 초기 배양액 40 ~ 80 중량% 및 JM 배지 20 ~ 60 중량%로 이루어진 미세조류 배양액 100 ml에 대하여, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 5 ~ 40 mM를 혼합하고,

상기 S200' 단계는, 공기는 0.11 ~ 1.2 vvm의 속도로 투입하고, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 3,000 ~ 4000 Lux, 광량 50 ~ 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 조사되도록 하는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류인 오실라토리아(Oscillatoria)의 배양효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 식물성 플랑크톤에 의해 생산되는 유기물의 양은 연간 1×10^{11} 톤으로 추정되고 있다. 식물성 플랑크톤, 즉 미세조류는 많은 분야에 유용하게 이용이 되고 있는데, 대표적으로 어패류 양식을 위한 먹이생물로 이용되거나(비특허문헌 1), 연료, 단백질 및 천연색소 등의 고부가가치 소재의 공급원으로 사용될 수 있어 이와 관련된 많은 연구가 진행되고 있다(비특허문헌 2, 비특허문헌 3).

[0003] 이 중에서 미세조류(microalgae)를 이용한 바이오디젤 생산연구가 많이 진행이 되고 있는데 이는 기존 재료를 이용한 바이오디젤 생산에 비해 많은 장점이 있기 때문이다(비특허문헌 4, 비특허문헌 5). 예를 들면, 미세조류를 이용하여 생산된 바이오디젤의 에너지 근원은 태양에너지이므로 무한 공급이 가능하며, 연소 시 발생하는 CO_2

는 식물 또는 광합성 작용으로 회수되므로 탄소 중립적이기 때문이다. 미세조류 배양을 통해 생산된 최종 산물인 Biomass는 바이오연료 외에 동물 사료, 물고기 사료로 재사용함으로써 이산화탄소 저감과 대체연료 생산이라는 환경개선의 장점을 가지고 있다(비특허문헌 6 ~ 비특허문헌 9). 미세조류를 이용하여 바이오매스를 생산하는 것은 다음과 같은 장점이 있다. 미세조류는 과거 수십년 동안 많은 연구자들이 연구를 진행하였으며 30,000 종 이상이 연구가 완료되어 성장환경만 조절한다면 쉽게 원하는 미세조류를 배양할 수가 있다(비특허문헌 10). 미세조류의 lipids/oil 함량은 20-50%로서 비교적 높은 편이며 증식속도 또한 다른 육상식물에 비해 빠른 것으로 보고되었다(비특허문헌 10). 특히, 육상식물인 콩과 비교 시 동일 lipids/oil을 생산하는 데 필요한 부지는 49-132배 정도 작은 것으로 알려져있다(비특허문헌 11).

[0004]

한편, 미세조류의 배양방식은 생산된 바이오매스의 경제성에 큰 영향을 주는 요소이므로 최적의 배양방식을 선정하는 것이 중요하다고 할 수 있다(비특허문헌 12). 배양방식은 독립영양(autotrophy), 종속영양(heterotrophy), 혼합영양(mixotrophy), 그리고 광종속영양(photoheterotrophy)으로 구분되어 진다. 독립영양 배양방식은 대기중의 이산화탄소를 탄소원으로 사용하고 태양빛을 에너지원으로 하여 바이오매스를 생산한다. 종속영양 배양방식은 무기탄소인 이산화탄소를 사용하지 않고 배양액속에 포함된 유기탄소를 탄소원 및 에너지원으로 사용한다. 혼합영양 배양방식은 이산화탄소와 유기탄소를 탄소원과 에너지원으로 사용하여 바이오매스를 생산하는 방법이며, 광종속영양 배양방식은 태양빛을 이용하여 광합성을 하지만 이산화탄소를 이용하지 않고 유기탄소를 탄소원으로 사용하는 방식이다. 독립영양 방식은 오래전부터 사용되는 전통적인 방법으로 광범위하게 사용되지만 생산된 바이오매스의 농도가 낮아 수확효율을 고려하면 비경제적인 배양방식이라고 할 수 있다(비특허문헌 13). 대량배양 시 미세조류의 농도가 높아지면 빛이 침투할 수 없는 지역이 발생하게 되어 전체적인 배양효율을 낮추는 결과를 초래한다. 이러한 경우 혼합영양 배양방식을 적용하면 낮은 미세조류 농도에서는 독립영양 방식에 의해 미세조류가 성장하고 높은 미세조류 농도에서는 빛이 필요 없는 종속영양 방식에 의해 미세조류가 성장할 수 있다고 보고되었다(비특허문헌 14). 실제 혼합영양 방식을 적용한 경우 독립영양 방식에 비해 *Nannochloropsis* sp. 의 경우 1.6배(비특허문헌 15), *Neochloris oleoabundans*의 경우 1.5배(비특허문헌 16) 이상 농도가 증가하는 것으로 보고되었다.

[0005]

이에 대하여, 본 발명의 출원인은 오실라토리아(*Oscillatoria*)를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용할 경우 배양효율 및 최대바이오매스 생산효율을 향상시킬 수 있음을 도출하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

(비특허문헌 0001) 비특허문헌 1 :Hur, S., and H. Kim (1988) *Chlorella* cultivation for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis*. I. Selection of suitable *Chlorella* species. J. Aquaculture., 1: 135-143.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2 :Becker, E.W. (1981) Algae mass cultivation ? Production and utilization. Process Biochemistry, 8: 10-14.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3 :Hartig, P., Grobbelaar, J., Soeder, C., and J. Groeneweg (1988) On the mass culture of microalgae : A real density as an important factor for achieving maximal productivity. Biomass., 15: 211-221.

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4 :Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv., 25: 294-306.

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5 :Gouveia, L., and A. Oliveira (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36: 269-274.

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6 :Joen, S. M., Kim, I. H., Ha, J. M., and J. Lee (2008) Overview of Technology for Fixation of Carbon Dioxide Using Microalgae. J.Korean Ind. Eng. Chem., 19: 145-150.

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7 :Karube, I., Takeuchi, T., and D. Barnes (1992) Biotechnological Reduction of CO₂ Emissions. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 46: 63-79.

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8 :Stauber, J. L. (1998) Toxicity of chlorate to marine microalgae.

Aquat. Toxicol., 41: 213~227.

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9 :Shon, Y. H., Nam, K. S., and M. Kim (2004) Cancer chemopreventive potential of Scenedesmus cultured in medium based on swine wastewater. J. Microbiol. Biotechnol., 14: 158~161.

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10 :Khan, S. A., Mir Hussain, Z., Prasad, S., and U. Banerjee (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India. Renew. Sustain. Energy. Rev., 13: 2361-2372.

(비특허문헌 0011) 비특허문헌 11 :Yusuf, C. (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv., 25: 294-306.

(비특허문헌 0012) 비특허문헌 12 : Chen, H., Qiu, T., Rong, J., He, C. and Wang, Q. (2015), Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects, Appl. Energy, Vol. 155, No. 2, pp. 585~598.

(비특허문헌 0013) 비특허문헌 13 : Endo, H., Sansawa, H. and Nakajima, K. (1977), Studies on Chlorella regularis, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. Plant Cell Physiol., Vol. 18, No. 1, pp. 199~205.

(비특허문헌 0014) 비특허문헌 14 : Zhan, J., Rong, J. and Wang, Q. (2016), Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect, international journal of hydrogen energy, Vol. 7, No. 1, pp. 1~13.

(비특허문헌 0015) 비특허문헌 15 : Andrade, M. R. and Costa, J. A. V. (2007), Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. Aquaculture, Vol. 264, No. 1, pp. 130~134.

(비특허문헌 0016) 비특허문헌 16 : Giovanardi, M., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Tedeschi, P., Maietti, A. and Pantaleoni, L. (2013), Morphophysiological analyses of Neochloris oleoabundans (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product, Protoplasma, Vol. 250, No. 1, pp. 161~174.

(비특허문헌 0017) 비특허문헌 17 : Lee, J. K., Koh, T. H., Kim, S. K. and Lee, T. Y. (2009), A study on the Adsorptive removal of heavy metals using inflated vermiculites, Journal of Korean Geo-Environmental Society, Vol. 10, No. 6, pp. 61~68 (In Korean).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 미세조류인 오실라토리아(Oscillatoria)를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류의 배양효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 함을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서, 오실라토리아(Oscillatoria) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200);를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 과제의 해결 수단으로 한다.

[0009] 본 발명은 다른 실시예로써, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서, 오실라토리아(Oscillatoria) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200');를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 과제의 다른 해결 수단으로

한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 종래 미세조류 배양 보다 매우 높은 생산성과 경제성을 제공할 수 있으며, 이로 인해 경제적인 산업적 측면에서 미세조류 배양을 통하여 산업적으로 중요한 유용물질을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 바이오매스 및 산업적 유용물질은 중에 따라 건강보조식품, 사료, 화장품, 신약 개발원료, 수송연료나 교통에너지 등 여러 방법으로 활용될 수 있고, 수산 인공양식업의 발달에 따라 양어사료로써 미세조류의 수요가 증가하고 있으며 미네랄, 비타민, 필수 아미노산을 다량 함유하고 있다는 특징과 다양한 생리활성을 가지고 있어 사료첨가제, 식품첨가물 및 화장품, 의약품으로서 이용가능성을 지니고 있으므로 이러한 추세에 맞는 선도적인 발명으로 활용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 나타낸 공정 흐름도
 도 2는 본 발명에서 사용된 실험용 반응시스템을 나타낸 개략도
 도 3은 오실라토리아 초기 농도에 따른 성장 특성을 나타낸 도면
 도 4는 공기 주입에 따른 오실라토리아의 성장곡선을 나타낸 도면
 도 5는 아세테이트를 첨가한 경우 오실라토리아의 성장곡선을 나타낸 도면
 도 6은 에틸아세테이트 농도에 따른 배양 결과를 나타낸 도면
 도 7은 공기와 에틸아세테이트의 동시 주입 시 오실라토리아의 배양에 미치는 영향을 파악하기 위한 오실라토리아의 성장곡선을 나타낸 도면

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 상기의 효과를 달성하기 위한 본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로서, 본 발명의 기술적 구성을 이해하는데 필요한 부분만이 설명되며 그 이외 부분의 설명은 본 발명의 요지를 흐트리지 않도록 생략될 것이라는 것을 유의하여야 한다.

[0013] 이하, 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0014] 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법은 도 1의 '(a)'에 도시된 바와 같이, 오실라토리아 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트를 혼합하는 단계(S100) 및, 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200)를 포함하여 이루어지거나, 또는 도 1의 '(b)'에 도시된 바와 같이, 오실라토리아 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트를 혼합하는 단계(S100) 및, 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200')를 포함하여 이루어진다.

[0015] 보다 구체적으로 상기 S100 단계는, 초기농도가 0.42 ~ 0.91 g/L인 오실라토리아 초기 배양액 40 ~ 80 중량% 및 JM 배지 20 ~ 60 중량%로 이루어진 미세조류 배양액 100 ml에 대하여, 에틸아세테이트 5 ~ 40 mM를 혼합한다.

[0016] 여기서, 상기 오실라토리아 초기 배양액의 초기 농도가 상기 범위를 벗어나거나 또는 그 함량이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다. 한편, 상기 오실라토리아 초기 배양액은 오실라토리아를 배지를 이용하여 배양시킨 후, 희석시킨 용액으로 이미 공지된 기술이며, 오실라토리아 초기 배양액과 JM 배지에 대한 상세 조성은 후술하기로 한다.

[0017] 상기 에틸아세테이트는 미세조류의 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시키기 위해 첨가되는 것으로 그 함량이 5 mM 미만일 경우 상기 효과의 구현이 어려우며, 40 mM를 초과할 경우 사용량 대비 상기 효과의 향상효율이 미비하여 비경제적일 우려가 있다.

[0018] 상기 S200 단계는, 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계로써, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 3,000 ~ 4000 Lux, 광량 50 ~ 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 조사되도록 한다. 여기서 상기 광배양 조건이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다.

[0019] 한편, 상기 S200' 단계는, 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키

는 단계로써, 공기는 0.11 ~ 1.2 vvm의 속도로 투입하고, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 3,000 ~ 4000 Lux, 광량 50 ~ 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 조사되도록 한다. 여기서 상기 공기 투입 및 광배양 조건이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다.

이하 본 발명을 아래 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

1. 실험 재료 및 방법

1.1 사용 미세조류 및 배지

본 발명에서 사용된 오실라토리아는 오실라토리아(*Oscillatoria* sp.)(LIMS-PS-0030)로 한국해양미세조류은행(KMMCC, Korea)로부터 분양받았다. 사용된 배지는 아래 [표 1]에 나타낸 바와 같은 성분의 JM배지(Jaworski's Medium)와 필요 시 고농도 인과 질소 및 아세테이트를 포함한 인공배지를 조제하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

표 1

(단위: mg/L 탈이온수)

조성	함량
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
KH_2PO_4	12.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
NaHCO_3	15.9
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	36
NaNO_3	80
EDTA FeNa	2.25
EDTANa_2	2.25
H_3BO_3	2.48
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.39
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.00
cyanobalamin	0.04
thiamine HCl	0.04
biotin	0.04

1.2 실험방법

1.2.1 광배양 시스템

오실라토리아의 성장 실험은 공기 공급 속도에 따른 성장 속도를 비교하기 위해서 에어 펌프를 이용하여 공기의 공급 속도를 0.0, 0.11, 0.55, 그리고 1.2 vvm의 범위로 달리하였다. 광원으로는 660nm 파장으로 발광하는 적색 LED를 사용하였는데 이는 비특허문헌 17의 연구에서 녹색계통의 조류의 배양에는 적색 LED를 사용하였을 때 가장 우수하다고 보고하였기 때문이다. 반응기는 가로 60cm, 세로 60cm, 높이 30cm의 크기로 반응시스템을 제작하였으며 LED 램프는 S-tech LED사로부터 bar 형식의 LED램프를 구입하여 실험하였다. 광원은 반응기의 상부에 설치하여 위에서 아래로 광을 공급하였다. 조도 및 광량은 조도 3,540 lux, 58 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 하였으며, 조도계(I-346 Illuminometer, Sekonic Co., Philippines)와 광량계(MQ-306, Apogee Instruments, Inc., Logan, UT)를 사용하여 측정하였다. 반응시스템은 도 2와 같이 구성되었으며 반응조건에 따라 배양조조의 크기는 100 혹은 500 mL로 변경하여 사용하였다.

1.2.2 미세조류 배양 방법 및 바이오매스 측정

오실라토리아의 성장특성 실험은 100 혹은 500mL 용량의 코니칼 비이커를 사용하여 희석한 초기배양액을 주입하여 계획한 초기농도로 맞춘 후 파라필름을 이용해 비커의 입구를 막은 후 미세 구멍을 뚫어 주었다. 공기 공급

속도 따른 성장 속도를 비교하기 위하여 반응기의 바닥 부분에 산기석(porosity)을 고정시켜 에어펌프를 조정하여 공급 속도를 조절하였다. 아세트이트 주입 실험의 경우에는 100 ml 비이커에 20mM의 아세트에시드(Acetic acid), 에틸아세트이트(ethyl acetate), 부틸아세트이트(butyl acetate), 암모늄아세트이트(ammonium acetate)를 넣은 후 JM 배지로 채운 후 배양 실험을 실시하였다. 온도조절은 실험실에 설치된 온도 조절장치를 이용하여 반응기의 온도를 21 ~ 23℃로 일정하게 유지하였다. 배양액의 온도는 수온온도계를 이용하여 측정하였다.

[0030] 미세조류의 성장은 UV 흡광광도계(UV-vis Spectrophotometer SP 3000, Optima, Tokyo)를 이용하여 약 2mL의 샘플을 취한 후 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 관찰하였다. 미세조류 바이오매스량(g/L)과 흡광도의 관계는 흡광도 측정 후 샘플을 원심분리기에 넣어 고액분리하고 냉동건조한 후 측정된 바이오매스량을 이용하여 구하였다.

[0031] 1.2.3 미세조류 비증식속도와 최대 바이오매스 생산성 계산

[0032] 주어진 배양 조건에서의 오실라토리아의 비증식속도(specific growth rate)는 아래 수학적 식 1로 계산하였다.

[0033] (수학적 식 1)

[0034]
$$\mu_{\max} = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

[0035] 여기서, $\mu_{\max}$ 는 비증식속도(day^{-1}), N_1 및 N_2 는 대수증가 단계에서의 초기($t=0$) 및 일정 배양 시간 후의 오실라토리아의 최대 농도(g/L), 그리고 t 는 배양 시간(day)을 나타낸다.

[0036] 최대바이오매스 생산성(maximum biomass productivity)은 아래 수학적 식 2로 계산하였다.

[0037] (수학적 식 2)

[0038]
$$P_{\max} = (X_t - X_0) / (t_x - t_0)$$

[0039] 여기서, $P_{\max}$ 는 최대 바이오매스 생산성(g/L/day), X_t 는 최종 배양시간(t_x)에 측정된 바이오매스의 농도를 의미한다.

[0040] 2. 실험 결과 및 고찰

[0041] 각 실험조건에서의 성장특성, 즉 비성장속도, 최대바이오매스 생산성 및 최대농도는 아래 [표 2]에 요약되어있다. 먼저 오실라토리아의 초기 농도에 따른 성장특성을 보기 위해 초기 농도를 0.42 g/L, 0.50 g/L, 0.91 g/L로 조절하여 JM 배지에서 배양하였으며, 오실라토리아의 증식 곡선은 도 3에 나타내었다.

표 2

[0042]

실험조건		$\mu_{\max}$ (day^{-1})	$P_{\max}$ ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	$C_{\max}$ (g L^{-1})
초기농도(Initial Con.) (g/L)	0.42	0.114	0.037	0.91
	0.50	0.115	0.040	1.02
	0.91	0.084	0.045	1.49
공기주입(Aeration) (vvm)	0	0.022	0.020	0.45
	0.11	0.124	0.102	2.19
	0.55	0.287	0.152	3.25
	1.2	0.282	0.160	3.43
아세트이트 화합물 (Acetate Compounds) (20 mM)	아세트에시드 (Acetic acid)	dead	dead	dead
	에틸아세트이트 (Ethyl acetate)	0.314	0.096	1.14
	부틸아세트이트 (Butyl acetate)	dead	dead	dead
	암모늄아세트이트 (Ammonium acetate)	0.279	0.061	0.65

에틸아세테이트 (Ethyl acetate)	5 mM	0.302	0.136	1.32
	10 mM	0.313	0.156	1.45
	20 mM	0.337	0.205	1.95
	30 mM	0.347	0.214	2.05
	40 mM	0.340	0.206	1.99
아세테이트 화합물 (Acetate Compounds) (20 mM)	공기주입(Aeration) (0.54 vvm)	0.311	0.245	2.19
아세테이트 화합물 (Acetate Compounds) (20 mM)	공기주입 없음 (No Aeration)	0.240	0.171	1.13

- [0043] 최대 비성장속도(day^{-1})는 초기 농도가 0.42와 0.50 g/L일 때 각각 0.114와 0.115로 거의 유사한 값을 나타내었으나 초기 농도가 0.91 g/L로 증가하였을 때는 0.084로 감소하는 것을 알 수 있었다. 최대바이오매스 생산성의 경우 초기농도가 증가함에 따라 0.037, 0.040, 0.045 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ 로 조금씩 증가하였다. 최대농도 또한 초기 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다.
- [0044] 공기주입속도에 따른 오실라토리아의 성장곡선은 도 4에 나타내었다. 최대 비성장속도(day^{-1})는 공기를 주입하지 않았을 때 0.022 day^{-1} , 0.11 vvm일 때 0.124 day^{-1} , 0.55 vvm일 때 0.287 day^{-1} , 1.2 vvm일 때 0.282 day^{-1} 이었다. $P_{\max}$ 와 최대농도의 경우도 vvm이 증가할수록 큰 값을 나타내었지만, 0.55 vvm과 1.2 vvm의 경우 $\mu_{\max}$, $P_{\max}$ 와 최대농도는 거의 유사한 값을 나타내었으므로 오실라토리아의 성장에 동일한 효과를 가진다고 볼 수 있다.
- [0045] 오실라토리아의 배양에 가장 효과적인 아세테이트를 선정하기 위해 4개의 100 mL 코니컬 플라스크에 각 20 mM의 아세트익에시드(Acetic acid), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부틸아세테이트(butyl acetate), 암모늄아세테이트(ammonium acetate)를 첨가한후 JM 배지를 채운 후 배양을 하였다. 배양곡선은 도 5에 표시하였다.
- [0046] 각각 20 mM의 아세트익에시드와 부틸아세테이트를 포함한 실험의 경우 오실라토리아는 성장하지 않는 것으로 밝혀졌으며, 에틸아세테이트와 암모늄아세테이트를 첨가한 경우 JM 배지만 포함한 컨트롤(control)에 비해 성장속도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 20 mM의 에틸아세테이트를 포함한 배양실험에서의 $\mu_{\max}$, $P_{\max}$ 와 최대농도는 0.314 day^{-1} , 0.096 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ 1.14 g/L였다. 본 실험을 통해 에틸아세테이트가 가장 효과적인 유기탄소원인 것으로 파악되었다.
- [0047] 오실라토리아의 최적배양을 위한 최적의 에틸아세테이트 농도를 구하기 위하여 5개의 100 mL 코니컬 플라스크에 5, 10, 20, 30, 40 mM의 에틸아세테이트를 첨가한 후 JM 배지를 추가하여 배양을 하였다. 다양한 에틸아세테이트 농도에 따른 오실라토리아의 배양곡선은 도 6에 표시하였다.
- [0048] $\mu_{\max}$ 의 경우 모든 실험의 경우에 0.302 ~ 0.347 (day^{-1}) 범위의 값을 보여주었으며, $P_{\max}$ 의 경우에는 첨가한 아세테이트의 농도가 증가할수록 0.136에서 0.214 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ 로 지속적으로 증가하였다. 최대 농도의 경우도 아세테이트의 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다.
- [0049] 아세테이트 첨가와 공기주입(aeration)의 혼합효과를 보기 위해 2개의 500 mL 코니컬 플라스크를 준비하여 각각 20 mM의 에틸아세테이트를 JM 배지에 넣은 후 첫 번째 플라스크에는 공기주입을 하지 않고 두 번째 플라스크에 0.53 vvm의 속도로 공기를 주입하였다. 실험결과는 도 7에 나타내었다.
- [0050] 공기주입 없이 20 mM의 에틸아세테이트를 첨가한 실험의 경우 $\mu_{\max}$ 는 0.240 day^{-1} , $P_{\max}$ 는 0.171 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, 그리고 최대농도는 1.13 g/L의 값을 나타내었다. 이 값들은 앞의 20 mM의 에틸아세테이트를 첨가한 실험과 비교하였을 때 모두 감소하였다는 것을 알 수 있었다. 이는 앞 실험의 경우 100 mL 용량의 플라스크를 사용하였지만 본 실험은 500 mL 용량의 플라스크를 사용하여 배양 시 광공급조건 및 대기 중의 이산화탄소 공급 조건 등이 변화하여 성장특성에 영향을 준 것으로 판단된다. 이에 반해 0.53 vvm의 공기공급 조건에서는 오실라토리아의 성장이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 조건에서의 $\mu_{\max}$ 는 0.311 day^{-1} , $P_{\max}$ 는 0.245 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, 그리고 최

대농도는 2.19 g/L의 값을 나타내었다.

[0051] 3. 결론

[0052] 본 발명에서는 오실라토리아의 혼합영양배양에서의 효과적 배양조건 중 초기농도, 공기주입속도, 유기탄소원의 종류 및 농도를 선정하였다. 초기농도를 달리한 경우에는 초기 농도가 낮을수록 비성장속도는 증가하였지만 이에 반해 최대바이오매스 생산성은 오히려 감소한다는 것을 알 수 있었다. 공기를 주입하지 않은 경우와 다양한 공기 공급 속도(0.11 vvm, 0.55 vvm, 1.2 vvm)의 조건에서 비성장속도는 0.55 vvm의 공급 속도(0.287 day^{-1})에서 가장 높았다. 1.2 vvm의 경우 최대바이오매스 생산성과 최대농도에서 조금 높은 값을 나타내었으나 경제성을 고려할 때 0.55 vvm의 공기공급 조건이 최적조건이라 할 수 있다. 4가지 종류의 아세테이트 화합물에 대한 배양 실험에서 아세트에시드와 부틸아세테이트의 경우에는 배양에 효과가 없었으며, 암모늄아세테이트와 에틸아세테이트의 경우 오실라토리아의 배양에 효과가 있음을 알 수 있었다. 이중 에틸아세테이트 첨가의 경우 $\mu_{\max}$ 는 0.314 day^{-1} , $P_{\max}$ 는 $0.096 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 그리고 최대농도는 1.14 g/L으로 사용한 화합물 중 가장 효과가 좋았다. 에틸아세테이트의 농도가 5 mM에서 40 mM로 증가함에 따라 성장 또한 촉진됨을 확인할 수 있었다. 20 mM의 에틸아세테이트를 함유한 반응조에 0.54 vvm의 공기를 공급하여 주었을 때 공기 공급이 없는 조건 보다 오실라토리아의 성장이 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서 혼합영양배양 조건에서의 오실라토리아의 효과적인 배양을 위해서는 0.54 vvm의 공기공급과 더불어 20 mM 이상의 에틸아세테이트를 첨가하면 기존의 방법에 비해 훨씬 경제적으로 배양을 할 수 있을 것으로 판단된다.

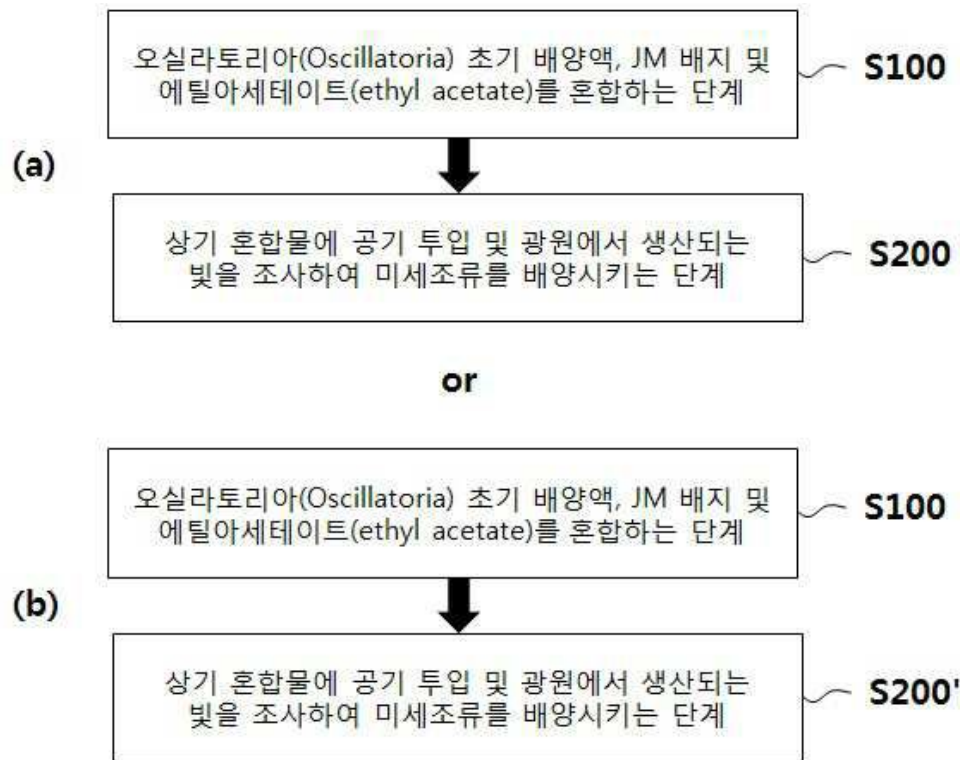
[0053] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 상기의 바람직한 실시 예를 통해 설명하고, 그 우수성을 확인하였지만 해당 기술 분야의 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

부호의 설명

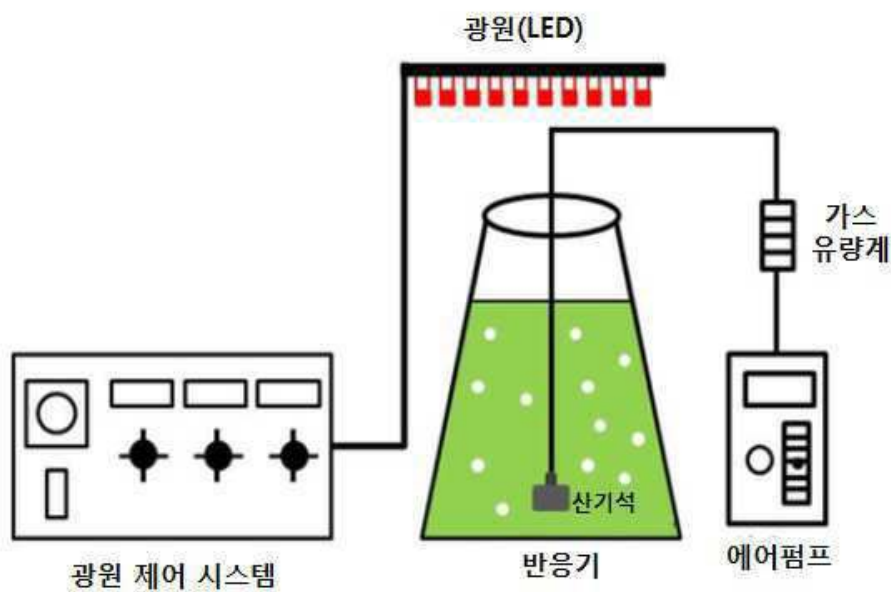
[0054] S100 : 오실라토리아(Oscillatoria) 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계
S200 : 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계
S200' : 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계

도면

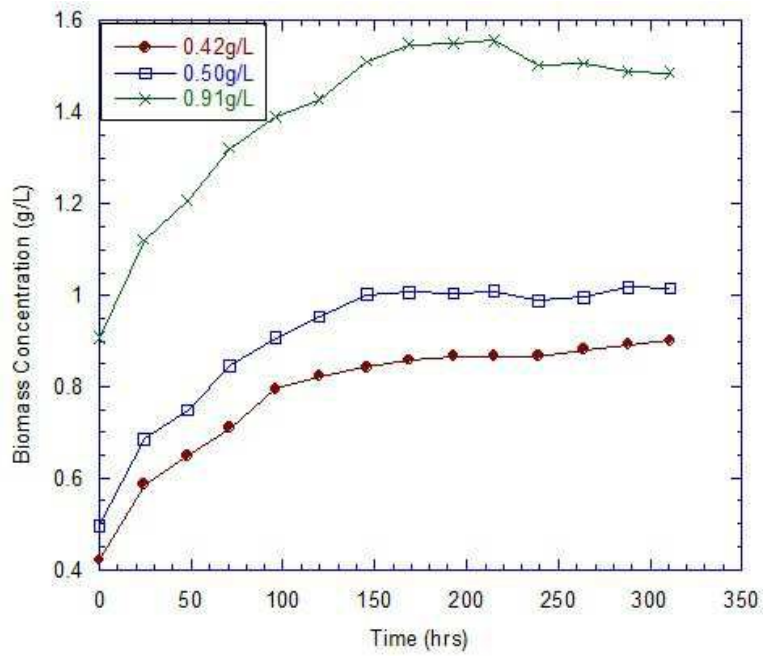
도면1



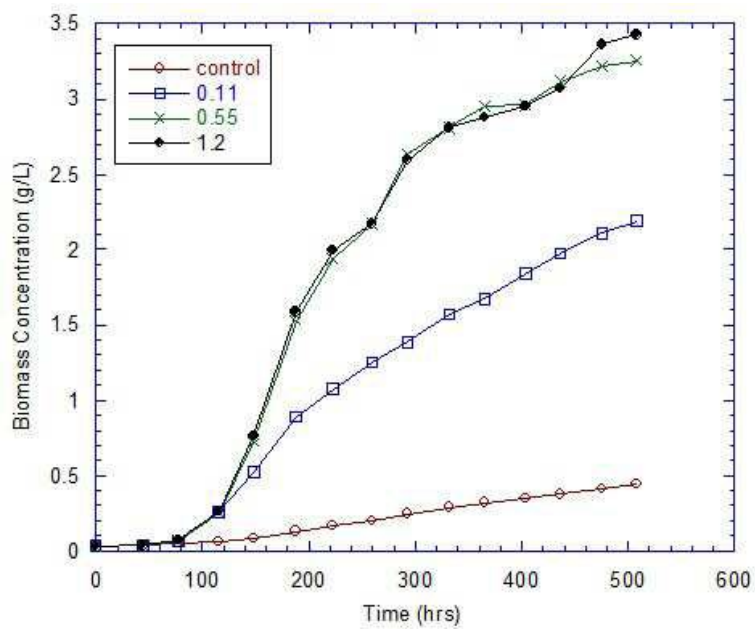
도면2



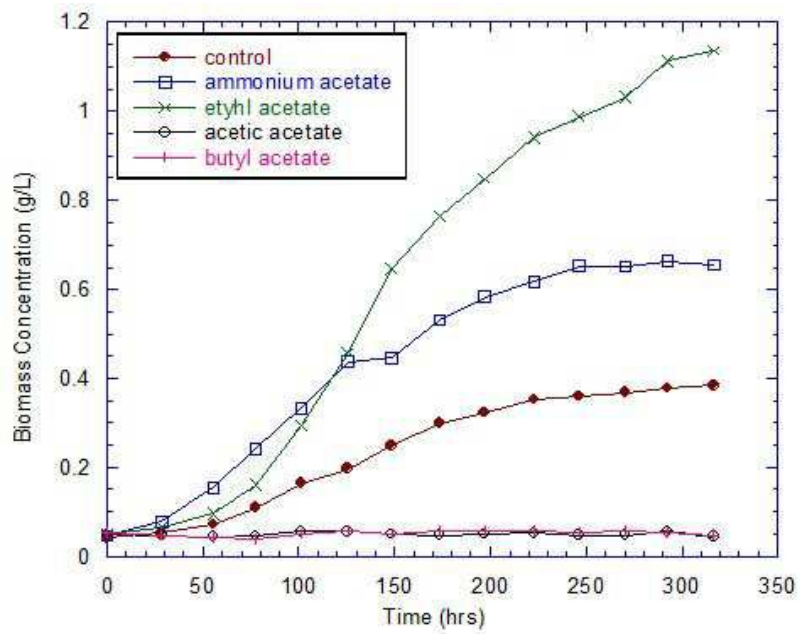
도면3



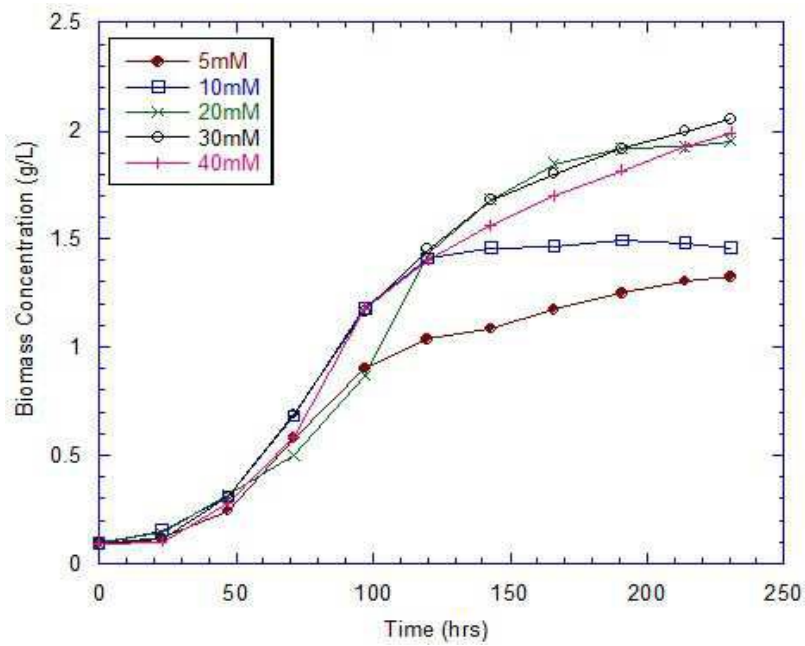
도면4



도면5



도면6



도면7

