



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0083847  
(43) 공개일자 2019년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/12 (2019.02)

Y02E 50/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0001780

(22) 출원일자 2018년01월05일

심사청구일자 2018년01월05일

(71) 출원인

군산대학교산학협력단

전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동,  
군산대학교)

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대  
학교)

(72) 발명자

박경일

전라북도 군산시 용둔길 12, 101동 1502호(  
미룡동, 금광베네스타)

김승현

전라북도 부안군 부안읍 부풍로 10-11

이철균

서울특별시 서초구 나루터로4길 49, 334동 601호  
(잠원동, 신반포17차아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 4 항

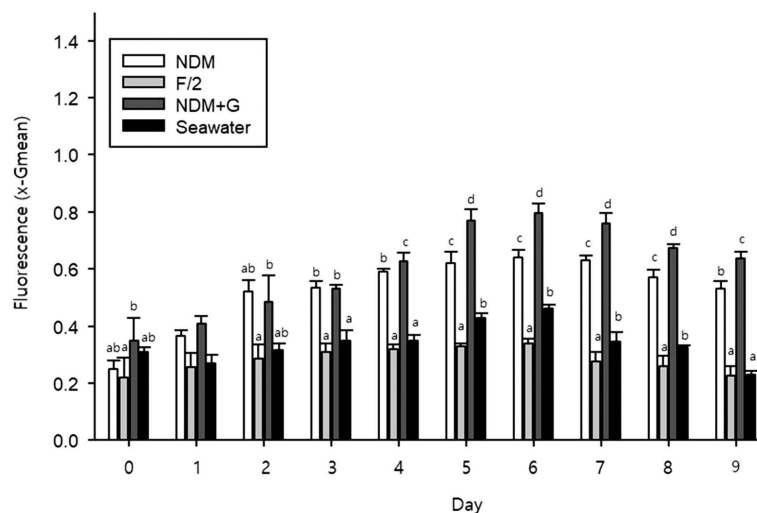
(54) 발명의 명칭 지질 함량이 증진된 테트라셀미스속 미세조류의 배양방법

## (57) 요약

본 발명은 지질 함량이 증진된 미세조류의 배양방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 바이오디젤 오일 원료로 이용되는 지질의 생산량을 증가시키기 위한 테트라셀미스속(*Tetraselmis* sp.) 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

본 발명의 배양방법에 의하면, 테트라셀미스속 미세조류 내 지질 함량을 현저히 증대시키는 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090267

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발, 해양실증배양

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2018.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

질소원이 결핍된 배지에서 미세조류를 배양하여 미세조류 내 지질 함량을 증대시키는 테트라셀미스속(*Tetraselmis* sp.) 미세조류의 배양방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배지는 포도당을 1 내지 5 mg/ml로 포함하는 고포도당 배지인 것을 특징으로 하는 미세조류의 배양방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 테트라셀미스속 미세조류는 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis* sp. Ganghwa) 균주(기탁번호 : KCTC 12236B P)인 것을 특징으로 하는 미세조류의 배양방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 배양은 염도 30 내지 35 psu(practical salinity unit), pH 7 내지 9, 온도 10 내지 35 °C 조건에서 4 내지 10 일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 미세조류의 배양방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지질 함량이 증진된 테트라셀미스속 미세조류의 배양방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 바이오디젤 오일 원료로 이용되는 지질의 생산량을 증가시키기 위한 테트라셀미스속 미세조류 배양방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 미세조류(microalgae)는 광합성 색소를 가지고 광합성을 하는 생물들에 대한 통칭으로, 태양광 등 빛을 에너지원으로 하여 이산화탄소를 고정하고 광합성을 하여 성장하는 마이크로 단위의 크기를 갖는 수중 생물을 의미한다.

[0003] 최근 들어, 미세조류는 온난화의 주범인 이산화탄소를 저감시키는데 기여하는 것 이외에도 지질 함량이 높아 바이오에너지를 생산할 수 있다고 알려졌다. 이에 따라, 이를 대량으로 생산하고 지질을 고수율로 추출하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 미세조류 내에 분포하는 지질의 함량은 미세조류의 종이나 strain에 따라 다르게 나타나며, 배양방법에 따라 서로 현저한 차이가 나타난다.

[0005] 지금까지 바이오에너지 분야에서 미세조류는 배양의 효과를 증대시켜 biomass량을 늘리는데 연구가 집중되었다. 즉, 지금까지는 세포분열을 촉진시켜 높은 농도의 미세조류를 확보하는 것에 노력을 기울였으나, 미세조류의 농도가 높아져도 실제 바이오에너지를 얻기 위해 필요한 것은 지질이므로, 지질 함량을 증대시킬 수 있는 배양 기술을 확보하는 것이 매우 중요하다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 질소원이 결핍된 배지에서 테트라셀미스속 미세조류를 배양하는 경우 테트라셀미스속 미세조류 내 지질 함량을 증대시킬 수 있으며, 특히 질소결핍 환경에 포도당을 첨가시 지질량이 현저히 증가함을 확

인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1670703 B

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 테트라셀미스속 미세조류 내 지질 함량을 증대시키는 미세조류의 배양방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 질소원이 결핍된 배지에서 미세조류를 배양하여 미세조류 내 지질 함량을 증대시키는 테트라셀미스속(*Tetraselmis* sp.) 미세조류의 배양방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 배지는 포도당을 1 내지 5 mg/ml 포함하는 고포도당 배지일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 테트라셀미스속 미세조류는 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis* sp. Ganghwa) 균주(기탁번호 : KCTC 12236BP)일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 배양은 염도 30 내지 35 psu(practical salinity unit), pH 7 내지 9, 온도 10 내지 35 °C 조건에서 4 내지 10 일 동안 수행될 수 있다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명의 배양방법에 의하면, 테트라셀미스속 미세조류 내 지질 함량을 현저히 증대시키는 우수한 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 결과, 테트라셀미스의 세포 내 지질 함량이 증대됨을 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 결과, 배지 내 포도당 함량에 따라 테트라셀미스의 세포 내 지질 함량이 현저히 증대됨을 나타내는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 질소원이 결핍된 배지에서 테트라셀미스속 미세조류를 배양하여 미세조류 내 지질 함량을 증대시키는 미세조류의 배양방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 명세서에서, 상기 "테트라셀미스속 미세조류"는 "테트라셀미스"라고도 기재된다.

[0018] 특히 본 발명의 테트라셀미스속 미세조류의 배양방법에서, 상기 배지는 포도당을 1 내지 5 mg/ml, 바람직하게는 1.5 내지 2.5 mg/ml로 포함하는 것이 바람직하다. 특히, 포도당을 1.5 내지 2.5 mg/ml의 고농도로 포함하고, 질소원이 결핍된 배지에서 미세조류를 배양하는 경우 일반적인 인공해수배지(F/2 배지)에서 배양하는 경우에 비해 미세조류 내 지질 함량이 130 % 이상 현저히 증가하는 것을 구체적으로 확인하였다.

[0019] 본 발명의 배양방법에서, 상기 배지에 포도당이 상기 하한치 미만으로 포함되는 경우에는 지질 함량을 증대시키는 효과를 기대하기 어렵고, 상기 상한치를 초과하여 포함되는 경우에는 원료의 가격이 상승하고 지질 함량 증대에 미치는 효과가 미미하므로 경제성이 없다. 즉, 포도당의 가격이 비싸므로 다량으로 투입할 경우 지질 생산

단가의 증가로 이어져 경제성이 악화될 것으로 추정된다.

[0020] 본 발명의 배양방법에서, 상기 테트라셀미스속 미세조류는 세포 내 질소가 결핍되는 경우 세포 내 지질합성효소가 활성화되고, 상기 활성화된 효소가 상기 포도당을 이용하여 지질을 합성함으로써 결국 세포 내 지질 함량이 증가하게 된다.

[0021] 본 발명의 배양방법에 적합한 테트라셀미스속 미세조류는 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주(기탁번호 : KCTC 12236BP)일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 배양은 염도 30 내지 35 psu(practical salinity unit), pH 7 내지 9, 온도 10 내지 35 ℃ 조건에서 4 내지 10 일 동안 수행될 수 있다. 상기 조건에서 미세조류를 배양하는 경우, 지질 생산성을 높일 수 있는 효과가 있다.

[0023] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

## [0024] 실시예

[0025] 실시예 1. 본 발명의 미세조류 배양방법에 따른 지질 함량의 증가 확인

[0026] a. 배지의 준비

[0027] 1) seawater : 여과한 해수이다.

[0028] 2) F/2 : 염도가 30 psu인 정상적인 인공해수배지로서, 기본적인 미세조류 배양액이며, 다양한 무기질이 포함되어 있다.

[0029] 3) NDM(nitrogen-deficient medium) : 상기 F/2 배지에서 질소원( $\text{NaNO}_3$ )이 빠져있는 배양액이다.

[0030] 4) NDM+G : 상기 NDM에 2 mg/mL의 포도당을 첨가한 배양액이다.

[0031] 하기 표 1 및 표 2는 각 배지별 조성을 정리하여 나타낸 것이다.

**표 1**

[0032]

| 구분                                                        | F/2 | NDM | NDM+G | seawater<br>(해수) |
|-----------------------------------------------------------|-----|-----|-------|------------------|
| $\text{NaNO}_3$                                           | √   |     |       |                  |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$        | √   | √   | √     |                  |
| $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$                  | √   | √   | √     |                  |
| $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | √   | √   | √     |                  |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$                 | √   | √   | √     |                  |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                 | √   | √   | √     |                  |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$                 | √   | √   | √     |                  |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$                 | √   | √   | √     |                  |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$       | √   | √   | √     |                  |
| $\text{NaHCO}_3$                                          |     | √   | √     |                  |
| glucose                                                   |     |     | √     |                  |
| 염분 (psu)                                                  | 30  | 30  | 30    | 30               |
| pH                                                        | 8.0 | 8.0 | 8.0   | 8.0              |
| Temp. (℃)                                                 | 20  | 20  | 20    | 20               |

표 2

[0033]

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F/2 배지         | 75 mg/L NaNO <sub>3</sub> (99%, S5022, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>5 mg/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (99%, 71505, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>3.15 mg/L FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%, F2877, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>4.36 mg/L Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O (98.5%, E1644, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A),<br>0.180 mg/L MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (99%, M3634, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.022 mg/L ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (99%, Z4750, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%, 255599, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (98%, C3036, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.006 mg/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (99.5%, M1651, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)                                                |
| 질소결핍 배지 (NDM)  | 5 mg/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (99%,71505, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>3.15 mg/L FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%,F2877, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>4.36 mg/L Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O (98.5%,E1644, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.180 mg/L MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (99%,M3634, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.022 mg/L ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (99%,Z4750, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%,255599, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (98%, C3036,Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.006 mg/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (99.5%,M1651, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.18 g/L NaHCO <sub>3</sub> (99.5%, S6297,Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)                                                      |
| NDM+glucose 배지 | 5 mg/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (99%,71505, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>3.15 mg/L FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%,F2877, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>4.36 mg/L Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O (98.5%,E1644, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.180 mg/L MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (99%,M3634, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.022 mg/L ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (99%,Z4750, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (98%,255599, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.01 mg/L CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (98%, C3036,Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.006 mg/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (99.5%,M1651, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>0.18 g/L NaHCO <sub>3</sub> (99.5%, S6297,Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)<br>2 mg/mL glucose (49163, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) |
| 해수             | 여과한 해수                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[0034] b. 테트라셀미스의 준비

[0035] 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주(기탁번호 : KCTC 12236BP)를 생물자원센터로부터 분양받아 F/2 배지에서 배양하였다.

[0036] c. 배양

[0037] 상기 4 종의 배양액을 4 개의 6 well plate에 각 well 당 4 ml씩 분주한 후, 상기 준비된 테트라셀미스를 500  $\mu$ l씩 분주하였다. 이후 10 일간 20 °C로 조절된 인큐베이터에서 배양하였다.

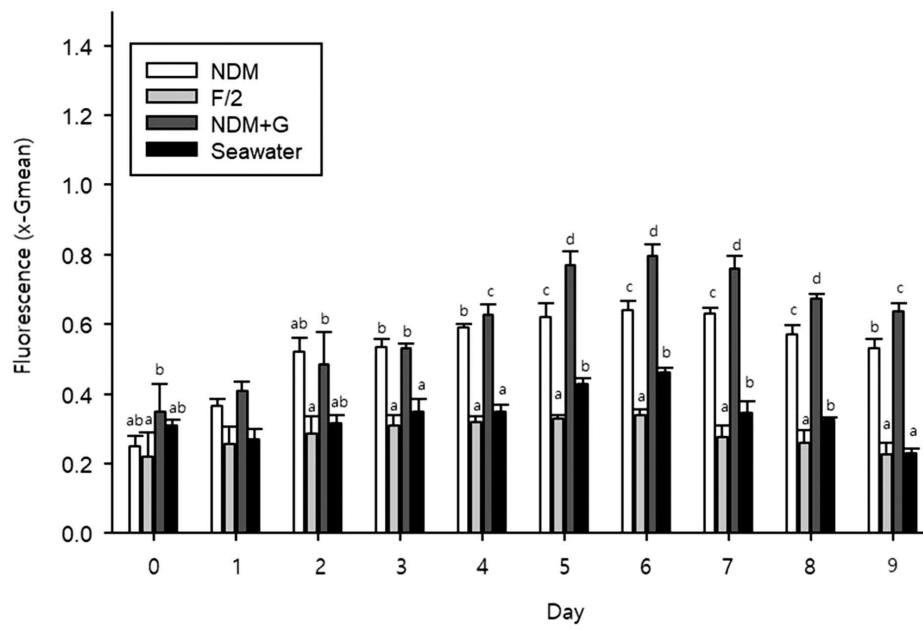
[0038] d. 지질함량 확인

[0039] 먼저 Flow cytometer(Gallius, Beckman Coulter, USA)를 이용하였다. 매일 각 배양 플레이트 well로부터의 시료(c. 단계에서의 테트라셀미스를 포함하는 배양액) 200  $\mu$ l와 1 mg/ml BODIPY<sup>™</sup> 505/515(4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene, Invitrogen D3921, USA) 2  $\mu$ l를 혼합하고, 10분 동안 암실에서 배양한 후 세포 수를 측정하였으며, 동일 시료에 대하여 3회 반복 측정하였다.

- [0040] 테트라셀미스 세포 내 지질 함량을 정량하기 위한 지방 소립세포의 분석은 다음과 같은 방법으로 이루어졌다.
- [0041] 상기 Flow cytometer(유세포분석기)를 이용하여 약 5,000 여개의 테트라셀미스 세포를 취득하고, 이에 대한 FSC(Forward scatter)와 SSC(Side scatter)의 dot plot 그래프 상에서 모든 테트라셀미스의 FL1(Excitation 488, Emission 525nm)에 발색된 각 세포 내 형광량을 3회 반복하여 측정한 후, 그 평균값을 지질량으로 표시하여 도 1에 나타내었다.
- [0042] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 테트라셀미스의 배양 결과, 테트라셀미스의 세포 내 지질 함량이 증대됨을 나타내는 그래프이다.
- [0043] 상기 도 1에서 보는 바와 같이, 질소원이 결핍되지 않은 배지, 즉 해수 또는 F/2 배지에서 미세조류를 배양하는 경우보다 질소원이 결핍된 배지(NDM)에서 미세조류를 배양하는 경우 미세조류 내 지질 함량이 증대되는 것을 알 수 있다.
- [0044] 특히, 질소원이 결핍되고 포도당이 첨가된 배지(NDM+G)에서 미세조류를 배양하는 경우 미세조류 내 지질 함량이 현저히 증대되는 것을 알 수 있다.
- [0045] 또한, 도 1을 통해 미세조류의 배양 5 내지 7일 쯤에 미세조류 내 지질 함량이 최대화되는 것을 알 수 있다.
- [0046] 실시예 2. 미세조류의 배양 배지 내 포도당 함량에 따른 지질 함량의 증가 확인
- [0047] 상기 실시예 1을 보면, 해수, F/2 배지, NDM 배지 및 NDM+G 배지를 이용한 테트라셀미스의 배양 6일 쯤에, 모두 지질 함량이 최대값을 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0048] 한편, 상기 3 종의 배지(해수, F/2 배지 및 NDM 배지)에 포도당(glucose)을 0 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.2 mg/ml 및 2 mg/ml로 각각 첨가한 후 테트라셀미스를 배양하고, 배양 6일 쯤의 테트라셀미스 세포 내 지질 함량을 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하여 도 2에 나타내었다.
- [0049] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 배양 결과, 배지 내 포도당 함량에 따라 테트라셀미스의 세포 내 지질 함량이 현저히 증대됨을 나타내는 그래프이다.
- [0050] 상기 도 2에서 보는 바와 같이, 포도당을 2 ml/ml 첨가한 NDM 배지에 테트라셀미스를 배양한 경우 지질 함량이 130 % 이상 증가하는 것을 알 수 있다.
- [0051] 즉, 본 발명에 따라 F/2 배지 조성 중  $\text{NaNO}_3$ 를 제외하여 질소원을 배제하고, 포도당을 1 내지 5 mg/ml 농도로 포함시킨 배지(NDM+G)에서 테트라셀미스를 배양하면 고농도의 지질을 효율적으로 수확할 수 있게 된다.
- [0052] 상기에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하며, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

도면1



도면2

