(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0129244
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) *C12N 1/38* (2006.01)
C05C 9/00 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0047379
(22) 출원일자 2011년05월19일
심사청구일자 2011년05월19일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
허성범
부산광역시 기장군 기장읍 동서길 100-2
배진희
부산광역시 남구 용소로8번길 33 (대연동)
(74) 대리인
위병갑

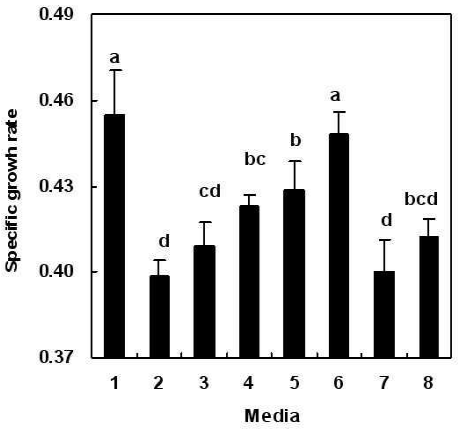
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **미세조류의 대량 배양을 위한 배지 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 요소비료, 복합비료, $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 유효성분으로 포함하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 배지 조성물은 유효성분으로 단가가 낮은 농업용 비료(요소비료 및 복합비료) 및 공업용 $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 이용함으로써 경제적으로 미세조류의 대량 배양에 적합할 뿐만 아니라, 이들을 이용하여 미세조류를 대량 배양하는 경우 f/2 배지와 동일하게 우수한 성장을 이끌어 낼 수 있는 이점이 있어, 산업적 활용도가 높은 미세조류의 대량 배양 및 생산성 향상을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R20800309H010000110
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	유용플랑크톤자원 기탁등록 보존기관
주관기관	부경대학교
연구기간	2008.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

요소비료, 복합비료, $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 유효성분으로 포함하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속인 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속은 *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. oceanica*, *N. oculata* 및 *N. salina*로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

요소비료 100 중량%에 대해 질소가 40 내지 50중량%로 포함된 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

복합비료 100중량%에 대해 질소가 20 내지 25중량%, 인이 10 내지 15중량%, 칼륨이 10 내지 20중량% 및 마그네슘이 1 내지 5중량%로 포함된 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미세조류 대량배양용 배지는 여과 해수 1000 중량부에 대해, 요소비료 30 내지 40중량부, 복합비료 35 내지 45중량부, $NaNO_3$ 140 내지 160중량부 및 $CuSO_4?5H_2O$ 0.05 내지 0.06 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물.

청구항 7

여과 해수 1000 리터에 요소비료 30 내지 40중량부, 복합비료 35 내지 45중량부, $NaNO_3$ 140 내지 160중량부 및 $CuSO_4?5H_2O$ 0.05 내지 0.06중량부를 첨가하여 혼합하는 단계를 포함하는, 미세조류 대량배양용 배지 조성물의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 미세조류는 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속인 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속은 *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. oceanica*, *N. oculata* 및 *N. salina*로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물의

제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양 미세조류의 대량 배양을 위한 배지 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 농업용 비료를 이용한 미세조류 대량배양용 배지 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세조류는 수권생태계에서 부유생활을 하는 단세포생물로, 그 종류로는 남조류, 규조류, 녹조류, 와편모조류, 황갈편모조류 및 은편모조류 등이 있으며, 녹조류나 규조류가 주를 이루고 있다.

[0003] 미세조류는 단백질의 함량이 높을 뿐만 아니라 이상적인 필수아미노산으로 구성되어 생체이용률이 좋으며 인체 건강증진에 활력을 주는 무기질과 비타민을 적절하게 함유하고 있어 미래식품으로 사용될 수 있으며, 대기 중의 이산화탄소를 사용하여 활발한 광합성을 하므로 지구온난화를 줄이는 친환경식품으로도 사용될 수 있기 때문에 대량배양생산을 통하여 고부가가치를 얻을 수 있는 “다기능성 미래식품” 이라 할 수 있다. 또한 미세조류는 생태계에서 1차 생산자로서 수산양식용 사료로도 널리 사용되고 있다.

[0004] 미세조류가 산업적으로 개발된 대표적 예는 양식 산업 중 먹이생물로 이용된 것이며, 최근에는 기능성식품, 화장품, 의약품소재, 바이오에너지 및 환경산업 등 다양한 분야에서 활용되고 있다(Borowitzka and Borowitzka, 1988).

[0005] 산업적인 생물소재로서 미세조류의 장점은 육상의 식물자원과 경쟁 없이 배양을 통하여 환경 친화적이고 지속적인 재생산이 가능하며, 오염 물질로 폐기하는 부분이 전혀 없어 100% 활용이 가능하다는 점이다. 그러나 미세조류는 대량배양 중 갑자기 폐사하는 경우가 많아 안정성이 낮고 비용이 높아 경제성이 낮다는 문제점이 있다(Chisti, 2007).

[0006] 조개류 인공종묘생산에서도 먹이생물로 이용되는 미세조류의 확보비용은 종묘생산 총 단가의 약 30%를 차지할 정도로 매우 높다(Borowitzka, 1997). 그러나 향후 기술 발달을 통해 대량배양의 안정성과 경제성이 확보되면 미세조류는 매우 훌륭한 생물 산업 소재가 될 것으로 기대된다.

[0007] 현재 이러한 미세조류의 배양에 가장 널리 사용되고 있는 배지는 f/2(Guillard and Ryther, 1962) 배지이다. 그러나 이 배지는 소규모 실내 배양에서 우수한 성장을 보이지만 배지를 제조하기 복잡하며, 단가가 상대적으로 매우 높아 경제적으로도 대량 배양에 이용하기 적합하지 않다.

[0008] 따라서 미세조류의 대량 배양 시 실내 소규모 배양에서 이용되는 시약을 사용하면 많은 비용이 소요되므로, 경제적인 농업용 비료(Let al., 1995; Valenzuela-Espinoza et al., 2002; Pacheco-Vega and S, 2009)를 사용하는 예가 많다. 그러나 농업용 비료만을 사용할 경우 f/2 배지와 같은 대표적인 시약배지에 비해 세포의 성장률이 낮아 f/2 배지를 완전히 대체하지 못해왔다. 그 이유는 농업용 비료는 주로 암모니아 성분의 질소와 인으로 구성되어 있으며(Ukeles, 1980; Gonzand Maestrini, 1984; Bae, 2004), 미세조류의 성장에 필수적인 미량원소나 비타민 등이 함유되어 있지 않기 때문이다(Stein, 1973).

[0009] 한편 *Nannochloropsis* 속(genus)인 *Nannochloropsis oceanica*는 대량배양이 용이하고 영양가가 높아 해산어 양식에서 rotifer 배양이나 유생 사육 수조의 물 만들기(green water)(Cabrera and Hur, 2001)에 가장 널리 이용되는 미세조류이다. 또한 *Nannochloropsis oceanica*는 비타민, 지질함량, 고도불포화지방산, 단백질 및 천연색소 등의 함량이 높아 해양바이오산업의 유망한 종으로 꾸준히 연구 개발되고 있다(Becker, 1981; Harting et al., 1988; Cha et al., 2010).

[0010] 이에 본 발명자들은 산업적 활용도가 높은 미세조류인 *Nannochloropsis* 속을 대상으로 대량배양 시 f/2 배지와 동일하게 우수한 성장을 이끌어 낼 수 있으면서, 단가가 낮아 경제적으로도 대량 배양에 이용하기 적합한 배지를 개발하고자 예의 노력하였으며, 그 결과 요소비료와 복합비료로 구성된 농업용 비료배지에 $NaNO_3$ 및 미량원소($CuSO_4?5H_2O$)를 포함하는 배지 조성물이 f/2 배지를 대체할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 단가가 저렴하여 경제적이면서, f/2 배지와 동일하게 우수한 성장을 이끌어 낼 수 있는 미세조류 대량배양용 배지 조성물 및 상기 배지 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 요소비료, 복합비료, $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 유효성분으로 포함하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미세조류는 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속은 *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. oceanica*, *N. oculata* 및 *N. salina*로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 따르면, 요소비료 100 중량%에 대해 질소가 40 내지 50중량%로 포함될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 따르면, 복합비료는 100중량%에 대해 질소가 20 내지 25중량%, 인이 10 내지 15중량%, 칼륨이 10 내지 20중량% 및 마그네슘이 1 내지 5중량%로 포함될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미세조류 대량배양용 배지는 여과 해수 1000 중량부에 대해, 요소비료 30 내지 40중량부, 복합비료 35 내지 45중량부, $NaNO_3$ 140 내지 160중량부 및 $CuSO_4?5H_2O$ 0.05 내지 0.06 중량부를 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은, 여과 해수 1000 리터에 요소비료 30 내지 40중량부, 복합비료 35 내지 45중량부, $NaNO_3$ 140 내지 160중량부 및 $CuSO_4?5H_2O$ 0.05 내지 0.06중량부를 첨가하여 혼합하는 단계를 포함하는, 미세조류 대량배양용 배지 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 미세조류는 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 나노클로롭시스(*Nannochloropsis*) 속은 *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. oceanica*, *N. oculata* 및 *N. salina*로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 배지 조성물은 유효성분으로 단가가 낮은 농업용 비료(요소비료 및 복합비료) 및 공업용 $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 이용함으로써 보다 경제적으로 미세조류의 대량 배양에 적합하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 이들을 이용하여 미세조류를 대량 배양하는 경우 종래 f/2 배지와 동일하게 우수한 성장을 이끌어 낼 수 있는 이점이 있어, 산업적 활용도가 높은 미세조류의 대량 배양 및 생산성 향상을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 비료배지의 농도별 *N. oceanica*의 고유성장률(specific growth rate)을 나타낸 그래프이다.

도 2는 미량원소 종류별 농도별 *N. oceanica*의 고유성장률을 나타낸 그래프이다.

도 3은 미량원소인 구리($CuSO_45H_2O$) 첨가 농도에 따른 *N. oceanica*의 고유성장률을 나타낸 그래프이다.

도 4는 비료배지의 농도와 $NaNO_3$ 및 구리($CuSO_4?5H_2O$) 첨가 유무에 따른 *N. oceanica*의 고유성장률을 나타낸 그래프이다.

도 5는 특급 시약과 공업용 시약에 따른 *N. oceanica*의 고유성장률을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 요소비료, 복합비료, $NaNO_3$ 및 $CuSO_4?5H_2O$를 유효성분으로 포함하는 미세조류 대량배양용 배지 조성물

을 제공함에 그 특징이 있다.

[0024] 본 발명에서 '요소비료(尿素肥料, urea fertilizer)'란 합성암모니아에 이산화탄소를 가하고 고온?고압으로 처리하여 제조되는 질소질 농업용 화학비료를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 '복합비료(複合肥料, compound fertilizer)'란 비료의 3요소(질소, 인, 칼륨) 가운데 2성분 이상을 함유한 농업용 화학비료를 의미한다.

[0026] 본 발명의 요소비료는 일반 시중에서 판매되거나, 직접 제조하여 만든 요소비료일 수 있으며, 바람직하게는 요소비료 총 중량에 비해 질소가 40 내지 50중량%로 포함하는 것이 좋다.

[0027] 본 발명의 복합비료는 일반 시중에서 판매되거나, 직접 제조하여 만든 복합비료일 수 있으며, 바람직하게는 질소, 인, 칼륨 및 마그네슘을 모두 포함할 수 있다. 상기와 같이 질소, 인, 칼륨 및 마그네슘을 모두 포함하는 복합비료의 경우 복합비료 총 중량에 대해 질소가 20 내지 25중량%, 인이 10 내지 15중량%, 칼륨이 10 내지 20중량% 및 마그네슘이 1 내지 5중량%로 포함하는 것이 바람직하다.

[0028] 또한, 본 발명에서 사용된 $CuSO_4?5H_2O$는 미량원소인 구리의 공급원이며, 특히 본 발명에서 제공할 수 있는 배지 조성물의 제조에 사용되는 $NaNO_3$ 와 $CuSO_4?5H_2O$는 단가가 저렴한 공업용 용액을 사용할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 미세조류 대량배양용 배지 조성물의 제조방법을 제공할 수 있는데, 구체적으로 여과 해수 1000중량부에 상기 기술된 요소비료를 30 내지 40중량부, 상기 기술된 복합비료를 35 내지 45중량부, $NaNO_3$ 140 내지 160중량부 및 $CuSO_4?5H_2O$ 0.05 내지 0.06중량부를 첨가하여 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 이렇게 본 발명의 방법에 의해 제조된 배지 조성물은 각 성분들이 상기 기술된 범위로 혼합되어 있을 경우, 일반적으로 사용되고 있는 종래 f/2 배지와 동일하게 조류 성장을 이끌어 낼 수 있는 효과가 있으므로, 보다 저렴한 가격으로 산업적 활용도가 높은 미세조류의 대량 배양에 유용하게 사용할 수 있다.

[0031] 이러한 결과는 본 발명의 일실시예를 통해 확인할 수 있었는데, 일실시예에 따르면, 복합비료 42mg/L 및 요소비료 34mg/L로 이루어진 농업용 비료배지에 $CuSO_4?5H_2O$ (0.0588mg/L)와 $NaNO_3$ (150mg/L)를 첨가한 실험구를 사용하여 미세조류를 배양한 결과, f/2 배지를 사용한 경우의 약 96%에 해당하는 성장률을 보이는 것을 확인함에 따라 본 발명의 배지 조성물이 f/2 배지와 비교해서 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으며, 이를 통해 본 발명의 배지 조성물이 f/2 배지와 동일하게 우수한 미세조류의 성장을 이끌어 낼 수 있음을 입증하였다.

[0032] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 본 발명에서 사용되는 $CuSO_4?5H_2O$ 와 $NaNO_3$이 가격이 저렴한 공업용으로 사용할 경우에도 동일한 성장결과를 나타낼 수 있다는 사실을 확인함으로써, 본 발명의 배지 조성물을 사용할 경우 종래 배지의 사용에 비해 보다 경제성이 우수할 수 있음을 알 수 있었다.

[0033] 따라서 본 발명의 미세조류 대량배양용 배지 조성물은 미세조류의 대량 배양에 유용하게 사용할 수 있으며, 바람직하게는 *Nannochloropsis* 속의 대량 배양을 위해 사용할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 배지 조성물로 배양할 수 있는 상기 *Nannochloropsis* 속은 *N. gaditana, N. granulata, N. limnetica, N. oceanica, N. oculata* 및 *N. salina*로 이루어진 군으로부터 선택된 조류일 수 있고, 바람직하게는 *N. oceanica*일 수 있다.

[0035]

[0036] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **<실시예>**

[0038] **재료 준비**

[0039] 미세조류 대량배양용 배지의 제조를 위해 농업용 비료로서 질소함량 46%의 요소비료와 질소, 인, 칼륨, 마그네슘 함량이 각각 22%, 12%, 17%, 3%인 복합비료 ((주) 남해화학)를 이용하였다. 비료의 량은 질산염($NaNO_3$

100mg/L)과 인산염(Na_2HPO_4?$12H_2O$ 20mg/L)만으로 구성된 대표적인 배지인 Schreiber (1927) 배지의 농도를 기준으로 하였다. 배지 제조는 다음과 같은 방법으로 제조하였는데, 즉, 여과 해수 1L 당 복합비료 166.7mg와 요소비료 137.6mg은 Schreiber 배지 (1927)와 동일한 질산염과 인산염의 농도가 되므로 이를 기본 1.0배로 설정하여 기본 비료배지 농도로 사용하였다(이하에서는 Schreiber 배지와 동일한 질산염과 인산염의 농도가 되는 여과 해수 1L 당 복합비료 166.7mg와 요소비료 137.6mg로 이루어진 비료배지를 '기본 비료배지' 또는 '비료 1.0 배지'라 함). 비료는 사용 전에 믹서로 갈아 따뜻한 물에 충분히 용해시킨 후 여과하여 사용하였다.

[0040] 하기 실시예에서 사용된 미세조류로는 *N. oceanica* (KMMCC-13)를 사용하였고, 상기 조류는 부경대학교 한국해양미세조류은행(KMMCC, Korea Marine Microalgae Culture Center)에서 분양받아 사용하였다. *N. oceanica*의 배양은 250mL에 100mL 본 발명의 미세조류 배양용 배지를 넣고 멸균한 후, 25℃, 15 psu, 100μmol m-2s-1 연속 조명 조건으로 정치배양으로 3회 반복 실험하였다. 세포 밀도는 매일 동일한 시간에 haemacytometer를 이용하여 2회 반복 계수하고, Guillard (1973)의 방법으로 일간 고유성장률(specific growth rate : s.g.r.)을 측정하였다[$s.g.r.= 3.322\times\log(N_2/N_1)/(t_2-t_1)$, ($t_2$, t_1 : 접종 후 배양일수, N_2, N_1 : 접종 후 t2, t1일 때의 세포밀도)].

[0041] **<실시예 1>**

[0042] **비료 농도에 따른 성장 실험**

[0043] 미세조류 대량배양용 배지제조를 위한 적합한 비료의 농도를 알아보기 위하여 ① f/2 배지(대조구), ② 비료 1.0배 배지(복합비료 166.7mg/L, 요소비료 137.6mg/L), ③ 비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L, 요소비료 172.0mg/L), ④ 비료 1.5배 배지(복합비료 250.1mg/L, 요소비료 206.4mg/L)로 구분하여 각각의 배지에 *N. oceanica* (EUS-7)를 5일간 세포의 성장 변화를 3회 반복하여 조사하였다.

[0044] 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이, 대조구인 f/2 배지에서는 성장률 0.3815 (최고 세포 밀도 130×10^4 cells/mL)로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 한편 비료 1.25배 배지를 사용한 실험구의 경우, 성장률 0.3407 (최고 세포 밀도 114×10^4 cells/mL)로 f/2 배지보다는 유의적으로 낮은 성장을 보였으나, 다른 비료배지 실험구와 비교하여 유의적으로 높은($P<0.05$) 것으로 나타났다. 따라서 비료 1.25배 배지의 농도가 미세조류 배양에 양호한 것으로 판단되었다.

표 1

[0045] f/2 배지 구성성분 및 함량

$NaNO_3$	1 mL
$NaH_2PO_4 \cdot 9H_2O$	1 mL
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	1 mL
trace metal solution	1 mL
vitamin solution	0.5 mL
filtered seawater	950 mL
Stock solution	
$NaNO_3$	75 g/L dH_2O
$NaH_2PO_4 \cdot 9H_2O$	5 g/LdH_2O
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	30g/LdH_2O
Trace metal solution	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3.15 g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	4.36 g
Primary trace metals	1 mL each
distilled water	1,000 mL
Primary trace metals	

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9.8 g/L dH_2O
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6.3 g/L dH_2O
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22.0 g/L dH_2O
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10.0 g/L dH_2O
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180.0 g/L dH_2O
vitamin solution	
work stock	
Vitamine B_{12}	1 mL
Biotin	10 mL
Thiamine·HCl	200 mg
distilled water	1,000 mL
Primary stock	
Vitamine B_{12}	1.0 g/L dH_2O
Biotin	0.1 g/L dH_2O

[0046]

[0047] **<실시예 2>**

[0048] **미량원소 종류별 첨가에 따른 성장 실험**

[0049] 실시예1에서 가장 양호한 비료배지의 농도(비료 1.25배 배지: 복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)를 확인하였으므로, 본 실험에서는 배지의 최적화를 위하여 상기 실시예1에서 선정된 비료배지의 농도(비료 1.25배 배지: 복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)에 다양한 종류의 미량원소를 첨가하여 7일간 3번 반복으로 배양한 후 미세조류의 성장 차이를 살펴보았다.

[0050] 첨가되는 미량원소로는 코발트($CoCl_2?6H_2O$), 구리($CuSO_4?5H_2O$), 아연($ZnSO_4?7H_2O$) 및 몰리뷰데늄($Na_2MoO_4?2H_2O$)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종을 각각 첨가하여 사용하였으며, 첨가되는 코발트, 구리, 아연, 몰리뷰데늄 각각의 농도는 상기 f/2 배지에서 사용된 코발트 양의 0.5배, 1.0배, 1.5배, 2.0배로 구분하여 비료배지에 첨가한 후 동일한 방법으로 7일간 배양하여 f/2 배지와 성장을 비교하였다. 하기 표 2에서는 본 실험에서 실시한 각각의 배지를 기재하였다.

[0051]

표 2

[0052] 미량원소 종류별 첨가에 따른 *N. oceanica* 성장 실험에서 실험구별 배지 구성

제조예	배지 구성
1	f/2 배지 (대조구)
2	비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)
3	비료 1.25배 배지+$CoCl_2 6H_2O$ (0.055mg/L)
4	비료 1.25배 배지+$CoCl_2 6H_2O$ (0.100mg/L)
5	비료 1.25배 배지+$CoCl_2 6H_2O$ (0.165mg/L)
6	비료 1.25배 배지+$CoCl_2 6H_2O$ (0.220mg/L)
7	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0098mg/L)
8	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0196mg/L)
9	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0294mg/L)
10	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0392mg/L)
11	비료 1.25배 배지+$ZnSO_4 7H_2O$ (0.022mg/L)
12	비료 1.25배 배지+$ZnSO_4 7H_2O$ (0.044mg/L)
13	비료 1.25배 배지+$ZnSO_4 7H_2O$ (0.066mg/L)

14	비료 1.25배 배지+$ZnSO_4 7H_2O$ (0.088mg/L)
15	비료 1.25배 배지+$Na_2MoO_4 2H_2O$ (0.006mg/L)
16	비료 1.25배 배지+$Na_2MoO_4 2H_2O$ (0.012mg/L)
17	비료 1.25배 배지+$Na_2MoO_4 2H_2O$ (0.018mg/L)
18	비료 1.25배 배지+$Na_2MoO_4 2H_2O$ (0.024mg/L)

[0053] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이(도 2의 각 lane 번호는 상기 표 1의 제조예 번호에 각각 대응됨), 각 미량원소의 첨가 함량이 높을수록 *N. oceanica*의 성장률은 유의하게 높은 경향을 보였다. 자세하게는 미량원소로 코발트 0.5 배(0.055mg/L) 및 몰리브데늄 0.5배(0.006mg/L)를 첨가한 실험구에서 성장률이 0.2903?0.2930으로 나타나 가장 낮은 성장률을 보였으며, 구리와 아연을 첨가한 실험구에서 각각 0.3096?0.3598, 0.3042?0.3559로 코발트나 몰리브데늄을 첨가한 배지(0.2903?0.3231)보다 비교적 높은 성장률을 나타내었다. 특히 전체 실험구 중에서 구리 1.5배(0.0294mg/L), 2.0배(0.0392mg/L) 및 아연 2.0배(0.088mg/L)를 첨가한 실험구의 경우 성장률이 0.3457?0.3598로 나타나 대조구인 f/2 배지(0.3726) 보다는 낮았으나 다른 실험구보다는 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다($P<0.05$). 따라서 미량원소로는 구리 또는 아연의 첨가가 *N. oceanica* 성장률을 효율적으로 높일 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0054] **<실시예 3>**

[0055] **구리의 첨가 농도에 따른 성장 실험**

[0056] 상기 실시예2에서는 *N. oceanica* 성장률을 효율적으로 높일 수 있는 미량원소의 한 종류로 구리가 가장 효과적임을 확인하였으며, 본 실험에서는 *N. oceanica* 성장에 최적의 구리 농도를 파악하기 위하여 f/2 배지에 사용된 구리($CuSO_4?5H_2O$) 농도를 기준으로 2배, 3배, 4배, 5배(0.0392, 0.0588, 0.0748, 0.098mg/L) 함량을 비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)에 첨가하여 8일간 배양하였다. 하기 표 3에서는 본 실험에서 실시한 각각의 실험구를 자세히 나타내었다.

표 3

[0057] 구리의 첨가 농도에 따른 *N. oceanica* 성장 실험에서 각각의 실험구별 배지 구성

제조예	배지 구성	도 3의 lane 번호
19	f/2 배지 (대조구)	1
20	비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)	2
21	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0392mg/L)	3
22	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0588mg/L)	4
23	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.0748mg/L)	5
24	비료 1.25배 배지+$CuSO_4 5H_2O$ (0.098mg/L)	6

[0058] 그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이, 구리 농도를 3배(0.0588mg/L)로 첨가한 실험구의 경우 성장률이 0.5955로 나타나 f/2 배지 성장의 약 80%에 달하는 높은 성장률을 보였으며, 3배 이상을 공급한 경우에는 농도가 높을수록 성장률이 낮아지는 경향을 나타내었다($P<0.05$). 따라서 비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)에 첨가되는 최적의 구리 농도는 0.0588mg/L인 것을 확인할 수 있었다.

[0059]

[0060] **<실시예 4>**

[0061] **$NaNO_3$ 첨가에 따른 성장 실험**

[0062] 상기 실시예 1 내지 3에서는 *N. oceanica* 배양을 위한 적정 비료배지의 농도(실시예1), 미량원소 종류(실시예2) 및 미량원소로 구리 첨가시 최적의 농도를 알아보았다. 다만 실시예1에 따라 비료 1.25배 배지를 사용한 경우에

도, f/2 배지에 비해 초기 성장이 늦고 최대 세포밀도가 낮은 것으로 나타났는데, 이는 높은 암모니아 농도 때문인 것으로 판단되었다.

[0063] Bae (2004)는 f/2 배지와 농업용 비료로 *N. oceanica*를 16일간 배양한 후 배지의 수질을 분석한 결과, 농업용 비료배지에서의 암모니아(NH4-N) 농도는 10.0 ppm으로 f/2 배지(0.065 ppm)에서 보다 약 154배나 높았고, 인산(PO4-P)의 경우도 약 9배 높았다고 보고하였다. 미세조류는 종류에 따라 높은 암모니아 농도(1mg?atom N/L 암모니아)에 매우 민감하여 성장이 저해된다(Kaplan et al., 1986). 암모니아 농도가 0.5 mg?atom N/L 보다 높으면 높은 조도와 pH 9 이상의 알칼리성 배양 환경에서의 미세조류의 성장을 저해한다(Admiraal, 1977; Kalpan et al., 1986).

[0064] 따라서 본 실험에서는 상기와 같은 높은 암모니아 농도의 문제를 해결하기 위하여, 실시예1에서 적정 비료배지 농도로 선정된 비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L) 농도의 40% 이하의 수준으로 농도를 감소시키는 대신 $NaNO_3$ (150mg/L)을 추가로 첨가하여 *N. oceanica* 배양한 경우 성장률을 조사하였다. 하기 표 4에서는 본 실험에서 실시한 각각의 실험구를 자세히 나타내었다.

표 4

[0065] $NaNO_3$ 첨가에 따른 *N. oceanica* 성장 실험에서 각각의 실험구별 배지 구성

제조예	배지 구성	도 4의 lane 번호
25	f/2 배지 (대조구)	1
26	비료 1.25배 배지(복합비료 208.4mg/L+요소비료 172.0mg/L)	2
27	비료 0.5배 배지(복합비료 83mg/L+요소비료 69mg/L)+$NaNO_3$ 150mg/L	3
28	비료 0.5 배지+$NaNO_3$ 150mg/L+$CuSO_45H_2O$ 0.0588mg/L	4
29	비료 0.25배 배지(복합비료 42mg/L+요소비료 34mg/L)+$NaNO_3$ 150mg/L	5
30	비료 0.25 배지+$NaNO_3$ 150mg/L+$CuSO_45H_2O$ 0.0588mg/L	6
31	비료 0.17배 배지(복합비료 28mg/L+요소비료 23mg/L)+$NaNO_3$ 150mg/L	7
32	비료 0.17 배지+$NaNO_3$ 150mg/L+$CuSO_45H_2O$ 0.0588mg/L	8

[0066] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, 비료 1.25배 배지의 실험구가 성장률 0.3985로 가장 낮은 성장률을 보이는 반면, 비료 0.25배 배지에 $CuSO_45H_2O$ (0.0588mg/L)와 $NaNO_3$ (150mg/L)를 첨가한 실험구에서는 f/2 배지의 약 96%에 해당하는 높은 성장률(0.4481)을 보여 f/2 배지와 비교해서 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 ($P<0.05$). 비료 0.17배 배지에서는 비료 1.25배 배지와 같이 가장 낮은 성장을 보였다.

[0067] **<실시예 5>**

[0068] **특급 시약과 공업용 시약의 성장 비교**

[0069] 상기 실시예4에서는 비료 0.25배 배지에 $CuSO_45H_2O$ (0.0588mg/L)와 $NaNO_3$ (150mg/L)를 첨가한 실험구에서 *N. oceanica* 성장률이 가장 높으며, 이는 f/2 배지와 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 향후 *N. oceanica* 대량생산에 f/2 배지를 대체할 수 있는 배양용 배지로의 가능성을 확인하였다.

[0070] 이에 상기 사용된 $NaNO_3$ 및 $CuSO_45H_2O$가 경제적으로 저렴한 공업용을 사용할 경우에도 유사한 결과를 도출할 수 있는지 확인하기 위하여, 본 실험에서는 $NaNO_3$와 $CuSO_45H_2O$를 특급 시약($NaNO_3$: Samchun Pure Chemical, CuSO4?5H2O: Shimakyu's Pure Chemical)과 공업용 시약(NaNO3: Rifa Ind., CuSO4?5H2O: (주)영풍)을 사용하여 비료배지를 제조한 후 대조구인 f/2 배지와 함께 앞에서와 동일한 방법으로 *N. oceanica*를 7일간 3반복으로 배양한 후 성장 차이를 비교하였다.

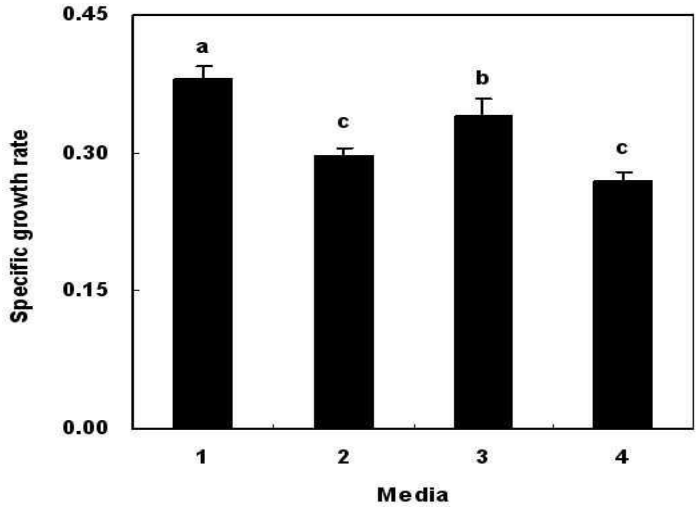
[0071] 그 결과 도5에서 보이는 바와 같이, $NaNO_3$와 $CuSO_45H_2O$를 가격이 저렴한 공업용으로 사용할 경우에도 *N. oceanica*의 성장은 f/2 배지와 비교해서 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0072] 결론적으로, 미세조류인 *N. oceanica*를 옥외 대량 배양에 있어서, 여과해수 1톤당 요소비료 34.4g, 복합비료(질소 22%, 인 12%, 칼륨 17%, 마그네슘 3%) 41.7 g, 공업용 $NaNO_3$ 150g, 공업용 $CuSO_4?5H_2O$ 0.0588g으로 구성된 배양용 배지가 f/2 배지를 대체할 수 있음을 입증하였다.

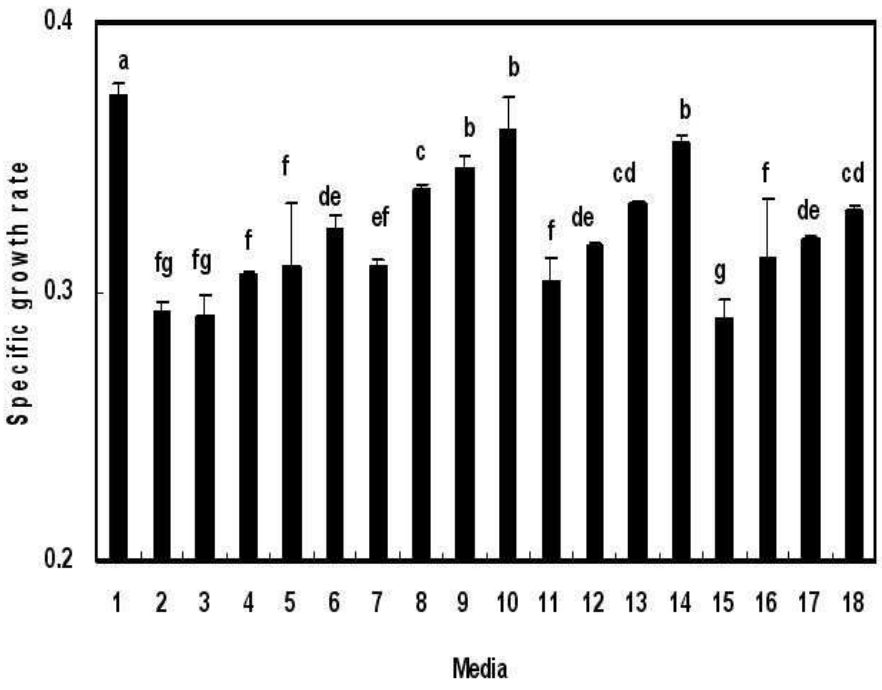
[0073] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

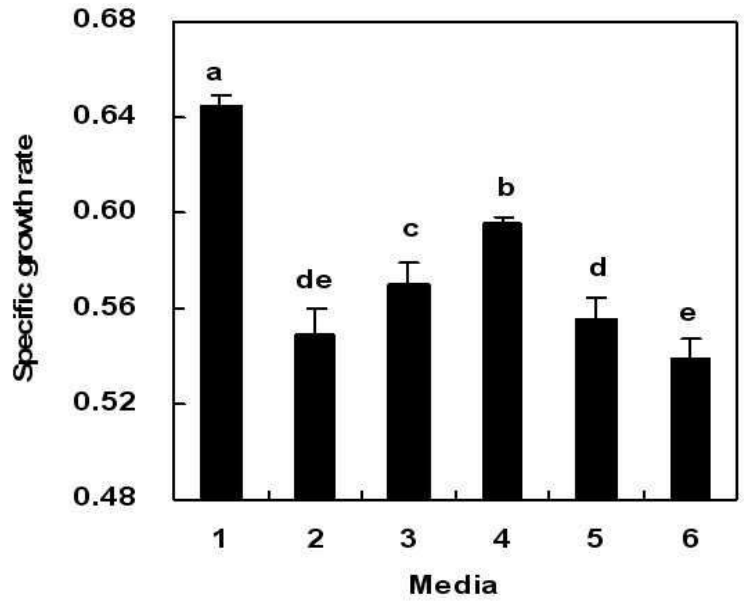
도면1



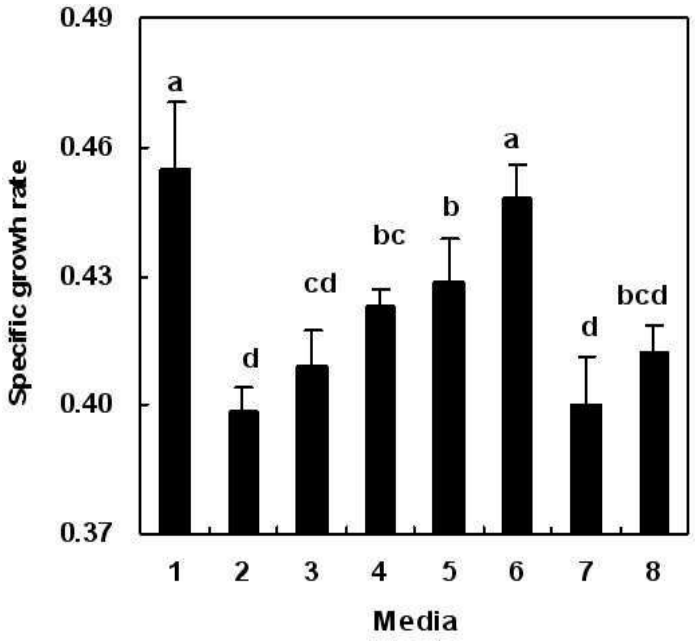
도면2



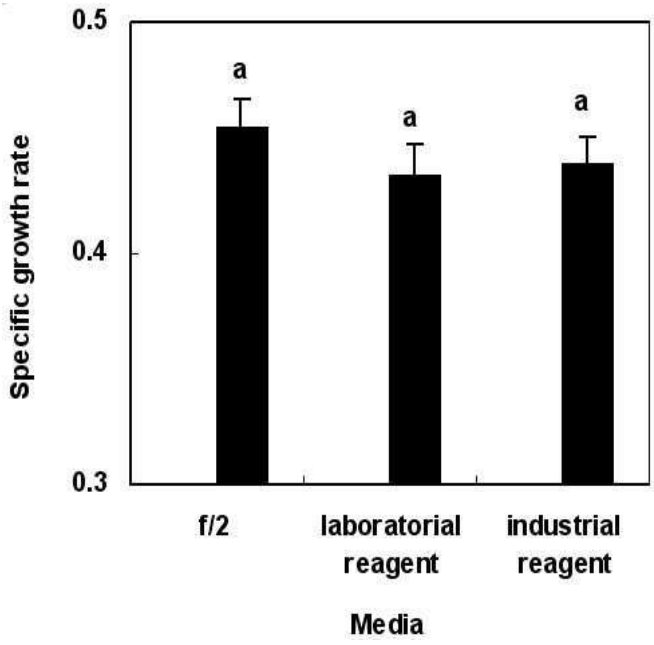
도면3


0.68
0.64
0.60
0.56
0.52
0.48
Specific growth rate
a
de
c
b
d
e
1
2
3
4
5
6
Media

도면4


0.49
0.46
0.43
0.40
0.37
Specific growth rate
a
d
cd
bc
b
a
d
bcd
1
2
3
4
5
6
7
8
Media

도면5


0.5
0.4
0.3
Specific growth rate
a
a
a
f/2
laboratorial reagent
industrial reagent
Media