(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0086924
(43) 공개일자 2019년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12N 2529/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0005050
(22) 출원일자 2018년01월15일
심사청구일자 2018년01월15일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
오석진
부산광역시 남구 수영로 345(대연동, 대연힐스테이트푸르지오) 2003호
한경하
경상남도 양산시 물금읍 버들2길 7-6 이지더원 5차 505동 301호
(74) 대리인
최석진

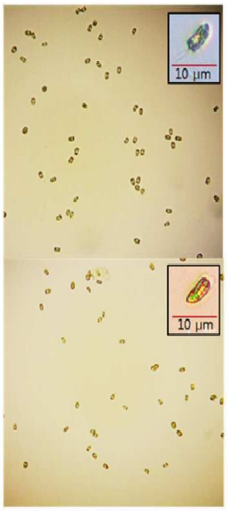
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **발광다이오드(Light-Emitting Diodes)를 이용한 담녹조강 Tetraselmis suecica 및 Tetraselmis tetrathele의 대량 배양방법**

(57) 요 약

발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 *Tetraselmis* 속의 대량배양방법에 있어, *Tetraselmis* 속은 *Tetraselmis. suecica* 및 *Tetraselmis. tetrathele*이고, 발광다이오드 광원은 620nm 내지 680nm의 파장을 가지는 적색광 또는 590 nm의 파장을 가지는 황색광이며, 발광다이오드 광원의 광도는 10 내지 300 μmol/m^2/s인 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis. tetrathele*의 대량 배양방법을 제공함으로써, *Tetraselmis* 속의 생장 향상을 통해 대량배양이 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2017-0843

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 LED-수산생물융합생산연구센터

연구과제명 LED를 이용한 초기먹이 생물 영양강화 및 질병 저감 양식생산성 향상 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 2

발광다이오드의 빛을 조사하여 미세조류 *Tetraselmis. suecica* 또는 *Tetraselmis. tetrathele*를 배양하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 3

미세조류 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis. tetrathele*의 성장단계를 유도기, 대수생장기, 영양물질강화기로 구분하고 각 단계별로 발광다이오드의 광량과 파장을 변화시켜 조사하여 배양하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 미세조류의 성장단계 중 유도기는 590 nm의 황색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 미세조류의 성장단계 중 대수생장기는 620nm 내지 680nm의 적색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 미세조류의 성장단계 중 영양물질강화기는 590 nm의 황색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 발광다이오드 광원의 Ks(반포화상수) 광도는 질소원의 경우 9.43 내지 21.2 μmol/m^2/s이고, 인원의 경우 0.98 내지 1.07 μmol/m^2/s인 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 발광다이오드 광원의 Ks(반포화상수) 광도는 질소원의 경우 15.5 내지 32.2 μmol/m^2/s이고, 인원의 경우 1.11 내지 1.27 μmol/m^2/s인 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

청구항 9

미세조류 *Tetraselmis. suecica* 또는 *Tetraselmis. tetrathele*의 성장단계중 유도기는 590 nm의 황색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하고,

대수생장기는 620nm 내지 680nm의 적색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하며,

영양물질강화기는 590 nm의 황색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하여 배양하는 것을 특징으로 하는 담녹조강 미세조류의 대량 배양방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 담녹조강을 대량으로 배양할 수 있는 방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 미세조류의 종 특이적인 발광다이오드의 최적 광량과 파장을 파악하여 조사함으로써 생장 강화와 더불어 높은 탄수화물, 단백질, 지질함량을 포함할 수 있는 발광다이오드를 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis tetrathele*의 대량 배양방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 해양생태계는 다양한 생물그룹으로 이루어져 있으며 최하위 단계를 차지하는 그룹은 미세조류이다. 미세조류는 빛 에너지를 통해 광합성을 하여 무기물을 유기물로 합성하는 독립영양생물이다. 또한, 산소를 발생시키는 일차생산자로, 생태계에서 생물생산의 기반이 되는 중요한 생물그룹 중 하나이다.

[0004] 미세조류는 농수산, 대체에너지, 식품, 의약품, 사료 첨가제 그리고 환경정화 등의 다양한 산업적 분야에서 널리 활용되고 있다. 윤충이나 패류 등의 먹이생물로 활용되거나, 가공 과정을 거쳐 동물 사료원으로서 제공된다. 또한, 미세조류의 세포내 영양물질들을 추출하여 식품 및 의약품의 원료로 활용하거나, 세포내 지질은 바이오디젤인 지방산 메틸에스테르로 전환이 가능하여 화석 연료를 대체할 에너지로 각광받고 있으며, 미세조류의 영양염 이용성 및 광합성에 따른 산소공급 기능을 활용한 생활 및 산업폐수 및 슬러지 정화의 이용도 있다.

[0005] 이와 같이, 미세조류의 상업적 이용을 위해서는 단기간 내에 고농도의 세포밀도가 요구되기 때문에 대량배양이 필수적이다. 현재 미세조류의 대량배양 방법에는 개방형(Open pond)과 밀폐형 배양시스템(Photo-Bioreactor; PB)이 있다. 개방형 대량배양은 태양광을 통해 야외에서 배양하는 방법으로 순도가 높지 않은 용도로 이용된다.

[0006] 밀폐형 배양은 의약품, 식품 및 사료와 같이 순도가 높으며, 안정성이 요구되는 배양에 사용되고 있지만, 운용비용이 높으며, 조명으로 사용하는 헬로겐 및 형광등의 경우, 많은 소비전력이 소모되는 단점이 있다. 그 중 광조건은 다른 환경보다 조절하기 쉽고 이에 따라 영양물질이나 생장에 변화를 줄 수 있다.

[0007] 미세조류의 생장에 영향을 미치는 생물화학물리적 환경조건(수온, 염분, 용존기체, pH, 이류, 영양염 및 환경수용력 등)은 다양하지만 대부분이 광합성 생물이기 때문에, 광 조건인 파장과 광량은 미세조류 생장에 중요한 요소이다.

[0008] 특히 빛 파장의 변화는 미세조류의 다양한 광합성 색소 반응성에 따라 세포 내 생화학적 조성 및 함유량을 변화시키기 때문에, 유용물질 증대 등 산업적인 분야에 많은 활용이 기대되고 있다.

[0009] 한편, 발광다이오드(Light Emission Diode; LED)는 인화갈륨 또는 비소화갈륨 등의 화합물을 통해 전류를 주어 빛을 조사할 수 있는 반도체 소자로, 수은이 포함되어 있지 않아 친환경적이며, 긴 수명 그리고 낮은 소비전력의 장점 때문에 산업분야에서 급속도로 발전하였다.

[0010] LED는 단파장 또는 복수파장으로 조절이 가능하고, 빛 조사 시간도 분 단위 또는 초 단위로 간헐적 제어를 통해 미세조류의 생장을 강화시키거나 영양강화를 시키는 파장만을 조사해줄 수 있어, LED를 이용한 미세조류 대량배양을 위해, 미세조류의 최적배양 조건을 찾는 연구가 활발히 수행되고 있다.

[0011] *Chlorella* sp.의 경우 청색 및 황색 파장에 비해 적색 파장에서 광량이 증가할수록 높은 생장속도를 보였고, 규조류인 *Chaetoceros calcitrans* 의 경우, 적색파장에서 높은 생장속도와 생물량을 보였다. 규조류인

*Thalassiosira pseudonana*는 백색 형광등에서 높은 생장을 보였으며, 단백질함량은 청색-녹색 파장에서 높아, 종에 따라 광파장에 대한 특이성(species specific)이 있는 것으로 판단된다.

[0012] *Tetraselmis* 는 담녹조강으로 여러 종이 알려져 있으며 광염광온성인 종으로 대량배양이 용이하여 여름철 고온에 취약한 클로렐라를 대체하여 이용되기도 하며, 영양학적으로 우수하여 먹이생물로 널리 이용되고 있다.

[0013] 또한, 다른 미세조류와 같이 수온, 염분, 광 파장 등의 환경조건 변화를 통해 세포 내 유용물질을 증진시킬 수 있고, 영양염 흡수가 높은 것으로 알려져 있어 수질정화에 활용 가능성이 있다. 그러나 발광다이오드의 조사를 통해 *Tetraselmis* 속의 대양배양을 위한 파장 연구는 타 미세조류보다 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 국내 등록특허번호 제10-1382955호에는 배양조 내부에 발광다이오드(LED)를 광원으로 하는 광섬유(optical fiber)를 설치하여, 광원이 배양조 전체에 고르게 전달될 수 있도록 한 발광다이오드를 이용한 미세조류 배양장치에 관한 것이다. 내부에 미세조류 및 배양액이 수용되어 있는 배양조와 상기 배양조의 내부에 설치되어 빛을 조사하는 광원부와 상기 배양조의 내부에 연결되어 이산화탄소가 공급되는 이산화탄소 공급부와 상기 광원부에 연결되어 상기 이산화탄소 공급부를 통해 공급된 이산화탄소를 배양조 내부로 배출시키는 이산화탄소 배출부를 포함하는 발광다이오드를 이용한 미세조류 배양장치에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 등록특허번호 제10-1447386호에는 LED 파장, 광도별 광 환경에 따른 해양 남세균, Synechococcus sp.의 성장에 따라 발생되는 광합성 색소 및 광합성 양을 측정하여 특정 LED 파장의 광원이 photosystem의 활성을 증가시키는 효과를 파악하기 위하여 광합성 색소의 함유량과 유전자 발현량을 검출하기 위한 프라이머를 제작하여 각각의 LED 파장별 및 세기별로 조명 후 광합성 색소함량 및 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과, 단파장인 녹색 및 청색 LED 광원이 Synechococcus sp.의 광합성 색소의 함량을 증가시키며, photosystem 관련 gene의 mRNA 발현을 유도, 세포내에서 발생되는 에너지를 전달하는 등 광합성과 성장에 있어서 positive한 영향을 미치는 것으로 발광다이오드 광원의 조사를 통한 해양 남세균의 광합성 증가를 이용한 배양방법에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허번호 제10-0415150호에는 미세 조류에 의한 고농도 배양시 발광다이오드(LED) 또는 직사각형 형광 광원을 이용한 동적 내부 광원과 기존의 터빈 교반형 생물 반응기를 이용하여 동적 내부 광원에 의한 광효율의 극대화와 터빈 교반형 반응기의 매우 높은 혼합 효율을 동시에 얻을 수 있는 미세 조류의 대량 배양을 위한 발광 터빈 장치가 설치된 교반형 광생물 반응기를 제공할 수 있는 미세조류의 대량배양을 위한 발광 터빈 장치가 설치된 교반형 광생물 반응기에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 공개특허번호 제10-2015-0057350호에는 미세조류 배양시 LED광원과 반사판을 이용하여 빛의 이용률을 극대화하였으며, 경사판을 가지고 있어 별도의 외부 동력장치 없이 기포기의 힘으로 미세조류의 교반 효과를 달성할 수 있어, 장치를 최소화하는 효율성을 증대시키게 되었으며, 또한 미세조류 배양시 고가의 유리 등의 용기 대신에 접근성이 높은 폴리에틸렌, 우레탄 등의 투명연성 재질을 이용한 장비를 제공하게 됨에 따라 배양의 편의성을 높이는 효과가 있는 내부에 경사진 반사장치를 갖는 LED 미세조류 클로렐라 배양장치에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0005) 그러나 상기 선행문헌은 본 발명의 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)를 이용하여 빛을 조사하여 Tetraselmis suecica 또는 Tetraselmis tetrathele 로 이루어지는 미세조류를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 미세조류의 성장단계 중 유도기, 초기, 대수 생장기 등에서 하나 이상 선택되는 단계의 발광 다이오드 광원 조사는 590 nm의 황색광 파장을 조사하여 미세조류 내 탄수화물, 단백질, 지질 함량을 증가시키고, 상기 미세조류의 성장단계 중 중기 대수생장기 단계에는 620nm 내지 680nm의 적색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하며, 상기 발광다이오드 광원은 10 내지 300 μmol/m2/s인 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 Tetraselmis suecica 및 Tetraselmis. tetrathele의 대량 배양방법 구성은 개시하지 않아 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 미세조류 산업화에 있어 발광다이오드의 조사를 통해 *Tetraselmis* 속의 대양배양을 위한 방법이 타 미세조류보다 미흡한 상기 문제점을 해결하기 위하여, 산업적 가치가 높은 *Tetraselmis suecica*와 *T. thetrathele* 생장에 미치는 LED 광량과 파장의 영향을 파악하여 이를 적용할 수 있는 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 *Tetraselmis* 속의 대량배양방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)를 이용하여 빛을 조사하여 *Tetraselmis suecica* 또는 *Tetraselmis tetrathele* 로 이루어지는 미세조류를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 미세조류의 성장단계 중 유도기, 초기, 대수 생장기 등에서 하나 이상 선택되는 단계의 발광 다이오드 광원 조사는 590 nm의 황색광 파장을 조사하여 미세조류 내 탄수화물, 단백질, 지질 함량을 증가시키고, 상기 미세조류의 성장단계 중 중기 대수생장기 단계에는 620nm 내지 680nm의 적색광 파장의 발광다이오드 광원을 조사하며, 상기 발광다이오드 광원은 10 내지 300 μmol/m^2/s인 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis. tetrathele*의 대량 배양방법을 제공하고자 한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 따른 방법으로 미세조류를 배양한 결과, 배양 광원은 발광다이오드를 이용하여 조사함으로 전기 절감 효과를 기대할 수 있고, 미세조류의 성장단계 중 유도기, 초기, 대수 생장기에는 황색광 파장을 조사하여 미세조류 내 세포 내 생화학 조성인 탄수화물, 단백질, 지질의 축적을 증가시켜 식품 및 먹이생물 영양강화, 바이오연료 생산 및 수질 또는 퇴적물 환경 개선 등에 사용하기 용이하도록 배양이 가능하다.

[0021] 또한, 미세조류의 성장단계 중 중기 대수생장기에는 적색파장을 조사하여 생장촉진 효과가 있어 단시간, 대량의 미세조류 배양이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 실험에 사용된 실험에 사용된 *Tetraselmis. suecica*(LIMS-PS-0007)와 *Tetraselmis. tetrathele*(LIMS-PS-0053)의 사진이다.

도 2는 광원의 파장 조건을 나타낸다.

도 3은 *T. suecica*의 파장별 광량에 따른 세포밀도의 변화를 나타낸다.

도 4는 *T. tetrathele*의 파장별 광량에 따른 세포밀도의 변화를 나타낸다.

도 5는 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 광량과 생장속도의 관계를 Lederman and Tett의 모델을 개량한 식을 통해 도출해낸 결과를 나타낸다.

도 6은 *T. suecica와 T. tetrathele의* 파장별 색소의 변화를 나타낸 그래프를 나타낸다.

도 7은 *T. suecica과 T. tetrathele의* 파장별 탄수화물 함량의 변화를 나타낸다.

도 8는 *T. suecica과 T. tetrathele의* 파장별 단백질 변화를 나타낸 것이다.

도 9는 *T. suecica과 T. tetrathele의* 파장별 지질 함량을 나타낸다.

도 10은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액의 암모니아 질소의 농도 변화를 나타낸다.

도 11은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액의 인산 인 농도 변화를 나타낸다.

도 12는 미세조류의 암모니아 질소 흡수과정 모식도를 나타낸다.

도 13은 질소원이 고갈된 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 암모니아 질소의 농도변화를 나타낸다.

도 14는 인원이 고갈된 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 인산 인의 농도변화를 나타낸다.

도 15는 본 발명으로부터 제안되는 발광다이오드의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis tetrathele*의 대량 배양방법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명의 발광다이오드(Light-Emitting Diodes; LEDs)의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis. tetrathele*의 대량 배양방법과 관련한 구체적인 실험 실시예를 들어 설명하면 다음과 같다.

[0026] 1. 실험방법

[0027] 1-1 *Tetraselmis* 속의 생장속도

[0028] 도 1은 실험에 사용된 실험에 사용된 *Tetraselmis. suecica*(LIMS-PS-0007)와 *Tetraselmis. tetrathele*(LIMS-PS-0053)의 사진이다. *Tetraselmis. suecica*(LIMS-PS-0007)와 *Tetraselmis. tetrathele*(LIMS-PS-0053)는 한국해양과학기술원 해양시료도서관에서 분양 받았다. 배양에 사용된 배지는 f/2이며, selenium(H_2SeO_3)의 최종농도가 0.001 μM이 되도록 첨가하였다.

[0029] 유지배양을 위한 수온과 염분은 20℃, 30 psu였으며, 광량은 100 μmol/m^2/s (L:D = 12L : 12D ; cool-white fluorescent lamp)으로 조절하였다. 실험에 사용된 기구는 2차적인 생물학적 오염을 차단하기 위해 고압멸균(121℃, 20 min)후 사용하였으며, 모든 작업은 무균대에서 수행되었다.

[0030] 실험종의 무균처리를 위해 AM9 항생제를 이용하였고, 실험에 사용된 기구는 2차적인 생물학적 오염을 차단하기 위해 고온고압멸균(121℃, 202 kpa, 20min)후 사용하였으며, 모든 실험은 Clean bench에서 수행되었다.

[0031] 세포밀도의 증감을 알기 위해 파장에 따른 *Tetraselmis suecica* 및 *T. tetrathele*의 생장속도 변화를 세포밀도의 증감을 통해 확인하였다. 세포밀도의 증감은 현미경을 통한 직접 검경이 아닌 *in vivo* chlorophyll 형광값을 통해 측정하였다. 세포밀도의 증감에 따라 성장단계는 다음의 3단계로 구분할 수 있었다.

[0032] - 유도기 : 미세조류 세포를 새로운 배지에 접종하였을 때, 대수생장기 전에 세포 수가 증가하지 않는 시기.

[0033] - 지수기(대수생장기) : 세포의 생장과정에서 세포의 증식이 일정한 속도로 최대 증가하는 시기.

[0034] - 정상기(영양물질 강화기) : 세포의 증식과 사멸이 일정한 비율을 가져, 세포 수의 증가가 없는 시기

[0035] 이는 형광광도계를 통해 직접 측정이 가능한 배양튜브를 이용하였기 때문에 직접적 개폐가 불필요하여 세포의 오염을 방지할 수 있고, 다량의 표본을 신속히 처리할 수 있도록 하기 위함이다.

[0036] 도 2는 광원의 파장 조건을 나타낸다. 파장별 광량에 따른 생장실험을 위한 광원은 복수파장인 형광램프(삼파장 등, ㈜ 남영전구)를 이용하였으며, 단일파장은 청색 LED(λ_{max}= 450 nm; LUMILEDS), 황색 LED(λ_{max}= 590 nm; LUMILEDS), 적색 LED(λ_{max}= 630 nm; LUMILEDS)을 이용하였다.

[0037] *Tetraselmis* 두 종을 대수생장기까지 생장시킨 후, 9 mL 배양튜브(13mm, disposable culture tubes, KIMBLE CHASE)에 f/2 배지 5 mL을 주입하여, 최종세포밀도가 약 1.0^2 cells/mL이 되도록 접종하였다.

[0038] 광 조건은 가시광선 차광필름을 이용하여 10, 30, 50, 70, 100, 200 그리고 300 μmol/m^2/s(QSL-2100, Biospherical Instrument Inc.)의 7단계로 조절하였다. 이후 이틀 간격으로 오전 10시에 형광광도계(10-AU-Fluorometer, Turner Designs,)로 형광값을 측정하였다.

[0039] 생장속도는 대수생장을 보이는 기간 동안의 세포밀도를 이용하여 아래의 식에 대입하여 계산하였다. 각각의 광조건 실험은 triplicate로 수행하였으며, 생장속도는 하기의 계산식으로 이들의 평균값으로 나타내었다(단,

triplicate 중 명백히 오류로 판명된 값은 평균시 제외하였다).

[0040] $$\mu = \frac{1}{\Delta t} ln \frac{N_t}{N_0}$$

[0041] μ : 생장속도(specific growth rate; /day)

[0042] N_0, N_t: 대수생장기에서 초기와 t시간(day) 후의 형광값

[0043] Δt: 대수생장기의 기간(day)

[0044] 생장속도와 광량의 관계를 Lederman and Tett (1981)의 모델을 개량한 하기의 식을 이용하여 계산하였다.

[0045] $$\mu = \mu_{max} \frac{I - I_0}{(K_s) - I_0 + (I - I_0)}$$

[0046] μ : 생장속도(specific growth rate; /day)

[0047] μ_{max}: 최대생장속도(maximum specific growth rate; /day)

[0048] I: 광량(irradiance; μmol/m^2/s)

[0049] I_0: 보상광량(compensation PFD; μmol/m^2/s)

[0050] K_S: 반포화광량(half-saturation light intensity; μmol/m^2/s)

[0052] 1-2. *Tetraselmis* 속의 생화학적 측정

[0053] 세포계수 확인을 위해 전 배양을 위한 수온과 염분은 20℃, 30 psu였고, 광량은 모든 파장을 100 μmol/m^2/s (L:D = 12L : 12D)으로 조절하였다. 4 L PE bottle에 f/2 배지 3 L을 주입하여, 최종 세포밀도가 약 1.0^2 cells/mL이 되도록 접종하였다. 세포 계수는 이틀에 한번 오전 10시에 현미경을 통해 직접 검경하였다.

[0054] 표 1은 측정된 색소항목을 나타낸다. Chl *a*, *b*, *c*, phaeophytin *a*, chlorophyllide *a*, 보조색소 13종을 측정하였다. 분석을 위한 시료는 대수생장기까지 배양시킨 후, 여과 직후 냉동(-20℃)하여 암소보관 하였다.

[0055] 색소는 UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) 시스템 (ACQUITY UPLC H-Class, Waters, USA)으로 Chl *a*, *b*, *c*, phaeophytin *a*, chlorophyllide *a*, 보조색소 13종을 측정하였다.

표 1

[0056] 측정된 색소항목

Peak no.	Pigment	Retention
1	Chlorophyllide a	2.1
2	Chlorophyll c_2	2.3
3	Peridinin	2.6
4	19'-butanoyloxyfucoxanthin	2.8
5	Fucoxanthin	2.9
6	Neoxanthin	3.0
7	Prasinoxanthin	3.1
8	Violaxanthin	3.2
9	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	3.2
10	Diadinoxanthin	3.6
11	Alloxanthin	4.0
12	Diatoxanthin	4.3
13	Lutein	4.6
14	Zeaxanthin	4.7
15	Chlorophyll b	8.0

16	Chlorophyll a	8.3
17	Pheophytin a	8.7
18	β-carotene	9.0

[0057] 광합성 색소분석은 대수생장기까지 생장한 생물시료 100 mL를 GF/F 여과지로 여과하여 -20℃로 냉암소 보관하였다.

[0058] 분석은 다음과 같은 방법으로 색소를 추출하였다.100% 아세톤을 5 mL 넣어 내부표준물질인 canthaxanthin을 100 μL 첨가 후, 초음파 분쇄를 약 5분 실시하였다. 이후 -20℃ 냉암소에서 24시간 추출하였다. 24시간의 추출 기간에 분쇄기를 이용하여 여과지를 분쇄하고, 2000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 상등액 1 mL와 300 μL의 UPLC grade water를 바이알에 넣은 후 혼합하여 UPLC loop에 주입하여 분석하였다.

[0059] 표 2는 색소분석을 위한 용매의 조성비율을 나타낸다. 색소 분석을 위한 용매의 조성비율을 ACQUITY UPLC Columns Calculator 프로그램을 이용하여 컬럼의 조건에 맞게 설정하였다.

표 2

[0060] 색소분석을 위한 용매의 조성

UPLC : Waters ACQUITY UPLC H-Class
Detector : Absorbance (Waters PDA) at 436 nm
Column : Waters HSS C18 (1.8 μm, 2.1mm)
Solvent A : MeOH 80%, Ammonium Acetate (0.5 M) 20%
Solvent B : Acetonitrile 87.5%, H_2O 12.5%
Solvent C : Ethyl Acetate 100%
Flow rate : 0.35 mL/min

[0061] 탄수화물은 Phenol-sulphuric acid 방법으로 분석하였다. 표준용액인 glucose을 통해 5% phenol 1 mL 첨가 후 40분간 방치하고, 세포 내 탄수화물을 추출한 후, H_2SO_4 5 mL를 첨가한다. 10분간 방치 후 찬물에 식힌다. 균질 혼합하여 2000 rpm에서 15분간 원심분리 시킨다. 이후 UV/Vis spectrophotometer(X-ma, 3000PC)를 이용하여 490 nm와 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

[0062] 단백질은 다음의 방법으로 분석하였다. Protein standard solution을 이용하여 표준용액을 조제하고, 혼합시약인 alkaline copper solution 5 mL를 첨가하여 균질하게 혼합하였다. 10분 방치 후 단백질을 추출한 뒤, folin ciocalteu로 1시간 30분간 방치하고 균질 혼합하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

[0063] 지질은 chloroform과 methanol을 이용하여 지질을 추출할 수 있는 다음의 방법으로 분석하였다. glycerintripalmitat(tripalmitin)을 표준용액으로 사용하였고, 지질추출과정은 다음과 같다.

[0064] chloroform과 methanol에 의해 추출된 지질이 포함된 상등액에 초순수를 넣는다. 이후 methanol과 초순수 그리고 chloroform과 지질 층으로 나뉘면, 상층의 methanol과 초순수를 제거한 후에 40℃에서 48시간 동안 건조기에서 보관한다. 시료가 모두 건조되면 H_2SO_4과 초순수를 첨가하고, UV/Vis spectrophotometer로 360 nm와 750 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다.

[0066] 1-3 *Tetraselmis* 속의 영양염 흡수능력 측정

[0067] *T. suecica*와 *T. tetrathele*는 AM 9법으로 무균처리 하였다. AM 9 혼합액은 dihydrostreptreptomycin sulfute(5 mg/mL), potassium penicillin G(3.5 mg/mL), polymyxin B sulfate(0.194 mg/mL), tetracycline(0.5 mg/mL), chloramphenicol(0.05 mg/mL) 그리고 neomycin sulfate(0.25 mg/mL)인 6가지 항생물질의 혼합액을 조제하여 사용하였다.

[0068] 배양 중인 세포액과 AM 9 혼합액을 각각 0.9:0.1, 0.8:0.2, 0.7:0.3, 0.6:0.4 비로 혼합하여 총 1 mL로 맞추었다. 24시간 후 AM 9 혼합액의 비율이 높았던 0.6:0.4에서는 두 종 모두 세포가 사멸하였고, *T. suecica*에서는

0.8:0.2, *T. tetrathele*에서는 0.7:0.3에서 세포의 생존을 확인하였다. 생존이 확인된 세포액을 f/2 배지 하에서 배양시켰다.

[0069] 상기 배양된 세포액을 글루타알데히드의 최종농도가 1%가 되게 혼합하여 냉암소 보관하였다. 이후, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)를 최종농도 1 μg/mL로 혼합한 후, 형광현미경 검사를 통해서 무균화 여부를 확인하였다. 또한 2차적 오염을 막기 위하여 모든 실험은 Clean bench에서 수행하였으며, 실험기구는 고온고압멸균(121℃, 202 kpa, 20 min)하여 사용하였다.

[0070] 미세조류의 흡수속도와 영양염 농도 간의 관계를 파악하기 위해서는 영양염 첨가 후 정속흡수(Surge uptake)를 보이며 세포 내 영양염의 변화가 없는 시간 내에 실험을 수행하여야 한다. 따라서 영양염 흡수 실험을 하기 전에 사전실험을 통해 정속흡수를 파악하였다.

[0071] 우선, 세포 내 질소와 인을 고갈시키기 위해 질소 또는 인원이 제외된 AK 인공해수를 기반으로 한 L1배지에서 *T. suecica*와 *T. tetrathele*를 전 배양하였다. 이후 세포의 생장이 정지할 때까지 배양을 실시하였고, 질소원은 암모니아 질소 20 μM, 인원은 인산 인 3 μM으로 함유된 L1 배지 700 mL에 세포 내 질소와 인이 고갈된 세포액을 각각 접종하였다.

[0072] 배양개시(0분), 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분에 각각 배양액을 채수하여 0.45 μm filter으로 여과한 후 암모니아 질소와 인산 인을 각각 측정하였다. 파장에 따른 변화를 파악하기 위해 형광램프(fluorescent lamp), 적색파장(630 nm), 황색파장(590 nm), 청색파장(450 nm)에서 동일한 실험을 하였고, 일정한 흡수속도를 보였던 시간을 영양염 흡수실험 시간으로 선택하였다.

[0073] 영양염 흡수속도는 300 mL 배양용기에 암모니아 질소가 1.0, 5.0, 10, 20, 50, 70, 100 μM의 7단계, 인산 인이 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10, 20 μM의 7단계로 조제된 L1배지에 질소와 인이 고갈된 세포액(약 1×10^4 cells/mL)을 각각 접종하였다.

[0074] 배양시간은 사전실험에서 정속흡수를 보였던 시간으로 설정하였다. 특히, 질소와 인이 고갈된 세포를 함유한 배양액을 첨가하면 흡수실험에 제공된 영양염의 농도보다 낮아지기 때문에, 접종직후 배양액을 채수하여 농도를 확인하였다. 파장에 따른 영양염 흡수속도 파악을 위해 모든 파장에서 100 μmol/m^2/s하에서 실험을 수행하였다.

[0075] 영양염 흡수속도와 영양염 간의 관계를 파악하기 위해 Michaelis-Menten 식을 이용하였다. 그리고 변수값(Ks)은 측정된 실험값을 식 (1)에 대입하여 비선형 최소자승법을 이용하여 계산하였다.

[0076] $$\rho = \rho_{max} \cdot \frac{S}{Ks + S} \qquad (1)$$

[0077] ρ_{max}: 영양염 최대 흡수속도 (pmol/cell/hr)

[0078] Ks: 반포화상수 (μM) S: 영양염 농도 (μM)

[0079] 영양염 측정을 위한 모든 분석은 해양환경공정시험기준(국토해양부, 2014)에 의거하여 실험하였고, 분석 항목은 하기에 기재된 바와 같이, 암모니아 질소와 인산인이 포함된다.

[0080] 암모니아 질소는 염기성 차아염소산용액과 산화반응하여 모노크롤아민을 생성한다. 모노크롤아민은 페놀과 촉매인 니트로프러시트 그리고 차아염소산에 의해 푸른색의 인도페놀을 생성하게 된다. 항온조 35℃하에서 1시간의 반응시간을 거친 후, UV/Vis Spectrophotometer로 최대 흡수파장인 640 nm에서 발색된 인도페놀의 흡광도를 측정하였다. 암모니아의 농도는 검량선식을 이용하여 계산하였다.

[0081] 해수 중 인산 인을 측정하는 방법으로 molybden 청법이 가장 많이 이용된다. 인산 인은 산성조건에서 인-molybden산 암모늄과 주석산안티모닐칼륨과 반응하여 인-molybden산 착체를 형성한다. 이 착화합물은 ascorbic산에 의해 환원되어 푸른색 용액을 생성하게 된다. 이 푸른색의 강도는 인산 인의 농도와 비례하기 때문에 이 용액을 UV/Vis Spectrophotometer(X-ma, 3000PC)로 최대 흡수파장인 885 nm에서 흡광도를 측정하였다. 인산 인의 농도는 검량선식을 이용하여 계산하였다.

[0083] 2. 실험 결과

[0084] 2-1 파장과 광량에 따른 *Tetraselmis* 속의 생장 결과

[0085] 미세조류의 광화학장치는 주색소 chlorophyll *a*로 이루어져 있는 반응중심(reaction center)과, 일부 chlorophyll *a*(chl-*a*)와 보조색소 carotenoid와 phycobilin 등으로 이루어져 있는 안테나 복합체(antenna complex)로 구성되어 있다.

[0086] 광합성 색소는 미세조류 문(phylum) 수준에서 구성이 달라지기 때문에 중요한 분류 키(key)가 되기도 하며, 광합성 색소에 따라 흡수파장이 결정이 되기 때문에 빛 파장에 따라 미세조류 생장속도 및 생체 내 구성성분까지 영향을 주는 것으로 판단된다.

[0087] 도 3은 *T. suecica*의 파장별 광량에 따른 세포밀도의 변화를 나타낸다. 그래프이고, 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 생장 곡선을 광량별로 나타내었다. 그 결과 모든 파장에서 광량의 증가에 따라 최대세포밀도가 증가하는 것을 확인하였고, 일정 광량이상에서는 유사하였다. 형광램프, 청색파장 그리고 적색파장은 100 μmol/m^2/s, 황색파장은 300 μmol/m^2/s 까지 광량의 증가에 따라 최대세포밀도가 증가하였고, 그 이상의 광량에서는 유사하였다.

[0088] 도 4는 *T. tetrathele*의 파장별 광량에 따른 세포밀도의 변화를 나타내고 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 생장 곡선을 광량별로 나타내었다. 그 결과 모든 파장에서 광량의 증가에 따라 최대세포밀도가 증가하는 것을 확인하였고, 일정 광량이상에서는 유사하였다. 형광램프와 적색파장의 경우, 200 μmol/m^2/s까지, 청색파장과 황색파장은 300 μmol/m^2/s까지 광량의 증가에 따라 최대세포밀도가 증가하였고, 그 이상의 광량에서는 유사하였다.

[0089] 상기 결과에서는 일부 미세조류에서 보고되는 생장속도에 대한 광저해 현상이 나타나지 않았고, 형광램프와 적색파장이 광원이었을 때 비교적 낮은 광량에서 최대세포밀도를 보여 다른 광원에 비해 높은 광량이 아니어도 높은 세포밀도를 기대할 수 있어 전기절감의 효과가 있을 것으로 사료된다.

표 3

[0090] *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 광량과 생장속도의 관계

Species	Wavelength	Hyperbobolic equation	μ_{max} (/day)	Ks (μmol/m^2/s)	I_0 (μmol/m^2/s)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	$\mu = 0.91(I-4.73)/(I+37.6)$	*0.91*	*47.1*	*4.73*
	Blue LED	$\mu = 0.94(I-1.50)/(I+17.8)$	*0.94*	*20.8*	*1.50*
	Yellow LED	$\mu = 0.89(I-5.45)/(I+32.9)$	*0.89*	*22.0*	*5.45*
	Red LED	$\mu = 1.14(I-9.01)/(I+46.2)$	*1.14*	*64.2*	*9.01*
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	$\mu = 0.96(I-10.7)/(I+44.1)$	*0.96*	*65.6*	*10.7*
	Blue LED	$\mu = 0.83(I-12.7)/(I+49.7)$	*0.83*	*75.2*	*12.7*
	Yellow LED	$\mu = 0.63(I-3.74)/(I+19.8)$	*0.63*	*12.4*	*3.74*
	Red LED	$\mu = 0.95(I-10.4)/(I+51.6)$	*0.95*	*72.5*	*10.4*

[0091] 도 5와 상기 표 3은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 광량과 생장속도의 관계를 Lederman and Tett의 모델을 개량한 식을 통해 도출해낸 결과를 나타낸다. I_0는 호흡과 광합성이 같은 광량인 세포가 생장이 가능한 최소광량을 의미하고, Ks는 광의 친화성지수(affinity index)로 값이 낮을수록 높은 친화성을 의미한다.

[0092] 각 파장 조건에서 광량이 증가할수록 생장속도 역시 증가하였고, 일정 광량 이상에서는 유사한 생장속도를 보였다. *T. suecica*의 μ_{max}는 적색파장, 청색파장, 형광램프, 황색파장 순으로 나타났다. 따라서 *T. suecica*의 파장

별 생장속도는 적색파장에서 가장 높고, 황색파장에서 가장 낮은 생장속도를 확인하였다.

[0093] Ks와 I_0는 청색파장이 가장 낮았으며, 생장이 느렸던 적색파장에서 비교적 높게 나타났다. Ks는 청색파장과 황색파장이 유사하게 가장 낮았으며, 적색파장에서 가장 높게 나타났다.

[0094] 상기의 결과로 청색파장의 I_0와 Ks를 고려할 때 *T. suecica* 경우에는 낮게 나타나, 낮은 광량에서도 생장이 가능하며 일정 세포수까지는 빨리 생장할 수 있는 것으로 판단된다.

[0095] *T. tetrathele*의 경우, 모든 파장에서 광량이 증가할수록 생장속도 역시 증가하였고, 일정 광량 이상에서는 유사한 생장속도를 보였다. μ_{max}는 형광램프와 적색파장에서 유사하였고, 청색파장, 황색파장 순으로 높게 나타났다. 따라서 *T. tetrathele*의 생장속도는 형광램프와 적색파장에서 가장 높고, 황색파장이 가장 낮았음을 확인하였다.

[0096] Ks는 황색파장을 제외한 나머지 광 조건에서 평균 71.1 ±5.00 $\mu mol/m^2/s$로 비슷하였고, 황색파장에서 가장 낮은 값을 보였다. I_0는 형광램프, 청색파장, 적색파장에서 평균 11.2 ±1.25 $\mu mol/m^2/s$로 유사하게 나타났으며, 황색파장에서 가장 낮았다.

[0097] 상기 결과를 확인하면 두 종 모두 LED 광원에 있어서 적색파장에서 가장 높은 생장속도를 보였고, *T. tetrathele*(0.95 /day)보다 *T. suecica*(1.12 /day)에서 더 높은 생장속도가 확인되었다.

[0098] *T. tetrathele*의 경우 형광램프에서도 적색파장과 유사한 생장속도를 보였다. 하지만 형광램프와 비교하여 소비전력을 보면, 일반 형광램프가 40 W인 것에 비해 LED는 낮은 소비전력으로 높은 광합성 효과를 구현할 수 있다.

[0099] 이에 대한 경제적 효과를 알아보기 위해 전기요금을 계산해보았다. 한국전력의 전기요금을 참고하여 산업용 평균 전력량 요금(kWh)을 약 73.2원으로 보았고, 이를 기준으로 형광램프(삼영전구, 40 W, 수명시간 8000 h)와 LED(스마트엘이디, 20 W, 수명시간 25000 h)를 비교해보았다. 그 결과, 25000 시간 사용을 기준으로 형광램프는 전기요금이 79,450원이었고, LED는 49,100원으로 약 45%의 절감효과가 있었다. 따라서 LED는 형광램프와 비슷한 수준으로 미세조류의 생장을 보이더라도, 장기적으로 절반 정도의 전기 절감 효과를 기대할 수 있다.

[0100] 미세조류는 종에 따라 빛에 대한 흡수스펙트럼의 수준이 다르며, 녹조류의 경우 chlorophyll *a*의 영향으로, 주로 청색파장 또는 적색파장에서 높은 생장을 보인다.

[0101] 본 발명의 실험 실시예에 따르면, *T. suecica*와 *T. tetrathele*는 적색파장에서 높은 생장속도를 보였으며, 이는 광합성 색소의 흡수스펙트럼에 대한 영향으로 판단된다. 녹조류는 고유로 보조색소 chlorophyll *b*(chl-*b*)를 함유하고 있는데, chl-*b*의 최대 흡수파장은 455 nm와 642 nm로 청색뿐만 아니라, 적색파장을 잘 흡수하여 chl-*a*로 광 에너지를 전달하게 된다.

[0102] 상기 실시예에 사용된 적색 LED의 중심파장은 630 nm로 chl-*b*와 최대흡수파장과 유사하였다. 이처럼 흡수스펙트럼의 일치정도에 따라 특정 파장대에서 생장이 높고, 적색파장에서 높은 생장속도는 대부분 녹조류와 남조류이다.

[0103] 녹조류는 *C. pyrenodosa*, *C. vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, 남조류는 *Spirulina platensis*, *Synechococcus* sp.가 보고되어 있다. 홍조류 *Porphyra*는 청색 광에 비해 적색 광에서 빛 흡수율이 높고, 광합성을 위한 다음단계로 전달하는데 있어 1.2~1.5배의 효율성을 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 광자극은 높은 탄소축적률 뿐 아니라 효소활성을 포함한 대사 작용을 활발하게 하여 높은 생장속도를 보이는 것으로 사료된다.

[0104] 황색파장의 경우, 생장속도가 낮을 것으로 생각되었으나, 두 종 모두 최대생장속도의 70% 수준이고, 다른 파장보다 비교적 낮은 Ks와 I_0를 보였다. 일반적으로 *Tetraselmis* 속이 가지고 있는 보조색소는 chl-*b* 그리고 neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin을 포함하는 carotenoids가 가장 많은 비율을 차지하며, carotenoids의 흡수파장은 400~550 nm (보라색에서 녹색)이다.

[0105] 그러나, *Tetraselmis*속의 흡수스펙트럼(absorption spectrum)은 chl-*a*는 녹색파장을 제외하고는 대부분의 파장을 흡수할 수 있으며, chl-*b*는 황색파장을 포함한 대부분의 파장을 흡수할 수 있기 때문에, 본 발명의 실험 실시예에 따르면 황색 파장대에서도 충분히 생장이 가능할 것으로 사료된다.

[0106] 본 발명의 실시예에 따른 결과, T. suecica와 T. tetrathele의 파장별 광량에 따른 생장속도는 적색파장에서 가장 높은 생장속도를 보였고, 이는 적색파장에서 높은 빛 흡수 전달 및 높은 탄소축적률 등 복합적인 요인 때문

으로 사료된다.

[0107] 그러나, Ks와 I_0의 경우, 황색파장에서 오히려 낮았다. 따라서 Tetraselmis 속의 대량배양 시 유도기와 초기 대수생장기에는 황색파장, 중기 대수생장기에는 적색파장을 이용하면 생장을 촉진시키는데 효율적인 것으로 판단된다.

[0109] 2-2 파장과 광량에 따른 *Tetraselmis* 속의 생화학적 조성 결과

[0110] 미세조류의 세포 내 성분인 탄수화물, 단백질, 지질, 색소 등은 상업적으로 활용된다. 또한 미세조류는 먹이생물로서 이용될 때, 높은 생화학적물질이 요구되는데, 이는 먹이생물을 섭이하는 섭이자의 체내 성분에 영향을 끼치기 때문이다.

[0111] 이와 같이, 미세조류의 생화학적 조성 및 함량은 광 조건에 따라 변화할 수 있고 생장이 저해되는 환경조건에서 영양 강화가 된다는 보고가 되어 본 발명의 실시예에서는 *Tetraselmis* 속의 LED 파장별 광합성 색소, 탄수화물, 단백질, 지질 함량 변화를 측정하였다.

[0112] 미세조류의 색소는 광합성을 통해 축적되는데, 주색소인 chlorophyll뿐 아니라 여러 보조색소를 함유하고 있다. 이는 미세조류의 종에 따라 그 조성이 다르며, 보조색소의 종류 또한 다양하다.

[0113] 그 중 상업적으로 많이 이용되는 보조색소로는 카르티노이드 계열인데, β-carotene, astaxanthin, lutein 등이 있다. 이와 같이, 색소의 함량 및 축적률은 배양환경에 따라 달라질 수 있어 LED 파장별로 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 광합성 색소와 보조색소에 대한 변화를 UPLC를 통해 측정하였다.

표 4

[0114] *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 색소의 변화

Species	Wavelength	Chlil d A	Chl c2	Neo	Viol + Hex	Allo	Dtx	Lut + Zea	Chl b	Chl a	Pht a	β-caro
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*0.021*	*0.000*	*0.046*	*0.058*	*0.005*	*0.002*	*0.059*	*1.350*	*1.371*	*0.028*	*0.040*
	Blue LED	*0.038*	*0.000*	*0.075*	*0.132*	*0.005*	*0.006*	*0.106*	*1.677*	*1.827*	*0.155*	*0.136*
	Yellow LED	*0.055*	*0.000*	*0.156*	*0.176*	*0.010*	*0.007*	*0.143*	*4.206*	*4.077*	*0.158*	*0.220*
	Red LED	*0.041*	*0.000*	*0.099*	*0.130*	*0.010*	*0.007*	*0.111*	*2.193*	*2.212*	*0.172*	*0.115*
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*0.015*	*0.002*	*0.021*	*0.024*	*0.001*	*0.001*	*0.030*	*0.590*	*0.636*	*0.006*	*0.013*
	Blue LED	*0.020*	*0.000*	*0.030*	*0.050*	*0.002*	*0.002*	*0.042*	*0.696*	*0.801*	*0.049*	*0.041*
	Yellow LED	*0.018*	*0.000*	*0.066*	*0.077*	*0.002*	*0.002*	*0.059*	*1.624*	*1.856*	*0.053*	*0.098*
	Red LED	*0.010*	*0.000*	*0.020*	*0.032*	*0.001*	*0.001*	*0.027*	*0.582*	*0.711*	*0.024*	*0.039*

[0115] 상기 표 4 및 도 6은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 색소의 변화를 나타낸 그래프이고, 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 색소 농도를 항목별로 나타내었다.

[0116] 도 6의 a는 *T. suecica*의 파장별 색소의 변화를 나타낸다. 대부분의 항목은 황색파장에서 높은 것을 확인하였다. 주색소인 chlorophyll *a*(chl-*a*)와 chlorophyll *b*(chl-*b*)의 경우, 기존의 대량배양에 사용되는 광원인 형광램프와 비교하였을 때, 황색파장에서 각각 약 2.97, 3.11배로 높았다.

[0117] 빠른 생장을 보였던 적색파장에 비해서는 황색파장이 각각 약 1.84, 1.91배 높았다. 보조색소의 파장별 농도 결과, neoxanthin, violaxanthin + 19-hexanoyloxyfucoxanthin, lutein + zeaxanthin, β-carotene은 황색파장이 가장 높았다. 형광램프와 비교하여 각각 3.1, 3.1, 2.4, 5.6 배 높은 농도를 보였다. 적색파장에 비해서도 황색파장이 각각 1.6, 1.4, 1.3, 1.9배 높은 농도로 나타났다.

[0118] 그러나, chlorophyllide *a*, alloxanthin, diatoxanthin에서는 모든 파장에서 유사한 농도를 보였으며, Chlorophyll *c2*는 본 실험에서 검출되지 않았다. 파장별 총 색소 농도 또한 황색파장에서 가장 높았는데, 주색소는 8.38 pg/cell, 총 보조색소는 0.93 pg/cell의 농도를 보였고, 형광램프, 적색파장, 청색파장에서는 각각

2.7~4.4 pg/cell, 0.26 ~ 0.69 pg/cell 였다.

[0119] 도 6의 b는 *T. tetrathele*의 파장별 색소의 변화를 나타낸 그래프이다. 대부분의 항목은 황색파장에서 높은 것을 확인하였다. 주색소인 chl *a*와 chl *b*의 경우, 기존의 대량배양에 사용되는 광원인 형광램프와 비교하였을 때, 황색파장에서 각각 약 2.9, 2.8배로 높았다. 빠른 생장을 보였던 적색파장과 비교하였을 때에도 각각 약 2.6, 2.8배 높게 나타났다. 보조색소의 파장별 농도 결과, neoxanthin, violaxanthin + 19-hexanoyloxyfucoxanthin, lutein + zeaxanthin, β-carotene은 황색파장에서 가장 높은 농도를 보였다.

[0120] 이는 형광램프와 비교하여 황색파장이 각각 3.2, 3.2, 2.0, 7.8배 높은 농도였다. 적색파장과 비교하였을 때도 황색파장이 각각 3.4, 2.4, 2.2, 2.5배 높은 농도를 보였다. 하지만 chlorophyllide *a*, alloxanthin, diatoxanthin는 모든 파장에서 유사한 농도를 보였다.

[0121] 또한, chlorophyll *c2*는 모든 파장에서 나타나지 않아 *T. tetrathele*는 chlorophyll *c2*를 포함하지 않는 것으로 판단된다. 파장별 총 색소 농도 또한 황색파장에서 가장 높았는데, 주색소는 3.5 pg/cell, 총 보조색소가 0.38 pg/cell의 농도를 보였고, 형광램프, 적색파장, 청색파장에서는 각각 1.2 ~ 1.5 pg/cell, 0.11 ~ 0.24 pg/cell 였다. 두 종을 비교하였을 때, 주색소 농도와 보조색소의 농도 모두 *T. suecica*에서 각각 2.5, 2.9배 높았다.

[0122] 미세조류마다 함유하고 있는 색소의 구성과 함량은 종 특이적이고 본 발명의 *Tetraselmis* 속의 색소함량은 대체적으로 황색파장에서 광 스트레스를 받아 축적효과를 보이는 것을 확인하였다.

[0123] 스트레스 환경 조건에서 세포분열을 행하는 동안에는 최대한 빛 흡수의 양을 많이 하려는 방어기작이 작용하여 세포 당 색소의 축적률은 오히려 향상되고 생장이 빠른 적색 파장보다 생장이 느린 녹색 파장에서 높은 chl *a* 농도를 보이는 이유는 주색소의 파장 흡수 영역이 아니기 때문에, 생장과 색소함량에 대한 빛 조건의 불일치는 빛에 의해 높은 스트레스를 받을 경우에는 세포수의 감소와 함께 생장률 저하로 이어지는 것으로 알려져 있다.

[0124] 상기 결과에서 β-carotene은 황색파장에서 최대 7.8배까지 증가하였다. 일반적으로 녹조류는 적색 또는 청색 파장에서 높은 생장을, 녹색 파장에서 낮은 생장에 따른 영양물질 축적을 보고하는 경우가 많았다. 그러나, 황색 파장은 흡수스펙트럼에 있어 carotenoid 계열을 흡수하지 못하기 때문에 광 스트레스를 더 높여줄 수 있어 *Tetraselmis* 속의 색소 축적을 위한 광원으로 황색 LED가 적절한 것으로 판단된다.

[0125] *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장에 따른 색소의 변화는 생장이 가장 느렸던 황색파장에서 높은 색소 축적을 보였다. 그 이유는 상기 기재한 바와 같이, 황색파장이 주색소의 흡수파장영역이 아니라서 *Tetraselmis* 속의 생장에 스트레스를 주었기 때문이다. 황색파장은 carotenoid 계열의 흡수스펙트럼 파장이 아니기 때문에 기존에 사용되던 적색, 청색 또는 녹색 파장보다 높은 광 스트레스를 줄 수 있는 것으로 사료된다. 또한 적색파장에서 낮은 색소 농도를 보인 이유는 빠른 분열속도 때문에 색소를 축적할 여유가 없는 것으로 사료된다.

[0126] 따라서 *Tetraselmis* 속의 대량배양 시 광합성 색소의 함량은 기존의 대량배양 광원인 형광램프와 빠른 생장을 보였던 적색파장보다 황색파장에서 높은 축적을 보일 것이라 판단된다.

[0127] 탄수화물은 단당류로 결합된 중합체로써, 동물과 식물에 있어 중요한 에너지원으로 이용된다. 또한 미세조류는 빛 에너지에 의해 광합성을 하여 chlorophyll을 탄수화물로 변환시키기 때문에, 미세조류 내 탄수화물 함량에서 빛 조건은 중요한 요소이다. 미세조류는 종마다 배양 스트레스에 따른 탄수화물 축적 양상이 차이가 있어 본 발명의 실시예에서는 파장별 *Tetraselmis* 속의 탄수화물 변화에 대해 실험을 수행하였다.

표 5

[0128] *T. suecica(a)과 T. tetrathele(b)의* 파장별 탄수화물 함량의 변화

Species	Wavelength	Carbohydrate content (pg/cell)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*4.63 ±0.8*
	Blue LED	*3.80 ±3.0*
	Yellow LED	*6.15 ±2.8*
	Red LED	*1.70 ±2.0*

T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*1.84 ±0.2*
	Blue LED	*2.43 ±0.1*
	Yellow LED	*2.35 ±0.0*
	Red LED	*1.73 ±0.5*

[0129] 도 7과 상기 표 5는 *T. suecica(a)*과 *T. tetrathele(b)*의 파장별 탄수화물 함량의 변화를 나타낸 것이고 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 탄수화물 함량을 나타내었다.

[0130] 도 7의 (a)를 살펴보면 *T. suecica*는 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 형광램프, 청색파장, 적색파장 순으로 나타났다. 이를 통해 생장이 빨랐던 적색파장에서 가장 낮은 탄수화물을 보인다는 것을 확인하였다.

[0131] 황색파장은 기존의 대량배양 광원인 형광램프보다 약 1.3배, 빠른 생장을 유도했던 적색파장 보다는 약 3.6배 높은 탄수화물 함량을 보였다. 또한 *T. suecica*의 세포 내 탄수화물 비를 알기 위해 단백질과 지질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 *T. suecica*의 세포 내에서 탄수화물의 함량은 4~9%으로 단백질, 지질에 비해 가장 낮은 비율을 차지하였고, 파장별로 큰 차이가 없었다.

[0132] 도 7의 (b)를 살펴보면 *T. tetrathele*의 파장별 탄수화물 함량은 청색파장과 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 형광램프, 적색파장 순으로 나타났다. 이를 통해 *Tetraselmis* 두 종 모두 생장이 빨랐던 적색파장에서 가장 낮은 탄수화물을 보인다는 것을 확인하였다. 기존의 대량배양에 이용되고 있는 광원인 형광램프와 황색파장의 탄수화물 함량을 비교하면, 황색파장이 1.3배 높은 함량을 보였다.

[0133] 생장이 가장 빨랐던 적색파장과 비교하였을 때, 황색파장이 1.4배 높은 함량을 보였다. 또한 세포 내에서 탄수화물 비를 알기 위해 단백질과 지질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 세포 내에서 탄수화물의 함량은 약 3 ~ 6%으로 낮은 비율을 차지하였고, 파장별로 큰 차이가 없었다. 두 실험종을 비교하였을 때, 기존 대량배양광원인 형광램프와 높은 축적을 보인 황색파장 모두 *T. suecica*에서 높은 함량을 보였다.

[0134] 본 실험 실시예에 따른 결과, *T. suecica*와 *T. tetrathele*에서 생장이 느렸던 황색파장에서 높은 탄수화물 함량을 보였고, 생장이 빨랐던 적색파장에서 가장 낮은 농도를 보였다.

[0135] 이는 세포 분열 속도의 감소가 단백질 합성과 함께 세포의 화학적 조성과 효소 활동에 변화를 주어 지질과 탄수화물 함량을 증가시켜 황색파장에서 생장속도가 느려 분열속도 또한 느렸기 때문에 황색파장에서 탄수화물 함량이 높은 것으로 판단된다.

[0136] 생장이 빨랐던 적색파장에서는 탄수화물을 축적시킬 시간이 짧아 *Tetraselmis* 속은 생장촉진을 위해 적색파장이 유용하지만, 탄수화물의 합성은 황색파장에서 효율적으로 유도되었다고 판단된다.

[0137] 본 실험 실시예에 따른 *Tetraselmis* 속은 전체 생화학적 비율로 보았을 때 탄수화물의 비율이 3~9%를 차지했다. 탄수화물 추출을 위해 활용되는 미세조류는 생화학적 조성에서 탄수화물의 비율이 가장 높았다. *Tetraselmis* 속의 탄수화물 비율은 상대적으로 낮기 때문에 이에 대한 상업적 활용은 어렵다고 판단된다.

[0138] 그러나, 먹이생물로서 이용될 때, 기존 대량배양 광원인 형광램프보다 높은 탄수화물 축적을 보였다. 이는 미세조류 내의 탄수화물을 에너지원으로 이용하는 섭이자에게 도움이 될 것으로 판단된다.

[0139] 미세조류는 일반적으로 세포 내에 단백질 함량이 가장 높은 비율로 포함되어 있고. 단백질의 대부분 아미노산 형태로 존재한다. 미세조류가 먹이생물로 이용되려면, 주로 지방, 탄수화물, 단백질과 같은 생화학적 조성이 중요하며, 먹이의 영양은 부유유생의 성장과 생존율에 매우 큰 영향을 미친다.

[0140] 또한 단백질과 지방은 생물체내의 생합성을 위해 사용되기 때문에 미세조류 내 함량의 파악은 중요하다. 미세조류의 생화학적 조성은 빛 조건에 의해 달라질 수 있어, 이에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다.

표 6

[0141] *T. suecica*과 *T. tetrathele*의 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 파장별 단백질 변화

Species	Wavelength	Protein content (pg/cell)

T. suecica	*Fluorescent lamp*	*35.7 ±0.2*
	Blue LED	*24.4 ±0.0*
	Yellow LED	*42.8 ±0.0*
	Red LED	*28.6 ±0.8*
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*17.1 ±1.5*
	Blue LED	*18.2 ±0.2*
	Yellow LED	*38.5 ±3.8*
	Red LED	*15.4 ±1.3*

[0142] 도 8과 상기 표 6은 *T. suecica*과 *T. tetrathele*의 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 파장별 단백질 변화를 나타낸다.

[0143] 도 8의 (a)를 살펴보면 *T. suecica*는 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 형광램프, 적색파장, 청색파장 순으로 나타났다. 이를 통해 생장이 가장 느렸던 황색파장에서 가장 높은 단백질 함량을 보이는 것을 확인하였다.

[0144] 황색파장은 기존의 대량배양 광원인 형광램프보다 약 1.2배, 빠른 생장을 유도했던 적색파장 보다는 약 1.5배 높은 단백질 함량을 보였다. 또한 *T. suecica*의 세포 내에서 단백질 비를 알기 위해 탄수화물과 지질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 *T. suecica*의 세포 내 단백질의 함량은 48~69%으로 가장 높은 비율을 차지하였다. 두 실험종을 비교하였을 때, 기존 대량배양광원인 형광램프와 높은 축적을 보인 황색파장 모두 *T. suecica*에서 높은 함량을 보였다.

[0145] 표 8의 (b)를 살펴보면, *T. tetrathele*의 파장별 단백질 함량은 청색파장과 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 청색파장, 형광램프, 적색파장 순으로 나타났다.

[0146] 이를 통해 *Tetraselmis* 두 종 모두 생장이 느렸던 황색파장에서 가장 높은 단백질 함량을 보인다는 것을 확인하였다. 기존의 대량배양에 이용되고 있는 광원인 형광램프와 황색파장의 단백질 함량을 비교하면, 황색파장이 2.3배 높은 함량을 보였다.

[0147] 생장이 가장 빨랐던 적색파장과 비교하였을 때, 황색파장이 2.5배 높은 함량을 보였다. 또한 세포 내에서 단백질 비를 알기 위해 탄수화물과 지질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 세포 내에서 단백질의 함량은 약 42~56 %으로 높은 비율을 차지하였다.

[0148] *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장에 따른 단백질의 변화는 생장이 가장 느린 파장이었던 황색파장에서 높은 단백질 축적을 보였다. 그 이유는 상기 기재한 바와 동일하게 황색파장에서 세포분열의 감소가 *Tetraselmis* 속에 스트레스를 주어 높은 단백질 함량이 유도되었기 때문으로 사료된다.

[0149] 탄수화물 실험도 축적을 위해 기존 연구에서 여러 파장이 이용되었지만, 색소 결과에서도 언급했듯, 황색파장에서도 광 스트레스를 주어 충분히 높은 축적효과를 볼 수 있었다. 또한 세포 분열속도가 빠른 적색파장에서는 단백질 합성이 유도될 시간이 짧았을 것이라 생각되어진다. 따라서 *Tetraselmis* 속은 생장촉진을 위해 적색파장이 유용하지만, 단백질 함량은 황색파장에서 효율적으로 축적되었다고 판단된다.

[0150] 해산어류의 성장에 있어 먹이생물의 지방성분은 중요한 역할을 한다. 미세조류의 세포 내 지질은 항상 일정한 함량을 갖는 것이 아니라, 배양환경인 수온, 염분, 영양염 상태 및 빛 등에 의해 변할 수 있기 때문에, 이에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다.

표 7

[0151] *T. suecica*과 *T. tetrathele*의 파장별 지질 함량

Species	Wavelength	Lipid content (pg/cell)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*11.3 ±1.3*
	Blue LED	*20.3 ±1.3*
	Yellow LED	*39.4 ±0.4*
	Red LED	*13.0 ±2.6*

T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*15.6 ±0.4*
	Blue LED	*22.7 ±4.3*
	Yellow LED	*28.0 ±1.4*
	Red LED	*15.9 ±0.2*

[0152] 도 9와 표 7은 *T. suecica*과 *T. tetrathele*의 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장에 대한 파장별 지질 함량을 나타낸다.

[0153] 도 9의 (a)를 살펴보면 *T. suecica*는 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 청색파장, 적색파장, 형광램프 순으로 나타났다. 이를 통해 생장이 가장 느렸던 황색파장에서 가장 높은 지질 함량을 보이는 것을 확인하였다.

[0154] 기존의 대량배양에 이용되고 있는 광원인 형광램프와 황색파장의 지질 함량을 비교하면, 황색파장이 약 3.5배 높은 함량을 보였다. 생장이 가장 빨랐던 적색파장과 비교하였을 때, 황색파장이 약 3.0배 높았다. 또한 *T. suecica*의 세포 내 지질의 비를 알기 위해 탄수화물과 단백질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 *T. suecica*의 세포 내에서 지질의 함량은 22~45%으로 단백질 다음으로 높은 비율을 차지하였다.

[0155] 도 9의 (b)를 살펴보면 *T. tetrathele*의 파장별 단백질 함량은 황색 파장에서 가장 높은 농도를 보였고, 청색파장, 적색파장, 형광램프 순으로 나타났다. 이를 통해 *Tetraselmis* 두 종 모두 생장이 느렸던 황색파장에서 가장 높은 지질 함량을 보인다는 것을 확인하였다.

[0156] 기존의 대량배양에 이용되고 있는 광원인 형광램프와 황색파장의 지질 함량을 비교하면, 황색파장이 약 1.8배 높은 함량을 보였다. 생장이 가장 빨랐던 적색파장과 비교하였을 때, 황색파장에서 약 1.8배 높았다. 또한 세포 내 지질의 비를 알기 위해 탄수화물과 단백질의 함량을 참고하여 구하였다. 그 결과 세포 내에서 지질의 함량은 약 42~56 %으로 높은 비율을 차지하였다.

[0157] 본 실험의 결과, *T. suecica*와 *T. tetrathele*에서 생장이 가장 느렸던 황색파장에서 높은 지질 함량을 보이는 것을 확인하였다. 이와 유사한 결과는 *Chlorella* sp.에도 나타났는데, 높은 생장은 적색파장에서, 생장이 느린 청색파장에서 높은 지질함량을 보였다.

[0158] 세포 분열 속도의 감소는 단백질 합성과 함께 세포의 화학적 조성과 효소 활동에 변화를 주어 지질과 탄수화물 함량을 증가시키고, 미세조류에 대한 지질의 강화는 염분, 질소 결핍을 통해 유도 되는 것으로 알려져 있다.

[0159] 본 발명의 실험 실시예는 조건변화가 어려운 염분과 같은 환경요인을 대신해 조절이 수월한 광 파장으로도 stress를 주어 지질이 축적됨을 확인하였다. 또한, 미세조류에게 스트레스를 주는 환경조건을 복합적으로 가해주면 더 효율적인 지질축적이 가능할 수 있다.

[0160] 본 발명의 실시예에 따른 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장에 따른 지질의 변화는 생장이 가장 느렸던 황색파장에서 높은 지질 축적이 확인되었다. 그 이유는 상기 언급한 바와 같이 황색파장에서 세포분열의 감소가 단백질 합성과 함께 세포의 화학적 조성과 효소 활동에 변화를 주어 지질과 탄수화물 함량을 증가시키기 때문으로 사료된다.

[0161] 또한, 적색파장에서는 세포분열이 빨랐기 때문에 비교적 낮은 지질 축적이 유도되었다. 따라서 *Tetraselmis* 속의 대량배양 시 적색파장을 광원으로 이용하면 높은 생장속도를 기대할 수 있고, 지질 함량은 기존의 대량배양 광원인 형광램프와는 비슷하여, 지질축적 효과는 없을 것으로 판단된다.

[0162] *Tetraselmis*속의 대량배양 시 생장을 촉진시키는 광원과 생화학적 조성을 증진시키는 광원이 다름을 확인하였고, 생장촉진을 위한 배양단계와 생화학적 조성 증진을 위한 배양이 단계적으로 수행되는 것이 적절한 것으로 사료된다.

[0163] 본 발명의 실험 실시예에 따른 광량별 생장실험을 통해 생장속도는 적색파장에서 빠르지만, 광 친화성은 황색파장에서 높음을 확인하였다. 이는 생장유도를 위해서 황색파장이 유리할 수 있음을 의미한다. 즉, 대량배양 시 유도기에서 대수생장기 초반에는 황색파장, 이후부터 대수생장기 후반까지는 적색파장을 통한 생장촉진을, 정지기부터는 황색파장을 이용하여 영양물질 강화를 위한 배양을 하는 것이 적절한 것으로 사료된다.

[0165] 2-3 *Tetraselmis* 속의 영양염 흡수력 확인 결과

[0166] 미세조류의 생장에 있어 필수적으로 요구되는 영양염 중에서 인과 질소는 환경에 따라 제한될 수 있다. 통상적으로 미세조류의 영양염 이용은 빛 조건에 따라 변하는데, 흡수속도의 경우 광량의 증가에 따라 증가되지만, 일정 광량 이상에서는 유사한 흡수속도를 보이고 생장이 증진되는 조건에서 영양염의 흡수 또한 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0167] 그러나 생장속도의 증가에 따라 영양염 흡수속도가 감소하거나 종 특이적으로 생장속도와 흡수속도가 무관한 반응을 보이며, 각각의 영양염에 대해 최적의 생장을 보이는 영양염 농도의 범위가 있어 본 발명에 따른 실시예는 Michaelis-Menten 식을 이용하여 파장에 따른 영양염 흡수속도 실험을 실시하여 파장에 따른 *Tetraselmis* 속의 영양염 흡수력을 확인하였다.

[0168] 도 10은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장파장별 시간에 따른 배양액의 암모니아 질소의 농도 변화를 나타낸다. 그 결과, 파장별로 시간에 따라 암모니아 질소의 흡수속도는 배양시작(0분)부터 일정시간까지 정속흡수를 보인 후 흡수속도가 현저히 낮아지는 경향을 보였다(t-test, p<0.05).

[0169] *T. suecica*는 황색파장에서 30분으로 가장 길었으며, 형광등, 적색파장, 청색파장에서는 동일하게 20분으로 나타났다. *T. tetrathele*는 황색 파장을 제외한 모든 파장에서 동일하게 10분으로 나타났고, 황색파장에서는 20분이었다. 파장별 정속흡수 속도는 적색파장에서 2.75~3.49 pmol/cell/hr로 가장 높았고, 형광램프, 청색파장, 황색파장 순으로 높게 나타났다.

표 8

[0170] *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 정속흡수 시간

Species	Wavelength	Nutrient	Incubation time (min)	Uptake rate (pmol/cell/hr)	Surge uptake time (min)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*Ammonium*	*0 ~ 20*	*2.17 ~ 3.17*	*20*
			20 ~ 240	*0.0 ~ 0.40*	
	Blue LED		*0 ~ 20*	*1.74 ~ 2.23*	*20*
			20 ~ 240	*0.01 ~ 0.36*	
	Yellow LED		*0 ~ 30*	*1.74 ~ 2.40*	*30*
			30 ~ 240	*0.00 ~ 0.36*	
	Red LED		*0 ~ 20*	*2.75 ~ 3.49*	*20*
			20 ~ 240	*0.03 ~ 0.54*	
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*Ammonium*	*0 ~ 10*	*4.88*	*10*
			10 ~ 240	*0.00 ~ 1.03*	
	Blue LED		*0 ~ 10*	*3.72*	*10*
			10 ~ 240	*0.02 ~ 0.80*	
	Yellow LED		*0 ~ 10*	*1.34 ~ 3.05*	*20*
			10 ~ 240	*0.03 ~ 0.71*	
	Red LED		*0 ~ 10*	*4.50*	*10*
			10 ~ 240	*0.03 ~ 0.46*	

[0171] 상기 표 8은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 정속흡수를 보인 시간을 나타낸다. 상기 결과를 토대로 정속흡수를 보인 시간을 암모니아 흡수실험을 위한 배양시간으로 선택하였고, 후술할 파장별 암모니아 질소의 농도에 따른 흡수속도 실험을 수행하였다.

[0172] 본 실험을 통해 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 암모니아 질소에서 정속흡수 시간을 구하였다. 그 결과, *T. suecica*는 황색파장이 30분인 것을 제외하고 모두 20분으로 나타났고, *T. tetrathele*는 황색파장에서 20분, 나머지 파장에서는 10분이었다. 정속흡수 시간 내에서 흡수속도의 경우 *T. suecica*는 적색파장, *T. tetrathele*는 형광램프와 적색파장에서 높았다.

[0173] 본 발명의 실험 실시예에 따른 정속흡수 시간 내에서 흡수속도는 앞선 장의 파장에 따른 생장속도의 결과와 일치하였는데, 생장속도가 빠른 파장에서 암모니아 질소에 대한 흡수 또한 증가되는 것을 확인하였다.

[0174] 도 11은 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 형광램프, 청색파장, 황색파장, 적색파장 파장별 시간에 따른 배양액의 인산 인 농도 변화를 나타낸다. 그 결과, 파장별로 시간에 따라 인산 인의 흡수속도는 배양시작(0분)부터 일정 시간까지 정속흡수를 보인 후 흡수속도가 현저히 낮아지는 경향을 보였다(*t*-test, $p<0.05$).

[0175] *T. suecica*는 모든 파장에서 20분의 정속흡수시간을 보였다. *T. tetrathele*는 형광등과 적색파장에서 10분으로 가장 짧았으며, 청색파장, 황색파장에서는 동일하게 20분으로 나타났다. 본 발명에 따른 실험 실시예의 결과, *T. suecica*와 *T. tetrathele*는 생장이 빠른 파장에서 빨랐던 파장이 영양염 정속흡수 또한 짧은 것을 확인하였다.

표 9

[0176] 인산 인의 파장별 정속흡수

Species	Wavelength	Nutrient	Incubation time (min)	Uptake rate (pmol/cell/hr)	Surge uptake time (min)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*Phosphate*	*0 ~ 20*	*0.12 ~ 0.13*	*20*
			20 ~ 240	*0.01 ~ 0.08*	
	Blue LED		*0 ~ 20*	*0.12*	*20*
			20 ~ 240	*0.01 ~ 0.06*	
	Yellow LED		*0 ~ 30*	*0.12*	*20*
			30 ~ 240	*0.01 ~ 0.04*	
	Red LED		*0 ~ 20*	*0.12 ~ 0.14*	*20*
			20 ~ 240	*0.01 ~ 0.06*	
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*Phosphate*	*0 ~ 10*	*0.20*	*10*
			10 ~ 240	*0.01 ~ 0.08*	
	Blue LED		*0 ~ 20*	*0.14 ~ 0.18*	*20*
			20 ~ 240	*0.00 ~ 0.07*	
	Yellow LED		*0 ~ 20*	*0.15 ~ 0.17*	*20*
			20 ~ 240	*0.01 ~ 0.08*	
	Red LED		*0 ~ 10*	*0.23*	*10*
			10 ~ 240	*0.02 ~ 0.12*	

[0177] 상기 표 9는 인산 인의 파장별 정속흡수를 나타내었다. 이 결과를 토대로 정속흡수를 보인 시간을 인산 인 흡수 실험을 위한 배양시간으로 선택하였다.

[0178] 본 발명의 실험 실시예를 통해 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 인산 인에서 정속흡수 시간을 구하였다. 그 결과, *T. suecica*는 모두 20분으로 나타났고, *T. tetrathele*는 형광램프와 적색파장에서 10분, 청색파장과 황색파장에서 20분을 보였다. 정속흡수 시간 내의 흡수속도는 *T. suecica*는 적색파장, *T. tetrathele*는 형광램프와 적색파장에서 높았다.

[0179] 상기 실험 실시예를 살펴보면, 정속흡수 시간 내에서 흡수속도는 앞선 장의 파장에 따른 생장속도의 결과와 일치하였는데, 생장속도가 빠른 파장에서 인산 인에 대한 흡수 또한 증가되는 것을 확인하였다. 이는 대량배양 시 빠른 속도의 생장과 영양염 흡수를 의미하는 것으로 단기간 내의 대량배양에 효율을 높여줄 수 있다.

[0180] 영양염의 농도에 따라 미세조류의 영양염 흡수속도는 차이가 있다. 일반적으로 광량의 증가에 따라 생장이 촉진되듯 영양염 농도의 증가에 따라 흡수속도가 증가한다. 그러나, 높은 광량은 광저해현상을 일으키듯이 고농도의 영양염 상태에서 오히려 흡수제한을 보이거나 일정 농도 이상에서는 흡수속도가 유사할 수 있다.

[0181] 또한 미세조류에 대한 영양염 흡수속도를 파악하여야 미세조류 배양 시 요구되는 영양염 조건을 알 수 있다. 이는 배양을 위한 영양염 첨가를 최소화 할 수 있어 대량배양 비용을 절감할 수 있다.

[0182] 따라서 하기 실험 실시예에서는 영양염 흡수능력을 알기 위해 암모니아 질소와 인산 인을 이용하여 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 흡수속도를 파악하였다. 배양시간은 상기 실험실시예에서 정속흡수를 보였던 시간으로 설정하였다.

[0183] 도 12는 미세조류의 암모니아 질소 흡수과정을 나타낸다. 미세조류는 질소원 중 암모니아 질소를 소비한 후, 질산 질소를 소비한다는 'preference' 기작을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 'preference' 기작은 질산성 질소에 비해 암모니아 질소가 에너지 측면에서 이용이 유리하기 때문으로 미세조류는 암모늄 이온 형태의 질소원을 체내에서 이용할 수 있다. 질산 질소 이용을 위해서는 두 단계의 효소반응을 통한 환원과정을 겪으면서 많은 에너지가 요구되어 미세조류는 암모니아 질소를 질소원으로 더 선호한다.

[0184] 따라서 하기 실험 실시예는 질산성 질소 대신 암모니아 질소로 질소원 흡수능력을 파악하였다. 농도 구간의 경우 1, 5, 10, 20, 50, 70, 100 μM의 7단계로 조제된 L1배지에 질소와 인이 고갈된 세포액(약 1×10^4cells/mL)을 각각 접종하였다.

표 10

[0185] Michaelis-Menten식에서 도출된 T. suecica와 T. tetrathele의 파장별 p_{max}(최대흡수속도), Ks(반포화상수)

Species	Wavelength	Ks (μM)	p_{max} (pmol/cell/hr)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*11.5*	*5.65*
	Blue LED	*16.6*	*5.78*
	Yellow LED	*15.5*	*5.15*
	Red LED	*9.43*	*6.35*
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*26.1*	*9.88*
	Blue LED	*26.3*	*6.46*
	Yellow LED	*32.2*	*5.71*
	Red LED	*21.2*	*9.85*

[0186] 상기 표 10은 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 p_{max}(최대흡수속도), Ks(반포화상수)를 나타낸 것이다. p_{max}의 경우 적색파장에서 가장 높았으며, 청색파장, 형광램프, 황색파장 순으로 나타났다. 도 13은 질소원이 고갈된 *T. suecica*와 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 암모니아 질소의 농도변화를 나타낸다.

[0187] 도 13의 (a)는 질소원이 고갈된 *T. suecica*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 암모니아 질소의 농도변화이다. 그 결과 모든 파장에서 암모니아 질소 농도가 50 μM까지 증가함에 따라 흡수속도 역시 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사한 경향을 보였다.

[0188] 표 10의 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. suecica*의 파장별 p_{max}(최대흡수속도), Ks(반포화상수)를 살펴보면, Ks의 경우 영양염에 대한 친화성의 척도로, 낮은 값을 보일수록 저농도의 영양염 조건에서 생장에 유리한 특성을 보인다. Ks는 적색파장이 다른 파장의 평균보다 약 1.5배 낮았고, 나머지 파장에서는 11.5 ~ 15.5 μM(평균 14.5 ±2.68 μM)의 범위로 나타났다.

[0189] 도 13의 (b)는 질소원이 고갈된 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 암모니아 질소의 농도변화이다. 그 결과 모든 파장에서 암모니아 질소 농도가 70 μM까지 증가함에 따라 흡수속도 역시 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사한 경향을 보였다.

[0190] 표 10의 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. tetrathele*의 파장별 p_{max}(최대흡수속도), Ks(반포화상수)를 살펴보면, 최대흡수속도를 나타내는 p_{max}의 경우 형광램프와 적색파장에서 가장 높았으며, 청색파장, 황색파장 순으로 나타났다. 제한 영양염에 대한 친화성 지수인 Ks는 적색파장, 형광램프, 청색파장, 황색파장 순으로 낮게 나타났다.

[0191] 두 실험종을 비교하였을 때, p_{max}는 *T. suecica*에서 평균 5.73 ±0.49 pmol/cell/hr , *T. tetrathele*에서 평균 7.98 ±2.20 pmol/cell/hr으로 나타나, *T. tetrathele*가 약 1.4배 높았다. Ks의 경우, *T. suecica*에서 평균 13.3 ±3.36 μM, *T. tetrathele*에서 평균 26.5 ±4.50 μM으로 나타나, *T. tetrathele*가 약 2.0배 높았다.

[0192] 본 실험 실시예에 따른 결과, *T. suecica*와 *T. tetrathele*는 생장이 빨랐던 적색파장에서 암모니아 질소의 흡수

속도 또한 높았다. 따라서 *Tetraselmis* 속은 적색파장에서 대량배양을 하면 빠른 영양염 흡수와 함께 생장촉진이 효과가 있는 것으로 사료된다.

표 11

[0193] *Michaelis-Menten식에서 도출된 T. suecica과 T. tetrathele*의 파장별 p_{max}, Ks

Species	Wavelength	Ks (μM)	p_{max} (pmol/cell/hr)
T. suecica	*Fluorescent lamp*	*0.89*	*0.28*
	Blue LED	*0.94*	*0.22*
	Yellow LED	*1.27*	*0.18*
	Red LED	*0.98*	*0.29*
T. tetrathele	*Fluorescent lamp*	*1.00*	*0.30*
	Blue LED	*1.15*	*0.23*
	Yellow LED	*1.11*	*0.11*
	Red LED	*1.07*	*0.33*

[0194] 수중에서 인은 용존태 무기인, 용존태 유기인, 부유 입자성 유기인으로 구분된다. 미세조류는 질소원을 여러 가지 형태를 이용하지만, 인의 경우에는 인산 인의 형태로만 흡수한다. 수중에 인산 인의 농도가 충분하다면 미세조류는 이를 흡수하여(luxury consumption) 다인산 화합물로 세포 내에 저장하여 이용하게 된다.

[0195] 따라서 본 실험 실시예에서 인원에 대한 흡수속도 실험을 위해 인산 인을 선택하였다. 농도 구간의 경우 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10, 20 μM의 7단계로 조제된 L1배지에 질소와 인이 고갈된 세포액(약 1×10^4cells/mL)을 각각 접종하였다.

[0196] 상기 표 11은 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. suecica과 T. tetrathele*의 파장별 p_{max}, Ks를 나타낸 것이다. 도 14는 인원이 고갈된 *T. suecica와 T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 인산 인의 농도변화를 나타낸다.

[0197] 도 14의 (a)는 인원이 고갈된 *T. suecica*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 인산 인의 농도변화이다. 그 결과 모든 파장에서 인산 인 농도가 5 μM까지 증가함에 따라 흡수속도 역시 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사한 경향을 보였다.

[0198] 표 11의 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. suecica*의 파장별 p_{max}, Ks를 살펴보면, 최대흡수속도를 나타내는 p_{max}의 경우 적색파장에서 가장 높았으며, 형광램프, 청색파장, 황색파장 순으로 나타났다. Ks의 경우 황색파장에서 1.27 μM로 가장 높았고, 나머지 파장에서는 0.89 ~ 0.98 μM(평균 0.94 ±0.05 μM)로 나타났다.

[0199] 도 14의 (b)는 인원이 고갈된 *T. tetrathele*의 파장별 시간에 따른 배양액 중 인산 인의 농도변화이다. 그 결과 모든 파장에서 인산 인 농도가 5 μM까지 증가함에 따라 흡수속도 역시 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사한 경향을 보였다.

[0200] 표 11의 Michaelis-Menten식에서 도출된 *T. tetrathele*의 파장별 p_{max}, Ks를 살펴보면, 최대흡수속도를 나타내는 p_{max}의 경우 적색파장에서 가장 높았으며, 형광램프, 청색파장, 황색파장 순으로 나타났다.

[0201] 제한 영양염에 대한 친화성 지수인 Ks는 형광램프, 적색파장, 황색파장, 청색파장 순으로 낮게 나타났다. 두 실험 종을 비교하였을 때, p_{max}는 *T. suecica*에서 평균 0.24 ±0.05 pmol/cell/hr, *T. tetrathele*에서 평균 0.24 ±0.10 pmol/cell/hr으로 나타났고, Ks는 *T. suecica*에서 평균 1.02 ±0.17 μM, *T. tetrathele*에서 평균 1.08 ±0.06 μM으로 나타나, 두 종이 유사하였다.

[0202] 본 실험 실시예의 결과, *T. suecica*와 *T. tetrathele*는 생장이 빨랐던 적색파장에서 인산 인의 흡수속도 또한 높은 것을 확인하였다. *Tetraselmis* 속의 p_{max}는 타 종과 비교하였을 때, *Halampora veneta*와 *Achnanthes lanceolata*보다 높았다. 또한 저서미세조류인 *Navicula minima*와 *Nitzschia microcephala*보다 인산 인에 대해 높은 친화성을 가진다. 따라서 *Tetraselmis* 속은 대량배양 시 낮은 인산 인 조건에도 생장을 잘 할 수 있을 것

이라 사료된다.

[0203] 반포화상수 Ks는 미세조류 배양 시 필요한 영양염 농도를 제시해준다. 즉, *Tetraselmis* 속의 배양에는 형광램프를 기준으로 질소원 11.5 ~ 21.2 μM, 인원 0.89 ~ 1.00 μM이 요구된다. LED 파장에 따라 요구되는 영양염 농도가 다르기 때문에 이 역시 고려해주어야 한다.

[0204] 적색파장에서는 빠른 흡수속도와 요구되는 영양염 농도를 알 수 있는 Ks 값이 낮았지만, 황색파장에서 비교적 낮은 흡수속도와 높은 Ks 값을 보여 *Tetraselmis* 속의 대량배양 시 필요한 영양염을 파악이 가능한 것으로 사료된다.

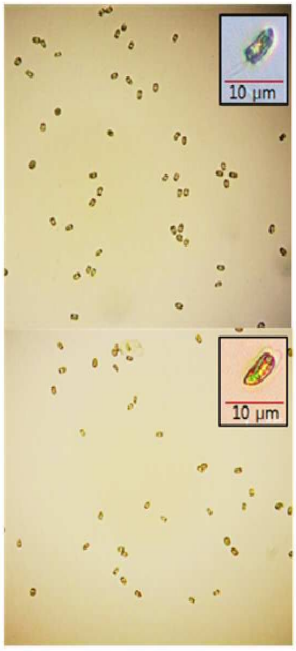
[0205] 도 15는 본 발명으로부터 제안되는 발광다이오드의 광량과 파장을 이용한 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis tetrathele*의 대량 배양방법을 나타낸다. 본원 발명의 결과로부터 담녹조강 *Tetraselmis suecica* 및 *Tetraselmis tetrathele*의 효율적 대량배양을 위해서는 초기 배양으로 생장촉진을 위한 배양과 후기 배양으로 영양강화를 위한 배양이 단계별로 이루어져야 한다. 기존 연구에서는 광량에 따른 생장을 고려하지 않은 2단계 배양이 많이 제시되어 왔으나, 본 연구에서는 3단계 배양이 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 즉, 배양초기인 유도기에는 낮은 보상광량과 반포화광량을 보였던, 황색파장으로 조사하고, 대수생장기에는 생장촉진을 위해 적색파장을 사용하며, 이후 영양물질 강화를 위해서 황색파장을 조사해주어야 한다.

산업상 이용가능성

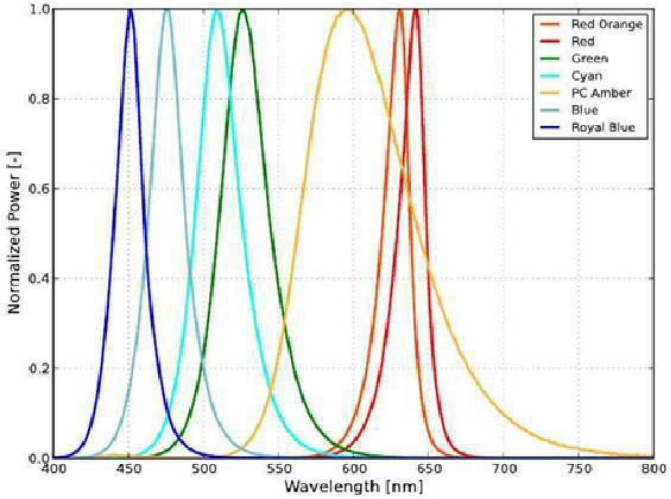
[0207] 최근 널리 여러 분야에서 활용중인 미세조류 중 대량배양이 용이한 *Tetraselmis* 속의 경제적이고 광 제어가 용이한 발광다이오드의 파장 및 광량 조절을 통해 단기간 고성장이 가능하여 산업발전에서 선행되는 대량배양이 가능함으로 미세조류와 관련한 산업상 이용가능성이 있다.

도면

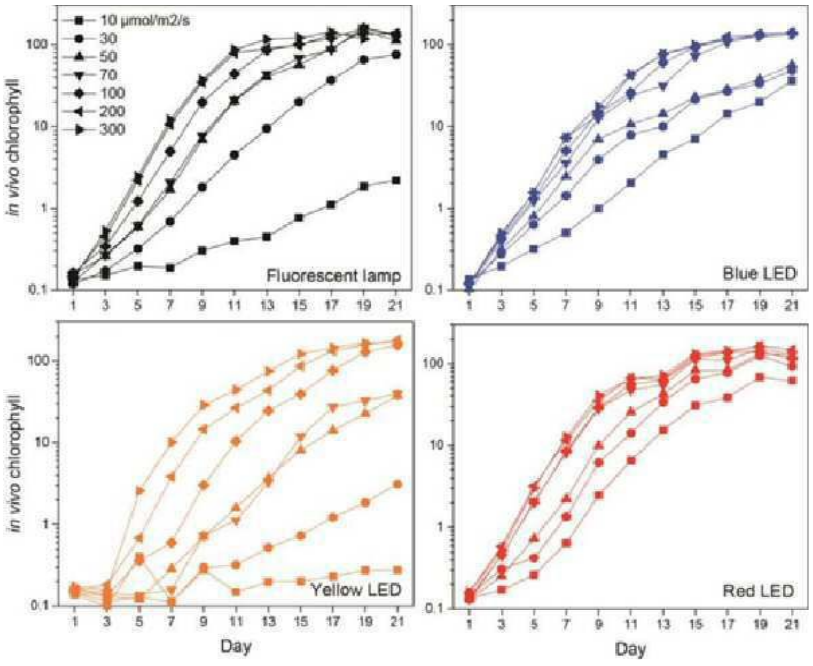
도면1



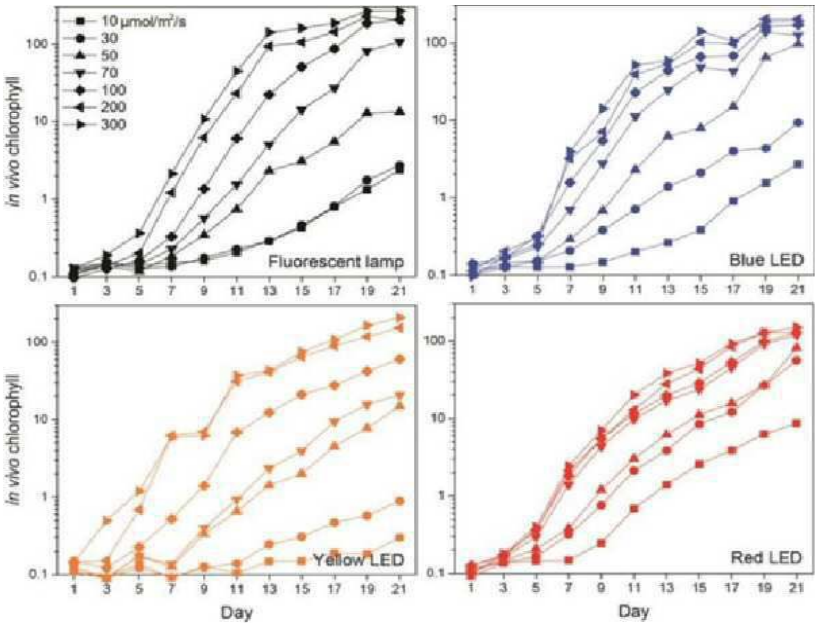
도면2


Red Orange
Red
Green
Cyan
PC Amber
Blue
Royal Blue
Normalized Power [-]
Wavelength [nm]

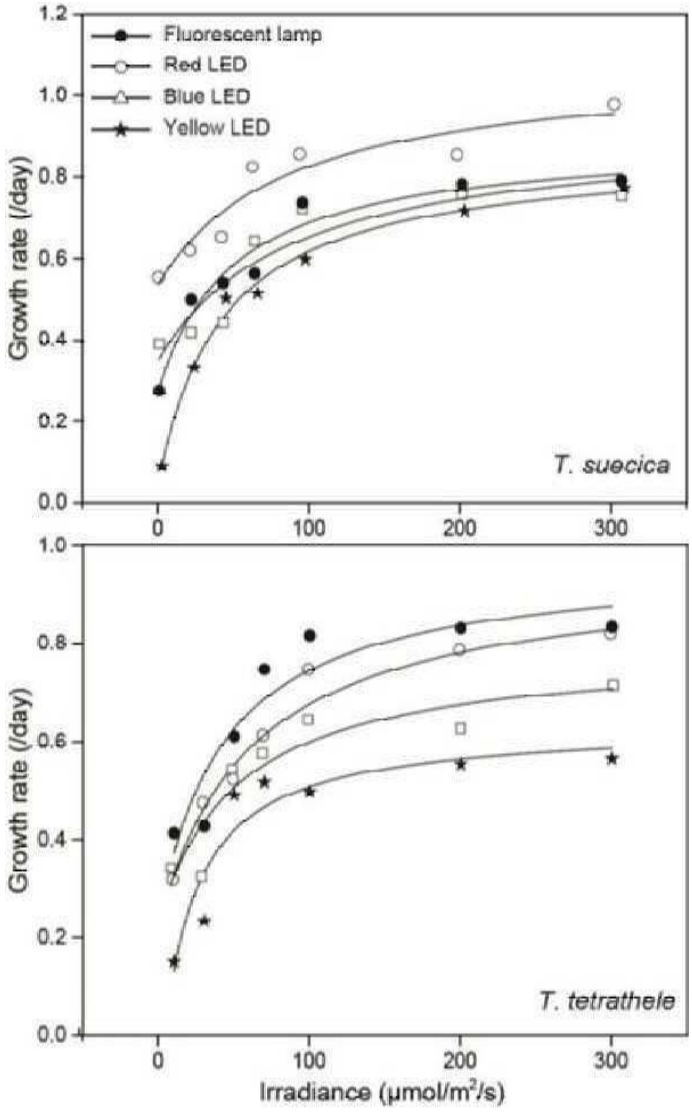
도면3


10 µmol/m2/s
30
50
70
100
200
300
in vivo chlorophyll
Fluorescent lamp
Blue LED
Yellow LED
Red LED
Day

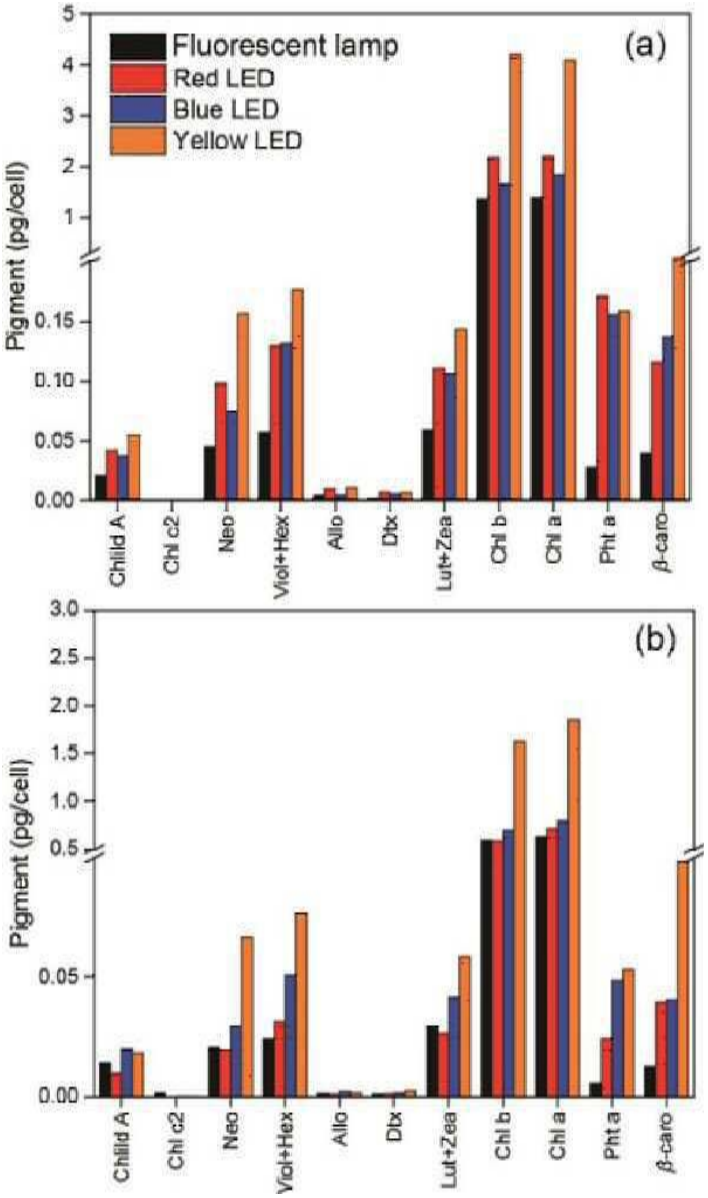
도면4


10 μmol/m²/s
30
50
70
100
200
300
In vivo chlorophyll
Fluorescent lamp
Blue LED
Yellow LED
Red LED
Day
Day

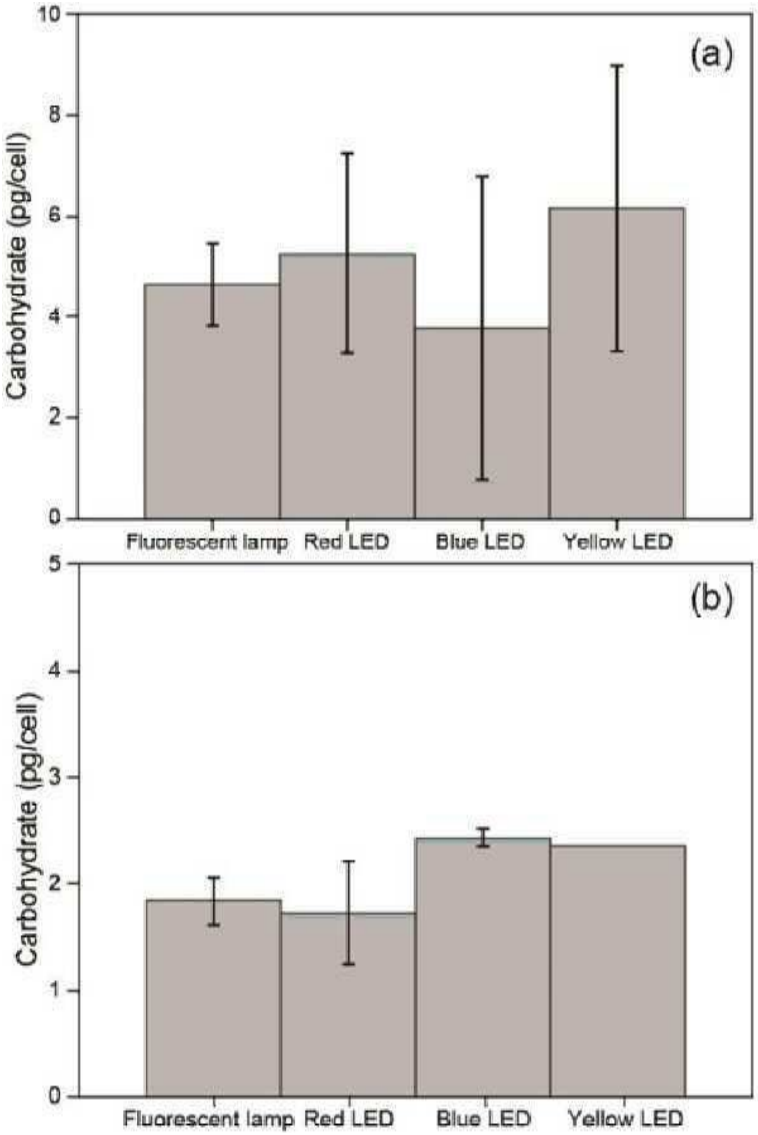
도면5


Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED
Growth rate (/day)
T. suecica
T. tetrathele
Irradiance (μmol/m²/s)

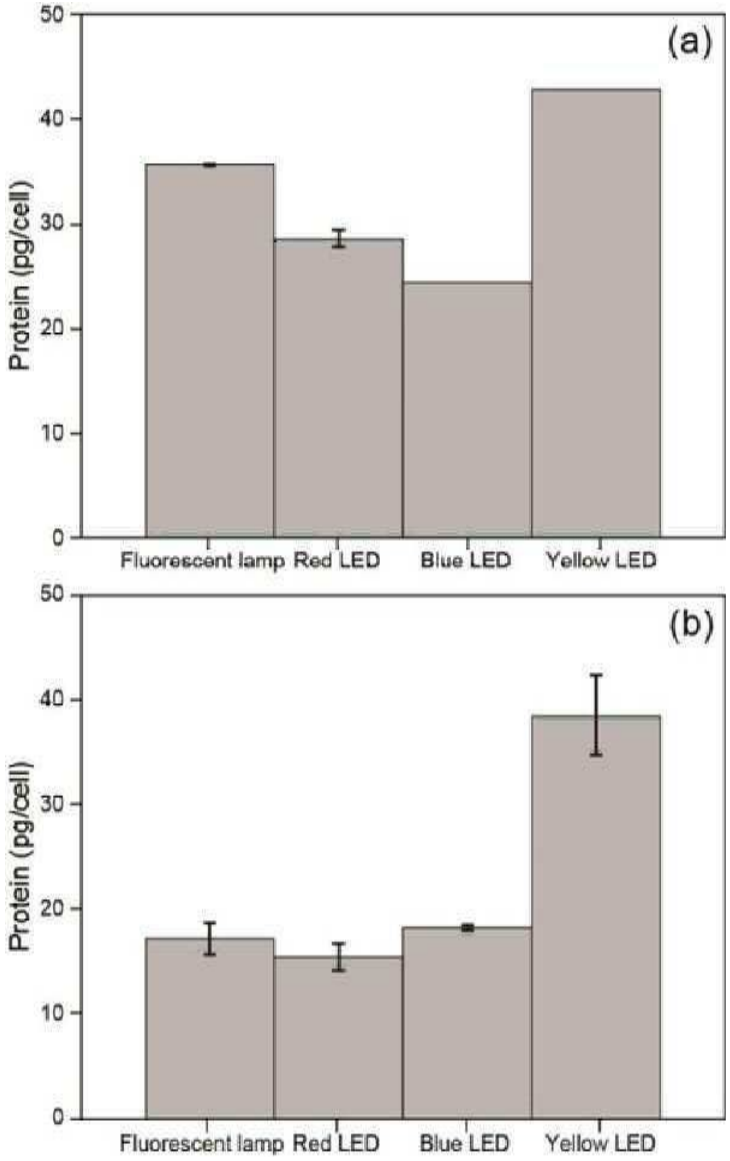
도면6


Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED
(a)
Pigment (pg/cell)
5
4
3
2
1
0.15
0.10
0.05
0.00
Chlid A
Chl c2
Neo
Viol+Hex
Allo
Dtx
Lut+Zea
Chl b
Chl a
Pht a
β-caro
(b)
Pigment (pg/cell)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.05
0.00
Chlid A
Chl c2
Neo
Viol+Hex
Allo
Dtx
Lut+Zea
Chl b
Chl a
Pht a
β-caro

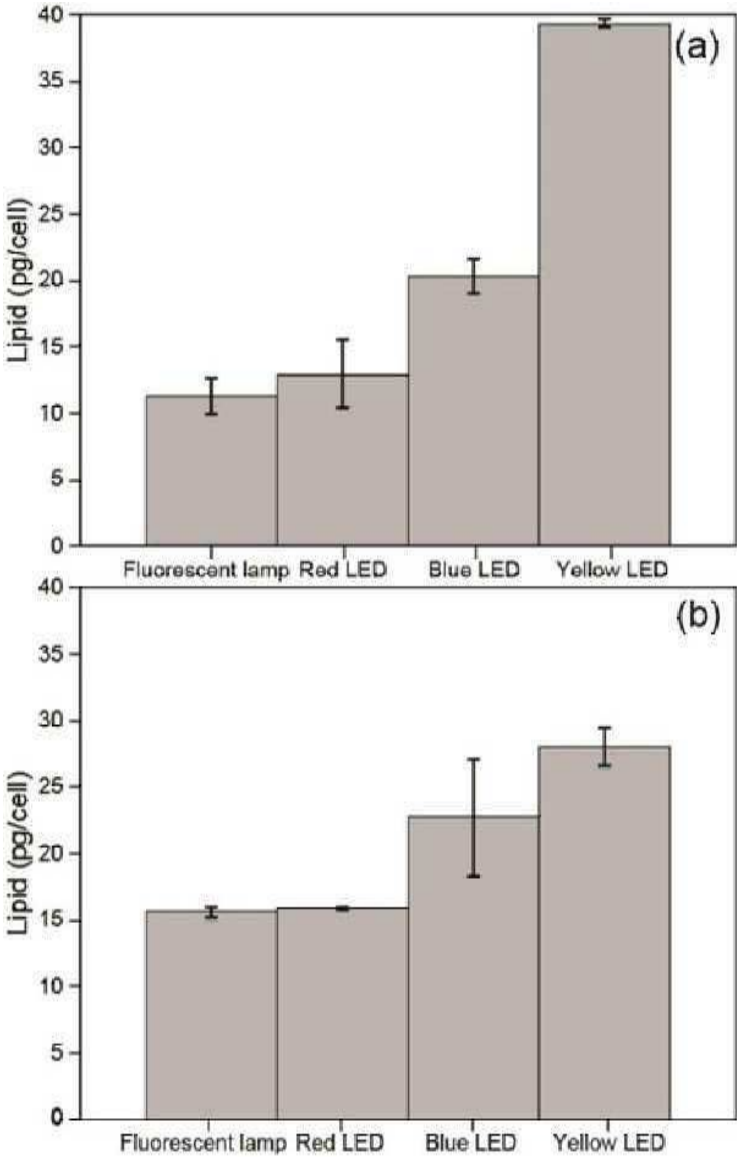
도면7


(a)
Carbohydrate (pg/cell)
10
8
6
4
2
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED
(b)
Carbohydrate (pg/cell)
5
4
3
2
1
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED

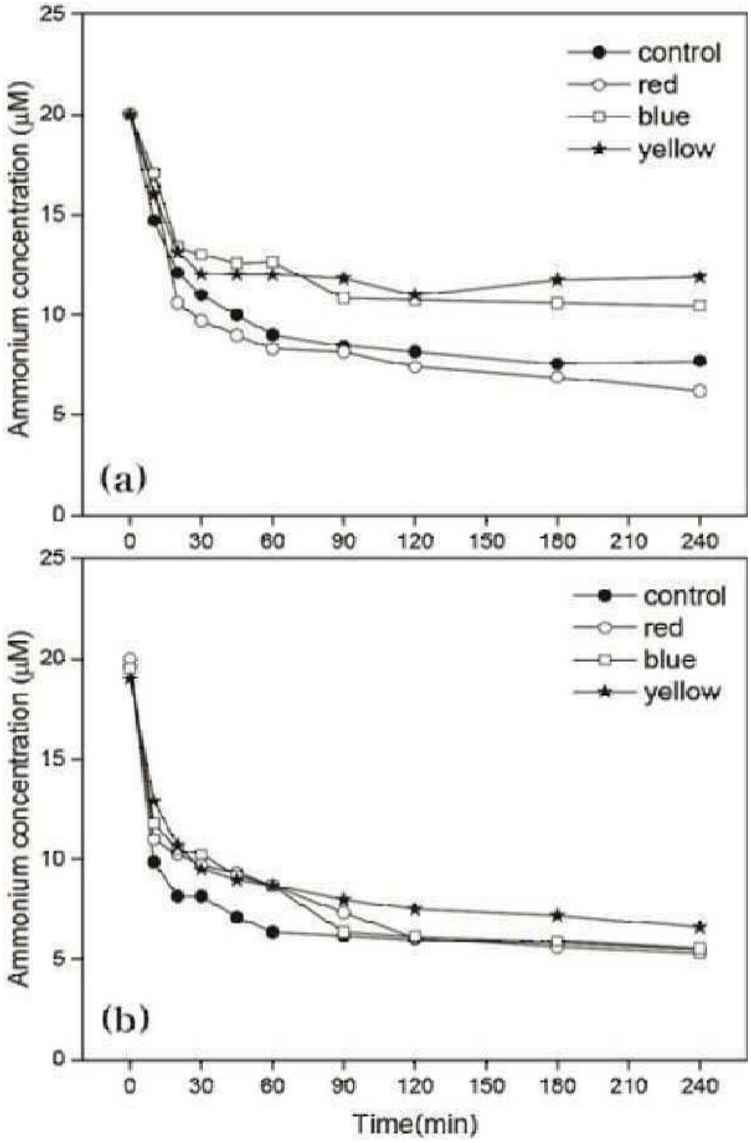
도면8


(a)
Protein (pg/cell)
50
40
30
20
10
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED
(b)
Protein (pg/cell)
50
40
30
20
10
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED

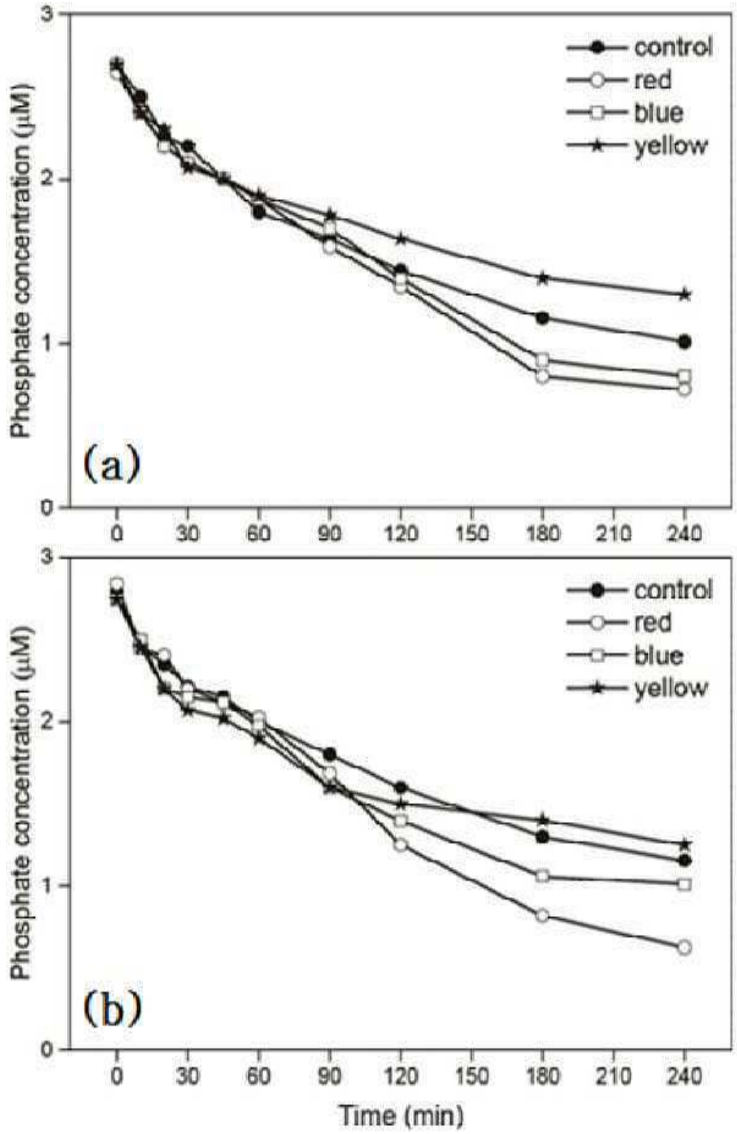
도면9


(a)
Lipid (pg/cell)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED
(b)
Lipid (pg/cell)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Fluorescent lamp
Red LED
Blue LED
Yellow LED

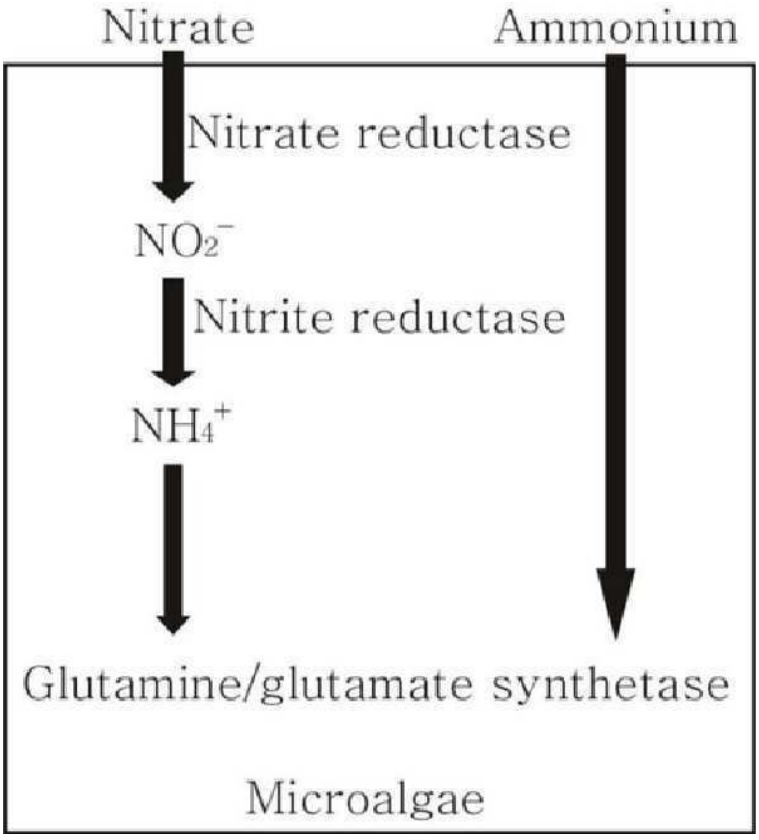
도면10


Ammonium concentration (μM)
control
red
blue
yellow
(a)
(b)
Time(min)
0
5
10
15
20
25
30
60
90
120
150
180
210
240

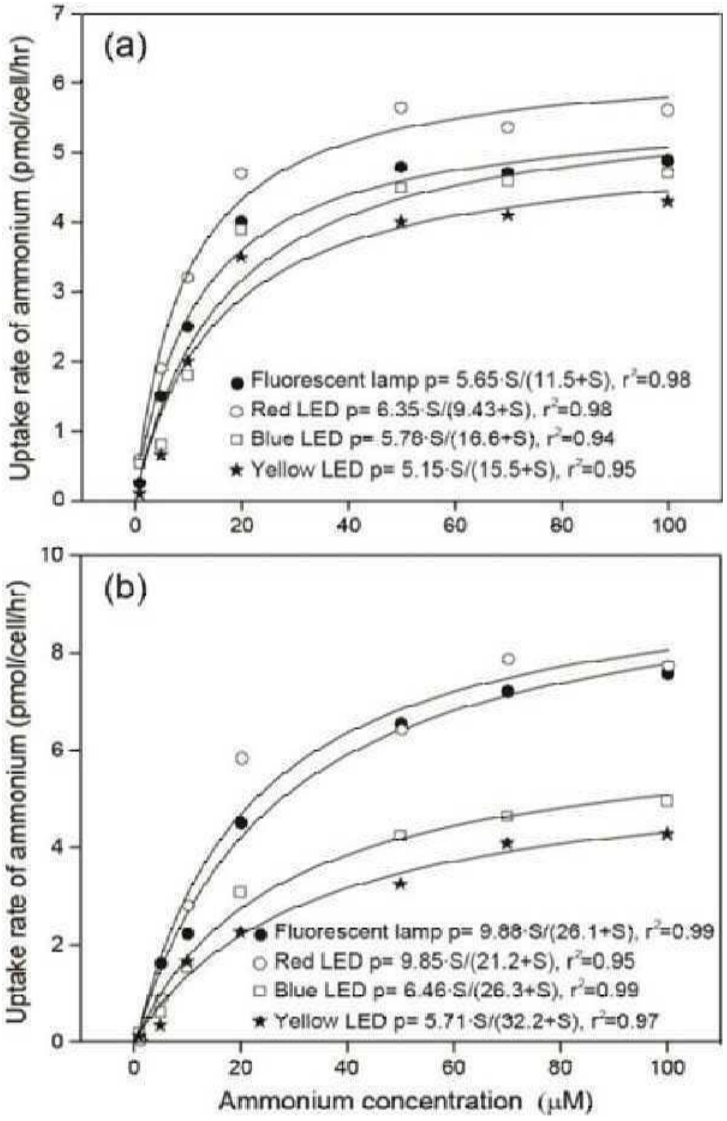
도면11


Phosphate concentration (μM)
control
red
blue
yellow
(a)
(b)
0
30
60
90
120
150
180
210
240
Time (min)

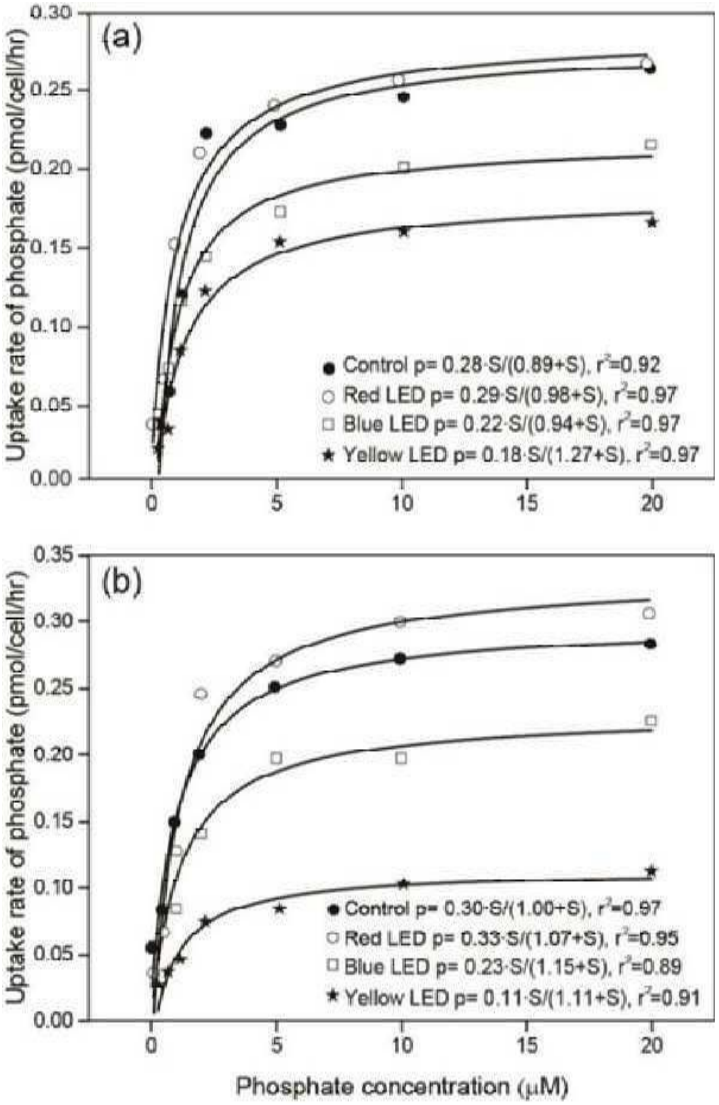
도면12


Nitrate
Ammonium
Nitrate reductase
NO_2^-
Nitrite reductase
NH_4^+
Glutamine/glutamate synthetase
Microalgae

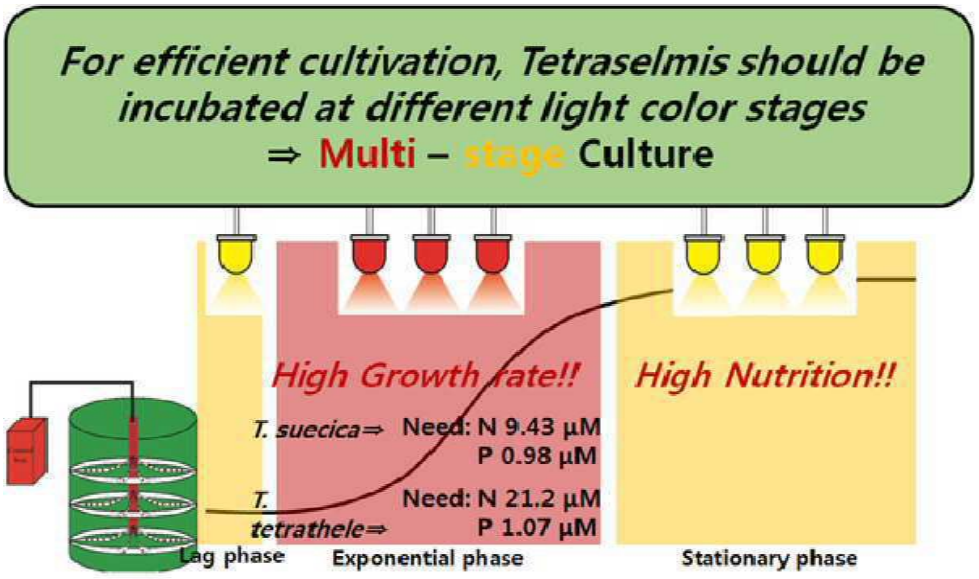
도면13


(a)
Uptake rate of ammonium (pmol/cell/hr)
Fluorescent lamp p= 5.65·S/(11.5+S), r²=0.98
Red LED p= 6.35·S/(9.43+S), r²=0.98
Blue LED p= 5.76·S/(16.6+S), r²=0.94
Yellow LED p= 5.15·S/(15.5+S), r²=0.95
(b)
Uptake rate of ammonium (pmol/cell/hr)
Fluorescent lamp p= 9.88·S/(26.1+S), r²=0.99
Red LED p= 9.85·S/(21.2+S), r²=0.95
Blue LED p= 6.46·S/(26.3+S), r²=0.99
Yellow LED p= 5.71·S/(32.2+S), r²=0.97
Ammonium concentration (μM)

도면14


(a)
Uptake rate of phosphate (pmol/cell/hr)
Control p= 0.28·S/(0.89+S), r²=0.92
Red LED p= 0.29·S/(0.98+S), r²=0.97
Blue LED p= 0.22·S/(0.94+S), r²=0.97
Yellow LED p= 0.18·S/(1.27+S), r²=0.97
(b)
Uptake rate of phosphate (pmol/cell/hr)
Control p= 0.30·S/(1.00+S), r²=0.97
Red LED p= 0.33·S/(1.07+S), r²=0.95
Blue LED p= 0.23·S/(1.15+S), r²=0.89
Yellow LED p= 0.11·S/(1.11+S), r²=0.91
Phosphate concentration (μM)

도면15


For efficient cultivation, Tetraselmis should be incubated at different light color stages
⇒ Multi – stage Culture
High Growth rate!!
High Nutrition!!
T. suecica⇒ Need: N 9.43 μM
P 0.98 μM
T. tetrathele⇒ Need: N 21.2 μM
P 1.07 μM
Lag phase
Exponential phase
Stationary phase