



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0127535

(43) 공개일자 2015년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 13/00 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 13/00 (2013.01)

C12N 1/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0060808

(22) 출원일자 2015년04월29일

심사청구일자 2015년04월29일

(30) 우선권주장

1020140054118 2014년05월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

김성구

부산광역시 남구 용호로 38-17, 207동 1702호 (용호동, 일신님2차아파트)

강창한

부산광역시 중구 보수북길 56 (보수동1가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 동원

전체 청구항 수 : 총 15 항

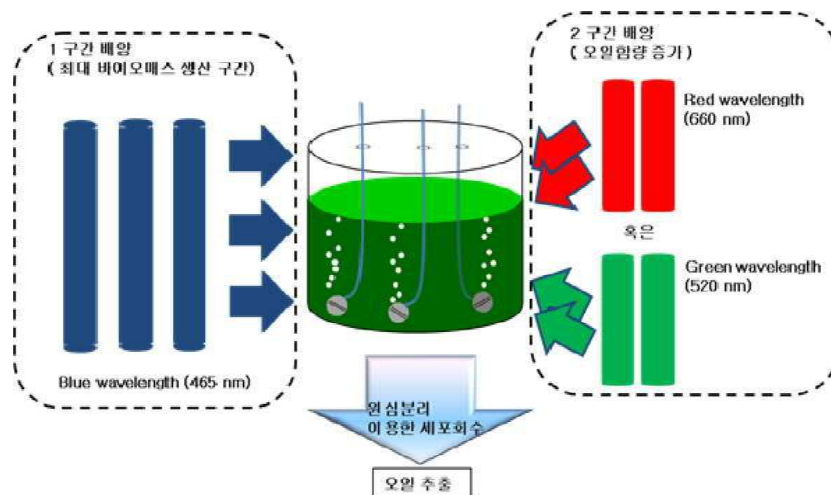
(54) 발명의 명칭 미세조류의 고농도 오일 축적 방법

(57) 요약

기존 영양분 저해 및 Two-stage의 공정은 복잡하므로, 이에 비해 간단하고

효과가 큰 빛 파장을 이용한 오일 축적기술이 필요하다. 본 발명은 미세조류를 Two-phase로 배양하는 방법에 관한 발명으로서, LED 파장(Blue/Red) 변환에 따른 성장(first phase; 예로서 Blue파장) 또는 성장 저해(second phase; 예로서 Red파장)를 이용하여 오일 축적량을 증가시키는 방법이다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12P 7/64 (2013.01)

(72) 발명자

라채훈

부산광역시 사하구 다대낙조2길 100, 212동 1503
호(다대동, 롯데캐슬물운대아파트)

유영문

서울특별시 관악구 청룡길 77, 201-204호(봉천동,
풍림아이원아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

미세조류의 바이오메스를 증가시킨 후 오일축적량을 증가시키는 순차적인 고농도 오일축적방법에 있어서,
바이오메스를 증가시키는 1구간;과
오일축적물을 증가시키는 2구간;의 배지가 동일하며,

상기 미세조류가 Chlorophyll a 와 β -carotene 및 phycocyanin 물질을 함유하며,

상기 물질별로 흡수도가 높은 파장 중에서, 상기 1구간에서 조사하는 광의 파장과 2구간에서 조사하는 광의 파장을 다르게 적용하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 물질별로 흡수도가 높은 파장이 각각 465nm, 520nm, 660nm인 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배지의 질소원으로서 질산염(nitrate) 농도가 16, 24, 36 mg/L 중 어느 하나인 미세조류의 고농도 배양방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 4

미세조류 *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. salina*, *D. salina*, 및 *D. tertiolecta* 중 하나 이상의 바이오메스를 증가시킨 후 오일축적량을 증가시키는 순차적인 고농도 오일축적방법에 있어서,

바이오메스를 증가시키는 1구간;과

오일축적물을 증가시키는 2구간;의 배지가 동일하며,

상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 465 nm이며 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 520 nm 또는 660 nm 파장 중 어느 하나 인 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 1구간에서의 파장의 광 강도가 $100 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 인 미세조류의 고농도 배양방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 6

미세조류 *N. atomus* 중 어느 하나의 (또는 하나 이상의) 바이오메스를 증가시킨 후 오일축적량을 증가시키는 순차적인 고농도 오일축적방법에 있어서,

바이오메스를 증가시키는 1구간;과

오일축적물을 증가시키는 2구간;의 배지가 동일하며,

상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 660 nm이며 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 465 nm 또는 520 nm 파장 중 어느 하나 인 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 1구간에서의 파장의 광 강도가 $100 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 인 미세조류의 고농도 배양방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 8

투명한 배양기;

상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명;

상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과

상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고,

상기 배양기는 Chlorophyll a, β -carotene 및 phycocyanin 물질을 함유하는 미세조류 중 하나 이상에 대하여 바이오메스를 증가시키는 1 구간; 과

오일축적률을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며,

상기 LED조명은 상기 물질이 흡수하는 레드, 그린, 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 물질이 흡수하는 파장이 각각 465nm, 520nm, 660nm인 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 배양기에 삽입되는 조명이 투명한 관을 통하여 설치되는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적 시스템.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 배양기를 둘러싼 LED조명;과

상기 배양기에 삽입되는 LED조명;이

점 또는 선 또는 면 중 하나 이상의 형태로 배열된 파장별 칩을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

청구항 12

투명한 배양기;

상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명;

상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과

상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고,

상기 배양기는 미세조류 *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. salina*, *D. salina*, 및 *D. tertiolecta* 중 하나 이상에 대하여

바이오메스를 증가시키는 1 구간; 과

오일축적률을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며,

상기 LED조명은 레드, 그린, 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 파장이 465nm, 520nm, 660nm 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

청구항 14

투명한 배양기;

상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명;

상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과

상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고,

상기 배양기는 미세조류 *N. atomus* 에 대하여

바이오메스를 증가시키는 1 구간; 과

오일축적률을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며,

상기 LED조명은 레드, 그린, 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 파장이 465nm, 520nm, 660nm 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 미세조류의 고농도 오일축적시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 바이오 디젤에 대하여 많은 연구가 진행되었고, 우리나라에서도 폐식용유, 찌꺼기, 대두유 등을 원료로 바이오디젤을 생산하고 있으며, 2004년부터 2년간의 시범사업을 통해 2006년 7월부터 바이오디젤 상용화가 시작되었다.

배경 기술

[0002] 현재 미세조류를 이용한 오일 축적기술은 성장 배지의 기질 저해(nitrate, phosphate, silica, salinity)를 통해 스트레스를 주어 오일함량을 증가시키는 방법이 대부분이다. 미세조류의 성장과 오일축적과정을 각각의 배지에서 수행한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 1. 특허번호: KR2012-0110295 (2012.10.10.) 조류 배양용 배지조성물 및 조류 배양 방법
(특허문헌 0002) 2. 특허번호: US8163515 (2012.04.24) Eukaryotic Microorganisms for producing lipids and antioxidants
(특허문헌 0003) 3. 특허번호: EP1040182 (2005.04.06 Bulletin 2005/14) METHOD FOR PRODUCING BIOMASS BY

PHOTOSYNTHESIS

(특허문헌 0004) 4. 특허번호: CN103451101 (2013.12.18.) Production method of high-quality microalgae biodiesel

(특허문헌 0005) 5. 특허번호: CN102766578 (2012.11.07.) Cultivating and producing method for haematococcus pluvialis.

(특허문헌 0006) 6. 특허번호: JP2007-236277 (2007.09.20.) METHOD FOR CULTURING ISOCHRYISIS-ALGAE

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 기존의 영양분 저해 및 Two-stage의 공정은 미세조류의 성장과 오일축적과정을 각각의 배지를 사용하며 복잡하므로, 이에 비해 간단하고효과가 큰 오일 축적기술이요구되어 왔다.

[0005] 도 10과 같은 종래의 Two-stage culture 공정은 1단계 배양에서 최대의 바이오매스를 생산하고, 세포가 정지기에 도달하였을 때, 원심분리기를 이용하여 세포를 회수한다. 회수한 세포를 질소원 혹은 인 등의 영양원을 제거한 새 배지에 재 현탁하여 2단계 배양을 위해 재접종한다. 영양원을 제거한 2단계 배양은 오일 축적률을 증가시키는 단계이며, 3일간의 배양이 끝나고 원심분리를 이용해 세포를 회수한다. 회수한 세포는 오일 추출공정을 통해 분리된다.

[0006] 본 발명은 미세조류를 Two-phase로 배양하는 방법에 관한 발명으로서, LED 파장(Blue/Red/Green) 변환에 따른 성장촉진(first phase; 예로서 Blue파장, Red파장) 과 오일축적증가(second phase; 예로서 Red파장, Blue파장, Green파장)를 도모한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 미세조류의 고농도 오일축적방법으로서, 상기 미세조류가 Chlorophyll a 물질과 β -carotene 및 phyocyanin을 함유하며, 바이오매스를 증가시키는 1구간;과 오일축적률을 증가시키는 2구간;을 포함하며, 상기 1구간과 2구간에서 동일한 배지를 연속으로 사용하며 조사 광의 파장과 강도를 조절할 수 있다.

[0008] 또한 본 발명에 있어서, 상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장범위는 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장범위와 다르다.

[0009] 본 발명은 미세조류의 고농도 오일축적방법으로서, 바이오매스를 증가시키는 1구간;과 오일축적률을 증가시키는 2구간;을 포함하며, 상기 1구간과 2구간에서 동일한 배지를 연속으로 사용하며, 상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장범위는 465nm (blue) 또는 660nm (red) 중 어느 하나이며 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장범위는 465nm (blue), 520nm (green), 660nm (red) 중 어느 하나일 수 있다.

[0010] 이와 관련하여 1구간에서 465 nm (blue)의 파장을 빛에너지 원으로 이용하였을 때, Isochrysis galbana, Pheodactylum tricornutum, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis oceanica, Nannochloropsis salina, Dunaliella salina, Dunaliella tertiolecta는 0.97, 1.08, 1.01, 0.9, 0.84, 0.79, 0.75 g/L, Nannochloris atomus는 660 nm (red) 의 파장에서 0.87 g/L 의 최대 바이오매스를 생산하여 형광등에서 배양했을 때보다 2배 이상의 바이오매스를 생산했고(도 5). dry cell weight 기준 오일함량(%)도 상당히 증가하였다 (도 6).

[0011] 2구간배양에서 456, 520, 660 nm (blue, red, green)의 파장으로 변환하였을 때, 배양 1~3일째 되는 날 최대 오일 함량을 측정하였으며 이때의 오일 함량은 I. galbana는 2일째 red (660 nm)에서 56%,green (520 nm)에서 60%의 오일함량이 측정되었으며(도8a),

[0012] P. tricornutum는 2일째 red (660nm)에서 58%, green (520 nm)에서 62%로 측정되었으며(도8b), N. oculata는 2일째 red (660nm)에서 50%, green (520nm)에서 56%로 측정되었으며(도8c), N. oceanica는 2일째 red (660nm)에서 47%, green (520nm)에서 53%로 측정되었으며(도8d), N. atomus는 2일째 blue (465nm)에서 47%, green (520nm)에서 50%로 측정되었으며(도8e), N. salina는 3일째 red (660nm)에서 47%, green (520nm)에서 52%로 측정되었으며(도8f), D. salina는 1일째 red (660nm)에서 48%, green (520nm)에서 52%로 측정되었으며(도8g), D. tertiolecta는 1일째 red (660nm)에서 46% green(520)에서 54%로 측정 되었다.

- [0013] 1구간의 Blue 465 nm (N. atomus는 Red 660 nm) 파장에서의 오일함량보다 2구간의 Green 520 nm 에서의 최대오일 함량이 I. galbana는 30%, P. tricornutum는 26%, N. oculata는 28%, N. oceanica는 30%, N. atomus는 28%(660nm기준), N. salina는 27%, D. salina는 27%, D. tertiolecta는 28%의 오일함량 증가를 보였다(도 8a, 도 8b, 도 8c, 도 8d, 도 8e, 도 8f, 도 8g, 도 8h).
- [0014] 또한 본 발명에 있어서, Isochrysis galbana, Pheodactylum tricornutum, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis oceanica, Nannochloropsis salina, Dunaliella salina 와 Dunaliella tertiolecta 로 이루어지는 그룹 중 어느 하나 이상의 종을 배양하기 위하여, 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장을 465 nm (blue) 범위의 파장을 사용, 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장을 520, 660 nm (red, green) 범위의 파장을 사용하고, 광 강도를 40, 70, 100, 130 mol m⁻² s⁻¹로 할 수 있다.
- [0015] 1구간에서 465 nm (blue)의 파장을 빛에너지 원으로 이용하였을 때, 100 mol m⁻² s⁻¹의 광도에서 Isochrysis galbana, Pheodactylum tricornutum, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis oceanica, Nannochloropsis salina, Dunaliella salina, Dunaliella tertiolecta는 0.58, 0.65, 0.69, 0.61, 0.59, 0.55, 0.51 g/L의 바이오매스를 생산했고(도 3a, 도 3b, 도 3c, 도 3d, 도 3f, 도 3g, 도 3h),
- [0016] Nannochloris atomus를 배양하기 위하여, 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장을 660 nm (red)범위의 파장을 사용, 광 강도를 40, 70, 100, 130 mol m⁻² s⁻¹로 할수 있다. Nannochloris atomus는 100 mol m⁻² s⁻¹에서 0.52 g/L의 바이오매스를 생산하였다. (도 3e)
- [0017] 또한 본 발명에 있어서, 상기 1구간의 LED 광의 파장이 465 nm(blue), 혹은 660 nm (red) 중 어느 하나인 경우에 있어서 light/dark cycle 이 12h:12h 이고, 상기 2구간의 LED 광의 파장범위인 465, 520, 660 nm(blue, green, red)중 어느 하나에 있어서 light/dark cycle 이 12h:12h 이다.
- [0018] 또한 본 발명에 있어서, 배양조건은 201의 온도, pH 7.0 ~ pH 9.0의 pH 및 질소원으로서 질산염(nitrate) 농도를 16, 24, 36 mg/L 로 적용하였다.
- [0019] 도 4a, 도 4b, 도 4c, 도 4d, 도 4e, 도 4f, 도 4g, 도 4h를 참조하면, I. galbana 와 P. tricornutum은 기본 배양에 사용 하였던 8 mg/L의 질소원 농도 2배인 16 mg/L의 농도에서 최대 바이오매스 0.97, 1.08 g/L을 생산하였고, N.oculata, N. oceanica, N. atomus, N. salina, D. salina, D. tertiolecta 는 기본 질소원 농도의 3배인 24 mg/L의 농도에서 최대 바이오매스 1.01, 0.91, 0.87, 0.84, 0.79, 0.75 g/L을 생산하였다.
- [0020] 본 발명의 미세조류의 고농도 오일축적시스템은, 투명한 배양기; 상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명; 상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과 상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고, 상기 배양기는 Chlorophyll a , β-carotene 및 phycocyanin 물질을 함유하는 미세조류 중 하나 이상에 대하여 바이오매스를 증가시키는 1 구간; 과 오일축적률을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며, 상기 LED조명은 상기 물질이 흡수하는 레드, 그린 , 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 물질이 흡수하는 파장이 각각 465nm, 520nm, 660nm인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 배양기에 삽입되는 조명이 투명한 관을 통하여 설치되는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 배양기를 둘러싼 LED조명;과 상기 배양기에 삽입되는 LED조명;이 점 또는 선 또는 면 중 하나 이상의 형태로 배열된 파장별 칩을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 미세조류의 고농도 오일축적시스템에 있어서, 투명한 배양기; 상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명; 상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과 상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고, 상기 배양기는 미세조류 I. galbana, P. tricornutum, N. oculata, N. oceanica, N. salina, D. salina, 및 D. tertiolecta 중 하나 이상에 대하여 바이오매스를 증가시키는 1 구간; 과 오일축적률을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며, 상기 LED조명은 레드, 그린 , 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 파장이 465nm, 520nm, 660nm 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명의 미세조류의 고농도 오일축적시스템에 있어서, 투명한 배양기; 상기 배양기를 둘러싸며 내부를 비추는 LED조명; 상기 배양기에 삽입되는 LED조명; 과 상기 배양기의 내부와 외부에서 조사되는 LED 광의 파장과 강

도, 시간을 상기 1과 2 구간별로 조절하는 제어장치;를 포함하고, 상기 배양기는 미세조류 *N. atomus*에 대하여 바이오매스를 증가시키는 1 구간; 과 오일축적물을 증가시키는 2 구간; 의 배지를 동일하게 유지하며, 상기 LED 조명은 레드, 그린, 블루의 파장 중 하나 이상을 선택적으로 조사한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 파장이 465nm, 520nm, 660nm 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 기존의 영양분 저해 방법 및 각가의 배지를 사용하는 Two-stage 방법의 복잡한 공정에 비해 간단하며, 영양분 저해로 인한 오일축적 방법이 아닌 빛 파장을 이용한 오일축적기술로서 단일한 배지를 사용하는 방법이다.

[0029] 본 발명은 기존의 오일 축적 방법보다 간단하며, 동일한 배지를 사용하므로 공정소요시간이 단축되며, 기존의 기술에 의한 오일 축적량보다 높은 오일함량을 확보할 수 있어서 기술적인 효율성이 높고 경제성이 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a, 도 1b, 도 1c, 도 1d, 도 1e, 도 1f, 도 1g 및 도 1h는 각 파장에서의 미세조류의 성장곡선
 도 2는 Chlorophyll a, β -carotene, Phycocyanin 의 파장 흡수율
 도 3a, 도 3b, 도 3c, 도 3d, 도 3e, 도 3f, 도 3g 및 도 3h는 다양한 광도에서의 미세조류 성장곡선
 도 4a, 도 4b, 도 4c, 도 4d, 도 4e, 도 4f, 도 4g 및 도 4h는 다양한 질소원 농도에서의 미세조류 성장곡선
 도 5는 형광등 및 LED 최적 조건에서의 바이오매스 생산 비교(1, 2 구간 단일파장적용)
 도 6은 형광등 및 LED 최적 조건에서의 오일함량 비교(1, 2 구간 단일파장적용)
 도 7은 파장 변화의 Two-Phase 공정을 통한 오일 함량 증가
 도 8a, 도 8b, 도 8c, 도 8d, 도 8e, 도 8f, 도 8g 및 도 8h는 파장 변환을 이용한 Two-phase 공정에서의 오일 함량 변화
 도 9a, 도 9b 및 도 9c는 본 발명에서의 미세조류의 배양장치로
 도 10은 Two-stage culture 공정
 도 11은 Two-phase culture 공정

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명에 있어서 미세조류는 호환하여 사용할 수 있다. 상기 조류는 원생생물계에 속하는 진핵생물군을 의미한다. 바람직하게 조류는 규조류, 갈색편모조류, 남조류, 유글레나류, 녹조류로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 가장 바람직하게는 *Isochrysis galbana*, *Pheodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis salina*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*와 *Nannochloris atomus* 일 수 있다. 8종의 미세조류가 이용하는 각각의 최적 파장을 찾기 위해 Red(660 nm), Orange (640 nm), Green (520 nm), Blue (465 nm), Violet(405 nm)의 파장에서 $70\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광도에서 배양을 하였다.

[0032] 도 1a, 도 1b, 도 1c, 도 1d, 도 1e, 도 1f, 도 1g 및 도 1h는 각각의 미세조류가 이용하는 최적 파장을 찾기 위해 각 파장별로 배양한 결과로서, *Isochrysis galbana*, *Pheodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis salina*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*는 Blue (465nm)에서 최대 바이오매스 0.44, 0.54, 0.42, 0.41, 0.42, 0.40, 0.40 g/L을 생산하였고, *Nannochloris atomus*(도 1e)는 Red (660 nm)에서 최대 바이오매스 0.40 g/L을 생산하였다.

[0033] 상기 8종의 미세조류는 광합성을 이용하기 위해 빛을 흡수하는 Chlorophyll a 물질이 존재하고, β -carotene 및 phycocyanin의 보조색소를 함유한다. Chlorophylla가 주로 흡수하는 파장은 주로 blue (400~500 nm)그리고 red (600~700 nm) 파장영역이고, 보조색소 β -carotene 은 blue-green (400~600 nm) 영역을 흡수하고, phycocyanin은 Red (600~700 nm) 영역을 흡수하여 광합성에 이용하게 된다. UVspectrophotometer를 이용하여 wave scanning을 하였고, 이 결과를 도 2에 표시하였다. 이러한 파장들에 대하여 실험한 결과를 나타낸 도 1a

내지 도1f를 참조하면, 미세조류 *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata* 와 *N. oceanica*, *N. salina*, *D. salina*, *D. tertiolecta*는 최적 파장이 Blue (465 nm)이고, *N. atomus*의 경우 Red (660 nm)(도 1e)이다.

[0034]

미세조류 *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. salina*, *D. salina*, *D. tertiolecta* 및 *N. atomus*의 바이오매스 증가율을 확인하기 위해 광도 최적화 실험을 수행하였다. 각 미세조류별로 확인된 최적 파장에서의 최적 광도를 찾기 위해 40, 70, 100, 130 mol m⁻² s⁻¹의 다양한 광도에서 미세조류를 배양하였다. 도 3a, 도 3b, 도 3c, 도 3d, 도 3e, 도 3f, 도 3g 및 도 3h는 결과 그래프이다. *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. atomus*, *N. salina*, *D. salina* 및 *D. tertiolecta*의 8종은 100 mol m⁻² s⁻¹의 광도에서 최대의 바이오매스 0.58, 0.65, 0.69, 0.61, 0.52, 0.58, 0.55, 0.51 g/L을 각각 생산하였으므로 최적 광도 조건은 100 mol m⁻² s⁻¹ 이었다.

[0035]

도 4a, 도 4b, 도 4c, 도 4d, 도 4e, 도 4f, 도 4g 및 도 4h는 고농도 바이오매스를 생산하기 위하여 질소원 농도를 16, 24, 32 mg/L로 다르게 설정하여 실험을 진행한 결과이다. *I. galbana* 와 *P. tricornutum*은 기본 배양에 사용하였던 8 mg/L의 질소원 농도 2배인 16 mg/L의 농도에서 최대 바이오매스 0.97, 1.08 g/L을 생산하였고(도 4a, 도 4b,), *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. atomus*, *N. salina*, *D. salina*, *D. tertiolecta* 는 기본 질소원 농도의 3배인 24 mg/L의 농도에서 최대 바이오매스 1.01, 0.91, 0.87, 0.84, 0.79, 0.75 g/L을 생산하였다. 본 발명의 효과를 확인하기 위해 최적 LED 파장 (Blue, 465 nm, Red, 660 nm)과 광도(100molm⁻² s⁻¹)에서 대조군인 형광등 배양과 비교했을 때 최대 바이오매스의 생산량을 비교하였다. 도 5는 각각의 미세조류별 최적 광도에서 LED 파장과 형광등을 이용해 배양 한 후 최대 바이오매스를 측정하여 비교한 그래프이다. 8종의 미세조류는 대조군인 형광등에 비하여 최적 LED 파장 및 광도에서 유의적으로 2배 이상 바이오매스 생산이 증가하였다. 오일 함량은 solvent extraction 방법을 이용하여 측정하였다. Solvent extraction 방법은 homogenizer를 이용하여 세포를 분쇄시킨 후 chloroform과 methanol을 1 : 2의 비율로 혼합하여 10 mg 당 18 ml의 양을 첨가하였고, 남은 세포 잔해를 제거하여 chloroform과 증류수를 1 : 1의 비율로 12 ml를 첨가하였다.

[0036]

2000 rpm, 5분간 원심분리 하여 층을 분리하였고, 상층을 제거한 후 오일이 녹아있는 하층을 30에서 증발시켜 오일함량을 측정하였다. 형광등 배양과 최적 LED파장 배양에서의 오일함량을 비교분석한 결과를 도 6에 나타내었다. 미세조류 *I. galbana*, *P. tricornutum*, *N. oculata*, *N. oceanica*, *N. atomus*, *N. salina*, *D. salina*, *D. tertiolecta*는 대조군인 형광등에 비해 약 1.5배 이상의 오일을 축적하였다. 본 발명에서는 이러한 실험결과를 바탕으로 미세조류의 오일 축적량을 향상시키기 위하여 파장의 변환을 통한 동일배지에서 Two-Phase 공정을 실시하였다. 미세조류는 고농도 성장 조건에서는 바이오매스는 증가하지만 오일 축적량은 감소하고, 성장제한 조건일 경우는 바이오매스는 감소하지만 오일 축적량은 증가하게 된다. 이에 관한 모식도를 도 7에 나타내었다. Blue (465 nm)와 Red (660 nm)에서 100 mol m⁻² s⁻¹의 광도에서 배양한 미세조류를 정지기 상태에 도달하였을 때 Blue (465 nm), Red (660 nm), Green (520 nm)의 파장으로 변환 시켰다.

[0037]

*I. galbana*는 2일째 red (660 nm)에서 56%, green (520 nm)에서 60%의 오일함량이 측정되었으며(도8a), *P. tricornutum*는 2일째 red (660nm)에서 58%, green (520 nm)에서 62%로 측정되었으며(도8b), *N. oculata*는 2일째 red (660nm)에서 50%, green (520nm)에서 56%로 측정되었으며(도8c), *N. oceanica*는 2일째 red (660nm)에서 47%, green (520nm)에서 53%로 측정되었으며(도8d), *N. atomus*는 2일째 blue (465nm)에서 47%, green (520nm)에서 50%로 측정되었으며(도8e), *N. salina*는 3일째 red (660nm)에서 47%, green (520nm)에서 52%로 측정되었으며(도8f), *D. salina*는 1일째 red (660nm)에서 48%, green (520nm)에서 52%로 측정되었으며(도8g), *D. tertiolecta*는 1일째 red (660nm)에서 46% green(520)에서 54%로 측정 되었다(도8h). 1구간의 Blue 465 nm (*N. atomus*는 Red 660 nm) 파장에서의 오일함량보다 2구간의 Green 520 nm 에서의 최대오일 함량이 *I. galbana*는 30%, *P. tricornutum*는 26%, *N. oculata*는 28%, *N. oceanica*는 30%, *N. atomus*는 28%(*N. atomus*는 Red 660 nm 대비), *N. salina*는 27%, *D. salina*는 27%, *D. tertiolecta*는 28%의 오일함량 증가를 보였다(도8a, 도 8b, 도 8c, 도 8d, 도 8e, 도 8f, 도 8g, 도 8h).

[0038]

상기 실험에서 각 파장의 오차범위는 5nm, 광강도의 오차범위는 5 mol m⁻² s⁻¹, nitrate의 오차는 10%, DCW의 오차는 5%, Oil의 오차도 5%이다. 상기 5%는 나온 실험농도수치 및 결과수치의 5%이다. 예를 들어 8g/L의 nitrate의 오차는 8의 5%인 0.4g/L이다. 각 오차가 적용되는 실험 데이터는 도1의 DCW, 도3의 DCW, 도4의 DCW, nitrate, 도5의 DCW, 도6의 Oil, 도8의 Oil 등이다.

[0039]

도 9a, 도 9b 및 도 9c는 본 발명에서의 미세조류의 고농도 오일축적시스템으로서 내부와 외부에서 이중으로

LED 광을 투과할 수 있는 투명한 통모양의 배양기에 LED가 설치되는 비어있는 원통을 삽입한 것을 특징으로 하는 장치이다. 도 9a는 투명한 용기(배양기)에 공기를 공급하는 튜브와 버블러가 삽입된 용기를 나타내며, 용기의 주위에 필요로 하는 파장을 선별적으로 공급하는 조명기구(LED panel 1, 2)가 설치된 모습을 나타낸다. 도 9b는 이러한 용기 내에 LED가 삽입되는 투명한 관이 원주 형태로 설치된 모습을 보인다. 도 9c는 배양기의 외부에 배양기를 감싸는 형태로 LED가 배열된 모습을 도시한다. 이때, LED는 순차로 또는 번갈아가면서 점, 선, 면의 형태로 배열될 수 있다. 배양기 내부와 외부의 LED는 자동제어장치에 의해 두 개의 구간(Two-Phase)에 맞춰 파장과 광량을 단계적으로 조절할 수 있다.

[0040]

도 11과 같은 본 발명의 Two-phase culture 공정은 1구간 배양에서 blue(465 nm), red(660 nm) 파장에서 최대의 바이오매스를 생산하고, 세포가 정지기에 도달하였을 때, 2구간 배양을 실시하며 blue(465 nm), red(660 nm) 혹은 green(520 nm)로 파장을 변환하여 오일 축적률을 향상시켰다. 배양이 끝난 후 원심분리를 이용하여 세포를 회수하고 이를 오일 추출공정을 통해 분리한다.

[0041]

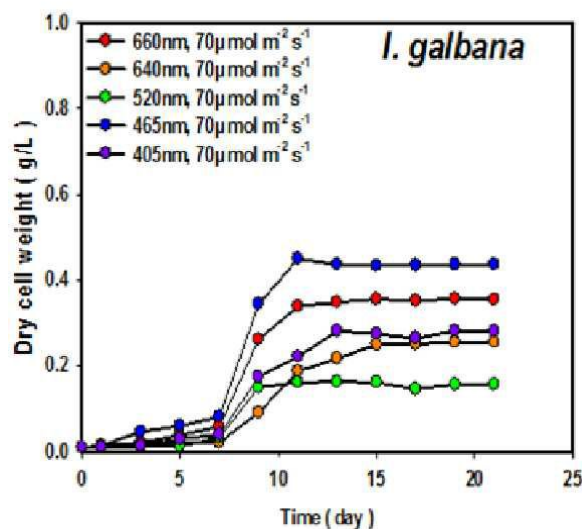
종래의 Two-stage culture 공정과 본 발명의 Two-phase culture 공정을 비교했을 때 차이점 및 본 발명의 장점을 정리하면 다음과 같다. Two-stage culture 공정에서는 1단계 배양에서 최대의 바이오매스를 생산하고, 배양액 전체를 원심분리를 이용해 세포만을 회수한다. 이후 스트레스 요인으로써 질소원을 제거한 새 배지에 재현탁 하여 2단계 배양을 위해 재접종하는 공정을 거친다. 하지만 Two-phase culture 공정에서는 이 공정을 거치지 않고, 1구간 배양에서 최대의 바이오매스를 생산하고 세포가 성장을 정지한 정지기에 도달했을 때, 그 상태에서 파장만을 변환시켜 오일 축적률을 증가시키기 위한 배양으로써 2구간 배양을 실시한다. 그러므로 Two-phase culture 공정은 Two-stage culture 공정에 비해 배지를 변경하지 않고 간편히 오일을 축적 할 수 있으므로 Two-phase 공정이 효율적이다.

[0042]

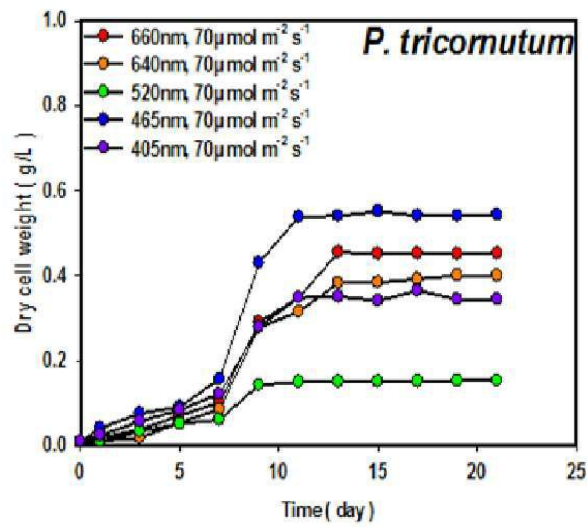
또한, 일반적인 형광등은 여러 가지 파장을 포함하고 있다. 미세조류에 함유되어있는 Chlorophyll a 물질은 여러 가지 파장 중 특정 파장인 blue (465 nm), red(660 nm)만을 흡수하여 광합성을 이용하게 된다. 그러나 LED의 경우 Chlorophyll a가 흡수하는 파장인 blue (465 nm)만을 형광등과 동일한 광량을 조사하여 광합성의 효율이 증가하게 되며 형광등에 비해 소모전력량이 낮으므로 더 경제적인 장점을 가지고 있다 (도2).

도면

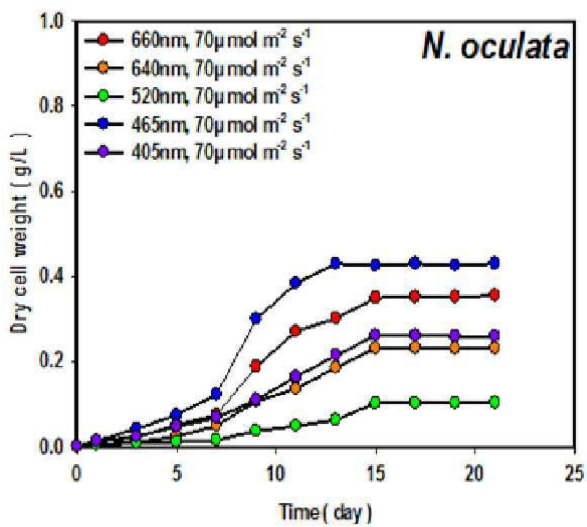
도면1a



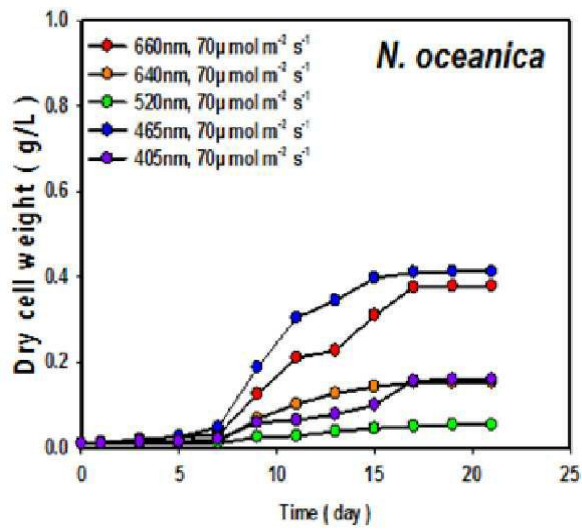
도면1b



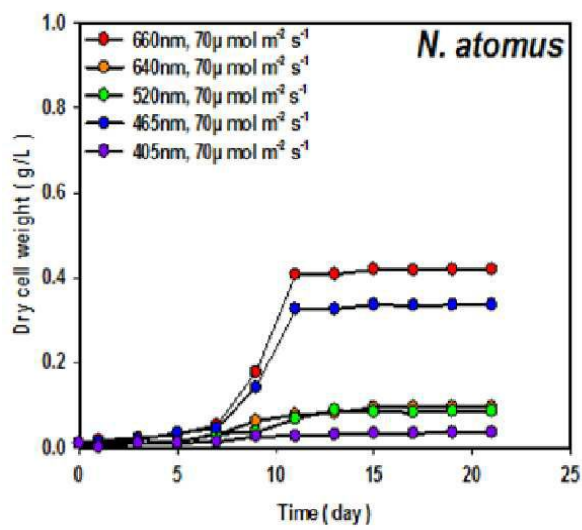
도면1c



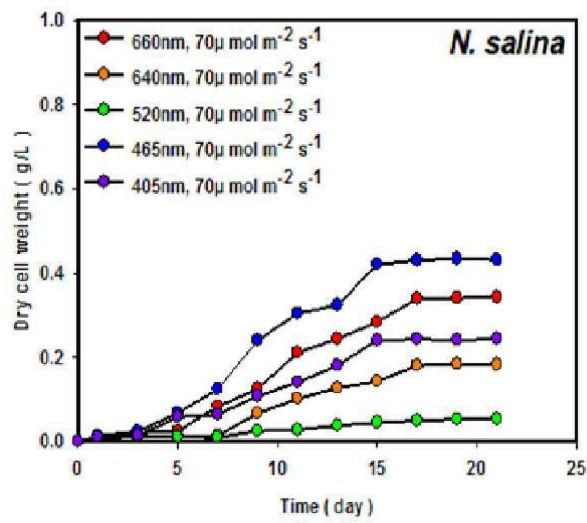
도면1d



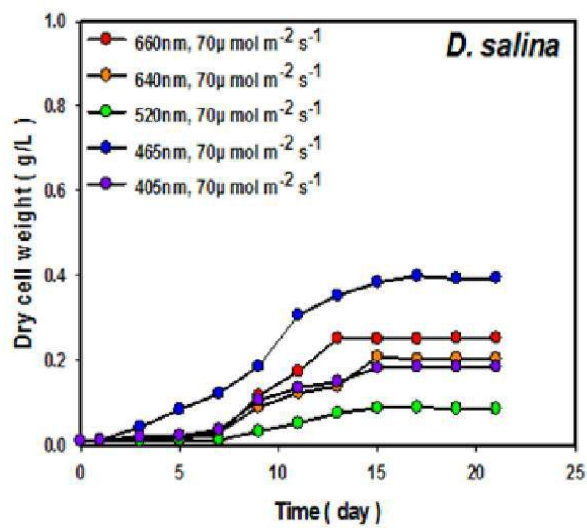
도면1e



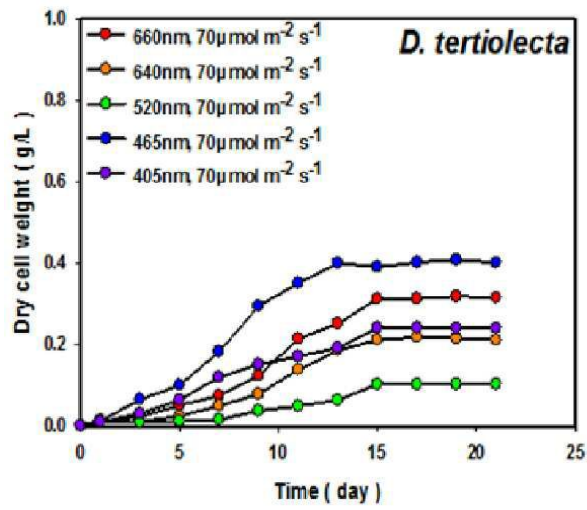
도면1f



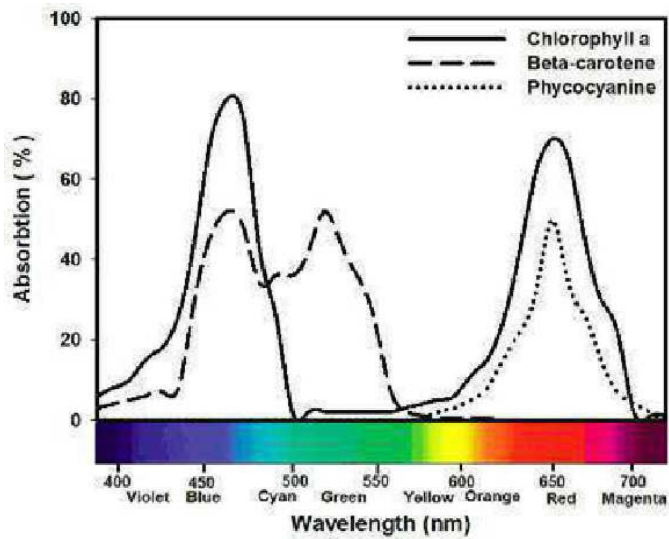
도면1g



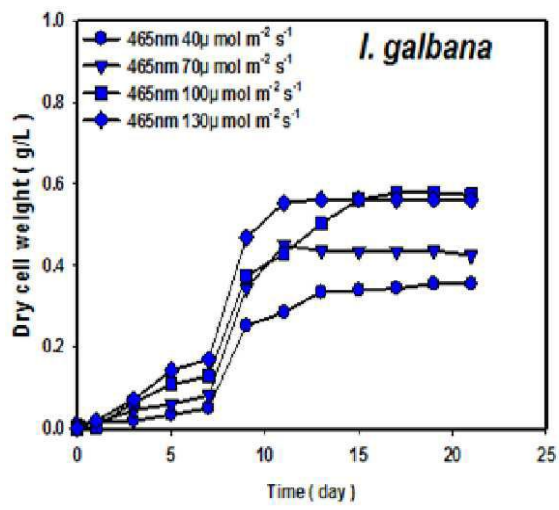
도면1h



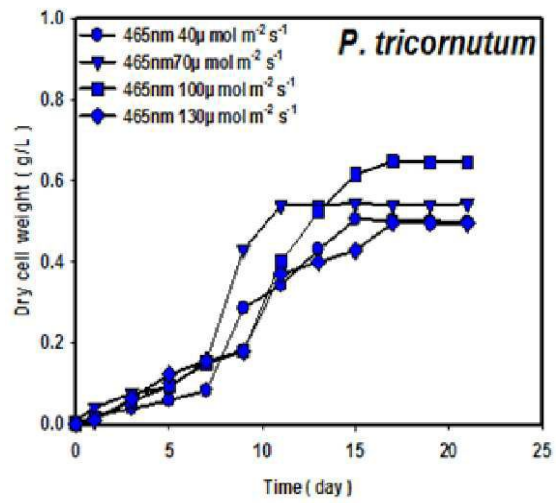
도면2



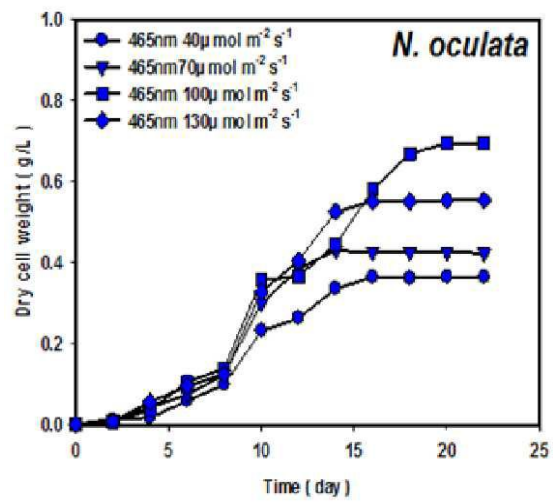
도면3a



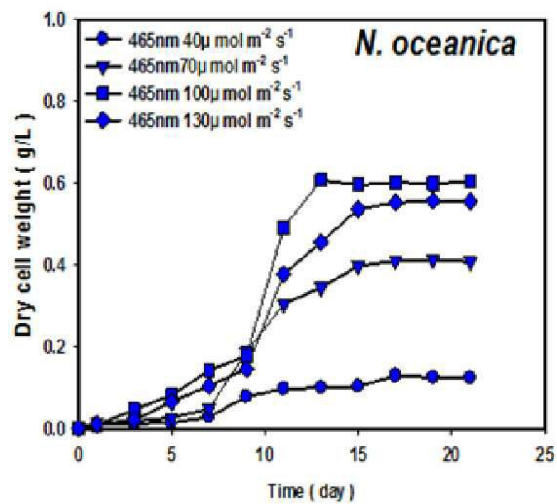
도면3b



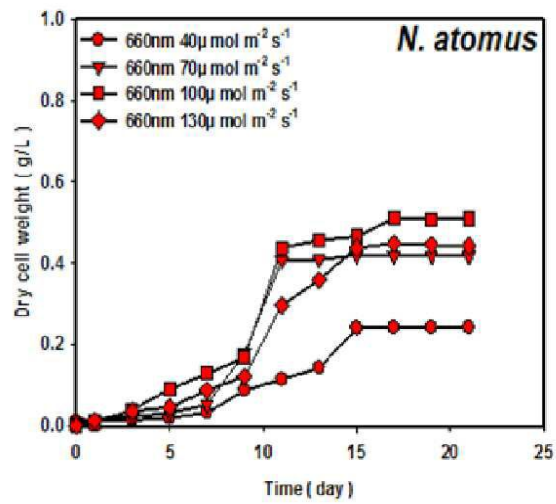
도면3c



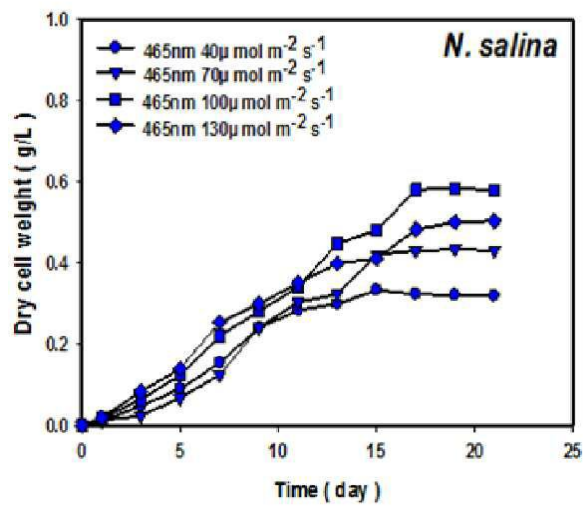
도면3d



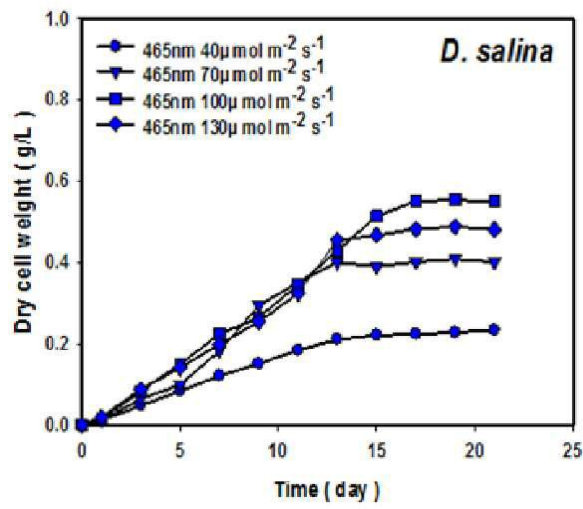
도면3e



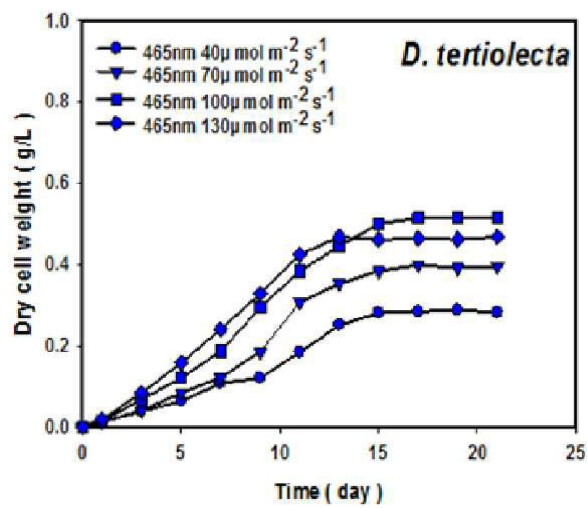
도면3f



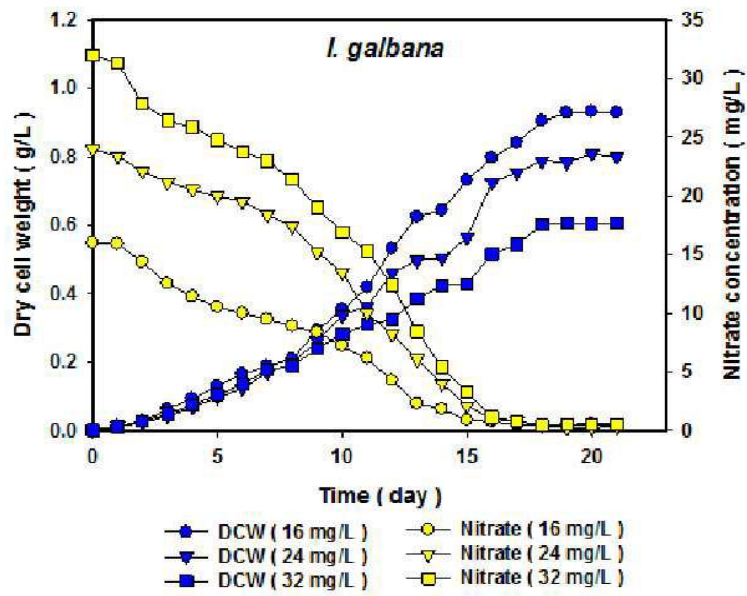
도면3g



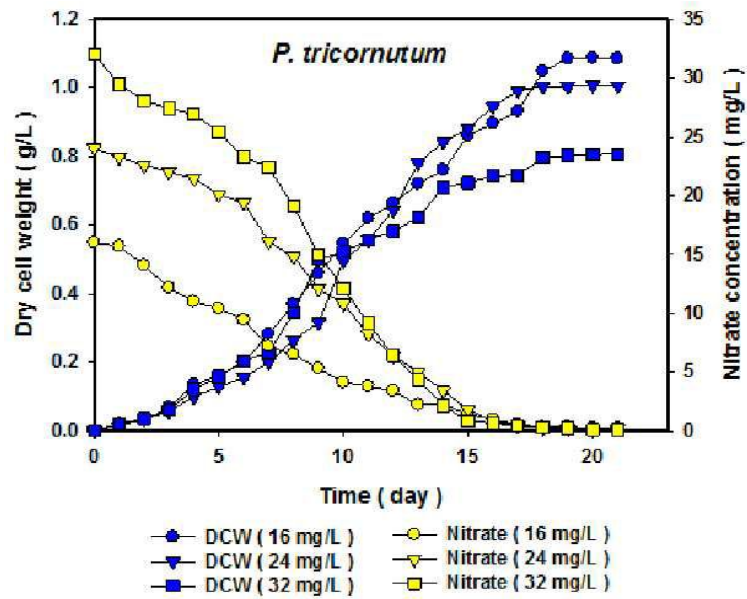
도면3h



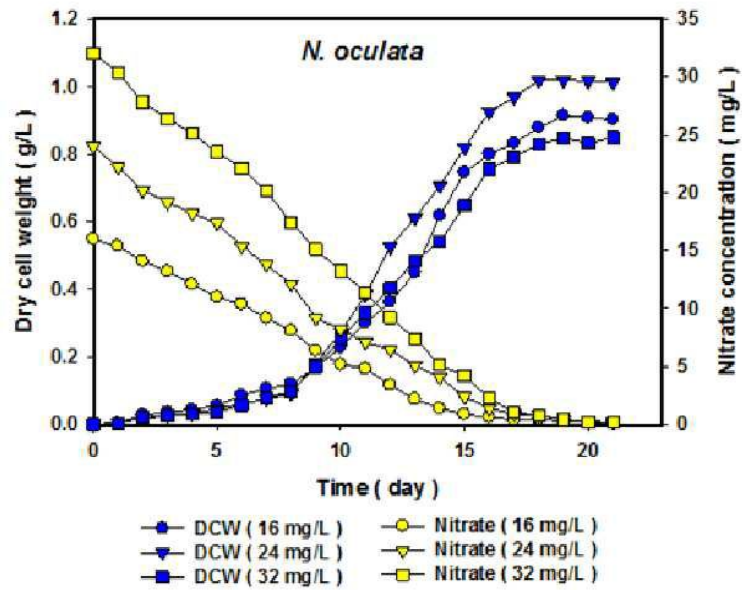
도면4a



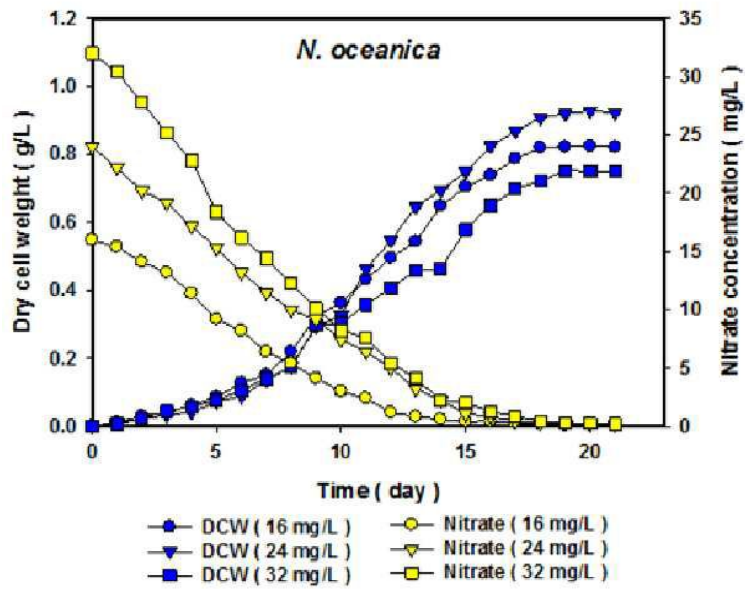
도면4b



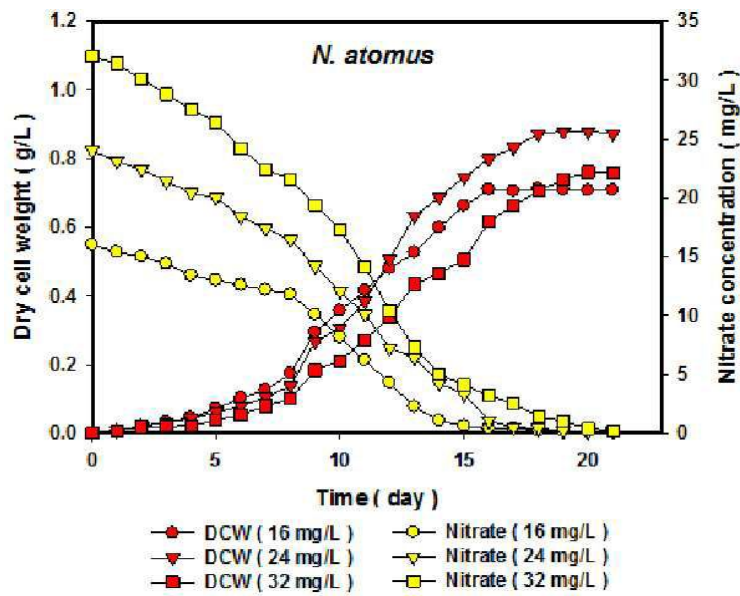
도면4c



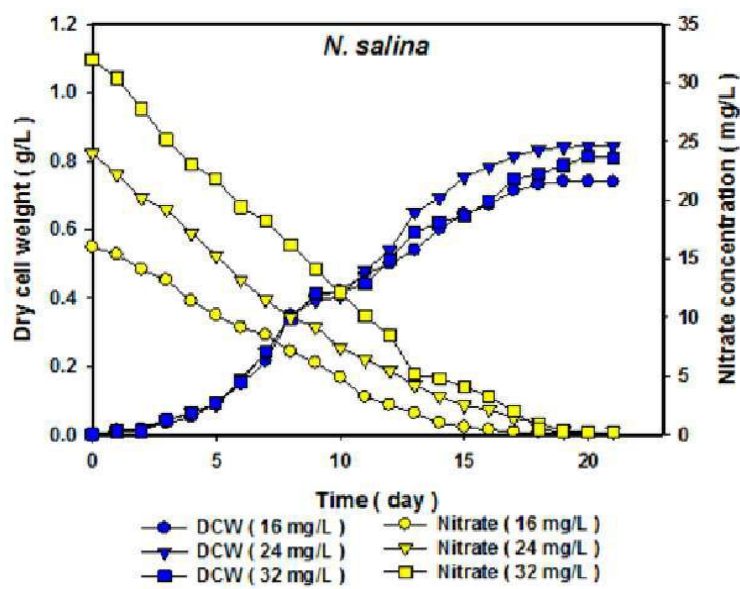
도면4d



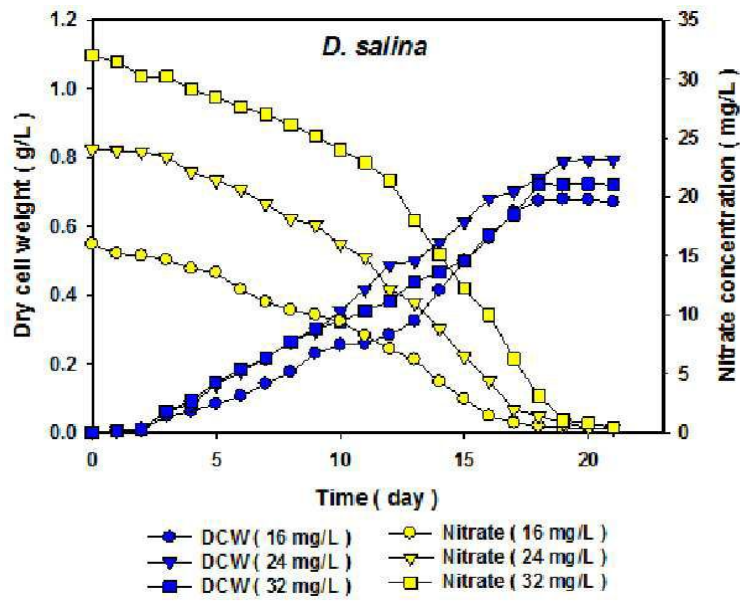
도면4e



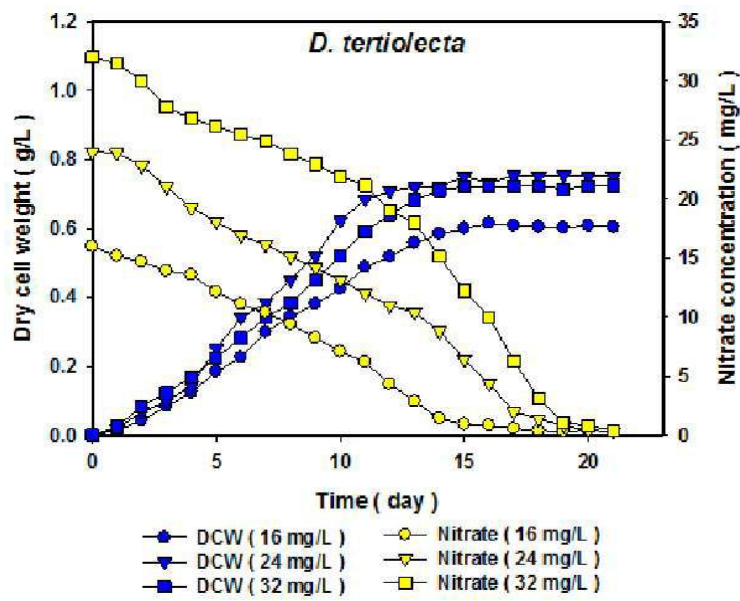
도면4f



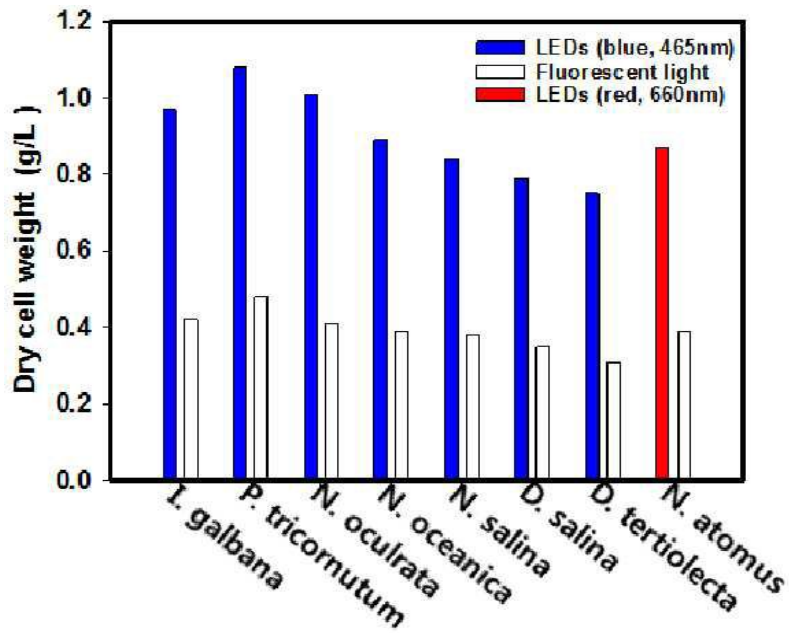
도면4g



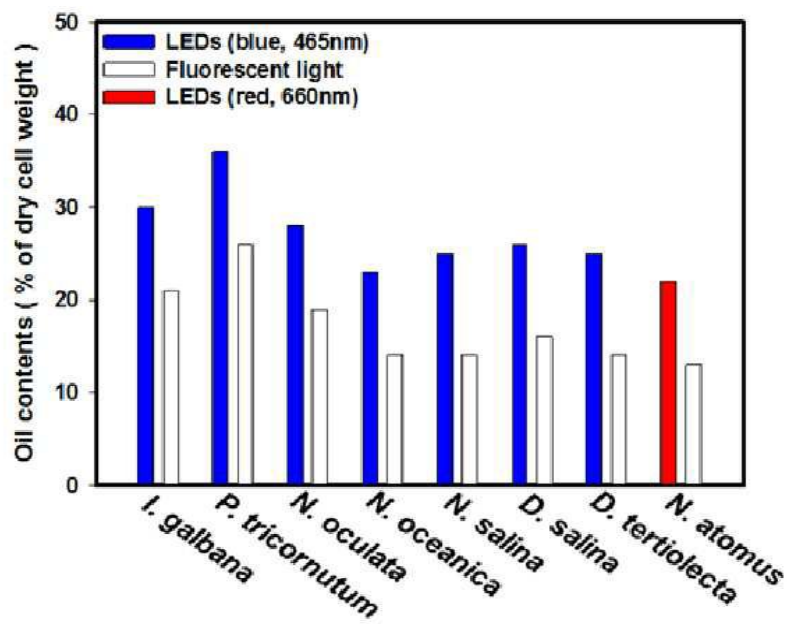
도면4h



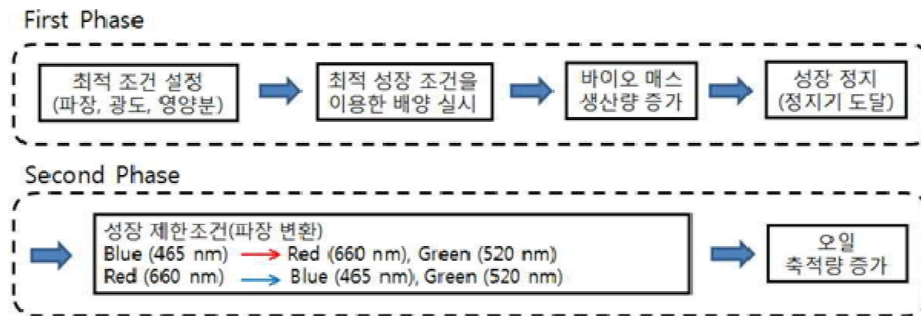
도면5



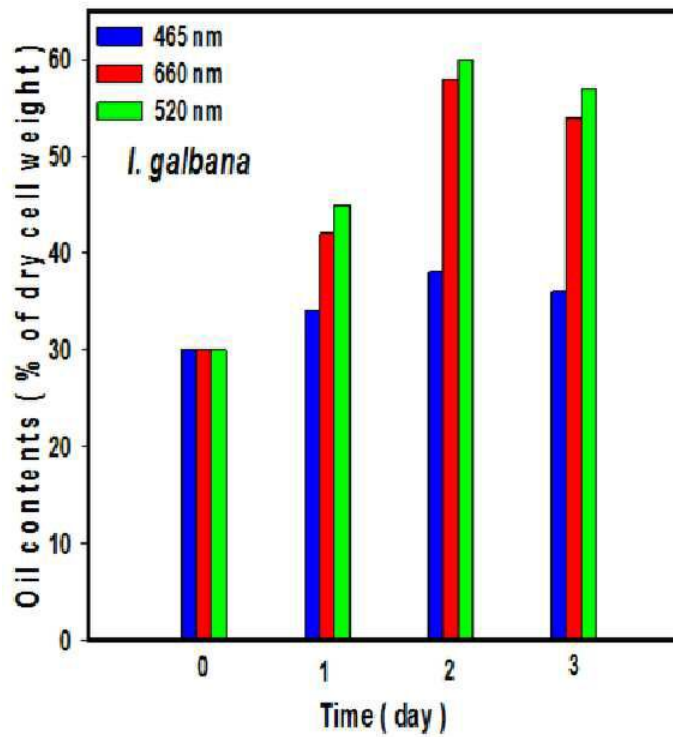
도면6



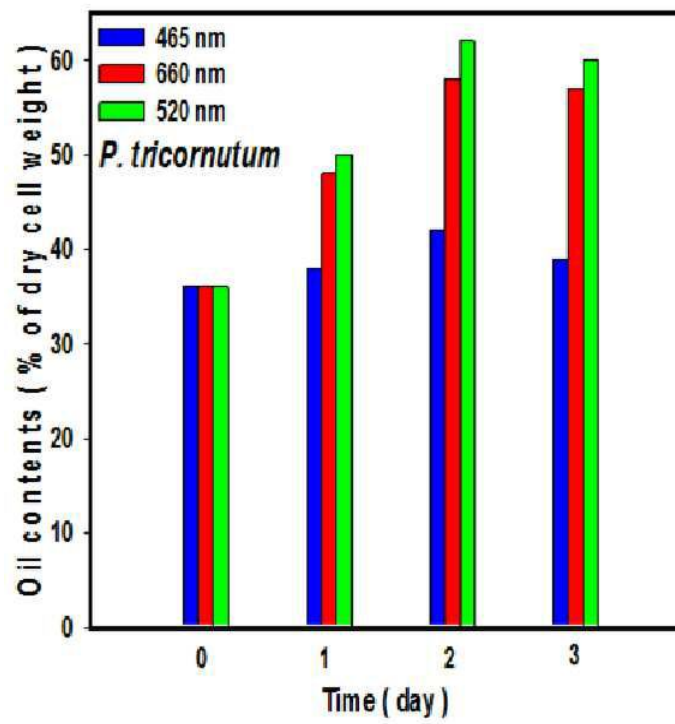
도면7



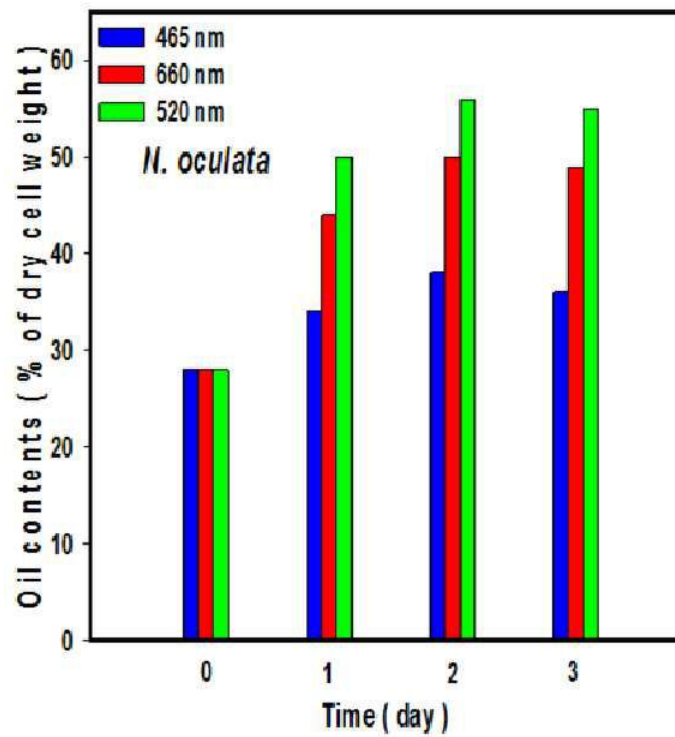
도면8a



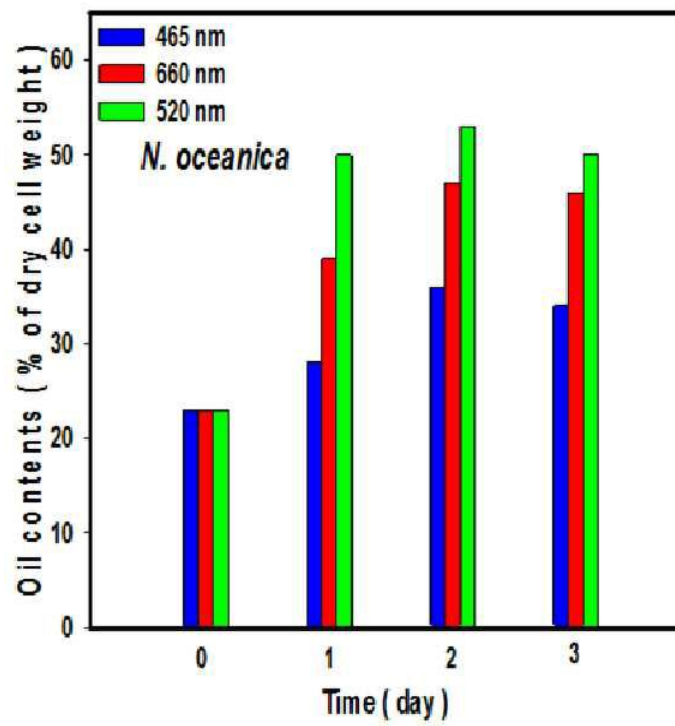
도면8b



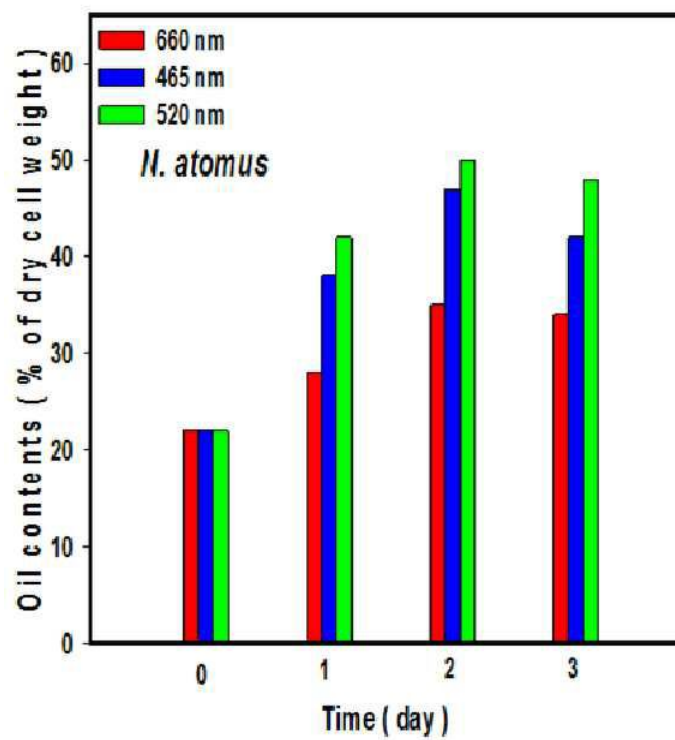
도면8c



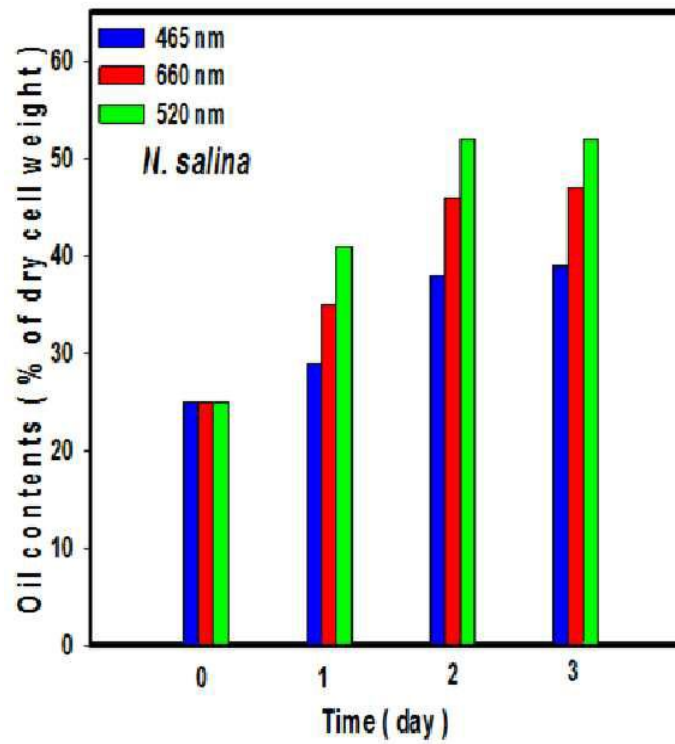
도면8d



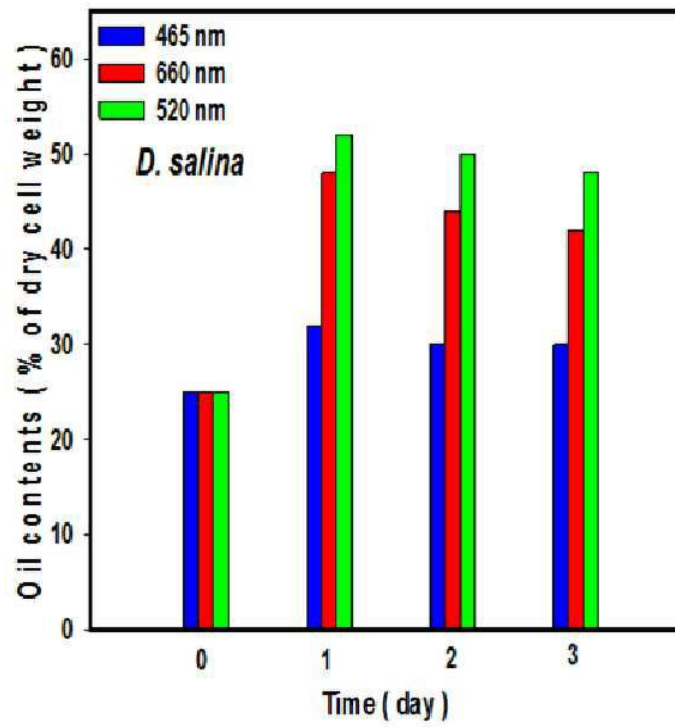
도면8e



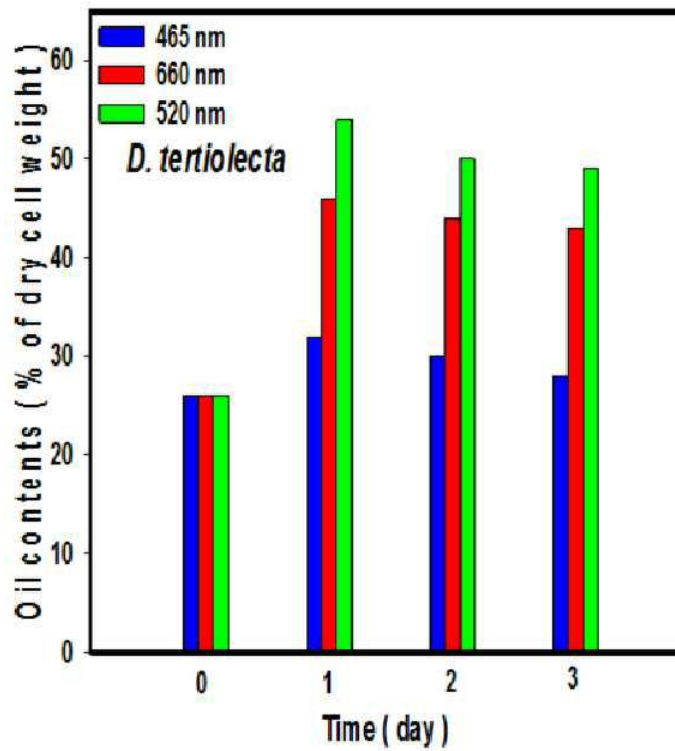
도면8f



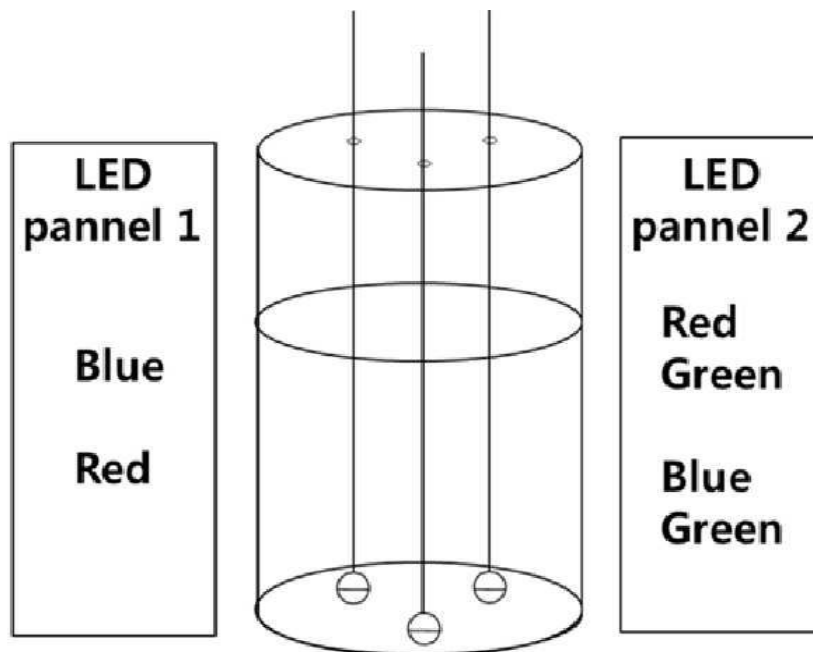
도면8g



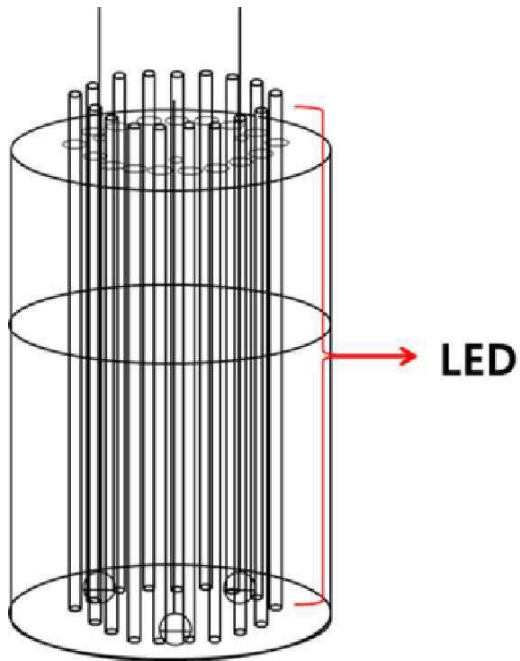
도면8h



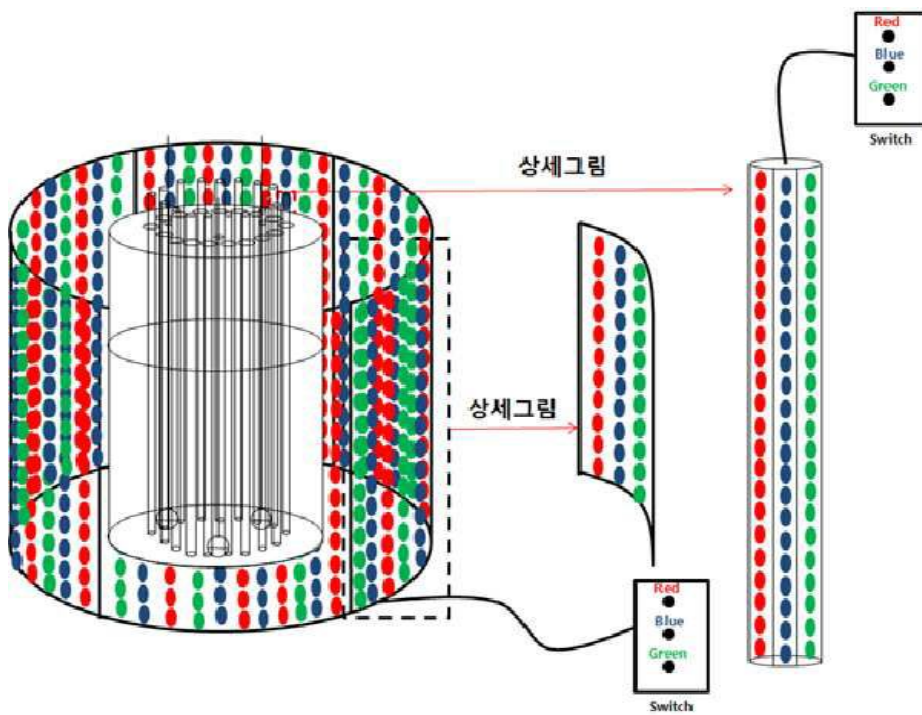
도면9a



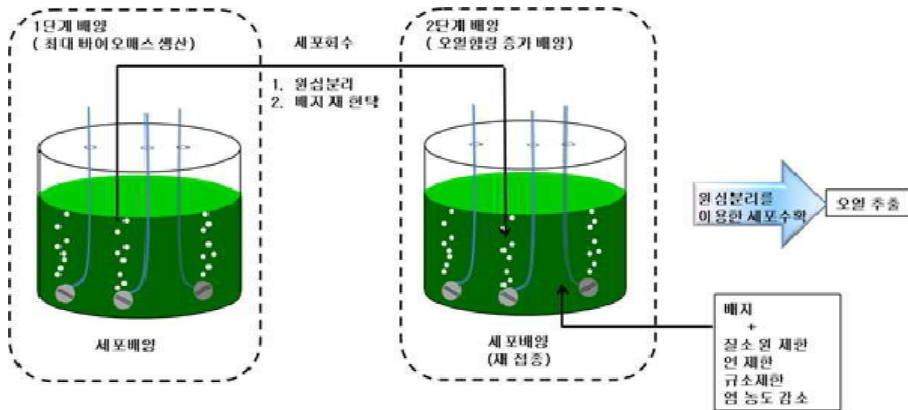
도면9b



도면9c



도면10



도면11

