(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0110781
(43) 공개일자 2018년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 1/12* (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
*C12P 1/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 1/12* (2013.01)
*C12N 1/20* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0040530
(22) 출원일자 2017년03월30일
심사청구일자 2017년03월30일

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**심상준**
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호
**최윤영**
서울특별시 강남구 선릉로 7, 708동 1501호
**전재민**
서울특별시 동작구 사당로2자길 2-2
(74) 대리인
**정은열**

전체 청구항 수 : 총 9 항

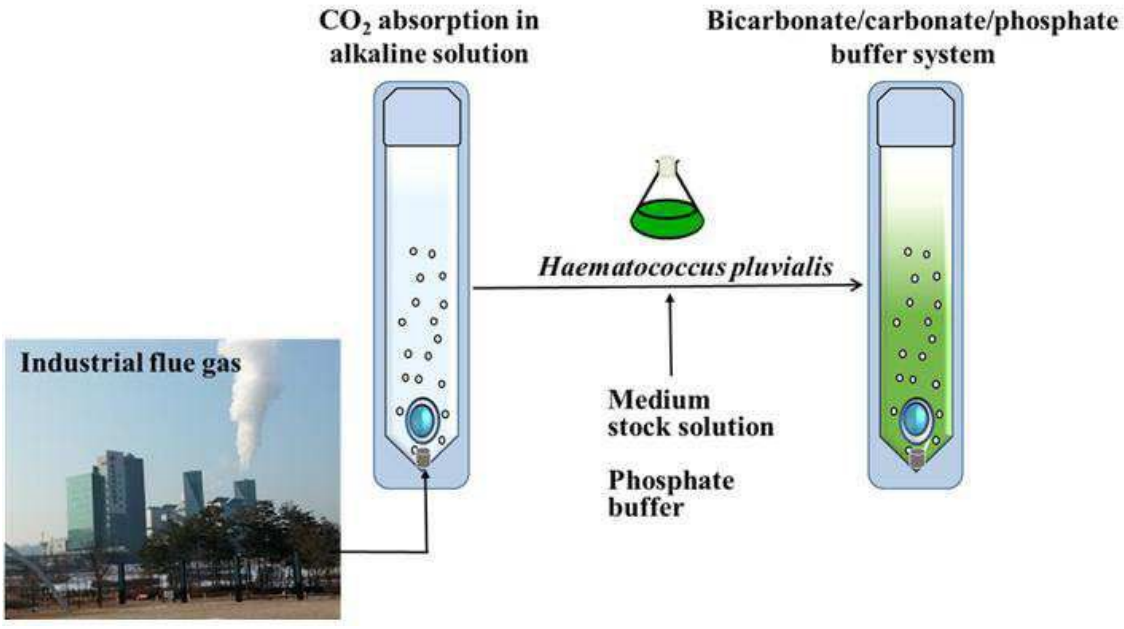
(54) 발명의 명칭 **배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법**

## (57) 요 약

본 발명은 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 혼합 용액에 공급하여 배가스 포화 버퍼 시스템을 조성하고 배지와 광합성 미생물을 접종하여 유용물질을 생

(뒷면에 계속)

*대 표 도* - 도1



성하는 광합성 미생물을 배양할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 배가스 내 이산화탄소를 이용한 중탄산 버퍼와 무기 인산염 버퍼의 혼합 버퍼 시스템은 산성에 대한 완충작용이 우수하고 동시에 광합성 미생물에 탄소원과 영양원을 공급할 수 있으므로 미세 조류 생산성 저해를 방지할 수 있으므로, 배가스 배출에 의한 대기오염을 방지할 수 있고 기존 HEPES 버퍼 및 $Na_2$Glycerophosphate · $5H_2O$에 비해 비용절감 효과가 뛰어나 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용할 수 있다.

(52) CPC특허분류
*C12P 1/00* (2013.01)
*C12N 2500/02* (2013.01)
*C12N 2500/60* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M1A8A1049278
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터
연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)
연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20152010201900
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지기술개발사업
연구과제명 미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환 공정의 실증
기 여 율 50/100
주관기관 한국지역난방공사
연구기간 2015.06.01 ~ 2017.05.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

다음의 단계를 포함하는 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법:

(a) 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 공급하여 이산화탄소 용해를 통한 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및

(b) 상기 조성된 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 광합성 미생물을 접종한 다음, 이산화탄소 함유 배가스를 공급하면서 배양하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이산화탄소는 배가스에서 탈진, 탈황, 탈질소 및 탈염소 중 적어도 2가지 이상의 단계를 포함하는 정화과정을 거쳐 얻어지는 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 염기는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아($NH_4OH$), 수산화칼슘($Ca(OH)_2$) 또는 수산화마그네슘($Mg(OH)_2$)인 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 무기 인산염 버퍼 용액은 $K_2HPO_4$와 $KH_4PO_4$의 혼합용액인 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배가스 내 이산화탄소 함량은 3 ~ 50%인 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 염기의 농도는 5 ~ 50 mM인 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 무기 인산염의 농도는 0.01 ~ 5 mM인 것을 특징으로 하는 배양방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 광합성 미생물은 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 클로렐라 소로키니아나(Chlorella sorokiniana), 스피룰리나(Spirurlina) 속, 두나리엘라(Dunaliella) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스

(Haematococcus pluvialis), 스키조키트리움(Schizochytrium) 속, 크립테코디니움(Crypthecodinium) 속, 클라미도모나스(Chlamydomonas) 속, 네오클로리스(Neochloris) 속, 아파니조메논(Aphanizomenon) 속 또는 시아노박테리아(Cyanobacteria) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 배양방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 (b)단계의 광합성 미생물 배양에 의해 유용물질을 생성하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배양방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 혼합 용액에 공급하여 배가스 포화 버퍼 시스템을 조성하고 배지와 광합성 미생물을 접종하여 유용물질을 생성하는 광합성 미생물을 배양할 수 있는 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 에너지 생산을 위한 석탄, 석유 그리고 천연가스와 같은 화석 연료의 연소는 대기 중 이산화탄소의 농도를 높이는 주요 원인이고, 이는 지구 온난화의 원인이다. 1 kWh의 전력을 생산하는데 0.95 kg의 이산화탄소가 발생한다. 이러한 이산화탄소 배출을 줄이기 위해 지질학적인 이산화탄소 포집 기술을 개발하고 있으나, 이는 비용이 많이 들 뿐만 아니라 지진 등에 의한 이산화탄소 유출의 우려, 지하수의 오염 등의 문제가 있다. 이를 대체하기 위한 이상적인 이산화탄소 포집법은 생물학적 매커니즘을 이용한 바이오매스 형태로 이산화탄소를 고정하는 것이다. 그러나 기존의 콩, 야자수, 옥수수, 카놀라, 자트로파 등의 농작물을 사용하는 방법은 이러한 식물들이 식량 자원일 뿐 아니라 생산량이 낮다는 문제가 있다(Plasynski, S.I. et al., Crit. Rev. Plant Sci. 28:123-138, 2009).

[0003] 반면 광합성 미생물은 높은 생산성을 가지고 있을 뿐만 아니라 식량 자원과 경쟁하지 않고 가치가 높은 부산물을 생산한다. 그러나 광합성 미생물의 배양에 있어서 지속적으로 이산화탄소를 포집하여 광합성 원료로 공급하는 것은 비용이 들고, 이는 바이오매스 생산에 있어 걸림돌이 되고 있다. 또한, 이산화탄소를 광합성 미생물의 배양액에 공급할 경우, 하기와 같은 화학식에 의해 배양액의 산성화가 진행되어 미생물의 생장을 저해할 우려가 있다.

[0004] $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$

[0005] $H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$

[0006] 한편, 바이카보네이트(bicarbonate, $HCO3^-$)는 광합성의 원료로서 활용할 수 있다. 시아노박테리아 및 미세조류에서 발달되어 온 탄소 농축 메커니즘(CCM; carbon concentration mechanism)은 세포막을 통해서 이산화탄소와 바이카보네이트 이온을 모두 수송할 수 있다. 세포 안으로 수송된 이산화탄소와 바이카보네이트 이온은 주로 바이카보네이트 이온 형태로 존재한다. 특히, 클라미도모나스(Chlamydomonas)와 같은 진핵 미세조류는 엽록체 안에 무기 탄소(Ci) 수송자를 가지므로 바이카보네이트 이온을 엽록체 스트로마 안에 축적하고 저장할 수 있다. 또한, 바이카보네이트가 배양액에 첨가되면 하기 화학식의 평형에 의해, $H^+$를 소모할 수 있다.

[0007] $HCO_3^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2O$

[0008] 한편, 인(phosphorus)은 미세 조류 생장 및 배양에 있어 또 다른 중요한 영양원이다. 인은 인지질, 뉴클레오티드, 핵산 등의 원료가 되며 에너지 전달 (ATP)와 여러 세포 내 신호 전달에 관여한다. 세포는 인이 많은 환경에서 체성분의 약 3%까지 인을 축적할 수 있으며, 질소 결핍보다는 그 효과가 약하나 인 결핍은 몇몇 미세 조류 종에서 스트레스 환경 및 지질 결핍을 유도하는 것으로 알려져있다(Price, G.D. et al., *J. Exp. Bot.* 59: 1441-1461, 2008). 인은 세포 생장에 필수적인 영양소이므로 세포는 poly phosphate 형태로 인을 세포 내에 축

적할 수 있다.

[0009] 기존에는 광합성 미생물 배양 시 배양액의 산성화를 방지하기 위해 HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid) 버퍼를 사용하였으며, 인산원은 $Na_2$Glycerophosphate · $5H_2O$를 사용하였다. 하지만, HEPES 버퍼와 $Na_2$Glycerophosphate · $5H_2O$는 고가이기 때문에 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용하기 부담스럽다는 단점이 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 염기 수용액과 무기 인산염의 혼합 용액에 배가스 내의 이산화탄소를 용해시켜서 생성된 바이카보네이트/카보네이트 버퍼 시스템을 이용하여 광합성 미생물을 배양할 경우, 기존 HEPES 버퍼에 비해 미생물 배양액의 산성화 방지 능력이 우수하고 동시에 미생물의 생장이 향상되면서 바이오매스를 포함한 유용물질의 생산을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0011] 본 발명의 목적은 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼와, 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물 또는 미세조류의 배양방법을 제공하는 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은

[0013] 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 공급하여 이산화탄소 용해를 통한 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및 (b) 상기 조성된 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 광합성 미생물을 접종한 다음, 이산화탄소 함유 배가스를 공급하면서 배양하는 단계를 포함하는 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법을 제공한다.

### *발명의 효과*

[0014] 본 발명에 따른 배가스 내 이산화탄소를 이용한 중탄산 버퍼와 무기 인산염 버퍼의 혼합 버퍼 시스템은 산성에 대한 완충작용이 우수하고 동시에 광합성 미생물에 탄소원과 영양원을 공급할 수 있으므로 미세 조류 생산성 저해를 방지할 수 있으므로, 배가스 배출에 의한 대기오염을 방지할 수 있고 기존 HEPES 버퍼 및 $Na_2$Glycerophosphate · $5H_2O$에 비해 비용절감 효과가 뛰어나 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용할 수 있다.

### *도면의 간단한 설명*

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 이용한 미세조류 배양 과정에 관한 공정도이다.

도 2는 이산화탄소를 강염기 수용액에 0.1 vvm의 기체 유속으로 12시간 이상 폭기(aeration)시 가스 공급 조건 및 염기 수용액의 농도별 이산화탄소의 화학적 흡착에 따른 pH 및 용해 무기 탄소종 (Dissolved inorganic carbon)의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따라 이산화탄소 흡착에 의해 생성된 용해 탄소종의 농도가 세포 생장에 미치는 영향을 관찰한 결과 그래프이다.

도 4는 이산화탄소를 강염기 수용액 및 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 0.1 vvm의 기체 유속으로 12시간 이상 폭기(aeration)시 무기 인산염의 농도별 이산화탄소의 화학적 흡착에 따른 pH 및 용해 무기 탄소종 (Dissolved inorganic carbon)의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 강염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 농도에 따른 세포 생장 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 산업체 배출 배가스 조건에서 기존 버퍼인 HEPES 20 mM과 본 발명에 따른 버퍼 시스템을 사용하여 *H. pluvialis*를 장기간 배양 (60일) 하였을 때의 바이오매스 생산성 (도 6A), 아스타잔틴 생산성 (도 6B), pH (도

6C), 용해 탄소종 농도 (도 6D)를 비교한 결과 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 광 생물 반응기를 사용한 미세 조류 배양 공정에서 고농도 이산화탄소의 지속적 공급에 의한 pH 저하를 방지하고 배양액의 pH를 일정하게 보정하여 이산화탄소 농도에 민감한 미세 조류 종을 산업체에서 배출되는 배가스 내 이산화탄소 처리에 활용할 수 있도록 하는 기술을 제공하고자 한다.

[0019] 본 발명에서는 배가스 내 이산화탄소를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 공급하여 이산화탄소 용해를 통한 중탄산/인산염 버퍼를 제조한 후 광합성 미생물을 접종하여 배양한 결과, 지속적으로 탄소원과 영양원이 공급됨으로써 배양액의 산성화가 방지되고 미생물의 생장 저해효과가 일어나지 않아 미생물로부터 바이오매스를 포함한 유용물질을 안정적으로 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0020] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 공급하여 이산화탄소 용해를 통한 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및 (b) 상기 조성된 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 광합성 미생물을 접종한 다음, 이산화탄소 함유 배가스를 공급하면서 배양하는 단계를 포함하는 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 이산화탄소는 배가스에서 탈진, 탈황, 탈질소 및 탈염소 중 적어도 2가지 이상의 단계를 포함하는 정화과정을 거쳐 얻어지는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 염기는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아($NH_4OH$), 수산화칼슘($Ca(OH)_2$) 또는 수산화마그네슘($Mg(OH)_2$)일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 무기 인산염 버퍼 용액은 $K_2HPO_4$와 $KH_4PO_4$의 혼합용액일 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 배가스 내 이산화탄소 함량은 3 ~ 50%일 수 있으나 반드시 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 이산화탄소의 함량은 이산화탄소 발생원의 종류에 따라 달라질 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 염기의 농도는 5 ~ 50 mM, 바람직하게는 강염기를 사용할 경우 5 ~ 20 mM, 더욱 바람직하게는 10 mM의 강염기(KOH)를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 무기 인산염의 농도는 0.01 ~ 5 mM, 바람직하게는 0.1 ~ 1 mM, 더욱 바람직하게는 1 mM일 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에서, 버퍼(buffer)는 외부로부터 산이나 염기가 가해졌을 때, 영향을 크게 받지 않고 수소이온농도를 일정하게 유지시켜주며, 일반적으로 약한 산과 그 염의 혼합용액 또는 약한 염기와 그 염의 혼합용액이 완충작용을 한다.

[0028] 본 발명에 따라 용해된 이산화탄소는 $HCO_3^-/CO_3^{2-}$ 상태로 수용액에 존재하며 이는 짝산/짝염기 화학종으로서 버퍼 효능을 가진다. 이러한 중탄산 버퍼를 이용하여 미세 조류 배양 기간 동안 pH를 일정하게 유지할 수 있으나, 일정 범위 이상 (>5% v/v)의 $CO_2$ 농도에서는 pH 보정 효과가 저해되는바, 본 발명에서는 상기 중탄산 버퍼 시스템($HCO_3^-/CO_3^{2-}$)에 무기 인산염 버퍼($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$)가 혼합된 버퍼 시스템(바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템)을 사용하여 완충 능력을 향상시킴으로써 미세조류의 장기간 배양에도 pH를 보정하는 효과가 있을 뿐만 아니라 미세 조류 생산성 저해를 방지할 수 있다.

[0029] 아울러, 본 발명의 배가스 포화 버퍼 시스템은 배양하고자 하는 광합성 미생물 또는 미세조류에 따라 최적인 pH 조건이 각각 다르기 때문에, 해당 광합성 미생물의 최적 pH에 맞게 배가스의 이산화탄소의 함량, 배가스의 공급속도, 배가스 공급시간, 염기 및 무기 인산염의 농도를 조절하여 조성할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 광합성 미생물은 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 클로렐라 소로키니아나

(Chlorella sorokiniana), 스피룰리나(Spirurlina) 속, 두나리엘라(Dunaliella) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis), 스키조키트리움(Schizochytrium) 속, 크립테코디니움(Crypthecodinium) 속, 클라미도모나스(Chlamydomonas) 속, 네오클로리스(Neochloris) 속과 같은 미세조류와 아파니조메논(Aphanizomenon) 속 또는 시아노박테리아(Cyanobacteria)와 같은 광합성 박테리아인 것을 특징으로 할 수 있으나, $CO_2$를 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물이라면 제한없이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 광합성 미생물 배양에 의해 유용물질을 생성하는 단계를 추가로 포함할 수있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 유용물질은 건강식품, 바이오플라스틱, 베타카로틴, 동위원소 화합물, 아스타잔틴, DHA 오일, 바이오디젤, 바이오에탄올, 토양개량제 또는 생물비료인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0034] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0036] **<실험 재료 및 배양조건>**

[0037] 본 발명에 사용된 균주는 *Haematococcus pluvialis* NIES-144로서 National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan으로부터 구입하였다. 본 실험에 사용된 배지는 NIES-C 및 NIES-N 배지이며 이의 구성성분을 하기 [표 1]에 나타내었다.

*표 1*

[0038]

| NIES-C | | NIES-N | |
|---|---|---|---|
| 성분 | 함량(/L) | 성분 | 함량(/L) |
| $Ca(NO3)_2$ | 0.15 g | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.13 g |
| $KNO_3$ | 0.10 g | KCl | 0.07 g |
| $Na_2$Glycerophosphate $\cdot 5H_2O$ (무기 인산염 버퍼로 대체) | 0.05 g | $Na_2$Glycerophosphate $\cdot 5H_2O$ (무기 인산염 버퍼로 대체) | 0.05 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.04 g | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.04 g |
| Thiamine | 0.01 mg | Thiamine | 0.01 mg |
| Biotin | 0.10 μg | Biotin | 0.10 μg |
| Vitamin B12 | 0.01 μg | Vitamin B12 | 0.01 μg |
| PIV metal solution (per liter)<br>$Na_2EDTA$ 1 g<br>$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.196 g<br>$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.036 g<br>$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.022 g<br>$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mg<br>$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 mg | 3 mℓ | PIV metal solution (per liter)<br>$Na_2EDTA$ 1 g<br>$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.196 g<br>$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.036 g<br>$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.022 g<br>$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mg<br>$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5 mg | 3 mℓ |

[0039] 또한, 자가 영양 조건에서 *H. pluvialis* 대량 배양 공정의 옥외 배양 조건은 아래에 나타내었다.

[0040] **<배양 조건>**

[0041] - NIES-C 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 생장)

[0042] - NIES-N 배지: autotrophic medium (자가영양배지, 목적: 영양 결핍 스트레스를 통한 아스타잔틴 축적 유도)

[0043] - 가스 공급 : 이산화탄소 및 공기 혼합 가스를 기본으로 하며 농도는 각각 air (대조군), 5% $CO_2$, 10% $CO_2$ 및 15% $CO_2$ (v/v)에서 시험하였으며, 배가스는 한국 지역난방공사 판교지사에서 공급받았으며, 이때 배가스에 포함된 $CO_2$ 농도는 약 3~6%로 관찰되었음

[0044] - 주입 유량 : 0.1 vvm (vessel volume per minute)

[0045] - 배양 온도 : 23±3 ℃

[0046] - 광주기 : (대략적으로) 명암주기 12 : 12

[0047] - 반응기 종류 : 5L 부피의 기포탑(bubble column) 형식의 공기 방울을 이용하여 교반하는 관형(tubular)의 투명한 광 생물 반응기

[0048] - 생장 시 광조건 : 50~70 $\mu E/m^2/s$

[0049] - 유도기 시 광조건 : 300~500 $\mu E/m^2/s$

[0050] - 이산화탄소의 화학적 흡착을 이용한 무기 탄소종 버퍼 제작 시 사용되는 염기성 용액 : KOH 각각 0mM (대조군), 10mM, 20mM, 30mM

[0051] - pH 보정 효과 강화를 위한 무기 인산염 버퍼 조성 : (1M 용액 제작 시) $K_2HPO_4$ 163.73g/L와 $KH_4PO_4$ 8.17 g/L의 혼합 용액을 각각 0 mM (대조군, phosphate source로서 $Na_2Glycerophosphate \cdot 5H_2O$ 0.05 g/L 첨가), 0.1 mM, 0.5 mM 그리고 1.0 mM의 농도로 배양액에 주입하여 그 효과를 시험함

[0053] **실시예 1. 중탄산 버퍼의 최적화**

[0054] 하기 도 1에 나타낸 바와 같이 Air, 5% $CO_2$, 10% $CO_2$, 15% $CO_2$ (v/v)를 각각 다른 농도의 강염기 (KOH) 수용액에 공급하여 중탄산 버퍼 수용액을 제조하였다. 이때, 반응기는 광 투과 비닐로 제작된 기포탑 (bubble column) 형태의 반응기를 사용하였으며, 공급 가스 유량은 0.1 vvm로 일정하게 지속적으로 가스를 공급하였다. 강염기 수용액은 반응기 내 pH를 급격히 올리며 이에 따라 이산화탄소는 다음의 화학 반응을 통해 강염기 수용액에 용해된다.

[0055] $CO_2 + OH^- \leftrightarrow HCO_3^-$

[0056] $HCO_3^- + OH^- \leftrightarrow CO_3^- + H_2O$

[0057] 높은 pH 조건에서 이산화탄소의 흡착은 속도 결정 단계이므로 공기 방울의 평균 크기를 감소시켜 반응 표면을 증가시키면 물질 전달(mass transfer) 측면에서 유리하다. 이를 위해 본 발명에서는 다공성 돌 재질로 만들어진 기체 분산기 (sparger)를 사용하였다.

[0058] 이산화탄소 용해 반응은 반응기 내 별다른 유입과 유출 없이 연속적으로 이산화탄소 혼합 가스만 공급되는 상태에서 정상 상태 (steady-state)에 다다르며 이때 반응은 회분식 (batch)으로 12시간 이상 진행된다.

[0059] $CO_2$의 화학적 흡착을 통한 용해 무기 탄소종 용액의 제조 및 미세 조류 배양액의 버퍼 효능을 탐구하기 위하여, 먼저 광 생물 반응기 내 서로 다른 농도의 KOH 수용액을 주입한 후, $CO_2$ 용해 반응이 정상 상태에 다다르도록 24시간 이상 가스를 일정한 유속으로 주입하였으며, 이때 하기 도 1과 같이 bubble column reactor를 설치하여 다양한 농도의 이산화탄소 혼합 가스 및 배가스를 주입했다.

[0060] 도 2는 이산화탄소를 강염기 수용액에 0.1 vvm의 기체 유속으로 12시간 이상 폭기(aeration)시 가스 공급 조건 및 염기 수용액의 농도별 이산화탄소의 화학적 흡착에 따른 pH 및 용해 무기 탄소종 (Dissolved inorganic carbon)의 농도를 나타낸 그래프이다. 이때 공급된 가스 조건은 air (대조군)(도 2A), 5%(도 2B), 10%(도 2C), 및 15% $CO_2$(도 2D) 혼합가스이다.

[0061] 도 2A에 나타난 바와 같이 Air 공급 조건에서 KOH 수용액 (10 mM, 20 mM, 30 mM)의 pH는 12~13으로 매우 높았다. 반면 대조군 (KOH 0 mM) 조건에서 air만 지속적으로 공급 시 pH가 약 6.3으로 저하되는 것을 관찰할 수 있

었다. 반면, 도 2B-D에 나타난 바와 같이 $CO_2$ 혼합 가스 공급 조건에서는 이산화탄소 농도 및 KOH 농도와 관계없이 pH가 일정 범위 (7~8 사이) 내로 수렴하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 이산화탄소 농도 및 KOH 수용액 농도가 증가할수록 용해 무기 탄소종의 농도 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이후 배지 농축액을 주입하고 미세 조류 *H. pluvialis* 세포를 접종하여 약 18일 동안 자가 영양 조건에서 옥외 배양을 실시하였다.

[0062] 도 3은 본 발명에 따라 이산화탄소 흡착에 의해 생성된 용해 탄소종의 농도가 세포 생장에 미치는 영향을 관찰한 결과 그래프이다. 이때 공급된 가스 조건은 air (대조군)(도 3A), 5%(도 3B), 10%(도 3C), 및 15% $CO_2$(도 3D) 혼합가스이다.

[0063] 도 3A에 나타난 바와 같이 Air 공급 조건에서는 세포 생장이 거의 일어나지 않음을 관찰할 수 있었다. 또한, KOH 0 mM인 경우 배양액의 pH는 9.0으로 최적 세포 생장 pH 조건인 7.5보다 매우 높은 값을 보여 세포 생장이 저해될 뿐 아니라 세포 용해(cell lysis)됨을 관찰하였다. 도 3B에 나타난 바와 같이 5% $CO_2$ 혼합 가스 공급 조건하에서 바이오매스 생장이 가장 우수했으며 특히 KOH 수용액 10 mM에서 최종 바이오매스 농도가 1.32 g/L로 세포 생장이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 도 3C에 나타난 바와 같이 10% $CO_2$ 혼합 가스 조건에서도, KOH 수용액 10 mM에서 최종 바이오매스 농도가 0.80 g/L로 가장 우수했으며, 배양액의 pH는 모든 염기성 수용액 조건에서 7.7~7.9 (KOH 0 mM 조건에서는 pH 6.0)로 유지됨을 확인하였다. 또한, 도 3D에 나타난 바와 같이 15% $CO_2$ 혼합 가스 조건에서는, 배양액의 pH가 모든 염기성 수용액 조건에서 6.8~7.3 (대조군인 0 mM KOH는 5.5)이며, 용해 탄소종의 농도가 400~1300mg/L로 매우 높았으며, 이에 따라 세포 생장이 저해됨을 확인하였다.

[0065] **실시예 2. 중탄산/인산염 버퍼 최적화**

[0066] 강염기와 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에 $CO_2$의 화학적 흡착 반응을 유도함으로써 중탄산/인산염 버퍼의 최적 조건을 도출하였다.

[0067] 이때 중탄산 버퍼는 10 mM의 KOH 수용액에 이산화탄소를 용해시켜 제조하였으며, 무기 인산염 버퍼 농도는 각각 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0mM이며 대조군은 무기 인산염 버퍼 없이 10 mM KOH에 $CO_2$ 혼합 가스 (5%, 10%, 15%, 대조군으로 air)를 24시간 이상 폭기(aeration)해서 용해 반응을 진행하였다.

[0068] 도 4는 이산화탄소를 강염기 수용액 및 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 0.1 vvm의 기체 유속으로 12시간 이상 폭기(aeration)시 무기 인산염의 농도별 이산화탄소의 화학적 흡착에 따른 pH 및 용해 무기 탄소종(Dissolved inorganic carbon)의 농도를 나타낸 그래프이다. 이때 공급된 가스 조건은 air (대조군)(도 4A), 5%(도 4B), 10%(도 4C), 및 15% $CO_2$(도 4D) 혼합가스이다.

[0069] 도 4A에 나타난 바와 같이, 대조군인 air 공급 조건에서는 $CO_2$가 거의 용해되지 않았으므로 무기 인산염 버퍼 첨가 시에도 pH는 11.0~12.3으로 상당히 높아 세포 생장에 적합하지 않을을 확인하였다. 또한, 도 4B-D에 나타난 바와 같이 5%, 10%, 15% $CO_2$ 혼합 가스 공급 시에는 무기 인산염 버퍼 첨가와 관계없이 모든 조건에서 pH는 6.8~7.5로 떨어지는 것을 확인하였으나, 15% $CO_2$ 혼합 가스 공급 시에는 용해 탄소종 농도가 410~720 mg/L로 지나치게 높아 세포 생장에 부적합함을 확인하였다.

[0070] 이러한 결과를 통해 강염기 용액 및 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에서 pH 저하는 $CO_2$ 흡착에 의해 이루어지며, 이 과정에서 무기 인산염 버퍼의 영향은 미미함을 암시한다. 또한, 도 4B-D를 통해 $CO_2$ 용해 반응 후 무기 탄소종 농도는 공급되는 $CO_2$ 혼합 가스 농도가 증가할수록 증가하며 무기 인산염 농도가 증가할수록 역시 증가하는 추세를 보임을 확인하였다.

[0071] 다음으로, 강염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 농도에 따른 세포 생장 결과를 관찰하는 실험을 진행하였다. 이때, 10% $CO_2$ 혼합 가스를 공급하였으며 $CO_2$ 흡착을 위한 KOH 수용액의 농도는 각각 0 mM KOH, 10 mM, 20 mM으로 하였다. 또한, 무기 인산염 버퍼의 농도는 0 mM(대조군, phosphate source로서 $Na_2$Glycerophosphate · $5H_2O$ 0.05g/L를 첨가, 도 5A), 0.1 mM(도 5B), 0.5 mM(도 5C), 1.0 mM(도 5D)로 하였으며, NIES-C 배지 stock과 *H. pluvialis* seed를 공급하여 세포 생장을 관찰하였다.

[0072] 실험 결과, 10% $CO_2$ 가스 공급 조건에서 10 mM KOH 강염기 용액 및 0.1 mM 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에 $CO_2$

를 흡착시켜 중탄산/인산염 버퍼를 제조하였을 때 용해 탄소종 농도는 약 420 mg/L이며, 배지 pH는 약 7.2였으며, 세포 생장 또한 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

[0073] 이러한 결과들을 통해 본 발명에 따라 $CO_2$ 용해를 통해 제조된 중탄산 버퍼는 세포 생장에 탄소원으로 활용될 수 있고 pH 완충 효과가 있으나 높은 $CO_2$ 농도는 수용액 내 용해 탄소종 농도를 크게 증가시키고, 과도한 용해 탄소종 농도는 오히려 세포 생장을 저해할 수 있다는 점을 확인하였으며, 무기 인산염 버퍼는 중탄산 버퍼와 같이 세포 생장에 필수 영양인 인을 공급할 뿐 아니라 잔류 무기 인산염 ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$)은 pH를 보정하는 버퍼로 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0075] **실시예 3. 바이오매스와 아스타잔틴 생산성, pH 및 용해 탄소종 농도 비교**

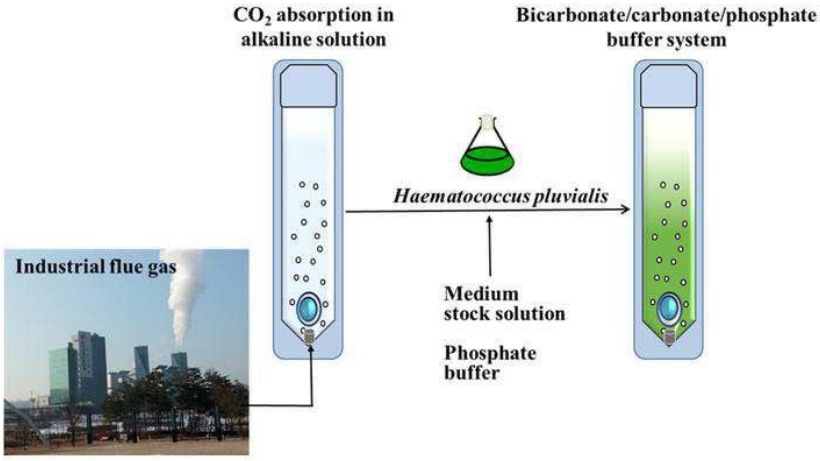
[0076] 다음으로, 종래 사용된 HEPES 버퍼와 본 발명에 따른 버퍼 시스템의 성능을 비교하기 위해 HEPES 버퍼 20 mM과 실시예 2를 통해 미세조류 생장이 가장 우수했던 버퍼 시스템(KOH 10 mM, 무기 인산염 0.1 mM)를 사용하여 60일간 미세조류 배양 실험을 진행하여 바이오매스 생산성 (도 6A), 아스타잔틴 생산성 (도 6B), pH (도 6C), 용해 탄소종 농도 (도 6D)를 비교하였다(도 6). 이때 생장기에는 세포의 광 요구량이 낮으므로 낮은 광도의 광(50~70 μE/$m^2$/s)을 공급하였으며, 아스타잔틴 축적이 이루어지는 유도기에는 세포에게 영양 결핍 스트레스 및 광 스트레스를 유발하기 위해 높은 광도 (300~500 μE/$m^2$/s)의 광을 공급하고 NIES-N 배지를 공급하였다.

[0077] 이를 통해 장기간 세포 배양을 진행했을 때 기존 HEPES 버퍼와 대비 용해 탄소종 농도 및 pH가 일정하게 유지되었으며(도 6C-D) 낮은 광도에서도 본 발명에 따른 버퍼시스템의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산성이 더욱 우수함을 확인하였다(도 6A-B).

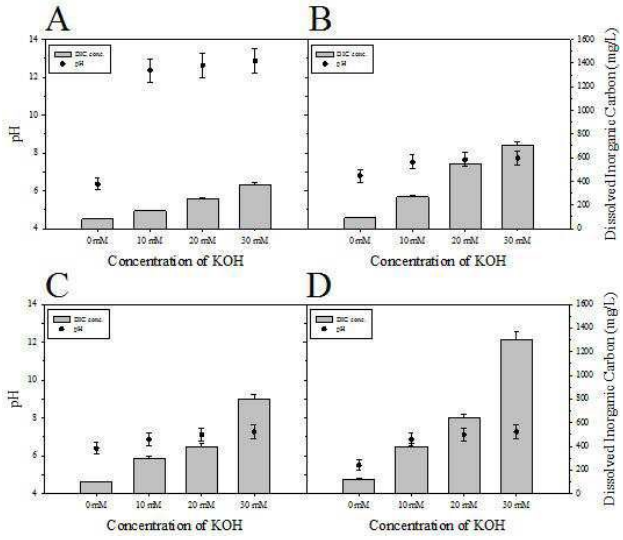
[0078] 이러한 결과를 통해 본 발명은 종래 버퍼로 사용된 HEPES를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고농도 $CO_2$(~10%) 조건에서도 미세 조류 배양이 가능하다는 것을 확인하였는바, 다양한 $CO_2$ 배출 산업체에서 미세 조류를 이용한 생물학적 $CO_2$ 저감 공정에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

## 도면

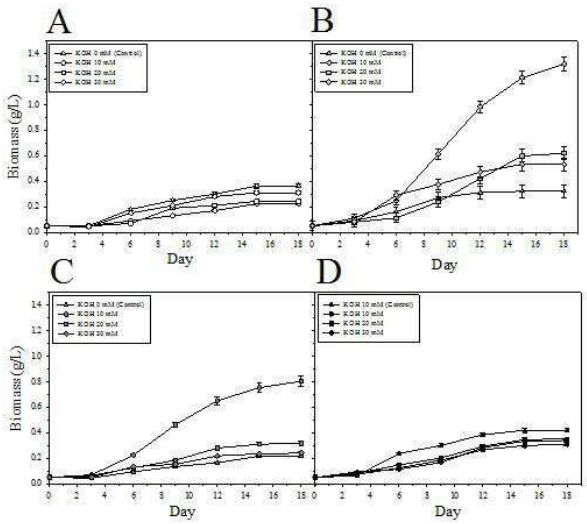
### 도면1



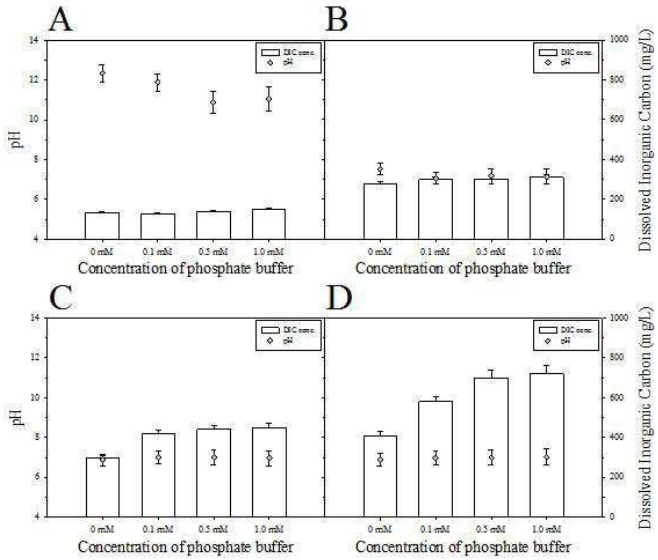
도면2


A
B
C
D
pH
Dissolved Inorganic Carbon (mg/L)
Concentration of KOH
0 mM
10 mM
20 mM
30 mM

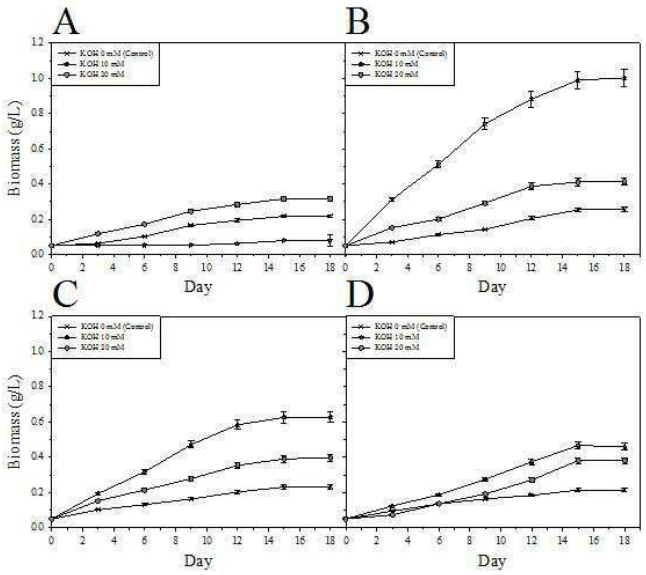
도면3


A
B
C
D
Biomass (g/L)
Day

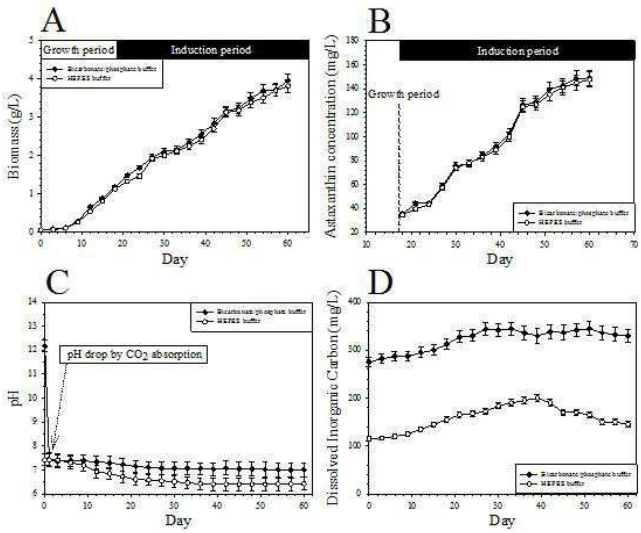
도면4


A
B
C
D
pH
Dissolved Inorganic Carbon (mg/L)
DIC conc.
pH
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
1.0 mM
Concentration of phosphate buffer

도면5


A
B
C
D
Biomass (g/L)
Day
KOH 0 mM (Control)
KOH 10 mM
KOH 20 mM

도면6


A
Growth period
Induction period
Bicarbonate phosphate buffer
HEPES buffer
Biomass (g/L)
Day
B
Induction period
Growth period
Astaxanthin concentration (mg/L)
Day
C
pH drop by $CO_2$ absorption
pH
Day
D
Dissolved Inorganic Carbon (mg/L)
Day