

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 10월 4일 (04.10.2018) **WIPO | PCT**

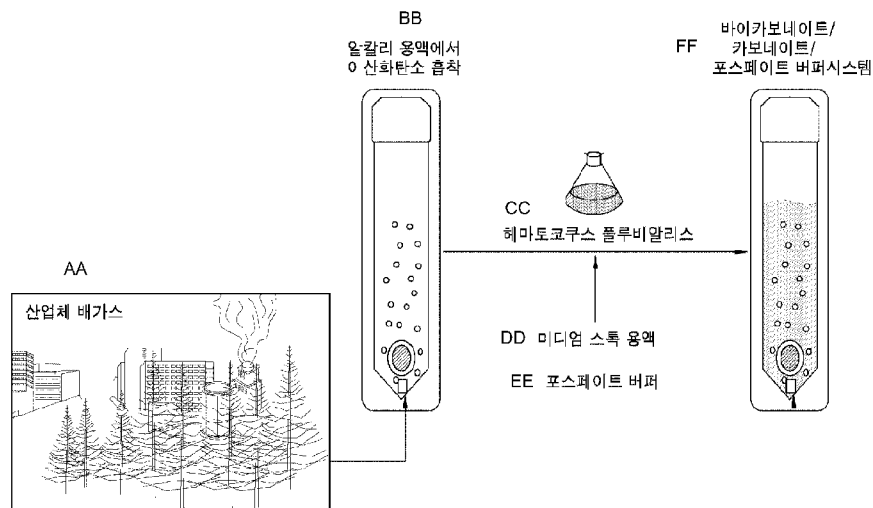


(10) 국제공개번호
WO 2018/182100 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 1/12* (2006.01) *C12P 1/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008029
- (22) 국제출원일: 2017년 7월 26일 (26.07.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0040530 2017년 3월 30일 (30.03.2017) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 심상준 (SIM, Sang Jun); 06276 서울시 강남구 선릉로 221, 301동 803호, Seoul (KR). 최윤영 (CHOI, Yoon Young); 06322 서울시 강남구 선릉로 7, 708동 1501호, Seoul (KR). 전재민 (JOUN, Jae Min); 07029 서울시 동작구 사당로2가길 2-2, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 정은열 (JUNG, Eun Youl); 06173 서울시 강남구 테헤란로103길 9, 제일빌딩 2층 (정앤김 특허법률사무소), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISM CULTURING METHOD USING BICARBONATE BUFFER PREPARED USING CARBON DIOXIDE IN EXHAUST GAS AND INORGANIC PHOSPHATE BUFFER

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



AA ... Industrial exhaust gas
BB ... Adsorb carbon dioxide in alkali solution
CC ... Haematococcus pluvialis
DD ... Medium stock solution
EE ... Phosphate buffer
FF ... Bicarbonate/carbonate/phosphate buffer system

(57) Abstract: The present invention relates to a photosynthetic microorganism culturing method using a bicarbonate buffer, prepared using carbon dioxide in an exhaust gas, and an inorganic phosphate buffer, and more particularly, to a method in which a carbon dioxide-containing exhaust gas is supplied to a mixed solution of a basic aqueous solution and an inorganic phosphate buffer to form an exhaust gas-saturated buffer system, and a culture medium and photosynthetic microorganisms are inoculated to be able to culture photosynthetic microorganisms that generate a useful material. A mixed buffer system of a bicarbonate buffer using carbon dioxide in an exhaust gas



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

and an inorganic phosphate buffer according to the present invention has an excellent buffer action with respect to acidity and at the same time can supply photosynthetic microorganisms with a carbon source and a nutrient source, thus being capable of preventing a reduction in microalgae productivity, and is thus able to prevent air pollution caused by the discharge of exhaust gas, and has an excellent cost-reducing effect compared to the existing HEPES buffer and $\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Therefore, the mixed buffer system can be applied to a mass-culturing process of the photosynthetic microorganism that produces a useful material.

(57) 요약서: 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 구성하고 배지와 광합성 미생물을 접종하여 유용물질을 생성하는 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 $\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 에 비해 비용절감 효과가 뛰어나 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용할 수 있다.

명세서

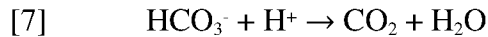
발명의 명칭: 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법 기술분야

- [1] 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.

배경기술

- [2] 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).
- [3] 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 성장을 저해할 우려가 있다.
- [4] $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$
- [5] $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
- [6] 한편, 바이카보네이트(bicarbonate, HCO_3^-)는 광합성의 원료로서 활용할 수 있다. 시아노박테리아 및 미세조류에서 발달되어 온 탄소 농축 매커니즘(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.



[8] 한편, 인(phosphorus)은 미세 조류 성장 및 배양에 있어 또 다른 중요한 영양원이다. 인은 인지질, 뉴클레오티드, 핵산 등의 원료가 되며 에너지 전달(ATP)과 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 중에서 스트레스 환경 및 지질 결핍을 유도하는 것으로 알려져있다(Price, G.D. et al., *J. Exp. Bot.* 59: 1441-1461, 2008). 인은 세포 성장에 필수적인 영양소이므로 세포는 poly phosphate 형태로 인을 세포 내에 축적할 수 있다.

[9] 기존에는 광합성 미생물 배양 시 배양액의 산성화를 방지하기 위해 HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid) 버퍼를 사용하였으며, 인산원은 Na₂Glycerophosphate·5H₂O를 사용하였다. 하지만, HEPES 버퍼와 Na₂Glycerophosphate·5H₂O는 고가이기 때문에 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용하기 부담스럽다는 단점이 있다.

[10] 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 상세한 설명

기술적 과제

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

과제 해결 수단

[12] 상기 과제를 해결하기 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

- [13] 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 $\text{Na}_2\text{Glycerophosphate}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 에 비해 비용절감 효과가 뛰어나 유용물질을 생산하는 광합성 미생물의 대량 배양 공정에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 본 발명에 따른 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 이용한 미세조류 배양 과정에 관한 공정도이다.
- [15] 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.
- [16] 도 3은 본 발명에 따라 이산화탄소 흡착에 의해 생성된 용해 탄소종의 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 관찰한 결과 그래프이다.
- [17] 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.
- [18] 도 5는 강염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 농도에 따른 세포 성장 결과를 나타낸 그래프이다.
- [19] 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.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [20] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [21]
- [22] 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.
- [23] 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 성장 저해효과가 일어나지 않아 미생물로부터 바이오매스를 포함한 유용물질을 안정적으로 생산할 수 있다는 것을 확인하였다.

- [24] 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.
- [25] 본 발명에 있어서, 상기 이산화탄소는 배가스에서 탈진, 탈황, 탈질소 및 탈염소 중 적어도 2가지 이상의 단계를 포함하는 정화과정을 거쳐 얻어지는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명에 있어서, 상기 염기는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아(NH₄OH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂) 또는 수산화마그네슘(Mg(OH)₂)일 수 있다.
- [27] 본 발명에 있어서, 상기 무기 인산염 버퍼 용액은 K₂HPO₄와 KH₂PO₄의 혼합용액일 수 있다.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 본 발명에 따라 용해된 이산화탄소는 HCO₃⁻/CO₃²⁻ 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 CO₂ 농도에서는 pH 보정 효과가 저해되는바, 본 발명에서는 상기 중탄산 버퍼 시스템(HCO₃⁻/CO₃²⁻)에 무기 인산염 버퍼(H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻)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.
- [33] 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 공급 속도, 배가스 공급시간, 염기 및 무기 인산염의 농도를 조절하여 조성할 수 있다.
- [34] 본 발명에 있어서, 상기 광합성 미생물은 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 스피룰리나(*Spirulina*) 속, 두나리엘라(*Dunaliella*) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 스킴조키텐트리움(*Schizochytrium*) 속, 크립테코디니움(*Cryptocodinium*) 속, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속, 네오클로리스(*Neochloris*) 속과 같은 미세조류와 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 속 또는 시아노박테리아(*Cyanobacteria*)와 같은 광합성 박테리아인 것을 특징으로 할 수 있으나, CO₂를 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물이라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 광합성 미생물 배양에 의해 유용물질을 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.
- [36] 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.

발명의 실시를 위한 형태

- [37] 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.

[38]

[39] <실험 재료 및 배양조건>

- [40] 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.

[41] [표1]

NIES-C		NIES-N	
성분	함량(/L)	성분	함량(/L)
Ca(NO ₃) ₂	0.15 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.13 g
KNO ₃	0.10 g	KCl	0.07 g
Na ₂ Glycerophosphate·5H ₂ O(무기 인산염 버퍼로 대체)	0.05 g	Na ₂ Glycerophosphate·5H ₂ O(무기 인산염 버퍼로 대체)	0.05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	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)Na ₂ EDTA 1 gFeCl ₃ ·6H ₂ O 0.196 gMnCl ₂ ·4H ₂ O 0.036 gZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.022 gCoCl ₂ ·6H ₂ O 4 mgNa ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 2.5 mg	3 ml	PIV metal solution(per liter)Na ₂ EDTA 1 gFeCl ₃ ·6H ₂ O 0.196 gMnCl ₂ ·4H ₂ O 0.036 gZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.022 gCoCl ₂ ·6H ₂ O 4 mgNa ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 2.5 mg	3 ml

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

[43] <배양 조건>

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

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

[46] - 가스 공급 : 이산화탄소 및 공기 혼합 가스를 기본으로 하며 농도는 각각 air (대조군), 5% CO₂, 10% CO₂ 및 15% CO₂ (v/v)에서 시험하였으며, 배가스는 한국 지역난방공사 판교지사에서 공급받았으며, 이때 배가스에 포함된 CO₂ 농도는 약 3~6%로 관찰되었음

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

[48] - 배양 온도 : 23±3 °C

[49] - 광주기 : (대략적으로) 명암주기 12 : 12

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

[51] - 생장 시 광조건 : 50~70 µE/m²/s

[52] - 유도기 시 광조건 : 300~500 µE/m²/s

- [53] - 이산화탄소의 화학적 흡착을 이용한 무기 탄소종 버퍼 제작 시 사용되는 염기성 용액 : KOH 각각 0mM (대조군), 10mM, 20mM, 30mM
- [54] - pH 보정 효과 강화를 위한 무기 인산염 버퍼 조성 : (1M 용액 제작 시) K_2HPO_4 163.73g/L와 KH_2PO_4 8.17 g/L 의 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
- [55] 실시예 1. 중탄산 버퍼의 최적화
- [56] 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.
- [57] $CO_2 + OH^- \leftrightarrow HCO_3^-$
- [58] $HCO_3^- + OH^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + H_2O$
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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 있었다. 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.

[64] 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% CO₂(도 3D) 혼합가스이다.

[65] 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 성장 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% CO₂ 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% CO₂ 혼합 가스 조건에서도, KOH 수용액 10 mM에서 최종 바이오매스 농도가 0.80 g/L로 가장 우수했으며, 배양액의 pH는 모든 혐기성 수용액 조건에서 7.7~7.9 (KOH 0 mM 조건에서는 pH 6.0)로 유지됨을 확인하였다. 또한, 도 3D에 나타난 바와 같이 15% CO₂ 혼합 가스 조건에서는, 배양액의 pH가 모든 혐기성 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.

[66]

[67] 실시예 2. 중탄산/인산염 버퍼 최적화

[68] 강염기와 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에 CO₂의 화학적 흡착 반응을 유도함으로써 중탄산/인산염 버퍼의 최적 조건을 도출하였다.

[69] 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 CO₂ 혼합 가스 (5%, 10%, 15%, 대조군으로 air)를 24시간 이상 폭기(aeration)해서 용해 반응을 진행하였다.

[70] 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% CO₂(도 4D) 혼합가스이다.

[71] 도 4A에 나타난 바와 같이, 대조군인 air 공급 조건에서는 CO₂가 거의 용해되지 않았으므로 무기 인산염 버퍼 첨가 시에도 pH는 11.0~12.3으로 상당히 높아 세포 생장에 적합하지 않음을 확인하였다. 또한, 도 4B-D에 나타난 바와 같이 5%, 10%, 15% CO₂ 혼합 가스 공급 시에는 무기 인산염 버퍼 첨가와 관계없이 모든 조건에서 pH는 6.8~7.5로 떨어지는 것을 확인하였으나, 15% CO₂ 혼합 가스 공급

시에는 용해 탄소중 농도가 410~720 mg/L로 지나치게 높아 세포 성장에 부적합함을 확인하였다.

- [72] 이러한 결과를 통해 강염기 용액 및 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에서 pH 저하는 CO₂ 흡착에 의해 이루어지며, 이 과정에서 무기 인산염 버퍼의 영향은 미미함을 암시한다. 또한, 도 4B-D를 통해 CO₂ 용해 반응 후 무기 탄소중 농도는 공급되는 CO₂ 혼합 가스 농도가 증가할수록 증가하며 무기 인산염 농도가 증가할수록 역시 증가하는 추세를 보임을 확인하였다.
- [73] 다음으로, 강염기 수용액과 무기 인산염 버퍼의 농도에 따른 세포 성장 결과를 관찰하는 실험을 진행하였다. 이때, 10% CO₂ 혼합 가스를 공급하였으며 CO₂ 흡착을 위한 KOH 수용액의 농도는 각각 0 mM KOH, 10 mM, 20 mM으로 하였다. 또한, 무기 인산염 버퍼의 농도는 0 mM(대조군, phosphate source로서 Na₂ Glycerophosphate·5H₂O 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 성장을 관찰하였다.
- [74] 실험 결과, 10% CO₂ 가스 공급 조건에서 10 mM KOH 강염기 용액 및 0.1 mM 무기 인산염 버퍼 혼합 수용액에 CO₂를 흡착시켜 중탄산/인산염 버퍼를 제조하였을 때 용해 탄소중 농도는 약 420 mg/L이며, 배지 pH는 약 7.2였으며, 세포 성장 또한 가장 우수함을 확인할 수 있었다.
- [75] 이러한 결과들을 통해 본 발명에 따라 CO₂ 용해를 통해 제조된 중탄산 버퍼는 세포 성장에 탄소원으로 활용될 수 있고 pH 완충 효과가 있으나 높은 CO₂ 농도는 수용액 내 용해 탄소중 농도를 크게 증가시키고, 과도한 용해 탄소중 농도는 오히려 세포 성장을 저해할 수 있다는 점을 확인하였으며, 무기 인산염 버퍼는 중탄산 버퍼와 같이 세포 성장에 필수 영양인 인을 공급할 뿐 아니라 잔류 무기 인산염 (H₂PO₄/HPO₄²⁻)은 pH를 보정하는 버퍼로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [76]
- [77] **실시예 3. 바이오매스와 아스타잔틴 생산성, pH 및 용해 탄소중 농도 비교**
- [78] 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 60 일간 미세조류 배양 실험을 진행하여 바이오매스 생산성 (도 6A), 아스타잔틴 생산성 (도 6B), pH (도 6C), 용해 탄소중 농도 (도 6D)를 비교하였다(도 6). 이때 생장기에는 세포의 광 요구량이 낮으므로 낮은 광도의 광 (50~70 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)을 공급하였으며, 아스타잔틴 축적이 이루어지는 유도기에는 세포에게 영양 결핍 스트레스 및 광 스트레스를 유발하기 위해 높은 광도 (300~500 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)의 광을 공급하고 NIES-N 배지를 공급하였다.
- [79] 이를 통해 장기간 세포 배양을 진행했을 때 기존 HEPES 버퍼와 대비 용해 탄소중 농도 및 pH가 일정하게 유지되었으며(도 6C-D) 낮은 광도에서도 본 발명에 따른 버퍼시스템의 바이오매스 및 아스타잔틴 생산성이 더욱 우수함을

확인하였다(도 6A-B).

- [80] 이러한 결과를 통해 본 발명은 종래 버퍼로 사용된 HEPES를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고농도 CO₂(~10%) 조건에서도 미세 조류 배양이 가능하다는 것을 확인하였는바, 다양한 CO₂ 배출 산업체에서 미세 조류를 이용한 생물학적 CO₂ 저감 공정에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

- [81] 본 발명에 따르면 종래 버퍼로 사용되어 온 HEPES를 대체할 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 CO₂ 배출 산업체에서 미세 조류를 이용한 생물학적 CO₂ 저감 공정에 효과적으로 활용할 수 있다.

청구범위

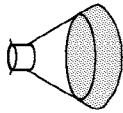
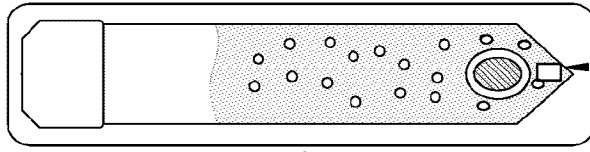
- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 제조된 중탄산 버퍼, 및 무기 인산염 버퍼를 활용한 광합성 미생물의 배양방법:
(a) 이산화탄소를 함유하는 배가스를 염기 수용액과 무기 인산염 버퍼 용액의 혼합용액에 공급하여 이산화탄소 용해를 통한 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 (combined bicarbonate/phosphate) 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및
(b) 상기 조성된 바이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 광합성 미생물을 접종한 다음, 이산화탄소 함유 배가스를 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(NH₄OH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂) 또는 수산화마그네슘(Mg(OH)₂)인 것을 특징으로 하는 배양방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 무기 인산염 버퍼 용액은 K₂HPO₄와 KH₄PO₄의 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(*Spirulina*) 속, 두나리엘라(*Dunaliella*) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 스킨조키트리움(*Schizochytrium*) 속, 크립테코디니움(*Cryptocodinium*) 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.

[도1]

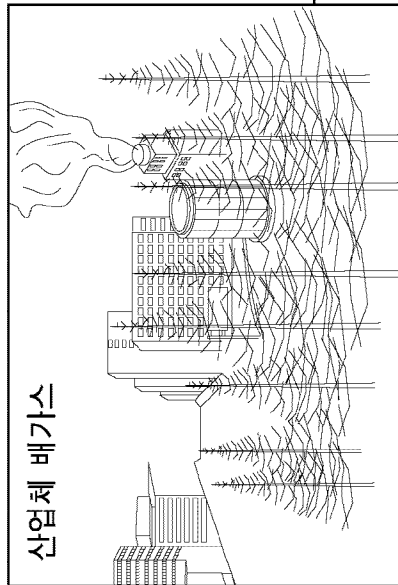
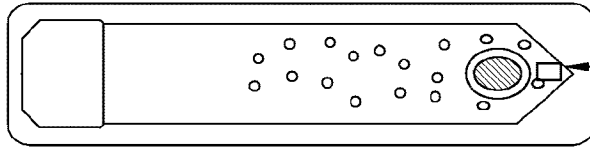
바이카보네이트/
카보네이트/
포스페이트 버퍼시스템

알칼리 용액에서
이산화탄소 흡착



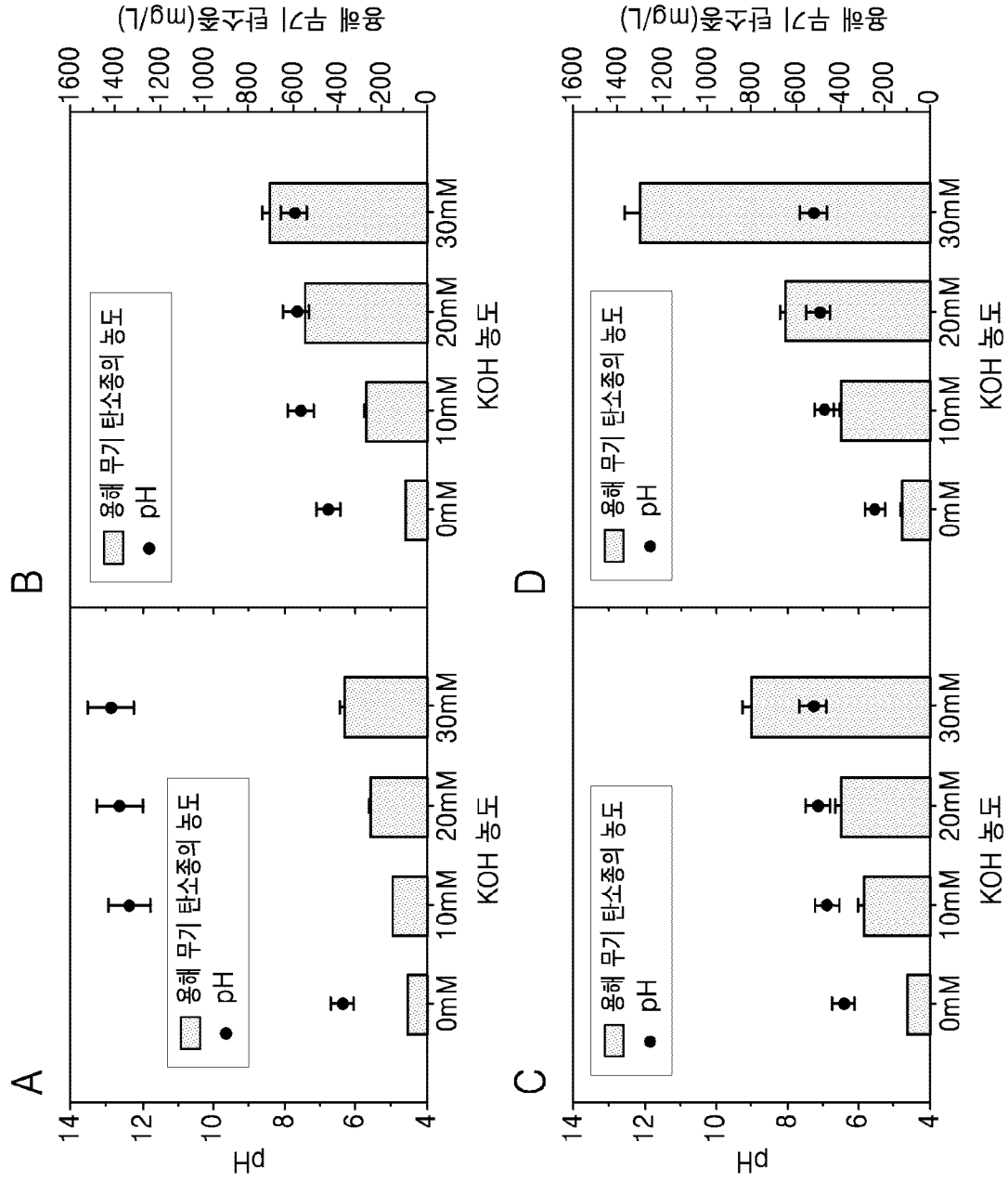
헤마토크쿠스 플루비알리스

미디엄 스톱 용액
포스페이트 버퍼

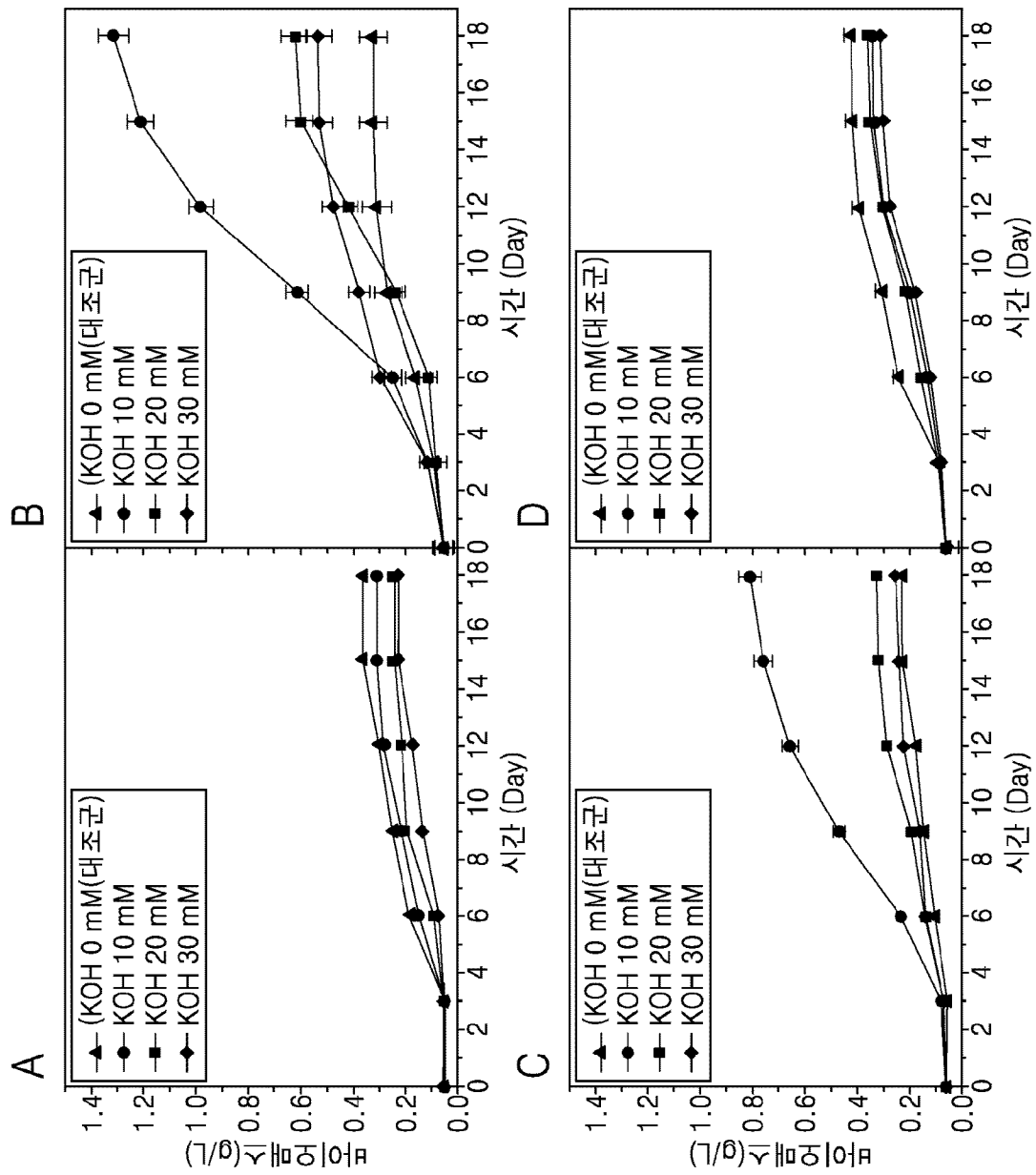


산업체 배가스

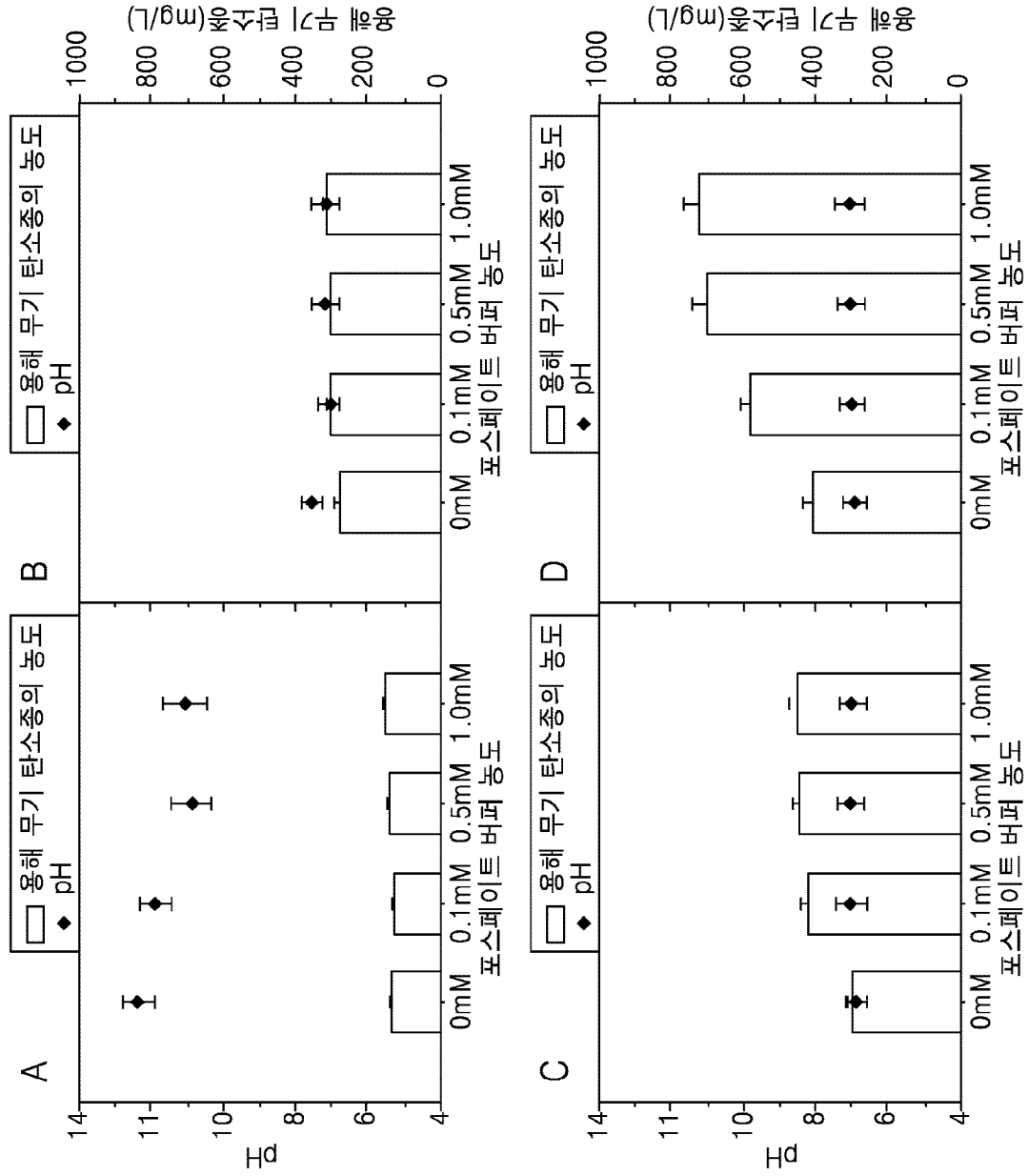
[도2]



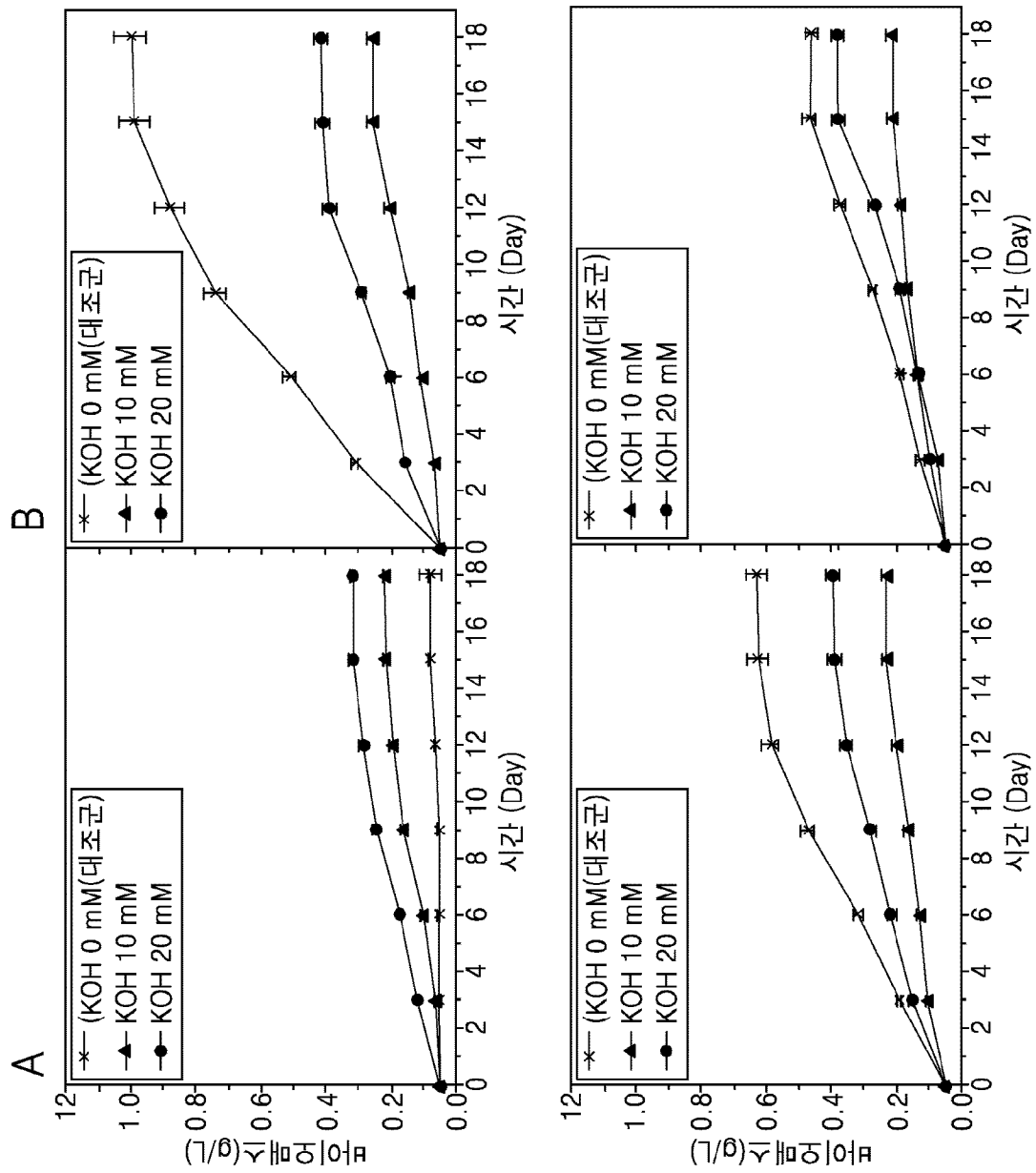
[도3]



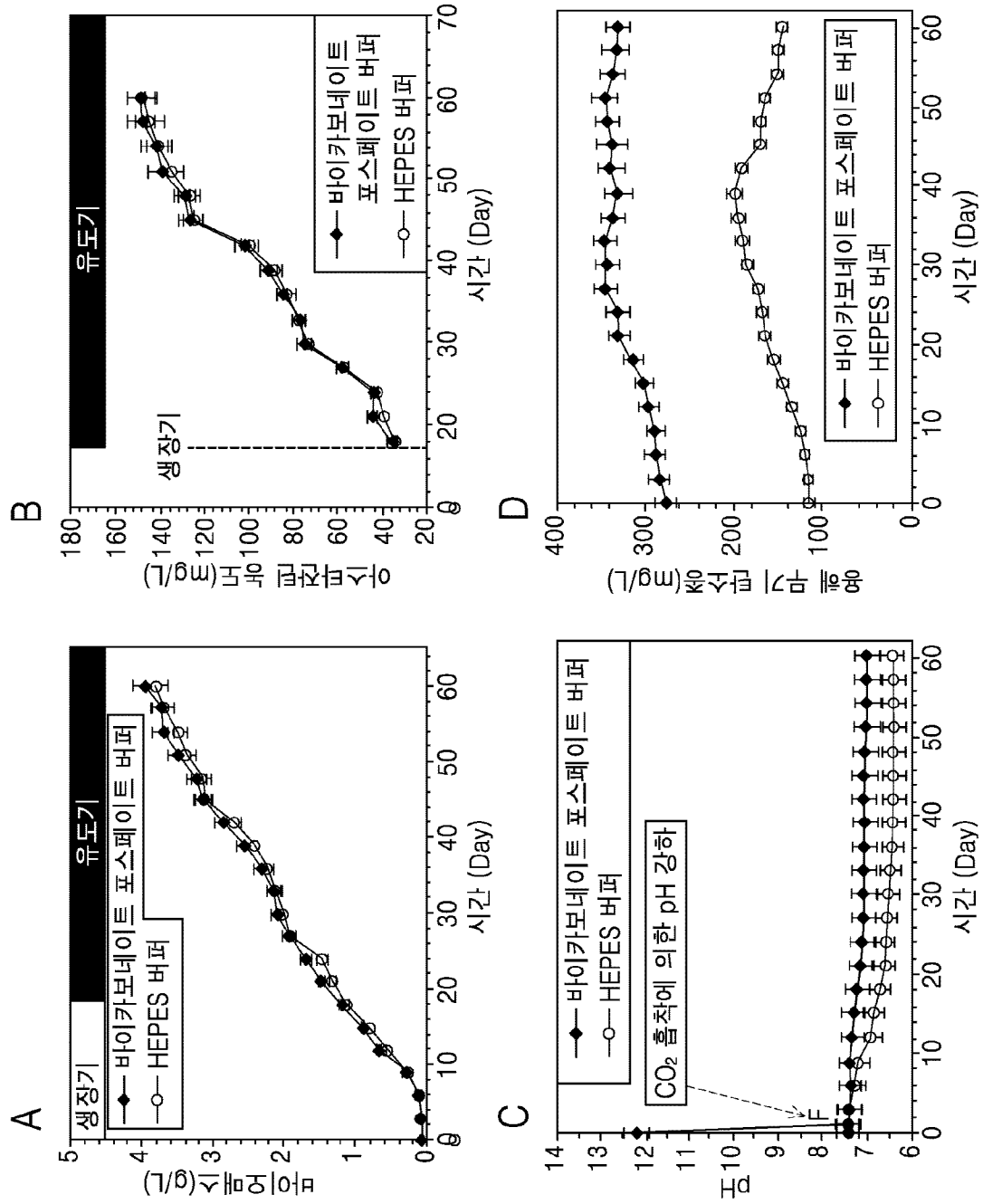
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12P 1/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/12; C12M 1/00; B01D 53/84; C02F 3/34; C05F 11/00; C12N 1/20; C12P 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: exhaust gas, carbon dioxide, microalgae, bicarbonate buffer, inorganic phosphate buffer, bicarbonate/carbonate/phosphate buffer system

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0021100 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 27 February 2017 See claims 1-7.	1-9
Y	US 2013-0319059 A1 (CHEN, S. et al.) 05 December 2013 See abstract; example 2; paragraph [0053]; figure 1.	1-9
Y	BAMBA, B. et al., "Photobioreactor-based Procedures for Reproducible Small-scale Production of Microalgal Biomasses", Journal of Algal Biomass Utilization, 2014, vol. 5, no. 1, pages 1-14 See pages 3-4.	1-9
A	KR 10-1122986 B1 (KOREA ENVIRONMENT CORPORATION) 12 March 2012 See claims 1-2.	1-9
A	AISHVARYA, V. et al., "Enhanced Inorganic Carbon Uptake by Chlorella sp. IMMTCC-2 under Autotrophic Conditions for Lipid Production and CO ₂ Sequestration", Journal of Applied Phycology, 2012, vol. 24, pages 1455-1463 See the entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 NOVEMBER 2017 (22.11.2017)	Date of mailing of the international search report 24 NOVEMBER 2017 (24.11.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CHOI, Y. Y. et al., "Development of Large-scale and Economic pH Control System for Outdoor Cultivation of Microalgae Haematococcus Pluvialis Using Industrial Flue Gas", Bioresource Technology, 2017 (Online publication date: 26 May 2017), vol. 244, pages 1235-1244 See abstract; page 1236, right column, section 2.3.2.; page 1237, section 3.2.; figures 1 and 4; table 1.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0021100 A	27/02/2017	KR 10-1731554 B1	28/04/2017
US 2013-0319059 A1	05/12/2013	CN 103502427 A	08/01/2014
		WO 2012-078970 A2	14/06/2012
		WO 2012-078970 A3	16/08/2012
KR 10-1122986 B1	12/03/2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/12(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12P 1/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/12; C12M 1/00; B01D 53/84; C02F 3/34; C05F 11/00; C12N 1/20; C12P 1/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:배가스, 이산화탄소, 미세조류, 중탄산 버퍼, 무기 인산염 버퍼, 마이카보네이트/카보네이트/포스페이트 버퍼 시스템

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2017-0021100 A (고려대학교 산학협력단) 2017.02.27 청구항 1-7 참조.	1-9
Y	US 2013-0319059 A1 (CHEN, S. 등) 2013.12.05 초록; example 2; 단락 [0053]; 도면 1 참조.	1-9
Y	BAMBA, B. 등. 'Photobioreactor-based procedures for reproducible small-scale production of microalgal biomasses', Journal of Algal Biomass Utilization, 2014, 제5권, 제1호, 1-14 페이지 페이지 3-4 참조.	1-9
A	KR 10-1122986 B1 (한국환경공단) 2012.03.12 청구항 1-2 참조.	1-9
A	AISHVARYA, V. 등, 'Enhanced inorganic carbon uptake by Chlorella sp. IMMTCC-2 under autotrophic conditions for lipid production and CO2 sequestration', Journal of Applied Phycology, 2012, 제24권, 1455-1463 페이지 전체 문헌 참조.	1-9

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 11월 22일 (22.11.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 11월 24일 (24.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



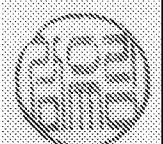
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	CHOI, Y. Y. 등, ‘Development of large-scale and economic pH control system for outdoor cultivation of microalgae Haematococcus pluvialis using industrial flue gas’, Bioresource Technology, 2017 (온라인공개일: 2017.05.26), 제244권, 1235-1244 페이지 초록; 페이지 1236, 우컬럼, 섹션 2.3.2.; 페이지 1237, 섹션 3.2.; 도면 1 및 4; 표 1 참조.	1-9

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0021100 A	2017/02/27	KR 10-1731554 B1	2017/04/28
US 2013-0319059 A1	2013/12/05	CN 103502427 A	2014/01/08
		WO 2012-078970 A2	2012/06/14
		WO 2012-078970 A3	2012/08/16
KR 10-1122986 B1	2012/03/12	없음	