



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0049804
(43) 공개일자 2009년05월19일

(51) Int. Cl.

C12P 19/04 (2006.01) C12P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0116103

(22) 출원일자 2007년11월14일

심사청구일자 2007년11월14일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

심상준

서울 강남구 도곡2동 527번지 도곡텍슬아파트 301동 803호

김준표

경기 수원시 장안구 율전동 433-124번지 104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영관

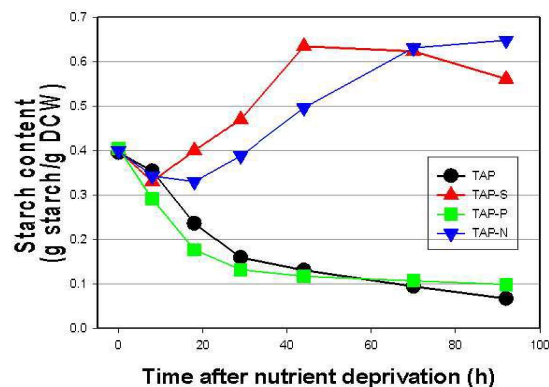
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 녹조류 배양에서 주요 성장원소 결핍을 통한 녹말의 축적강화법

(57) 요약

본 발명은 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양하여 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류, 상기 조류를 포함하는 동물 사료, 상기 조류가 생산하는 녹말을 원료로 이용하여 생산되는 바이오에너지, 및 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키기 위한, 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이진원

서울 송파구 오륜동 89 올림픽선수기자촌아파트
201동 1601호

이재화

경남 김해시 장유면 삼문리 쉼마을
부영그린타운7차 406-102호

특허청구의 범위

청구항 1

질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양하는 것을 특징으로 하는 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조류는 녹조류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 녹조류는 클라미도모나스 레인하르티아이 (*Chlamydomonas reinhardtii*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조류 배양용 배지는 질소 또는 황 성분이 결핍된 TAP 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조류 세포 내 녹말 생산을 20% 이상 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조류의 배양은 22-24℃의 온도에서, 150-250 mol/m²s의 빛 세기로 90-100시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류.

청구항 8

제7항의 조류를 포함하는 동물 사료.

청구항 9

제7항의 조류가 생산하는 녹말을 원료로 이용하여 생산되는 바이오에너지.

청구항 10

조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키기 위한, 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 조류는 녹조류이며, 배지는 질소 또는 황 성분이 결핍된 TAP 배지인 것을 특징으로 하는 배지.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 녹조류는 클라미도모나스 레인하르티아이 (*Chlamydomonas reinhardtii*)인 것을 특징으로 하는 배지.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 녹조류 배양에서 주요 성장원소 결핍을 통한 녹말의 축적 강화법에 관한 것으로서, 구체적으로는 질

소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양하여 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류, 상기 조류를 포함하는 동물 사료, 상기 조류가 생산하는 녹말을 원료로 이용하여 생산되는 바이오에너지, 및 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키기 위한, 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 바이오매스란 태양에너지를 받는 식물과 미생물의 광합성에 의하여 생성되는 식물체, 균체와 이를 먹고 살아가는 동물체를 포함하는 생물 유기체를 일컫는다. 따라서, 바이오매스 자원은 곡물, 감자류를 포함하는 전분질계의 자원과 초본, 임목과 벗짚, 왕겨와 같은 농부수산물물을 포함하는 셀룰로스계의 자원, 그리고, 사탕수수, 사탕무우와 같은 당질계의 자원은 물론이고 가축의 분뇨, 사체와 미생물의 균체를 포함하는 동물 단백질계의 자원 그리고 이들에서 파생하는 종이, 음식찌꺼기 등의 유기성 폐기물을 통틀어 포함하게 되는 것이다. 이와 같은 바이오매스 자원을 에너지화한 것을 바이오 에너지라 하며 전환, 이용의 방법은 펄프의 사용에서 보는바와 같이 직접 연소하여 열을 얻는 방법, 이를 열분해 하거나 가스화하여 숯이나 가연성 가스 등을 얻는 열화학적 방법과 혐기성 발효를 하여 메탄가스를 얻거나 당화하여 에탄올과 같은 고급 액체연료를 얻는 등과 같은 생물학적 방법이 있다. 그 외에도 유지작물을 채배하여 식물성 기름을 생산하고 이를 가공하여 자동차용 경유를 얻는 바이오디젤 등 여러 가지 형태의 에너지를 얻을 수 있다.
- <3> 이렇게 바이오에너지로서 녹조류를 이용하여 바이오매스를 다량 확보할 수 있다.
- <4> 조류(algae)는 약 40,000 종의 많은 종류가 알려져 있는 매우 다양한 특성을 지닌 생물군으로 미세조류 배양의 가장 큰 장점은 물과 이산화탄소, 빛만 있으면 성장과 번식을 할 수 있다는 점이다. 또한 다른 광합성 작물보다 성장속도가 매우 빠르며, 이산화탄소 고정화 속도도 매우 빨라 대기 중 이산화탄소를 저감하여 지구 온난화를 방지할 수도 있다. 그리고 작물 생산에 적합하지 않은 염도 농도가 높거나 강한 알칼리 등의 극한 환경에서도 성장 가능하여 지역에 제한을 받지 않고 녹조류를 배양하여 에너지원으로 이용할 수 있다.
- <5> 일반적으로 녹조류는 빛이 있으면 광합성을 하여 이산화탄소를 고정화하여 녹말을 세포내에 축적을 하고, 빛이 없을 때 녹말을 분해한다. 이렇게 녹조류 세포가 성장하면서 세포내 녹말을 점점 축적하게 되는데, 이러한 녹말을 다른 균주의 탄소원으로 공급해 주어, 에탄올이나 수소, 메탄 등 바이오에너지를 생산하는데 이용할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명에서는 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 조류 배양용 배지에서 주요 성장 원소의 결핍을 통해 세포 내 녹말 축적량을 강화하는 방법을 개발하고자 한다.

과제 해결수단

- <7> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양하여 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <8> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류를 제공한다.
- <9> 또한, 본 발명은 상기 조류를 포함하는 동물 사료를 제공한다.
- <10> 또한, 본 발명은 상기 조류가 생산하는 녹말을 원료로 이용하여 생산되는 바이오에너지를 제공한다.
- <11> 또한, 본 발명은 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키기 위한, 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지를 제공한다.

효 과

- <12> 본 발명의 미세조류에서 주요 성장 요소의 결핍을 이용한 세포내 녹말 생산 극대화 방법은 바이오매스 g 당 녹말의 함유량을 증가시킬 수 있기 때문에 이를 이용하여 동물 사료, 다른 균주의 탄소원으로 공급해 주어, 에탄올이나 수소, 메탄 등 바이오에너지를 생산하는데 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양하는 것을 특징으로 하는 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <14> 본 발명은 주요 원소 결핍 배지를 이용하여 미세조류의 세포내 녹말 축적량을 증가시키는 것이다. 구체적으로는, 본 발명에서는 녹조류 중 상대적으로 세포내 녹말 함유량이 많은 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 균주를 선별하여, 성장시킨 후 배양액에 질소 또는 황 성분을 결핍시켜 녹말의 축적량을 증대시켰다. 따라서, 본 발명의 방법에서, 상기 조류는 바람직하게는 녹조류일 수 있으며, 상기 녹조류는 바람직하게는 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- <15> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 조류 배양용 배지는 질소 또는 황 성분이 결핍된 TAP 배지(Tris-acetate-phosphate 배지; NH_4Cl , 0.4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05g; K_2HPO_4 , 0.108g; KH_2PO_4 , 0.056g; Tris, 2.42g; Gracial acetic acid, 1ml; Trace elements 1ml을 1L의 증류수에 넣어서 만들었다.)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 조류 세포 내 녹말 생산을 20% 이상 증가시키는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 조류의 배양은 22-24℃의 온도에서, $150\text{--}250 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ 의 빛 세기로 90-100시간 동안 배양할 수 있으며, 바람직하게는 23℃의 온도에서, $200 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ 의 빛 세기로 96시간 동안 배양할 수 있다.
- <16> 첨부한 도 1부터 도 3까지는 클라미도모나스 레인하르티 세포를 이용하여 각 주요 원소가 결핍된 배지를 이용하여 세포내 녹말을 극대화하는 방법을 보여준 결과이다. 도 3에서 보여준 것처럼, TAP-P에서는 녹말의 증가가 보이지 않았지만, TAP-S와 TAP-N의 경우에는 세포 g당 약 60% 이상을 녹말로 축적함을 알 수 있었다. 따라서 배지 내에 질소와 황을 결핍시켜 세포내 녹말의 양을 20% 이상 증가시킬 수 있었다. 이 방법은 동물 사료, 다른 균주의 탄소원으로 활용이 가능하여 에탄올이나 수소, 메탄 등 바이오에너지를 생산하는데 주요한 바이오매스로 이용할 수 있다.
- <17> 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류를 제공한다. 상기 조류는 바람직하게는 세포내 녹말의 양이 20% 이상 증가될 수 있다. 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지에서 조류를 배양함으로써 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시킨 후, 상기 녹말 생산이 증가된 조류로부터 녹말을 분리 및 정제하는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 녹말을 분리 및 정제할 수 있다.
- <18> 본 발명은 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포 내 녹말 생산이 증가된 조류를 포함하는 동물 사료를 제공한다. 상기 동물 사료에는 상기 조류 이외에도 통상적으로 동물 사료에 포함되는 성분을 포함할 수 있다.
- <19> 본 발명은 또한, 본 발명의 조류가 생산하는 녹말을 원료로 이용하여 생산되는 바이오에너지를 제공한다. 상기 녹말을 다른 균주의 탄소원으로 공급해 주어, 에탄올, 수소 또는 메탄 등의 바이오에너지를 생산할 수 있다.
- <20> 본 발명은 또한, 조류 세포 내 녹말 생산을 증가시키기 위한, 질소 또는 황 성분이 결핍된 조류 배양용 배지를 제공한다. 상기 배지는 바람직하게는, 질소 또는 황 성분이 결핍된 녹조류 배양용 배지이며, 더욱 바람직하게는 질소 또는 황 성분이 결핍된 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 배양용 배지이며, 더 더욱 바람직하게는 질소 또는 황 성분이 결핍된 TAP 배지이다.
- <21> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <22> 실시예
- <23> <실시예 1> 녹조류 배양에서 주요 성장원소 결핍을 통한 세포질량 변화
- <24> 주요원소 결핍을 위한 세포 확보를 위해, 먼저 클라미도모나스 레인하르티 (*C. reinhardtii*) 세포를 TAP 배지에 배양을 한 후, 늦은 지수성장기 때 세포를 원심분리기(2000 rpm, 10분)를 이용하여 수확하였다. 이렇게 수확한 세포는 100 ml serum bottle에 담겨져 TAP 배지에서 주요 성장 원소를 제거한 성장배지(TAP-S, TAP-P, TAP-N)에 수차례 씻겨낸 후, $200 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ 의 빛 세기로 96시간동안 배양하였다. 이 때 배양 온도는 23℃였다.
- <25> 각 성분 결핍 후 OD 값을 살펴보면 (도 1), TAP와 TAP-P 배지에서의 OD 값은 30시간까지 각각 2.35와 2.5까지

증가하였으며, 그 이후로는 점점 감소하였다 (여기서 TAP에 세포를 재배양한 것은, 단지 빛 세기를 증가했을 때의 영향을 알아보기 위한 척도로서 사용된다). 또한 TAP-S에서는 20시간에 최대 값을 가졌다가 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. TAP-N에서는 30시간까지 급격히 증가하다가 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 세포건조중량 (Dry Cell Weight: DCW)는 30시간까지는 동일하게 증가하다가, TAP-S와 TAP-N은 급격히 감소하였고, TAP는 72시간까지 증가하다가 그 이후로 감소하였고, TAP-P는 30시간 이후로 점차 감소하였다.

<26> <실시예 2> 녹조류 배양에서 주요 성장원소 결핍을 통한 녹말 축적 강화

<27> 각 원소 결핍 후 녹말 양을 살펴보면, TAP와 TAP-P에서는 초기에 약간 증가하다가 그 양이 점점 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 이와 다르게 TAP-S와 TAP-N에서는 녹말 양이 40 시간까지 증가하여 0.4 g/l 까지 도달한 후, 점차 감소함을 알 수 있었다. 이는 TAP와 TAP-P에서는 일반적인 성장에 의해 세포의 개체 수는 늘어나지만 녹말 축적은 하지 않은 것으로 사료된다. 그러나 반대로 TAP-S와 TAP-N에서는 세포들이 녹말을 축적하고, 40시간 이후에는 세포의 생존을 유지하기 위해 녹말을 분해하여 탄소원으로 사용하기 때문에 녹말 양이 점점 감소하는 것으로 사료된다 (도 2).

<28> 미세조류를 고농도 배양 후, 확보한 바이오매스를 다른 균주의 탄소원으로 사용하기 위해서는 세포를 고농도로 키우든지, 세포내 축적하고 있는 녹말의 양을 증가시키면 된다. 우리는 탄소원으로 사용하기 위한 바이오매스 확보를 위해 세포당 녹말의 축적양 극대화에 주력하였다. 따라서 앞에서는 배양액 1리터당 녹말 축적량을 보인 반면, 이 그래프에서는 세포 g당 녹말 g을 환산해 보았다 (도 3). TAP와 TAP-P에서는 세포가 분열하고 성장하는데 필요한 필수원소들이 풍부하게 존재하기 때문에 지속적인 세포분열이 일어나 세포질량은 증가하는 반면, 세포내 녹말양은 축적되지 않아 세포 그램당 녹말양은 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포가 녹말의 축적보다는 개체 수 증가에 우선순위를 둔 것으로 사료된다.

<29> 그러나 TAP-S와 TAP-N의 경우에는 세포의 개체수를 늘리는 성장 보다는 생존을 위해 녹말을 축적하는 것을 우선으로 하여 세포 g당 약 60% 이상을 녹말로 축적함을 알 수 있었다. 따라서 배지 내에 질소와 황을 결핍시켜 세포내 녹말의 양을 기존 세포의 녹말 함유량 보다 약 20% 이상 증가시킬 수 있었다.

도면의 간단한 설명

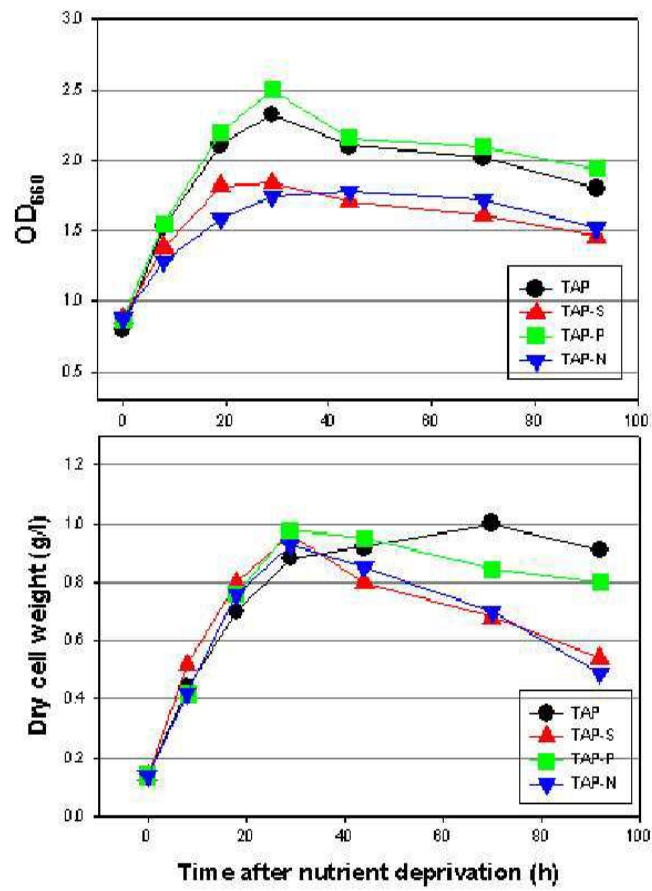
<30> 도 1은 배지내 N, S, P 원소 결핍의 시간에 따른 광학밀도 및 건조세포중량 변화를 나타내는 그래프이다.

<31> 도 2는 배지내 N, S, P 원소 결핍의 시간에 따른 녹말 변화를 나타내는 그래프이다.

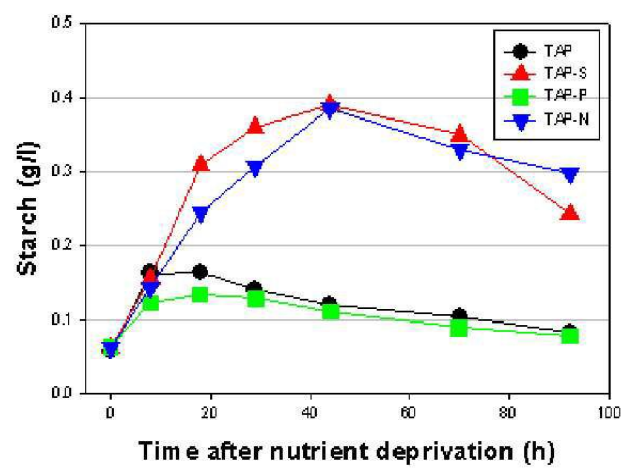
<32> 도 3은 배지내 N, S, P 원소 결핍의 시간에 따른 건조중량당 녹말 변화를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

