(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0072830
(43) 공개일자 2011년06월29일

(51) Int. Cl.
C12N 13/00 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0129919
(22) 출원일자 2009년12월23일
심사청구일자 2009년12월23일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
이철균
서울특별시 서초구 반포본동 1251 주공아파트 91-501
김동건
인천광역시 남구 용현1동 100-5 용현오피스텔 507호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

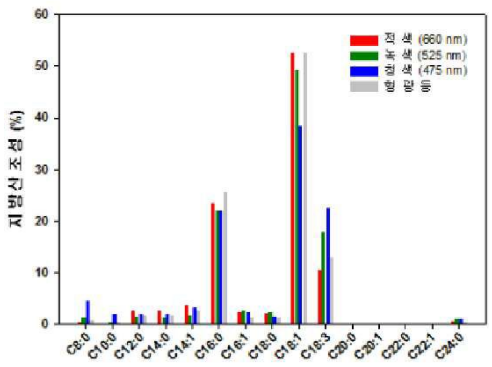
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발광 다이오드로 빛을 조사시켜 미세조류로부터 지질 및 특정 지방산을 생산하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 특정 파장을 이용하여 미세조류를 배양하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 장파장을 방출하는 광원을 미세조류 배양 기간동안 조사함으로써, 미세조류가 생산하는 지질의 총량 및 지방산의 조성비를 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법으로 배양된 미세조류는 총 생물체량(biomass) 및 총 지질 함량이 증가하고, 산화 안정성을 높이는 올레익산(oleic aicd)의 조성비가 증가하였으므로, 바이오디젤의 원료 물질 생산에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

김지훈

인천광역시 서구 가좌3동 210번지 신한연립 바동 1호

권지수

인천광역시 남구 용현1동 100-10 용담마을 나동 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 38169

부처명 농림부

연구관리전문기관

연구사업명 농업에너지 절감기술 개발사업

연구과제명 미세조류 대량 배양용 광생물 배양기의 광에너지 최적화

기여율

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2008년 6월 1일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지질 함량을 증가시키는 방법.

청구항 2

장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지방산 조성을 변화시키는 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 발광다이오드(LED)를 이용하여 장파장을 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 장파장은 640 내지 670nm의 적색 파장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 장파장은 660 nm의 적색 파장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 2항에 있어서, 장파장의 빛을 조사한 결과 올레익산(oleic aicd; C18:1)의 함량이 높아지고 리놀레익산(linolenic acid; C18:3)의 함량이 낮아지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 미세조류는 해마토코커스(*Haematococcus*), 듀나리엘라(*Dunaliella*), 클로렐라(*Chlorella*), 보트리요코쿠스(*votriyococus*), 난노클로리스(*Nannochloris*), 난노크롭시스(*Nannoclopsis*), 네오클로리스(*Neocloris*), 시조카이트리움(*Schizochytriym*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 아이소크리시스(*Isochrysis*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 녹조류인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 녹조류는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 9

장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 산화 안정성이 높은 바이오디젤의 원료물질 생산방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 발광다이오드(LED)를 이용하여 장파장을 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 장파장은 640 내지 670nm의 적색 파장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 장파장은 660 nm의 적색 파장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 9항에 있어서, 상기 미세조류는 해마토코커스, 듀나리엘라, 클로렐라, 보트리요코쿠스, 난노클로리스, 난노크롤롭시스, 네오클로리스, 시조카이트리움, 테트라셀미스, 세네데스무스, 아이소크리시스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 녹조류인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 녹조류는 클로렐라 불가리스인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 특정 파장을 이용하여, 미세조류를 배양하는 방법으로서, 보다 상세하게는 미세조류를 배양하기 위하여, 특정한 파장을 방출하는 광원을 이용하여 광에너지를 미세조류에 공급함으로서, 미세조류가 생산하는 지방산 종류의 비율을 조절할 수 있는 발명에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세조류는 그 다양한 능력에 기인하여, 불포화지방산, 카로테노이드, 비타민등의 다양한 생리활성 물질의 생산뿐만 아니라, 최근 들어 고효율의 광합성 능력에 기인한, 지구 온난화의 주범인 이산화탄소 제거, 미래의 청정에너지인 바이오디젤, 바이오에탄올등의 화석연료 대체에너지 생산까지 다양하게 사용되고 있다. 다양한 활용적 가치가 높은 미세조류를 보다 효과적으로 생산하기위해서는 고농도 배양이 필수적이다. 또한 미세조류는 환경적 영향에 의해 생산하고자 하는 목적 산물의 양이나 질이 달라 질 수 있으므로, 광도, 광파장, 이산화탄소 농도, 가스 공급속도, 온도 및 pH에 대한 세밀한 조사가 요구된다. 이러한 환경적 인자중에서도 광관련인자(광도, 광파장)은 무엇보다도 중요하게 고려되어할 요소이다.

[0003] 특히 생물유래의 바이오디젤의 생산시에는 무엇보다도 생물체가 생산하는 지질의 양과 지방산의 분포도가 중요하다. 따라서 생물유래의 지질로 바이오 디젤의 생산시에 지질함유량이 경제성에 맞는지, 혹은 지방산의 분포도가 바이오디젤에 적합성을 확인하여야 한다. 식물성 기름은 포화 지방산인 팔미틱산과 스테아릭산 그리고 불포화지방산인 올레익산, 리놀레익산, 리놀레닉산 등 5 가지 지방산이 성분으로 포함되어 있다. 따라서 대부분의 식물성 기름을 원료로 만들어진 바이오디젤은 앞에 언급한 5가지 성분의 바이오디젤이 95% 이상 포함되어 있다. 포화지방산인 팔미틱산 또는 스테아릭산으로부터 만든 바이오디젤은 녹는 온도가 높아 저온에서는 고체로 존재하며 겨울철에 연료로 사용시 연료필터막힘 현상의 주 원인이 된다. 하지만 이중 결합이 없어 산화에 대한 안정

성은 매우 높아 장기간 저장시 산화에 의한 변성 문제가 적다. 반면에 불포화지방산 함량이 높으면 겨울철 안정성이 우수하지만 산화안정성이 떨어진다. 이중 결합이 2개 인 리놀레익산이 다량 포함된 대두유는 산화에 의해 산이 생성되며 이러한 산은 차량 연료계 부품의 부식 원인이 된다. 따라서 이러한 문제를 방지하기 위해 산화방지제를 소량 첨가하여 산화안정성을 높여 주어야 한다. 미국의 농무성 연구소에서는 주 작물인 대두유를 바이오디젤로 사용할 때 예상되는 문제를 극복하기 위해 올레익산의 함량이 대폭 향상된 유전자 변형 대두 종자의 개발을 위한 연구를 수행하고 있다.

[0004] 종래, 대한민국 공개특허 제10-2009-0055497호에는 독립영양 배양 조건하 배양하는 것을 포함하는 종속영양 미세조류의 신규 배양 방법이 기재되어 있다. 또한, 광에너지의 강도는 미세조류를 이용하여 유용 산물이나 균체를 생산하고자 가장 중요한 고려 인자이다. 또한, 미세조류인 해마토코커스(Haematococcus)에 광 조사량 증가시켜 유용 산물인 아스타잔틴을 생산하는 방법에 대한 내용 및 루모스탯 방식을 이용하여 광합성 미생물의 배양 방법이 각각 대한민국 공개특허 제10-2005-0005341호 및 대한민국 공개특허 제10-2004-0025205호에서 개시된 바 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은, 발광 다이오드를 이용하여 특정 파장의 광에너지를 조사하여 미세조류를 배양시켰을 때, 장파장을 조사한 미세조류의 지질 함량이 대조군과 비교하여 증가되었고, 올레익산의 함량이 증가되고 리놀레익산의 함량이 감소되어 지방산 함량이 변화한 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 이에, 본 발명의 방법으로 배양된 미세조류는 바이오디젤의 원료물질의 품질개선 및 대량 생산에 유용하게 이용할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 미세조류 배양시에 특정 파장을 조사하여 미세조류의 지질함량을 증가시키고, 산화 안정성이 높은 바이오디젤의 원료물질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0007] 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지질 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지방산 조성을 변화시키는 방법을 제공한다.

[0009] 아울러, 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 산화 안정성이 높은 바이오디젤의 원료물질 생산방법을 제공한다.

효 과

[0010] 본 발명의 방법으로 배양시킨 미세조류에서 지질 함량을 증가되었고, 올레익산의 함량이 증가되고 리놀레익산의 함량이 감소되어 지방산 함량이 변화한 것을 확인하였으므로, 본 발명의 방법으로 배양된 미세조류는 바이오디젤의 원료물질의 품질개선 및 대량 생산에 유용하게 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지질 함량을 증가시키는

방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 미세조류의 지방산 조성을 변화시키는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 구체적 실시예에서 발광 다이오드를 이용하여 적색, 청색 또는 녹색 파장에서 미세조류를 배양한 다음(도 1 참조), 상기 각각의 조건에서 배양한 미세조류의 세포 성장, 지질 함량 및 지방산 조성비를 관찰하였다. 그 결과, 백색광을 조사한 대조군과 비교하였을 때 총 생물체량(biomass) 및 총 지질량이 적색광을 조사한 경우 증가하였으나, 녹색광 및 청색광을 조사한 경우에서는 감소하였다(도 2 및 도 3 참조). 한편, 지방산 조성비를 분석한 결과 모든 실험조건에서 포화 지방산 및 불포화 지방산의 비율은 변화가 거의 없었으나, 산화에 대한 안정성이 높은 올레익산(oleic aicd; C18:1)의 함량이 높아지고 안정성이 낮은 리놀레익산(linolenic acid; C18:3)의 함량이 낮아진 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0015] 상기 단계에서 장파장을 발광할 수 있는 것은 특별한 제한 없이 모두 사용할 수 있으나, 발광 다이오드(LED)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 장파장은 640 내지 670 nm의 파장 영역, 바람직하게는 660 nm의 파장 영역인 적색 파장이다.

[0016] 또한, 상기 미세조류는 해마토코커스(*Haematococcus*), 듀나리엘라(*Dunaliella*), 클로렐라(*Chlorella*), 보트리요코쿠스(*votriyococus*), 난노클로리스(*Nannochloris*), 난노크롭시스(*Nannoclopsis*), 네오클로리스(*Neocloris*), 시조카이트리움(*Schizochytriym*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 세네데스무스(*Scenedesmus*), 아이소크리시스(*Isochrysis*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 녹조류, 바람직하게는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 아울러, 본 발명은 장파장의 빛을 조사하여 미세조류를 배양하는 단계를 포함하는, 산화 안정성이 높은 바이오디젤의 원료물질 생산방법을 제공한다.

[0018] 산화 안정성이 낮은 지방산의 함량이 높은 원료를 바이오디젤로 사용시 차량 연료계 부품의 부식 원인이 된다. 바이오디젤 물성을 결정하는 산화 안정성은 지방산의 이중 결합 개수가 많을수록 감소하는데, 본 발명의 구체적인 실시예에서 미세 조류에 적색광을 조사하여 배양한 경우 미세조류의 총 생물체량 및 총 지질 함량이 증가하고(도 2 및 도 3 참조) 지방산의 이중 결합 개수가 1개인 올레익산(oleic aicd; C18:1)의 함량은 증가하고, 이중 결합 개수가 3개인 리놀레익산(linolenic acid; C18:3)의 함량은 감소한 것을 확인하였다(도 4 참조). 이에, 본 발명의 방법을 이용하여 배양된 미세조류로부터 산화 안정성이 높은 바이오디젤 원료물질을 생산할 수 있다.

[0019] 상기 단계에서 장파장을 발광할 수 있는 것은 특별한 제한 없이 모두 사용할 수 있으나, 발광 다이오드(LED)를 이용하는 것이 바람직하다. 상기 장파장은 640 내지 670 nm의 파장 영역, 바람직하게는 660 nm의 파장 영역인 적색 파장이다.

[0020] 또한, 상기 미세조류는 해마토코쿠스, 듀나리엘라, 클로렐라, 보트리요코쿠스, 난노클로리스, 난노크롭시스, 네오클로리스, 시조카이트리움, 테트라셀미스, 세네데스무스, 아이소크리시스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 녹조류, 바람직하게는 클로렐라 불가리스일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

실 시 예

[0021] 이하, 본 발명의 구성 및 작용은 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0022] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0023] **실시예 1. 특정파장의 광원을 이용한 미세조류의 배양**

[0024] 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받은 광합성 미세조류인 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris* UTEX 259)를 400 ㎖ 크기의 기포탑 광생물반응기에서 발광 다이오드(LEDs)를 이용하여 적색(660 nm), 녹색(525 nm) 또는 청색(475 nm)의 광에너지를 조사하거나, 전체 파장의 광에너지를 공급하는 형광등을 평균광도 100 μE/m^2/s 밝기로 조사해주며, 5% 이산화탄소를 0.1 VVM(Gas vol./Liquid vol./min)의 속도로 주입, 25℃

및 표 1의 배지 조건에서 고농도의 세포 밀도(10^6~10^7/㎖)로 일 동안 배양하여 지방산의 생성을 유도하였다. 이때, 발광 다이오드 조사 군의 경우, 발광다이오드에서 나오는 특정파장이외에 다른 파장의 빛이 들어가지 않도록 검은 비닐과 알루미늄 호일을 이용하여, 외부의 빛을 완전히 차단한 상태에서 실험을 수행하였다. 세포수는 쿨터 카운터(Coulter Counter, Coulter Electronics, Inc. 미국)를 이용하여 정밀하게 측정하였다.

표 1

[0025]

구성성분	농도(mg/L)
NH_4Cl	15
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	18
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15
KH_2PO_4	1.6
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.08
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.1
H_3BO_3	0.185
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.415
$ZnCl_2$	3×10^{-3}
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5×10^{-3}
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10^{-5}
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7×10^{-3}
$NaHCO_3$	50

[0026] **실시예 2. 특정 파장에서의 미세 균주의 지방산 조성 분석**

[0027] 200 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상기 실시예 1-1에서 배양된 균체를 수득하였다. 상기에서 수득한 각각의 균체에 액화질소를 붓거나 -80℃에서 냉동하여 급 동결한 후, 막자사발을 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 각각의 균체로부터 공지의 방법인 Bilgh 및 Dyer법을 총 지질양을 측정하였으며(Bligh, EG and Dyer, WJ 1959, *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-917), 지방산 조성은 가스크로마토그래피(Acme 6000, 한국, 컬럼: DB-WAX (30 m× 0.32 mm× 0.25 ㎛), 용매: 핵산)를 이용하여 확인하였다.

[0028] 그 결과, 특정 파장의 빛 중 적색 파장 (660 nm)를 공급해 배양해 준 경우 대조군인 형광등과 비교하였을 때, 세포의 성장은 거의 비슷한 패턴을 보였고 총 생물체량(biomass)과 총 지질량은 10%정도 향상시킬 수 있다. 반면 녹색과 청색 (525 nm, 475 nm)의 특정 파장을 공급해 배양한 경우 두 조건의 세포 성장 패턴과 총 생물체량과 총 지질량은 80%정도의 감소 현상을 확인 할 수 있었다(도 2,3 참조). 그리고 지방산 조성 분석 결과, 대조군과 비교하였을 때, 포화 지방산과 불포화지방산의 비율에는 변화가 없었으나 각각의 지방산 조성을 분석하였을 때 차이를 발견할 수 있었다. 특히, 바이오디젤 물성을 결정하는 것으로 산화안정성과 저온필터막힘점 (Cold Filter Plugging Point; CFPP)와 관련이 있는 올레익산(oleic aicd; C18:1)의 함량이 높아지고 리놀레익산(linolenic acid; C18:3)의 함량이 낮아지는 현상이 장파장인 적색 파장(660 nm)을 공급해 배양한 세포에서 확인 할 수 있었고, 그 반대로 단파장인 청색 파장(475 nm)의 경우 오히려 리놀레익산의 함량이 증가하고 올레익산의 함량이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(도 4 참조). 상기 결과로부터, 특정 파장 중 장파장에 속하는 적색 파장을 공급하여 배양한 경우 전 파장을 가진 형광등과 비교하여 세포의 성장, 총 지질 생산, 지방산 생산에서 긍정적인 효과를 보임을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 실시 예에 따른 반응기 설치 모습를 나타낸 것이며,

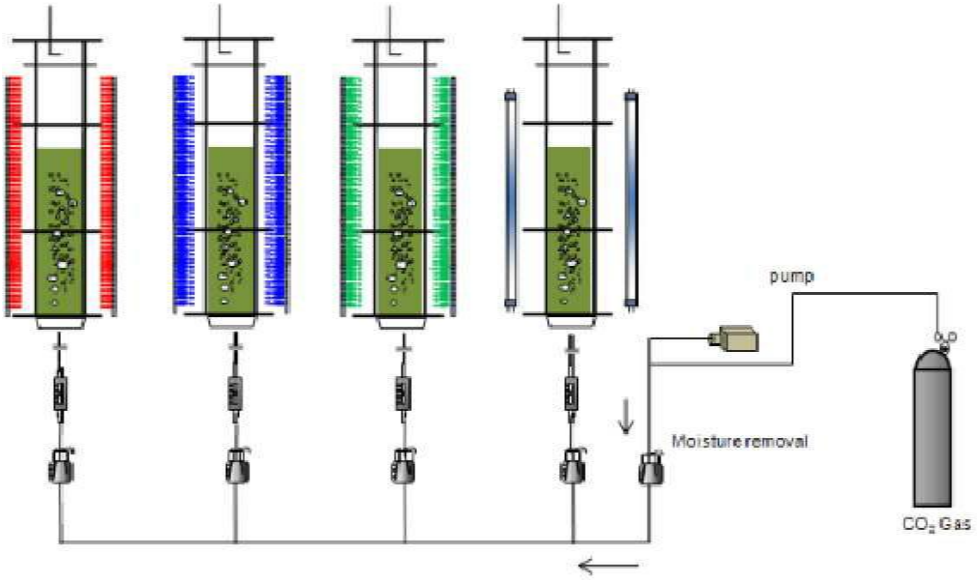
[0030] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물의 특정 파장에 따른 배양 결과를 비교한 균체 농도이며,

[0031] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 총 지질 농도 결과를 비교이며,

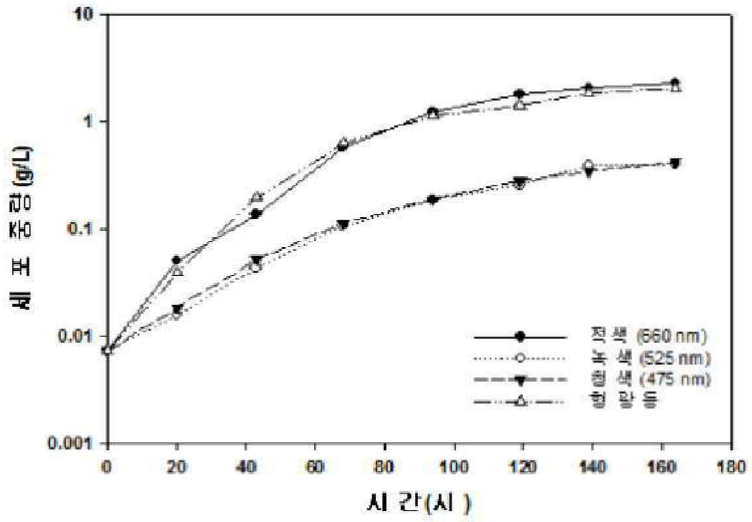
[0032] 도 4은 본 발명의 실시예에 따른 지방산 조성 결과를 비교이다.

도면

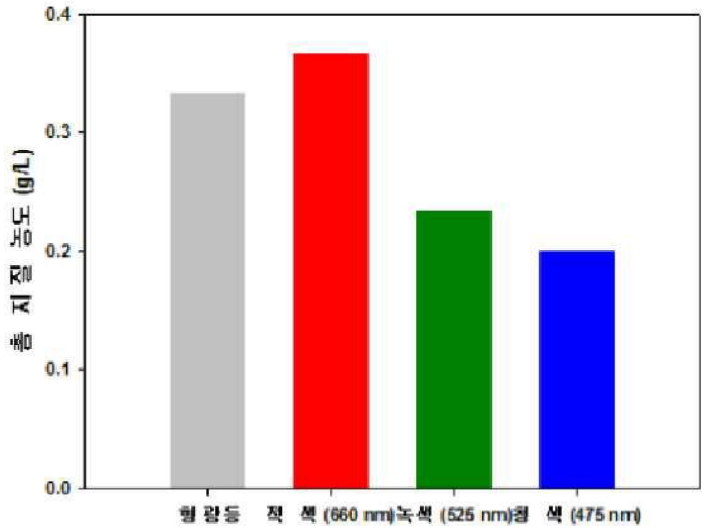
도면1



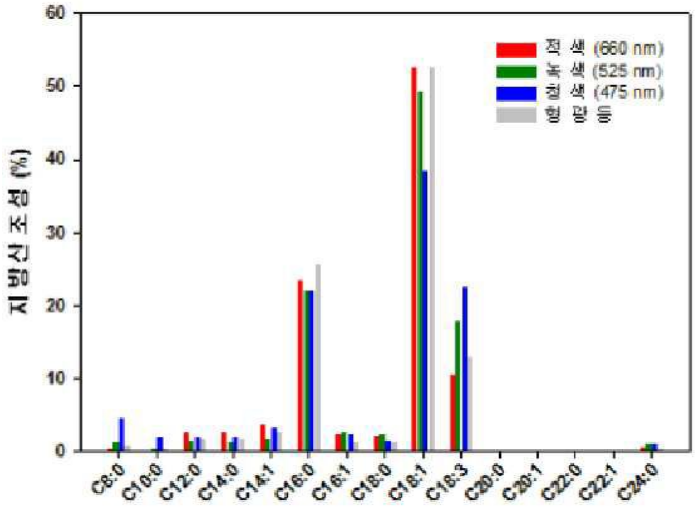
도면2



도면3


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
총 지질 농도 (g/L)
형광등
적색 (660 nm)
녹색 (525 nm)
청색 (475 nm)

도면4


60
50
40
30
20
10
0
지방산 조성 (%)
적색 (660 nm)
녹색 (525 nm)
청색 (475 nm)
형광등
C8:0
C10:0
C12:0
C14:0
C14:1
C16:0
C16:1
C18:0
C18:1
C18:3
C20:0
C20:1
C22:0
C22:1
C24:0