(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0087938
(43) 공개일자 2019년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) *C07C 59/40* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C07C 59/40 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0055425
(22) 출원일자 2018년05월15일
심사청구일자 2018년05월15일
(30) 우선권주장
1020180005972 2018년01월17일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김성구
부산광역시 남구 오륙도로 85, 102동 2303호(용호동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
푼랍 시리숙
부산광역시 남구 용소로 45, 9호관 9519호(대연동, 부경대학교 대연캠퍼스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

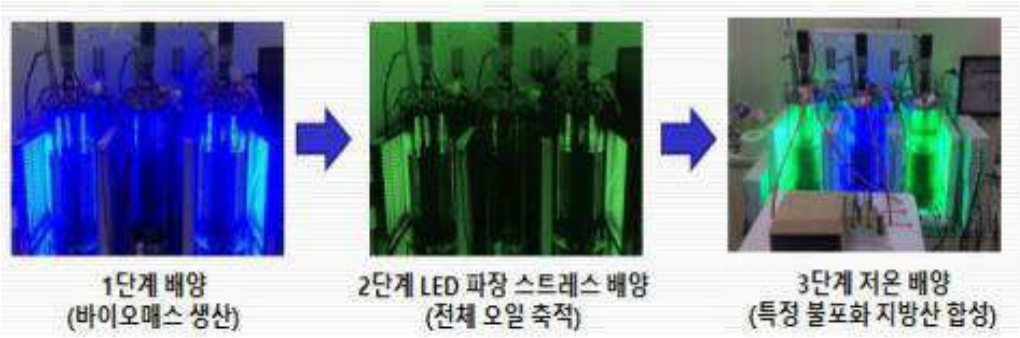
(54) 발명의 명칭 **해양 미세조류를 이용한 고농도 불포화 지방산 오일의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 해양 미세조류를 이용한 고농도 불포화 지방산 오일의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 기존의 영양분 저해 방법 및 각각의 배지를 사용하는 Two-stage 방법의 복잡한 공정에 비해 간단하며, 영양분 저해로 인한 오일축적 방법이 아닌 빛 파장을 이용한 오일축적기술로서 단일한 배지를 사용하는 방법이다.

따라서, 본 발명의 방법은 기존의 오일 축적 방법보다 간단하며, 동일한 배지를 사용하므로 공정소요시간이 단축되며, 기존의 기술에 의한 오일 축적량보다 높은 오일 함량을 확보할 수 있어 기술적인 효율성이 높고 경제성이 우수한 장점이 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 7/6427 (2013.01)
C12N 2523/00 (2013.01)
C12N 2529/10 (2013.01)
(72) 발명자
라채훈
부산광역시 수영구 남천동로 46, 8동 301호(남천동, 타워)

선우인영
부산광역시 북구 화명신도시로 39, 714동 2902호(화명동, 대림쌍용강변타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20150389
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 LED-수산생물융합생산연구센터
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2017.05.01 ~ 2018.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이오메스를 증가시키는 1구간;

오일축적률을 증가시키는 2구간; 및

저온으로 불포화 지방산을 증가시키는 3단계;를 포함하는 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 1구간, 2구간 및 3구간의 전구간에서 동일한 배지를 사용하는 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 Blue (460-470nm)이며 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 Green(515-525nm) 또는 Red (655-665nm) 파장 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1구간에서 5.0 L/min의 공기주입 속도, 250 μmol.m^{-2} s^{-1}의 LED 광량 및 24:0h light/dark의 광주기 조건으로 처리하는 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 1구간 배양기간은 11일, 2구간 배양기간은 3일 및 3구간 배양기간은 6일인 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 3구간의 저온은 0℃ 내지 20℃인 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 *Isochrysis galbana, Pheodactylum tricornutum, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis oceanica, Nannochloropsis salina, Dunaliella salina, Dunaliella tertiolecta* 및 *Nannochloris atomus*에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 3단계의 불포화 지방산은 팔미톨레산(Palmitoleic acid), 올레산(Oleic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid), EPA 또는 DHA인 것을 특징으로 하는, 미세조류 고농도 오일 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항의 방법으로 제조된 미세조류 유래 고농도 오일.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 오일은 팔미톨레산(Palmitoleic acid), 올레산(Oleic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid), EPA 또는 DHA인 것을 특징으로 하는 미세조류 유래 고농도 오일.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양 미세조류를 이용한 고농도 불포화 지방산 오일의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 미세조류를 이용한 오일 축적 기술은 성장 배지의 기질 저해(nitrate, phosphate, silica, salinity stress)를 통해 스트레스를 주어 오일함량을 증가시키는 Two-stage의 공정 방법이 대부분이다. 기존 영양분 저해 및 Two-stage의 공정은 복잡하므로, 이에 비해 간단하고 효과가 큰 오일 축적 기술이 요구되고 있는 실정이나 아직까지 그 연구가 미미하다.

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 ISOCHRYSIS-ALGAE

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 영양분 저해로 인한 오일축적 방법이 아닌 빛 파장을 이용하여 높은 오일 함량을 확보하였으며, 또한, 미세조류의 고농도 오일축적 방법의 전과정에서 단계마다 다른 배지를 사용하지 않고 동일한 배지를 사용하여 공정시간을 단축시켜 미세조류 유래의 유용 오일을 매우 효율적으로 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서, 본 발명은 바이오메스를 증가시키는 1구간; 오일축적률을 증가시키는 2구간; 및 저온으로 불포화 지방산을 증가시키는 3구간;을 포함하는 미세조류 고농도 오일 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기의 방법으로 제조된 미세조류 유래 고농도 오일을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바이오메스를 증가시키는 1구간; 오일축적률을 증가시키는 2구간; 및 저온으로 불포화 지방산을 증가시키는 3구간;를 포함하는 미세조류 고농도 오일 제조방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 1구간, 2구간 및 3구간의 전구간에서 동일한 배지를 사용할 수 있다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 1구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 Blue (460-470nm)이며 2구간에서 조사하는 LED 광의 파장은 Green(515-525nm) 또는 Red (655-665nm) 파장 중 어느 하나일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 1구간에서 5.0 L/min의 공기주입 속도, 250 μmol.m^{-2} s^{-1}의 LED 광량 및 24:0h light/dark의 광주기 조건으로 처리할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 1구간 배양기간은 11일, 2구간 배양기간은 3일 및 3구간 배양기간은 6일일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 3구간의 저온은 0℃ 내지 20℃일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 *Isochrysis galbana*, *Pheodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis salina*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* 및 *Nannochloris atomus*에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 3단계의 불포화 지방산은 팔미톨레산(Palmitoleic acid), 올레산(Oleic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid), EPA 또는 DHA일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 미세조류 유래 고농도 오일을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 오일은 팔미톨레산(Palmitoleic acid), 올레산(Oleic acid), 리놀레산(Linoleic acid), 리놀렌산(Linolenic acid), EPA 또는 DHA일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 기존의 영양분 저해 방법 및 각각의 배지를 사용하는 Two-stage 방법의 복잡한 공정에 비해 간단하며, 영양분 저해로 인한 오일축적 방법이 아닌 빛 파장을 이용한 오일축적기술로서 단일한 배지를 사용하는 방법이다.

[0018] 본 발명의 방법은 기존의 오일 축적 방법보다 간단하며, 동일한 배지를 사용하므로 공정소요시간이 단축되며, 기존의 기술에 의한 오일 축적량보다 높은 오일 함량을 확보할 수 있어 기술적인 효율성이 높고 경제성이 우수한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 100 μmol.m^{-2} s^{-1}의 광도, 12:12 시간의 명암주기, 2.5 L / min 공기주입 속도의 블루 파장 LED 하에서 2L 플라스크 및 14L LED 바이오 리액터를 사용하여 배양 후 *N. oceanica*의 세포 성장 정도를 확인한 결과이다.

도 2는 다양한 공기주입 속도로 블루 파장 LED 하에서 14L LED 바이오 리액터에서 배양된 *N. oceanica*의 세포 성장 정도를 확인한 결과이다.

도 3은 블루 파장 LED의 다양한 광도에서 5.0 L / min의 통기 속도로 14L LED 바이오 리액터를 사용하여 배양된 *N. oceanica*의 세포 성장 정도를 확인한 결과이다.

도 4는 다양한 광도에서 본 발명자의 선행기술인 two phase 방법(블루 파장 LED 하)으로 배양된 *N. oceanica*의 (A) 세포 성장 정도 및 (B) 지질 함량 정도를 시간 경과에 따라 비교한 결과이다.

도 5는 광주기에 따른 *N. oceanica* 미세조류의 성장 조건 최적화를 확인하기 위하여 광주기를 다양화 하여 250 μmol.m^{-2} s^{-1}의 블루 파장 LED 광도에서 14L LED 바이오 리액터를 사용하여 배양한 결과이다.

도 6은 다양한 광도에서 본 발명자의 선행기술인 two phase 방법(그린 파장 LED 하)으로 배양된 *N. oceanica*의 (A) 세포 성장 정도 및 (B) 지질 함량 정도를 시간 경과에 따라 비교한 결과이다.

도 7은 본 발명의 3단계 배양 방법(그린 파장 LED 하) 중 3단계의 온도를 다양화하여 배양된 *N. oceanica*의

(A) 세포 성장 정도 및 (B) 지질 함량 정도를 시간 경과에 따라 비교한 결과이다.

도 8은 본 발명의 3단계 배양 방법을 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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.

[0021] 이 중에 구체적인 실시예로 100 μmol.m^{-2} s^{-1}의 blue LED 파장, 12:12h light/dark 광주기 및 2.5 L/min의 공기주입 속도 하에서 2L flask와 14L 광배양기에서의 *Nannochloropsis oceanica* 미세조류 성장 속도를 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0022] 그 결과, 2L flask에서는 최대 바이오메스 0.71 g dcw/L을 생산하였고, 14L 광배양기에서는 최대 바이오메스 0.38 g dcw/L을 생산하였음을 알 수 있었다.

[0023] 본 발명에서는 *Nannochloropsis oceanica*를 이용하여 14L 광배양기에서 공기주입 속도, LED 광량, 광주기에 대한 최적 조건을 확립하였다.

[0024] 도면 2는 고농도 바이오메스를 생산하기 위해 *N. oceanica*의 공기주입 속도에 대한 배양결과로서, 5.0 L/min에서 최대 바이오메스 0.44 g dcw/L을 생산하였고, 7.5 L/min로 공기주입 속도를 증가시킨 결과, 더 이상 바이오메스의 증가는 나타나지 않았다. 따라서 최적 공기주입 속도를 5.0 L/min으로 선택하여 배양을 진행하였다.

[0025] 도 3은 미세조류 *N. oceanica*의 바이오메스를 증가시키기 위해 LED 광도 최적화 실험을 수행하였다. 최적 광도를 찾기 위해 100, 150, 200, 250, 400, 550 μmol.m^{-2} s^{-1}의 다양한 광도에서 미세조류를 배양하였다. *N. oceanica* 종은 250 μmol.m^{-2} s^{-1}의 광도에서 최대의 바이오메스 0.73 g/L을 생산하였으므로 최적 광도조건은 250 μmol.m^{-2} s^{-1} 이었다.

[0026] 도 4A는 광세기에 따른 미세조류 *N. oceanica*의 바이오메스 생산결과를 시간 경과에 따라 나타낸 것이다.

[0027] 그 결과, 최적 광도조건인 250 μmol.m^{-2} s^{-1}에서 시간의존적으로 생산되는 바이오메스의 양이 증가하였으며, 배양 17시간째에서 바이오메스 양이 최대를 보인 후 배양 시간을 더 늘린더라도 바이오메스의 양은 더 증가하지 않아 최적 광도조건인 250 μmol.m^{-2} s^{-1}에서의 최적 배양 시간은 14일임을 알 수 있었다.

[0028] 또한, 도면 4B는 다양한 광세기에 대한 2단계 배양에서 green LED파장으로 3일 동안 오일 함량 증가를 유도한 결과이다. 그 결과, 250 μmol.m^{-2} s^{-1} 에서 오일 축적량이 51.2%로 증가되는 것을 확인하였으며, 배양 17일째에 오일 축적량이 가장 많았음을 알 수 있었다.

[0029] 도 5는 12:12h, 18:6h, 24:0h light/dark의 광주기로 미세조류 *N. oceanica*의 최대 바이오메스 성장량인 0.73 g/L까지 도달 시간을 확인한 것으로서, 12:12h의 광주기에서는 최대 바이오메스 성장량까지 15일이 소요되었으나, 24:0h의 광주기에서는 최대 바이오메스 성장량까지 11일이 소요되어 24:0h의 광주기에서는 12:12h의 광주기에서 보다 배양기간을 4일이나 단축시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0030] 도 6A는 광주기에 따른 미세조류 *N. oceanica*의 바이오메스 생산결과이다. 광주기는 12:12h, 18:6h, 24:0h light/dark 주기로 실시한 결과, 24:0h light/dark의 광주기에서 최대 바이오메스 0.73 g/L을 생산하였다. 또한, 도면 6B는 다양한 광주기에 대한 2단계 배양에서 green LED파장으로 3일 동안 오일 함량 증가를 유도한 결과이다.

[0031] 그 결과, 24:0h light/dark 광주기 조건에서 오일 축적량이 57.5%로 증가되는 것을 확인하였다. 따라서, 광주기를 24:0h light/dark으로 선택하여 배양하였다.

[0032] 도 7은 14L 광배양기에서 5.0 L/min의 공기주입 속도, 250 μmol.m^{-2} s^{-1}의 LED 광량, 24:0h light/dark의 광주기 조건으로 미세조류 *N. oceanica*를 3단계 배양한 결과이다.

[0033] 도면 7A와 같이 Three-phase culture 공정은 1구간 배양에서 blue LED 파장을 이용하여 11일 동안 최대 바이오메스 0.73 g dcw/L를 생산하였고, 세포가 정기기에 도달하였을 때, 2구간 배양을 실시하며 green LED파장으로 파장을 변환하여 2일 동안 오일 축적률을 40%에서 57.5%로 향상시켰다. 이후 ω-3 성분인 DHA와 EPA를 증가시키기 위한 3구간 배양을 실시하며 배양온도를 20℃, 15℃, 10℃와 5℃로 구분하여 비교실험을 진행하였다.

[0034] 그 결과, 도면 7B에서 2구간 파장 변환을 통한 오일 축적량은 57.5%임을 알 수 있었고, 3구간 배양에서 20℃와 15℃로 배양 온도를 낮추었을 때 오일 축적량은 각각 51.3%와 52.2%로 감소하였다. 그 반면에 3구간 배양에서 10℃와 5℃로 낮추었을 때의 오일 축적량은 감소하지 않고 각각 59.0%와 60.1%로 나타나 3구간 배양에서 20℃와 15℃보다 10℃와 5℃로 배양 온도를 낮추었을 때 오일 축적량이 월등히 증가함을 알 수 있었다.

[0035] 표 1은 3구간 배양에서 배양 온도를 15℃, 10℃와 5℃ 낮추었을 때 지방산 조성에 대해 분석한 결과이다. 배양온도를 15℃, 10℃와 5℃로 낮추어 6일 동안 배양한 결과, 불포화지방산인 Palmitoleic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid과 ω-3 불포화 지방산인 EPA, DHA 등이 점점 증가하는 것을 확인하였다.

[표 1] 3단계 저온 배양을 통한 *N. oceanica*의 지방산 조성 분석

Free fatty acid (%w/w)		20-C						15-C					
	D-13	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18	D-19	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18	D-19
Myristic acid (C14:0)	3.08	2.98	3.02	2.84	2.78	2.65	2.82	3.10	2.98	2.83	2.53	2.45	2.30
Palmitic acid (C16:0)	20.54	20.98	20.49	20.87	21.15	20.98	20.96	20.60	19.41	19.70	18.38	18.18	18.49
Palmitoleic acid (C16:1)	4.53	4.72	4.79	4.68	4.84	4.80	4.65	4.45	5.61	6.03	6.34	6.85	7.68
Stearic acid (C18:0)	31.37	29.94	31.51	30.15	28.76	30.22	30.41	31.73	27.73	23.91	21.12	20.22	18.88
Oleic acid (C18:1)	23.75	23.50	22.38	23.87	24.10	23.84	23.77	22.82	25.78	28.15	31.98	32.47	32.16
Linoleic acid (C18:2)	2.33	2.51	2.47	2.29	2.61	2.27	2.43	2.31	2.58	3.34	2.83	3.29	3.79
Arachidic acid (C20:0)	0.21	0.21	0.16	0.19	0.19	0.15	0.17	0.18	0.12	0.17	0.13	0.19	0.16
Linolenic acid (C18:3)	9.88	11.03	10.65	10.71	11.38	10.99	10.41	10.20	11.28	11.24	11.76	11.16	11.49
EPA (C20:5)	2.29	2.44	2.49	2.40	2.35	2.30	2.30	2.47	2.23	2.52	2.58	2.84	2.72
Behenic acid (C22:0)	0.44	0.33	0.52	0.29	0.34	0.24	0.43	0.38	0.56	0.34	0.40	0.32	0.38
DHA (C22:6)	1.58	1.37	1.52	1.71	1.49	1.57	1.65	1.77	1.84	1.76	1.96	2.04	1.96
Saturated Fatty acid (SFA)	55.63	54.43	55.69	54.33	54.33	54.25	54.78	55.99	50.67	46.96	42.56	41.36	40.21
Mono unsaturated Fatty acid (MUFA)	28.28	28.23	27.17	28.55	28.55	28.64	28.42	27.27	31.39	34.18	38.32	39.32	39.83
Poly unsaturated Fatty acid (PUFA)	16.08	17.34	17.14	17.12	17.12	17.12	16.80	16.75	17.94	18.86	19.12	19.32	19.96

Free fatty acid (%w/w)		10-C						5-C					
	D-13	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18	D-19	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18	D-19
Myristic acid (C14:0)	3.08	2.93	2.74	2.64	2.37	2.09	2.24	3.05	2.82	2.67	2.30	2.06	2.24
Palmitic acid (C16:0)	20.54	20.51	19.55	18.80	18.58	17.18	17.37	20.41	19.66	18.55	16.97	16.52	16.87
Palmitoleic acid (C16:1)	4.53	4.79	5.66	6.45	7.98	8.22	7.96	5.00	5.00	6.27	8.26	7.47	8.57
Stearic acid (C18:0)	31.37	29.36	26.05	19.54	17.94	16.93	17.08	26.47	24.19	18.77	16.06	16.53	16.19
Oleic acid (C18:1)	23.75	25.47	27.96	32.32	31.73	30.85	31.61	26.76	28.24	31.27	30.37	29.21	27.63
Linoleic acid (C18:2)	2.33	2.23	2.65	2.80	3.82	4.96	4.09	2.46	2.56	3.32	4.46	6.25	6.64
Arachidic acid (C20:0)	0.21	0.29	0.20	0.27	0.30	0.34	0.23	0.16	0.15	0.17	0.13	0.23	0.22
Linolenic acid (C18:3)	9.88	9.99	10.57	10.78	11.34	13.07	13.46	10.59	10.97	11.52	13.59	14.68	14.95
EPA (C20:5)	2.29	2.10	2.60	3.87	3.34	3.44	3.31	2.52	3.82	4.37	4.48	4.41	4.17
Behenic acid (C22:0)	0.44	0.46	0.39	0.42	0.50	0.43	0.33	0.49	0.32	0.44	0.59	0.48	0.36
DHA (C22:6)	1.58	1.85	1.74	2.11	2.11	2.49	2.34	2.10	2.27	2.64	2.79	2.18	2.16
Saturated Fatty acid (SFA)	55.63	53.55	48.92	41.66	39.69	36.97	37.25	50.57	47.15	40.61	36.06	35.81	35.88
Mono unsaturated Fatty acid (MUFA)	28.28	30.27	33.53	38.77	39.71	39.07	39.55	31.76	33.24	37.54	38.64	36.67	36.20
Poly unsaturated Fatty acid (PUFA)	16.08	16.18	17.55	19.57	20.60	23.96	23.20	17.66	19.62	21.85	25.30	27.51	27.92

[0037]

[0039] 따라서, 본 발명은 Three-phase culture 공정을 통해 ω-3 성분인 DHA와 EPA를 유의적으로 증가시킬 수 있는 미세조류 배양법을 확립하였다.

[0040] 다시한번 간단히 본 발명에 대해 설명하면, 본 발명은 미세조류의 고농도 오일축적방법에 관한 것으로서, 바이오메스를 증가시키는 1구간과 오일축적률을 증가시키는 2구간과 낮은 온도로 특정 ω-3 성분인 DHA와 EPA를 증가시키는 3구간을 포함시킬 수 있다. 이는 기존의 Two-stage culture 방법의 복잡한 공정에 비해 간단하며, 영양분 저해로 인한 오일 축적 방법이 아닌 빛 파장을 이용한 오일축적기술로서 단일한 배지를 이용한다.

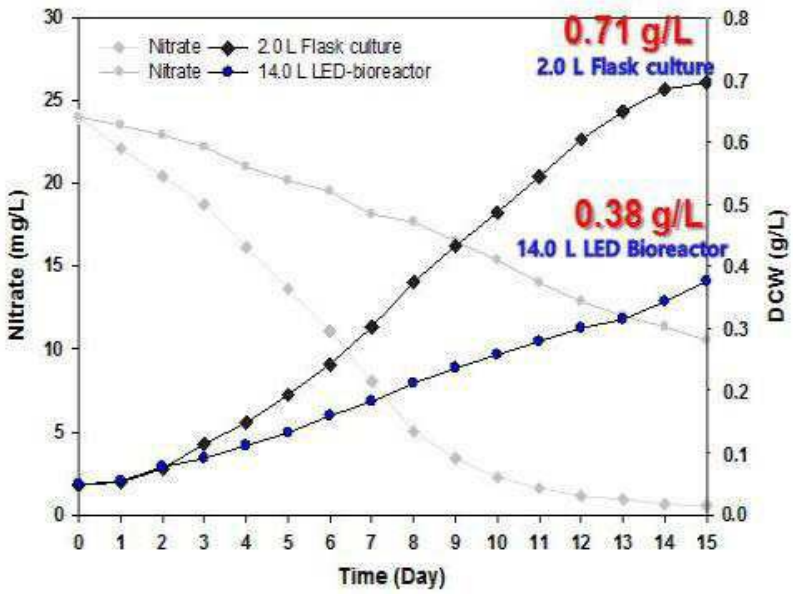
[0041] 따라서, 본 발명은 기존의 오일 축적 방법보다 간단하며, 동일한 배지를 사용하므로 공정소요시간이 단축된다. 또한, 기존 기술에 의한 오일 축적량보다 높은 오일 함량을 확보할 수 있는 장점이 있다.

[0042] 나아가 본 발명은 본 발명자가 보유하고 있는 선행기술인 Two-phase culture 방법(한국등록특허 10-1576622)과 비교하였을 때에도 3구간을 더 포함시켜 Palmitoleic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, EPA, DHA 등의 유용성분을 월등히 증가시킬 수 있어 상업적으로 매우 유용한 장점이 있다.

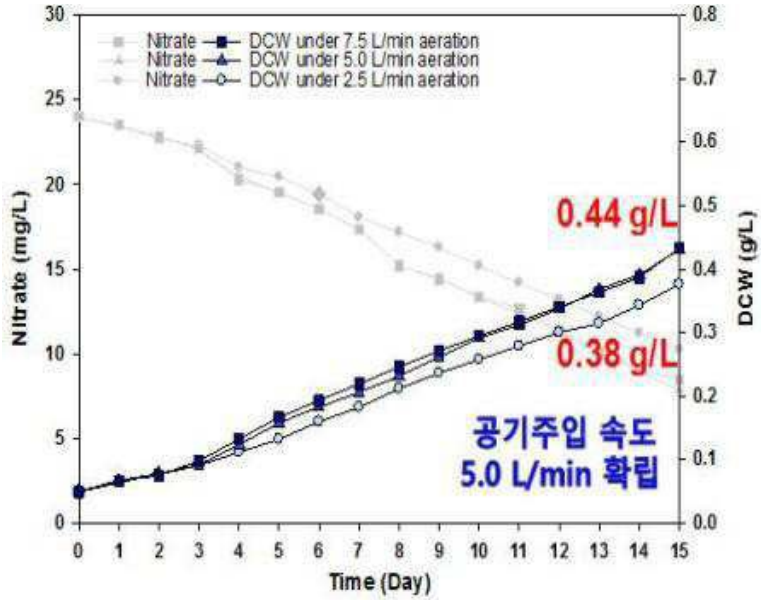
[0044] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

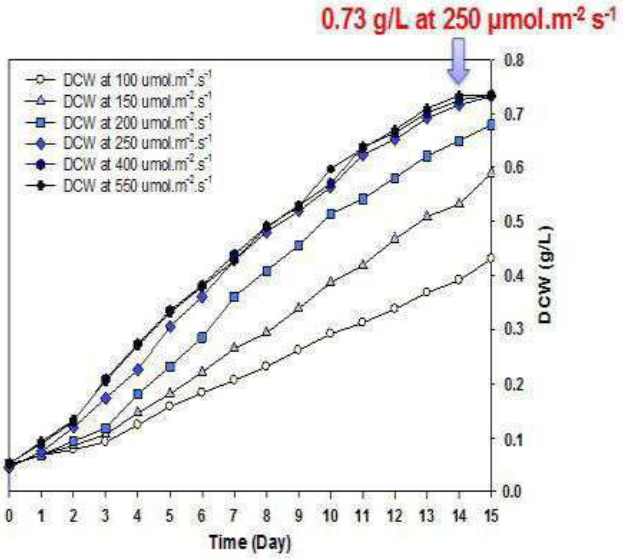
도면1



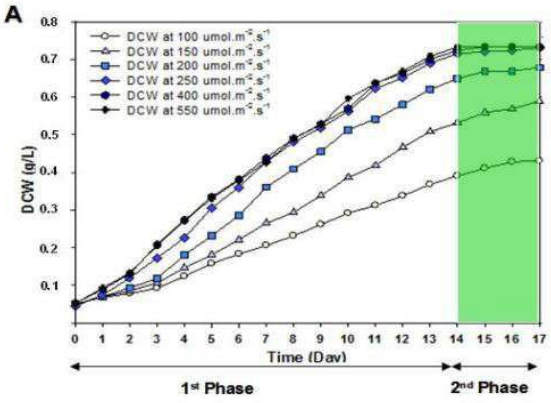
도면2

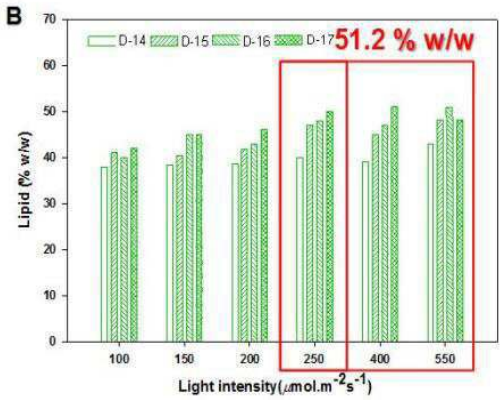


도면3

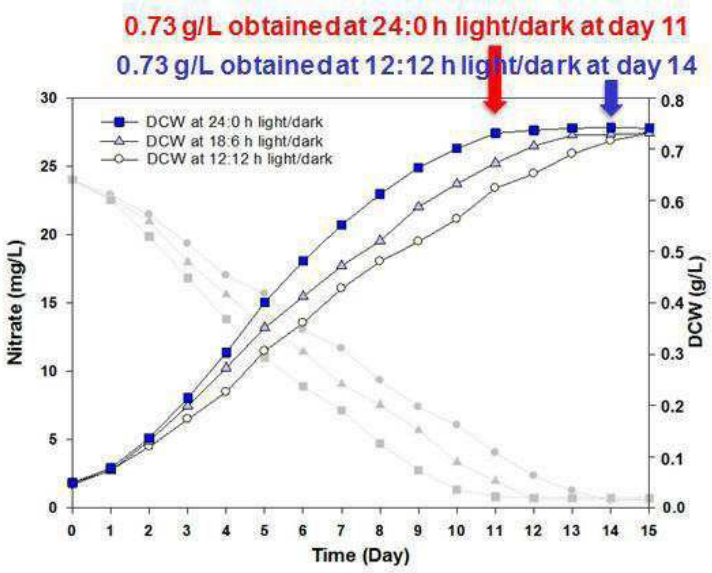

0.73 g/L at 250 μmol.m-2 s-1
DCW at 100 umol.m-2.s-1
DCW at 150 umol.m-2.s-1
DCW at 200 umol.m-2.s-1
DCW at 250 umol.m-2.s-1
DCW at 400 umol.m-2.s-1
DCW at 550 umol.m-2.s-1
DCW (g/L)
Time (Day)

도면4

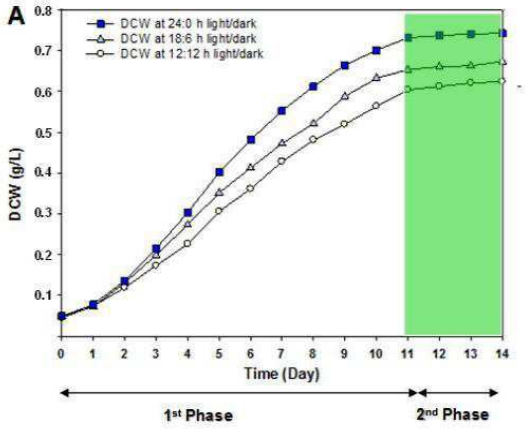

A
DCW at 100 umol.m-2.s-1
DCW at 150 umol.m-2.s-1
DCW at 200 umol.m-2.s-1
DCW at 250 umol.m-2.s-1
DCW at 400 umol.m-2.s-1
DCW at 550 umol.m-2.s-1
DCW (g/L)
Time (Day)
1st Phase
2nd Phase

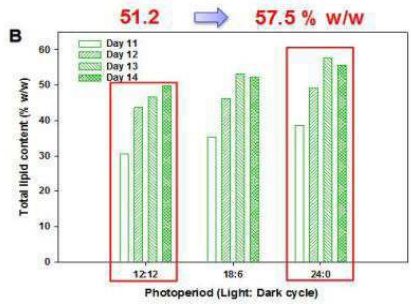

B
D-14
D-15
D-16
D-17
51.2 % w/w
Lipid (% w/w)
Light intensity(μmol.m-2s-1)

도면5

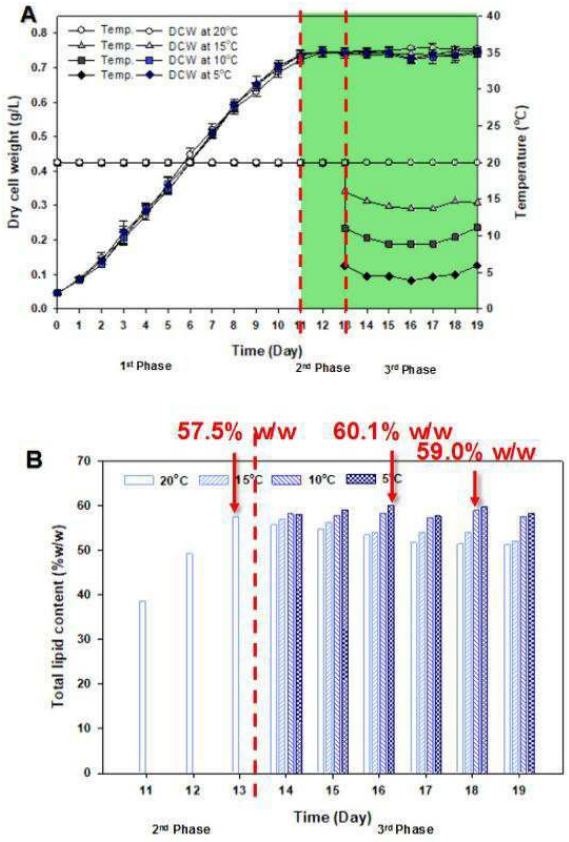

0.73 g/L obtained at 24:0 h light/dark at day 11
0.73 g/L obtained at 12:12 h light/dark at day 14
DCW at 24:0 h light/dark
DCW at 18:6 h light/dark
DCW at 12:12 h light/dark
Nitrate (mg/L)
DCW (g/L)
Time (Day)

도면6

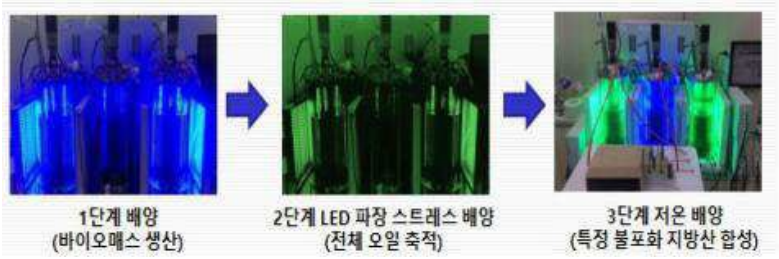

A
DCW at 24:0 h light/dark
DCW at 18:6 h light/dark
DCW at 12:12 h light/dark
DCW (g/L)
Time (Day)
1st Phase
2nd Phase


51.2
57.5 % w/w
B
Day 11
Day 12
Day 13
Day 14
Total lipid content (% w/w)
12:12
18:6
24:0
Photoperiod (Light: Dark cycle)

도면7


A
Temp. DCW at 20°C
Temp. DCW at 15°C
Temp. DCW at 10°C
Temp. DCW at 5°C
Dry cell weight (g/L)
Temperature (°C)
Time (Day)
1st Phase
2nd Phase
3rd Phase
B
57.5% w/w
60.1% w/w
59.0% w/w
20°C
15°C
10°C
5°C
Total lipid content (%w/w)
Time (Day)
2nd Phase
3rd Phase

도면8


1단계 배양
(바이오매스 생산)
2단계 LED 파장 스트레스 배양
(전체 오일 축적)
3단계 저온 배양
(특정 불포화 지방산 합성)