

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0123899
(43) 공개일자 2023년08월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/21 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 37/00 (2013.01)
C12M 21/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0021468
(22) 출원일자 2023년02월17일
심사청구일자 2023년02월17일
(30) 우선권주장
1020220021062 2022년02월17일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
윤흥기
충청남도 서산시 한마음8로 64, 602호
성영준
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 201동 501호
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
- (74) 대리인
정은열, 김태훈

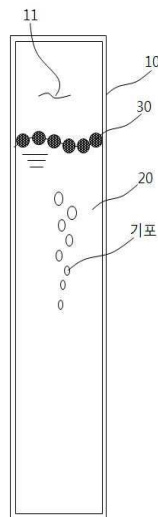
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 부유성 구조체를 이용한 광합성 미생물 배양방법

(57) 요약

본 발명은 부유성 구조체를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것으로, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법은 광생물반응기(10) 내부의 배양액(20)에서 광합성 미생물을 배양하는 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 배양액(20)의 수면에 부유하는 부유성 구조체(30)를 광생물반응기(10)의 내부에 투입하여 광합성 미생물을 배양한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 37/04 (2013.01)

C12M 41/02 (2013.01)

C12N 1/12 (2019.02)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128194
과제번호	2020M3H7A1098295
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	유용물질생산을위한CarbontoX기술개발(R&D)
연구과제명	연소가스 내 CO2 직접 광생물 전환을 위한 고효율 공정 원천 기술
기 여 율	70/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.27 ~ 2022.01.26

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141613
과제번호	2021B300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명	공공연구성과활용촉진(R&D)
연구과제명	광 조건하 미세조류 기반 아스타잔틴 고생산 및 제품화 기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.07.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

광생물반응기 내부의 배양액에서 광합성 미생물을 배양하는 광합성 미생물 배양방법에 있어서,
상기 배양액의 수면에 부유하는 부유성 구조체를 상기 광생물반응기의 내부에 투입하여 상기 광합성 미생물을 배양하는 광합성 미생물 배양방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 부유성 구조체는,
3차원 입체적 형상으로 형성되는 본체;를 포함하는 광합성 미생물 배양방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,
상기 본체는, 내부에 공동(cavity)을 구비하는 광합성 미생물 배양방법.

청구항 4

청구항 2에 있어서,
상기 본체는, 구(ball) 형상으로 형성된 광합성 미생물 배양방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,
상기 본체의 직경은, 8 ~ 13mm인 광합성 미생물 배양방법.

청구항 6

청구항 2에 있어서,
상기 부유성 구조체는,
상기 본체의 외면에 접하는 기저체;를 더 포함하는 광합성 미생물 배양방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,
상기 기저체는, 원통 형상으로 형성된 광합성 미생물 배양방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 부유성 구조체는, 3D 프린팅 공정에 의해 제조되는 광합성 미생물 배양방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 광생물반응기의 내부에 소포제(antifoaming agent)를 추가로 투입하는 광합성 미생물 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부유성 구조체를 이용한 광합성 미생물 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물 배양에서 바이오파울링(Biofouling)을 방지하고 세포 성장속도를 증진시켜 바이오매스의 생산성을 향상시키는 미생물 배양기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화석연료의 사용으로 인하여 발생하는 이산화탄소는 온실 가스 중 하나로써, 배출량이 많아 지구온난화를 비롯한 기후변화를 일으키는 주된 요인이라고 할 수 있다. 대기 중 이산화탄소의 농도는 급격하게 증가하여, 2020년에 이르러서는 412.5 ppm에 도달하였다. 이러한 이산화탄소를 감축하거나 저감하는 다양한 기술을 개발하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 이산화탄소의 포집 및 저장 기술(Carbon capture and storage)은 산업 시설로부터 발생하는 고농도의 이산화탄소를 대기중으로 직접 방출하지 않고, 포집제를 이용하여 포집 및 저장하는 기술이다. 그러나 이러한 기술들은 대기 중 이산화탄소 배출량을 감축하는 근본적인 대책이 될 수 없다. 따라서, 이러한 이산화탄소를 감축시키는 동시에 다른 유용물질로 전환시키는 CCU(Carbon capture and utilization) 기술로 전환되고 있다.

[0004] CCU 기술 중 하나인 미세조류를 이용한 이산화탄소 전환 및 유용물질 생산 기술은 광합성을 할 수 있는 생물인 미세조류(Microalgae)를 이용하여 이산화탄소의 고속 전환이 가능하며, 동시에 고 지질(Lipid) 함유 바이오연료 및 의약품 원료, 식량자원 등 다양한 종류의 고부가가치 생산물들을 합성할 수 있다. 특히, 최근에는 증가하고 있는 플라스틱 폐기물의 처리와 관련하여, 생분해성 바이오 플라스틱 산업의 수요가 증가하고 있다.

[0005] 그러나 이러한 장점에도 불구하고 상업적 미세조류 배양공정으로는 한계가 있다. 그 첫 번째 원인으로는, 산업계에서 요구하는 미세조류의 세포성장성이 여전히 느리다는 것이다. 두 번째 원인으로는, 생물오염에 취약하다는 것이다. 미세조류를 배양하는 방법에는 두 가지의 방법이 있는데, 첫째는 무기탄소원과 유기탄소원을 동시에 투입하여 배양하는 혼합영양배양(Mixotrophic cultivation)이며, 둘째는 미세조류의 특성을 이용, 무기탄소원만으로 광합성을 하여 배양하는 광독립영양배양(Photoautotrophic cultivation)이다. 유기탄소원을 추가 투입하는 혼합영양배양(Mixotrophic cultivation) 공정은 광독립영양배양(Photoautotrophic cultivation)에 비해 성장성이 우수하지만, 외부 오염원인으로 인하여 생물오염이 발생한다. 반면, 광독립영양배양(Photoautotrophic cultivation)의 경우에는 무기탄소원인 이산화탄소를 섭취하여 광합성을 진행하는 미세조류의 배양 공정에서 고 순도의 바이오매스를 얻을 수 있다는 장점이 있으나, 그 성장속도가 매우 느리다.

[0006] 한편, 미세조류를 대량 배양하는 공정에서 반응기 내부 표면에 생성되는 바이오파울링(Biofouling) 현상이 문제가 되고 있다. 바이오파울링 현상은 배양이 지속됨에 따라 배양액이 반응기의 헤드스페이스(Headspace)에 부착되어 자라면서 바이오필름(Biofilm)이 형성되며, 이것은 생물오염을 일으키는 원인이 된다. 이러한 바이오파울링 현상을 제거하거나 억제하기 위해, 하기 선행기술문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이 다양한 연구들이 진행되고 있다.

[0007] 그러나 종래 기술에서는 바이오파울링 현상에 대한 효과를 정량적으로 측정하는 연구 사례가 없었고, 효과적으

로 바이오필름의 생성을 억제하지도 못하였는바, 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-2016-0000206 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일측면은 부유성 구조체(Buoyant structure)를 사용하여 광생물반응기에서의 바이오파울링 생성을 방지함으로써 광합성 미생물의 세포 성장성을 향상시키고, 광생물반응기의 재사용을 가능하게 하는 광합성 미생물 배양방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법은 광생물반응기 내부의 배양액에서 광합성 미생물을 배양하는 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 배양액의 수면에 부유하는 부유성 구조체를 상기 광생물반응기의 내부에 투입하여 상기 광합성 미생물을 배양한다.

[0013] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 부유성 구조체는, 3차원 입체적 형상으로 형성되는 본체;를 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 본체는, 내부에 공동(cavity)을 구비할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 본체는, 구(ball) 형상으로 형성될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 본체의 직경은, 8 ~ 13mm일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 부유성 구조체는, 상기 본체의 외면에 접하는 기저체;를 더 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 기저체는, 원통 형상으로 형성될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 부유성 구조체는, 3D 프린팅 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 상기 광생물반응기의 내부에 소포제(antifoaming agent)를 추가로 투입할 수 있다.

[0022] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0023] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니 되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따르면, 광생물반응기 내 배양액에 부유성 구조체를 투입함으로써, 광합성 미생물 배양 시 바이오필름이 생성되는 것을 물리적으로 억제함으로써 바이오매스의 생산성을 획기적으로 향상시킬 뿐만 아니라 광생물 반응기의 재사용을 용이하게 한다.
- [0026] 또한, 별도의 세척 공정 없이 반연속식 배양(Semi-continuous cultivation)에 직접 적용이 가능하여 대부분의 심부배양 공정에서 범용적으로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법을 개략적으로 도시하는 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 광합성 미생물 배양방법에 사용되는 부유성 구조체의 실시예에 관한 것으로, (A)는 일실시예에 따른 구형 부유성 구조체의 단면도, (B) 다른 실시예에 따른 부유성 구조체의 사시도이다.
- 도 3은 미세조류 배양 시 형성되는 바이오필름의 영향을 나타내는 것으로서, (A)는 고분자 필름 재질의 수직관형 광생물반응기(PBR)의 헤드스페이스에 바이오필름이 형성되는 사진, (B)는 인위적으로 광생물반응기의 바이오필름을 제거한 경우와 제거하지 않은 경우의 세포 성장속도를 나타내는 그래프, (C)는 소포체가 있는 매스실린더와 소포체가 없는 매스실린더 각각에서 형성된 바이오필름의 이미지, (D)는 소포체의 유무에 따른 바이오매스 손실을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 다양한 부유성 구조체를 적용하여 바이오필름 형성을 방지하는 실험으로서, (A)는 3D 프린팅을 사용하여 제작된 다양한 형태의 부유성 구조체(구, 사면체, 육면체 및 팔면체) 이미지, (B)는 제작된 부유성 구조체의 형태에 따른 고분자 광생물반응기(PBR)의 헤드스페이스에 형성된 바이오필름의 이미지 및 디지털 이미지, (C)는 부유성 구조체의 형태에 따른 상위 10%에 분포하는 세포 배양액 액적의 평균 높이와 전체 분포 면적을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 구형 부유성 구조체의 크기에 따른 바이오필름 패턴 분석 결과로서, (A)는 구형 부유성 구조체의 크기에 따른 광생물반응기의 헤드스페이스에 형성된 바이오필름 패턴 이미지 및 디지털 이미지, (B)는 구형 부유성 구조체의 크기별 상위 10% 높이에 해당하는 세포 현탁액의 평균 높이 및 전체 세포 분포 면적을 나타내는 그래프, (C)는 구형 부유성 구조체의 크기에 따른 세포 현탁액의 높이별 분포를 나타내는 그래프, (D)는 구형 부유성 구조체의 크기별 바이오필름 형성에 의한 바이오매스 손실을 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 구형 부유성 구조체의 크기에 따른 기포 과열 억제 효과를 나타내는 결과로서, (A)는 배양액 표면에 부유하는 구형 부유성 구조체의 이미지, (B)는 구형 부유성 구조체의 크기별로 구조체가 배양액 표면을 덮은 면적을 나타내는 그래프, (C)는 구형 부유성 구조체의 크기에 따른 기포와의 상호작용을 관찰한 이미지(크기가 다른 구형 부유성 구조체의 다양한 움직임 패턴을 고속 셔터 속도로 촬영한 사진), (D)는 구형 부유성 구조체의 크기별 기포의 평균 크기를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 구형 부유성 구조체 및 광생물반응기를 사용하여 *N. oleoabundans*을 실내에서 반연속 배양한 결과로서, (A)는 부유성 구조체가 없는 광생물반응기 대조군(control 1, control 2, control 3) 및 부유성 구조체가 있는 광생물반응기 실험군(Exp 1, Exp 2, Exp 3)의 이미지, (B)는 상기 대조군 및 실험군에서 반연속 배양을 실시한 세포 성장곡선이다.
- 도 8은 200L 규모의 고분자 광생물반응기(작업량 100L), 구형 부유성 구조체 및 열병합 발전소의 연소 배가스 CO₂를 사용하여 *N. oleoabundans*을 옥외배양한 결과로서, (A)는 부유성 구조체가 없는 광생물반응기 대조군(왼쪽) 및 부유성 구조체가 있는 광생물반응기 실험군(오른쪽)의 이미지(파란색 실선 화살표와 점선 화살표는 각각 연소 배가스 CO₂ 보충 및 기포를 나타냄), (B)는 상기 대조군 및 실험군에서 회분식 배양을 실시한 세포 성장곡선, (C)는 상기 대조군 및 실험군에서의 바이오매스 및 지질 생산성을 나타내는 그래프, (D)는 상기 대조군 및 실험군에서의 지질 유도 단계 동안 축적된 *N. oleoabundans*의 총 지질함량을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람

직한 실시예 및 실험예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

- [0031] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예 및 실험예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0033] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법을 개략적으로 도시하는 도면이고, 도 2는 본 발명에 따른 광합성 미생물 배양방법에 사용되는 부유성 구조체의 실시예에 관한 것으로, (A)는 일 실시예에 따른 구형 부유성 구조체의 단면도, (B) 다른 실시예에 따른 부유성 구조체의 사시도이다.
- [0034] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 광합성 미생물 배양방법은 광생물반응기(10) 내부의 배양액(20)에서 광합성 미생물을 배양하는 광합성 미생물 배양방법에 있어서, 배양액(20)의 수면에 부유하는 부유성 구조체(30)를 광생물반응기(10)의 내부에 투입하여 광합성 미생물을 배양한다.
- [0036] 본 발명은 광합성 미생물의 배양공정에서 사용되는 다양한 종류의 광생물반응기(Photobioreactor, PBR, 10)에서 생성되는 바이오파울링(Biofouling) 현상에 의한 바이오필름(Biofilm)을 정량적으로 측정하는 방법을 규정하고, 배양액(20)으로부터 액막(Liquid film)이 광생물반응기(10)의 내벽에 물리적으로 튀는 것을 방지하기 위한 부유성 구조체(30)를 설계함으로써, 광생물반응기(10) 내에서 미생물 배양 시 바이오필름의 생성을 억제하는 광합성 미생물 배양방법을 제안한다. 이에 따라 바이오매스 생산성을 향상시킴과 동시에 광생물반응기(10)를 장기 사용 내지 재사용할 수 있다.
- [0037] 여기서, 광합성 미생물은 무기탄소원인 이산화탄소를 이용하여 광합성을 하는 미세조류와 다양한 종류의 미생물을 포함한다. 이러한 광합성 미생물은 광독립영양배양(Photoautotrophic cultivation) 방식에 의해 광생물반응기(10)에서 배양될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 광생물반응기(10)는 2L 규모의 V-shape 반응기, 100L 규모의 수직관형 반응기 등 그 규모와 크기에 무관하게 어떠한 반응기를 사용해도 무방하다. 또한, 광생물반응기(10)는 고분자 필름, 유리, 아크릴, 폴리카보네이트 등과 같이 어떠한 소재로 이루어져도 상관없다. 따라서, 닫힌 계(Closed system)를 특징으로 하는 고분자 필름(polymer film) 형태의 광생물반응기(10)에서 광합성 미생물을 배양할 수도 있다.
- [0039] 본 발명에서의 배양은 5% CO₂ 조건에서 20 ~ 25℃에서 수행될 수 있다. 이때, 발전소 등과 같은 산업 시설에서 배출되는 배가스 내 고농도의 이산화탄소를 사용할 수 있다. 또한, 100-300 μmol photons m⁻² s⁻¹ 광조건에서 그 배양이 수행될 수 있다.
- [0040] 본 발명은 반연속 배양에 적용이 가능하다. 예를 들면, 3일마다 75%의 배양액(20)을 회수한 뒤 새로운 배양액(20)을 투입하는 방식으로 반연속 배양을 수행할 수 있다. 또한, 옥외배양에도 적용할 수 있다. 예를 들어, 산업 설비에서 배출되는 배가스 내 이산화탄소를 이용하여 옥외에서 대규모로 광합성 미생물을 배양할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 광생물반응기(10) 내부의 배양액(20)에서 광합성 미생물을 배양하기 위해서, 부유성 구조체(30)를 투입한다. 부유성 구조체(30)는 배양액(20)의 수면에 뜰 수 있는 구조체로서, 배양 시에 배양액(20)에 투입된다.
- [0043] 일반적으로 광생물반응기(10) 내의 배양액(20)에서 광합성 미생물을 배양하는 경우에 바이오파울링 현상이 일어날 수 있다. 바이오파울링 현상은 배양이 지속됨에 따라 광생물반응기(10)의 내상부, 즉 헤드스페이스(Headspace, 11)를 형성하는 내벽에 배양액(20)이 부착되어 광합성 미생물이 자라면서 바이오필름(Biofilm)을 생성하는 현상이다. 이렇게 형성된 바이오필름은 생물오염을 일으키는 원인이 된다. 상기 헤드스페이스(11)는 광생물반응기(10) 내의 내상부를 이루는 공간으로서, 배양액(20) 수면을 경계로 그 상부 영역을 의미한다. 따라서, 광생물반응기(10)의 내부로 폭기(Aeration)된 가스 성분은 배양액(20)을 거친 뒤 헤드스페이스(11)로 유출된다. 배양 과정 중 폭기로 인해 생성된 기포가 수면에 도달하게 되며, 헤드스페이스(11)의 기체와 접하기 직전 순간적으로 액막(liquid film)을 형성하게 되고, 그 액막이 짧은 시간 동안 그 형상을 유지하지 못하다가 임의

의 부분을 중심으로 터지게 된다. 이러한 기포 과열(bubble burst)에 의해 배양액(20) 및 광합성 미생물 세포를 포함하는 미세한 액포 내지 거품이 생성되고, 액포가 상향으로 높이 튀면서 헤드스페이스(11) 구간의 광생물반응기(10)의 내벽에 부착된다. 여기서, 그 내벽에 부착된 상태로 세포가 성장하면서 바이오필름을 생성하고, 외부 환경에 노출되어 생물오염을 일으킨다.

[0044] 이러한 바이오파울링 현상을 방지하기 위하여, 본 발명은 부유성 구조체(30)를 배양액(20)에 투입한다. 투입 시기는 배양 초기가 적합하지만, 배양 중에 투입되어도 무방하다.

[0046] 도 2의 (A)에 도시된 바와 같이, 부유성 구조체(30)는 3차원 입체적 형상으로 형성되는 본체(31)를 포함한다. 여기서, 본체(31)의 내부에는 공동(Cavity, 31a) 내지 중공이 구비될 수 있다. 상기 공동(31a)은 부유성 구조체(30)에 자체적인 부력을 부여한다. 본체(31)는 구(Ball) 형상이나, 사면체, 육면체, 팔면체 등과 같이 다양한 입체구조로 형성될 수 있다. 바람직하게는, 구 형상으로 형성되고, 이때 그 직경은 8 ~ 13mm일 수 있다. 이러한 부유성 구조체는 3D 프린팅 고정에 의해 제작될 수 있다. 그 소재로는 3D 프린팅에 적용 가능한 소재이면 특별한 한정은 없고, 예를 들어 폴리에틸렌 테레프탈레이트(glycolmodified polyethylene terephthalate), PLA(Polylactic acid) 등과 같은 재료를 사용할 수 있다.

[0047] 도 2의 (B)를 참고로, 부유성 구조체(30)는 본체(31)의 외면에 접하는 기저체(33)를 더 포함할 수 있다. 이러한 기저체(33)는 원통 형상으로 형성될 수 있고, 이때 직경은 3 ~ 5mm일 수 있다. 상기 기저체(33)는 3D 프린팅 공정을 통한 구형 부유성 구조체(30) 제조 시 안정적인 출력물을 생산하기 위해 마련될 수 있다.

[0049] 한편, 본 발명은 광합성 미생물의 장기 배양 시 생성되는 거품(Foam)을 제거하기 위하여, 광생물반응기(10)의 내부에 소포제(Antifoaming agent)를 추가로 투입할 수 있다.

[0051] 이하에서는 구체적인 실험예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0053] 1. 실험재료 및 방법

[0054] 1.1 조류 균주 및 종배양 조건

[0055] 본 실험에 사용된 미세조류는 *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185로서, University of Texas at Austin의 Culture Collection of Algae에서 구입하여 5% CO₂ 균일 공급 조건하의 CO₂ 인큐베이터(VS-9170CT, Vision Science)에 보관하였다. 미세조류의 종배양(seed culture)은 23℃, 100 μE m⁻² s⁻¹의 광도에서 TAP(Tris-acetate-phosphate) 배지를 사용하여 수행하였다. 광독립영양배양을 위해 아세트산을 염산으로 대체하여 pH 7.0 ~ 7.5를 유지하였다(Tris-phosphate(TP) 배지).

[0057] 1.2 감염률 결정

[0058] 현미경(CKX41, Olympus, Japan)과 헤모사이토미터(hemocytometer)(DHC-F01 Incyto, South Korea)를 이용하여 감염률을 측정하였다. 샘플은 2L 광생물반응기(photobioreactor, PBR) 내 바이오필름으로부터 점종 루프를 사용하여 채취하고, 수집된 샘플을 탈이온수(DI)로 희석했다. 감염률은 감염되지 않은 세포와 감염된 세포의 수를 카운팅하여 아래 수식 1에 따라 계산하였다.

[0059] [수식 1]

[0060]
$$\text{감염률(\%)} = N_i \times 100 / (N_i + N_u)$$

[0061] 여기서 N_i 및 N_u는 각각 감염된 세포 수와 감염되지 않은 세포 수이다.

[0063] 1.3 오염물질 분석을 위한 DNA 추출 및 PCR 증폭

[0064] DNA 추출을 위한 바이오매스 샘플은 바이오필름을 긁어내어 수득했다. colony PCR을 효과적으로 수행하기 위하여, 100 μ L의 5%(v/v) Chelex®100 Resin(200-400 메쉬, Bio-Rad, USA) 배양액에서 샘플링한 바이오매스(건조 중량 10mg)를 재부유(resuspend)시키고, 98℃에서 10분 동안 가열하여 용해시켰다. 가열 후, 현탁된 바이오매스를 얼음 위에서 냉각시키고 4℃에서 1분 동안 15,000 $\times$ g에서 원심분리하였다. 그런 다음 상층액을 PCR에 사용했다. 세균 오염을 검출하기 위해 일반 프라이머(universal primers) 518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') 및 800R(5'-TACCAGGTATCTAATCC-3')을 사용하였다. 미세조류 및 진균의 동정을 위해 진핵생물의 일반 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 및 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하였다. PrimeSTAR®DNA Polymerase(Takara Bio, Japan)를 제조업체의 지침에 따라 PCR 증폭에 사용했다. PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동(1.5 wt% 아가로스 겔, 4 V cm^{-1} , 30분)으로 분석하였다.

[0066] 1.4 3D 프린팅 부유성 구조체 제조

[0067] Autodesk Fusion 360®소프트웨어를 사용하여 다양한 모양의 부유성 구조체를 설계했다. 각 정다면체(사면체, 육면체, 팔면체)와 구의 직경을 10mm로 설계하였다. 설계한 각 구조체의 모델링은 Fusion 360®소프트웨어를 사용하여 STL 파일로 내보내기 하였고 이를 Simplify 3D 소프트웨어를 사용하여 GCODE파일로 슬라이싱하였다. 최적의 인쇄 조건(노즐 온도: 215℃, 베드 온도: 75℃, 내부채움비율: 30%)에서 STICK 3D 프린터 Classic(STICK, Korea)을 사용하여 부유성 구조체를 인쇄하였다. 1.75 mm Poly lactic acid 필라멘트(3DM PLA Pro, 3D Materials, Korea)를 프린팅 재료로 사용했다.

[0069] 1.5 PBR 표면의 미세조류 바이오필름 정량화

[0070] PBR 상에서 바이오필름 형성을 시뮬레이션하기 위해서, 유리 실린더(직경 40mm, 부피 300mL)를 사용했다. 미세조류 세포는 5% CO₂ 농축(v/v) 공기 0.2 vvm가 공급되는 200mL 부피에서 배양되었다. PBR 표면 상의 바이오필름 패턴을 시각화하기 위해, 건조된 여과지를 실린더 헤드스페이스(headspace)에 고정하고, 여과지를 버블링 환경에 20분 동안 노출시킨 후 실린더에서 제거하고 50℃의 오븐에서 30분 동안 건조시켰다. 그런 다음 DSLR 카메라(Canon 700D)로 바이오필름 패턴 이미지를 촬영하고 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 미세조류 액적의 도트를 분석했다. 도트 분포는 ImageJ 소프트웨어의 '입자 분석 기능'을 사용하여 확인하였다. 바이오매스 손실을 측정하기 위해서, 여과지를 실린더에 고정하고 버블링 환경에 1시간 동안 노출시킨 후 여과지를 50℃오븐에서 24시간 동안 건조시켰다. 바이오매스 손실은 초기 여과지와 최종 여과지의 무게 차이로 확인하였다.

[0072] 1.6 기포 크기 분포 측정

[0073] 직경에 따른 구형 부유성 구조체의 운동 분석 실험 설정 시 단면이 원형인 용기를 사용할 경우, 구형 부유성 구조체가 2차원적으로 배열되어 구형 구조체의 직경에 따른 PBR 표면 부근의 기포 터짐 현상을 분석하기 어려웠다. 따라서 투명 아크릴판을 사용하여 구형 부유성 구조체에 적합한 폭을 갖는 직육면체 용기를 제작하였다. 기포의 상향 이동으로 인한 잔상을 최소화하기 위해 카메라 셔터 속도를 1/4000초로 설정했고, 빠른 셔터 속도로 인한 빛 부족을 보완하기 위해 고풍력 LED 백라이트를 사용했다.

[0075] 1.7 실내 반연속 배양

[0076] 최적화된 구형 부유성 구조체를 이용하여 미세조류를 배양하기 위해서, 작업량(working volume)이 2L인 V자형 고분자 필름 재질 PBR을 사용하였다. *N. oleoabundans* UTEX 1185는 23℃에서 배양되었고, 광도는 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 설정되었다. 더 큰 배양 부피에서의 음영효과(self-shading effect)로 인한 광 강도 감소를 고려하여, 플라스크 규모에서의 중배양에서보다 PBR 배양에서 더 높은 강도의 광을 조사하였다. 무기탄소원으로서 5%(v/v) 농도의 CO₂를 0.2 vvm으로 공급하였다. 실험군으로는 배양액 수면에 구형 부유성 구조체가 채워진 PBR을 사용하였고, 대조군인 PBR에는 구형 부유성 구조체를 사용하지 않았다. 배양은 16일 동안 계속하였으며, 건조 세포 중량을 이용하여 바이오매스의 성장을 확인하였다. 반복 배양은 7일, 11일, 15일에 전체 배지의 75%인 1.5L를 회수한 후 새로운 TP 배지 1.5L를 공급하여 수행하였다. 배지의 pH는 7.5로 유지되었고, 모든 실험은 세 번 수행

되었다. 구형 부유성 구조체가 미세조류 배양에 미치는 영향을 구체적으로 평가하기 위해 하기 [수학식 2]를 이용하여 일간 성장률(Specific growth rate, SGR)을 계산하였다.

[0077] [수학식 2]

[0078] 일간 성장률(day^{-1}) = $\ln(D_2 / D_1) / (t_2 - t_1)$

[0079] 여기서, D_1 및 D_2 는 각각 시간 1(t_1) 및 2(t_2)에서의 광학 밀도 기반의 세포 농도이다.

[0081] 1.8 배가스 CO_2 를 이용한 미세조류의 옥외 배양

[0082] 최적의 구형 부유성 구조체와, 한국지역난방공사(KDHC)의 LNG 발전설비에 연결된 CO_2 배출장치에서 얻어지는 연소 배가스를 사용하여 *N. oleoabundans* UTEX 1185를 옥외에서 대량 배양하였다($3.5 \pm 0.5\%$ (v/v) CO_2 , $21.63 \pm 3.54\text{ppm}$ NO_x , $1.36 \pm 4.12\text{ppm}$ CO, $10.17 \pm 0.73\%$ O_2). 반응기는 작업량이 100L인 200L 기포 컬럼 폴리머 필름 광생물반응기(bubble column polymer film PBRs)를 사용하였으며 자연광으로 미세조류를 배양하였다. 실험군에서는 배양액의 수면에 구형 부유성 구조체가 채워진 200L PBR을 사용하였다. 또한, 실험군에는 PBR에 소포제를 첨가하였다. 대조군에는 구형 부유성 구조체가 없는 200L PBR을 사용하였다. 배양은 21일 동안 수행하였으며, 배양 10일째 염 스트레스를 통한 지질 축적을 유도하기 위해 배양 중인 반응기에 200mM NaCl을 첨가하였다.

[0084] 1.9 CO_2 고정률 결정

[0085] 건조 세포 중량(DCW)을 측정하기 위해 각 PBR에서 3mL의 세포 배양액을 샘플링했다. 바이오매스 생산성(P; $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)은 아래 [수학식 3]으로 계산하였다.

[0086] [수학식 3]

[0087] $P = (X_F - X_I) / (t_F - t_I)$

[0088] 여기서, $X_F(\text{g L}^{-1})$ 및 $X_I(\text{g L}^{-1})$ 는 각각 배양 종료 시점(t_F) 및 배양 시작 시점(t_I)에서 측정된 건조 세포 중량이다.

[0089] 광독립영양 조건에서 탄소 균형 평가에 필요한 CO_2 고정률(R_{CO_2} ; $\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{d}^{-1}$)은 아래 [수학식 4]에 따라 계산하였다.

[0090] [수학식 4]

[0091] $R_{\text{CO}_2} = (C / 100) \times (M_{\text{CO}_2} / M_C) \times P$

[0092] 여기서, C, M_{CO_2} 및 M_C 는 각각 바이오매스의 탄소 함량(%w/w), CO_2 의 분자량(44.01 g mol^{-1}) 및 탄소의 원자량(12.01 g mol^{-1})이다. 다양한 미세조류 종의 원소 분석을 바탕으로 미세조류 바이오매스의 탄소 함량은 약 50%로 가정하였다.

[0094] 1.10 미세조류의 총 지질 및 지방산 메틸 에스테르(FAME)의 정량화

[0095] Bligh-Dyer 방법(Bligh and Dyer, 1959)에 따라 세포의 총 지질 및 FAME(fatty acid methyl esters) 함량을 결정하기 위하여, 옥외배양 중인 광생물반응기에서 배양액 샘플을 채취하고, 각 샘플 3.0 mL를 유리 바이알에 옮기고 $3,000 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심분리했다. 10 ~ 15mg 습중량(wet weight)에 대응되는 샘플 부피에는 지질 및 FAME 분석을 위한 충분한 수의 세포가 포함되어 있다. 3mL 샘플은 건조 중량이 약 3mg이고 수분 함량을 65 ~ 90%로 가정하면 습중량이 약 22.5 ~ 30mg으로 분석에 충분한 양이다. 상층액을 제거하고 3.9mL의 클로로포름(chloroform)과 메탄올(1:2, v/v) 용액을 바이알에 첨가했고, 세포 용해를 위해 바이알을 30분 동안 50°C 로 가

열하였다. 지질 함량의 중량 측정을 위해 유리 바이알을 3,000 x g에서 10분 동안 원심분리한 다음에, 바이알의 상층액을 미리 계량된 다른 빈 유리 바이알로 옮기고, 바이알을 16시간 이상 50℃에서 가열하여 용매를 증발시킨 후, 유리 바이알의 무게 변화를 계산하여 총 지질을 측정했다. FAME를 측정하기 위해 지질 추출을 통해 얻은 상층액에 10mg pentadecanoic acid(C15:0, inner standard)와 1.3 mL의 클로로포름을 첨가하였다. 에스테르 교환 반응을 위해 각 용액에 황산 80 µL를 첨가하고 95℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 혼합물을 3,000 x g에서 10분 동안 원심분리하고 하층액을 채취하여 가스 크로마토그래피로 분석하였다. 불꽃 이온화 검출기(frame ionization detector, GC-FID)가 내장된 Agilent 7890A 가스 크로마토그래프와 DB-23 GC 컬럼(Agilent, USA)을 사용하여 FAME를 측정했다. 시료 주입기의 주입량은 1.0 µL로 설정하고, 오븐 온도는 50℃에서 1분 동안 유지한 다음, 175℃까지 분당 25℃씩 증가시키고, 230℃까지 분당 4℃씩 증가시킨 후에 230℃에서 5분간 유지했다. 검출기의 온도는 280℃로 유지했고, 온도는 250℃로 설정했다.

[0097]

2. 결과

[0098]

2.1 PBR에서 바이오필름이 미세조류 세포 배양에 미치는 영향

[0099]

수직관형 고분자 PBR에서 미세조류의 광독립영양 배양을 위한 가스 버블링이 배양액 표면에 지속적인 기포 파열(bubble burst) 및 거품 형성을 유발하면서, PBR의 헤드스페이스에 바이오필름이 형성되었다. 바이오필름 면적이 지속적으로 증가함에 따라 배양액이 외부 환경에 노출된다(도 3A). 이에 따라, PBR 벽에 세포 부착을 유도할 수 있는 세포외 고분자 물질(extracellular polymeric substances, EPS)의 방출되고, 바이오필름에서의 세포 사멸에 의해 가속화되는 오염이 미세조류 생산량과 질을 악화시킨다. 본 실험에서는 배양 초기에 외부 오염이 관찰되지 않았으나, 약 17일 동안 배양한 후에는 *N. oleoabundans* 이외의 미생물에 의한 감염률이 82.15%로 급격히 증가하였다. 결과적으로 바이오필름 형성과 생물오염은 심각한 배양 손상을 일으킨다. PBR 헤드스페이스에서 지속적으로 형성되는 바이오필름을 인위적으로 세척하여 제거한 경우에 초기 배양 배지에서의 세포 밀도(OD₈₀₀)가 거의 그대로 유지되었으나, 배양 5일째에는 바이오필름 형성으로 인해 사멸한 바이오매스가 점진적으로 축적되면서 세포 농도가 15.3% 감소하였다(도 3B). 바이오필름의 형성은 기포 파열과 거품 형성에 모두 영향을 미칠 수 있다. 거품은 강한 기포에 의한 전단응력과 부적합한 배양조건에 의한 세포응력에 의한 세포파손 및 세포의 부분적 용해에 의해 분비되는 세포성분에 의해 생성될 수 있다. 이러한 거품의 형성은 기포 파열과 함께 PBR 표면에서의 심각한 바이오매스 손실을 야기한다. 이를 해결하기 위해 실리콘계 소포제를 반응기에 첨가하였다. 이로 인해 바이오필름 형성은 감소하였지만 세포 배양액이 여전히 기포 파열에 의해 튀었고(도 3C), 생물 부착 방지에 널리 사용되는 소포제를 도입해도 바이오매스 손실이 발생하여 바이오매스가 (최대) 39.4%까지 감소했다(도 3D).

[0101]

2.2 부유성 구조체의 형태에 따른 바이오필름 형성

[0102]

일반적으로 실리콘 오일과 소수성 구조체 입자로 구성된 소포제는 용매의 표면장력을 줄임으로써 거품 형성을 억제한다. 이러한 소포제의 거품 억제 효과에도 불구하고 미세조류 배양에서의 지속적인 소포제의 사용은 세포 성장에 악영향을 미칠 수 있기 때문에 그 사용은 제한적이다. 소포제가 제한적으로 사용되면 초기에 기포 파열에 의해 반응기 표면에 세포가 부착되게 되고, 이어서 EPS와 데옥시리보핵산으로 구성된 세포외 기질이 생성되어 결국 비가역적 부착이 이루어진다. 미세조류 세포와 반응기 표면 사이의 강한 상호작용은 바이오필름의 성장을 촉진시키고, 바이오필름을 제거하기 위해서는 추가적인 에너지 투입이 요구되는 물리력이 필요하다. 소포제 단독 사용의 한계를 극복하기 위해, PBR 내부의 배양액 수면에 부유하는 부유성 구조체를 도입하여, 버블링에 의해 세포 현탁액이 반응기 표면에 부착되는 것을 방지함으로써 바이오필름의 초기 형성을 억제하고자 하였다. 3D 프린팅을 통해 다양한 형태의 부유성 구조체를 제작하였다. 이러한 3D 프린팅 구조체는 내부 매트릭스를 포함하는데, 그 매트릭스는 외부의 기계적 스트레스에 대해 높은 안정성을 가지고, 공동 내지 중공을 구비함으로써 자체적인 부력을 부여한다. 구조체의 형태에 따른 바이오필름 형성 방지 효과를 알아보기 위해 구, 사면체, 육면체, 팔면체 등 가장 기본적인 3차원 기하학적 구조로 구조체를 제작하였다. 또한, 구조체가 배지에 뜰 수 있도록, 내부 채움 정도(infill ratio)를 30%까지 설정하여 부력을 증가시켰다(도 4A). 각 부유성 구조체는 소포제와 함께 미세조류 배양액에 첨가되었다. 그 결과, 부유성 구조체가 없는 대조군에 비해 구형의 부유성 구조체가 있는 경우에 바이오필름 형성이 현저히 감소하였으며, 다른 유형의 부유성 구조체도 바이오필름 형성을 감소시켰다(도 4B). 바이오필름 패턴의 변화를 정량화하기 위해, 바이오필름의 이미지를 디지털 이미지로 변환하고 세포 배양액이 튀는 것을 나타내는 도트 분포를 조사했다. 구형의 부유성 구조체를 사용한 경우, 전체 바이

오필름 면적과 상위 10% 세포 배양액의 평균 높이가 각각 36.6% 및 24.9% 감소했다(도 4C). 그 감소 효과는 구형 구조체에 비해 상대적으로 작았지만 다른 입체(사면체, 육면체 및 팔면체)의 구조체도 바이오필름 형성 방지에 기여하는 것으로 나타났다. 구형 구조체는 배양액의 수면에 어떻게 부유하든지 항상 같은 형태를 유지했기 때문에 기포 억제 효과를 상당히 발휘할 수 있지만, 모서리가 있는 입체 구조체에서는 기포에 의한 수면의 요동으로 인해 표면이 불규칙한 형태로 떠있게 되므로 기포 파열에 대한 제어가 상대적으로 떨어졌다. 전반적으로 구형의 부유성 구조체가 바이오필름 형성을 감소시키는데 상당한 효과가 있었다는 결론을 내릴 수 있다.

[0104] 2.3 부유성 구조체의 크기에 따른 바이오필름 패턴과 바이오매스 손실

[0105] 구형의 부유성 구조체의 크기에 따른 바이오필름 방지 효과를 분석하였다. 미세조류 배양에 직경이 각각 5, 10, 15, 20mm인 구형의 부유성 구조체를 사용하여 패턴 및 디지털 이미지 분석을 실행한 결과, 10mm 구조체가 바이오필름 형성을 가장 급격하게 감소시켰다(도 5A). 디지털 이미지 기반 정량분석 결과에서, 상위 10% 미세조류 현탁액의 높이가 모든 크기의 구형 구조체에서 23.1% 이상 감소한 것을 확인하였다(도 5B). 또한 전체 바이오필름 면적이 30.4% 이상 감소했다. 따라서 구형의 부유성 구조체는 그 크기에 관계없이 바이오필름 형성을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다. 특히, 직경이 10mm인 구조체는 바이오필름 형성 높이와 면적을 각각 58.3%, 82.5% 줄여 가장 우수한 효과를 보였다. 미세조류 현탁액의 분포 분석 결과를 통해서도 부유성 구조체를 사용하는 경우에 미세조류 현탁액이 낮은 높이에서 분포하는 것을 확인하였다(도 5C). 부유성 구조체는 광생물 반응기의 헤드스페이스에서 바이오 필름이 형성되는 높이를 급격히 감소시키기 때문에 배양액이 외부 환경에 대하여 노출되는 것을 줄임으로써 오염 가능성을 낮출 수 있다. 바이오필름 형성의 억제는 또한 바이오매스의 손실을 상당히 감소시키는데, 10mm 구형 구조체는 바이오매스 손실을 58.7% 이상 줄일 수 있는 것으로 나타났다(도 5D).

[0107] 2.4 부유성 구조체의 크기에 따른 커버링 면적(covering area) 및 기포의 크기 분석

[0108] 구형 부유성 구조체의 크기가 10mm까지 증가할 때에는 바이오필름 형성 억제 효과도 증대되었으나, 그 크기가 더욱 커짐에 따라서는 그 효과가 감소했다. 이에 구형 부유성 구조체의 직경이 바이오필름 형성 억제에 미치는 영향을 분석하였다. 구형 구조체가 배양액의 수면에 떠 있을 때, 구조체가 수면을 덮는 커버링 면적은 구조체의 직경에 따라 다르다(도 6A). 상대적으로 크기가 작은 구조체가 더 넓은 수면 영역을 커버할 수 있다. 5mm 구형 구조체는 수면의 71.2%까지 덮을 수 있었던 반면 20mm 구조체는 51.8%만 덮었다. 구형 구조체와 수면의 형태가 완전한 원이라고 가정하면, 구조체의 직경(5, 10, 15, 20mm)에 따라 이론적으로 수면을 덮는 면적의 직경은 40mm이다. 이론적 결과와 실험적 결과의 유사성을 기반으로, 구형 구조체가 배양액에 침수되어 커버리지 면적의 손실이 거의 없음을 확인하였다(도 4B). 또한 상대적으로 작은 구형 구조체는 부력이 작기 때문에, 그 구조체의 움직임은 수면에서의 기포에 의한 요동에 크게 영향을 받는다. 기포의 부력은 [수학식 5]에 의해 계산할 수 있다.

[0109] [수학식 5]

[0110]
$$F_{b,bubble} = \rho_{water} \times V_{bubble} \times g$$

[0111] 여기서, $F_{b,bubble}$ 은 상승하는 기포(N)의 부력, ρ_{water} 는 물의 밀도($kg\ m^{-3}$), V_{bubble} 은 기포의 부피(m^3), g 는 중력($m\ s^{-2}$)이다.

[0112] 직경 5mm의 구형 부유성 구조체의 평균 질량은 0.04973g으로, 기포의 부력이 상대적으로 크기 때문에, 5mm 부유성 구조체는 기포 파열을 효과적으로 막을 수 없다. 15mm와 20mm 구형 부유성 구조체의 경우, 기포는 부력이 너무 약해서 그 부유성 구조체를 밀어 올려 빠져 나가지 못하고 부유성 구조체의 아래에 쌓였다가 터진다. 10mm 구형 부유성 구조체는 기포 파열을 제한할 수 있을 정도로, 밀어 올려지면서 기포를 축적할 수 있다(도 6C).

[0113] 구형 부유성 구조체의 주위에 발생하는 기포의 직경을 조사한 결과, 무게가 가장 작은 5mm 구조체에는 0.5 mm ~ 5 mm 범위의 다양한 크기의 기포가 고르게 생성되었으며 기포의 평균 직경이 다른 조건에 비해 가장 큰(1.8 mm) 것으로 확인되었다(도 6D). 부유성 구조체의 크기가 커질수록 상대적으로 작은 크기의 기포가 분포했고, 20mm의 부유성 구조체를 사용했을 때 평균 기포 크기는 1.2mm로 5mm 구조체에 비해 33% 이상 감소한 것으로 나타났다. 결론적으로 구형 구조체의 의 크기가 작아지면 기포가 터지는 공간을 줄일 수 있지만, 작은 크기의 구형 구조체

는 무게가 가볍기 때문에 액체 배양에서 기포의 크기를 효과적으로 제어할 수 없다. 이러한 이유로 10mm 구형 부유성 구조체가 바이오필름 형성 방지에 가장 우수한 효과를 발휘할 것으로 기대된다.

[0115] 2.5 구형 부유성 구조체 재사용을 통한 미세조류의 반연속 배양

[0116] CO₂와 태양광을 각각 탄소와 에너지원으로 사용하는 광독립영양배양에서는 세포 성장과 함께 세포 밀도가 증가하면 음영 효과(self-shading effect)로 인해 빛 투과가 급격히 감소하므로, 반연속 배양 시스템을 이용하여 빛의 활용도를 높이고 신선한 배양액을 지속적으로 공급하여 높은 바이오매스 생산성을 유지할 수 있다. 부유성 구조체의 지속 가능한 활용성을 평가하기 위해 고분자 PBR을 이용하여 미세조류에 대한 반연속 배양을 실시하였다. 구형 부유성 구조체가 배양액 표면에 떠 있기 때문에 반응기 하단 부분으로부터 배양액을 수확하기가 더 쉬웠다. 반연속 미세조류 배양 시, 구형 부유성 구조체가 있는 반응기는 바이오필름 형성이 억제되고 바이오매스의 손실이 적으므로 세포 밀도가 더 높았다(도 7A). 배양 6일 후 구형 부유성 구조체를 사용한 경우, 부유성 구조체가 없는 배지보다 세포 밀도가 1.9배 더 높았다(도 7B). 배양액의 약 75%를 회수하고 새로운 배양액을 주입하는 반연속 배양에서, 부유성 구조체가 없는 초기 회분식 배양(0.366 d⁻¹)에 비해 1.68배(1주기, 0.614d⁻¹) 및 1.14배(2주기, 0.418 d⁻¹) 빠른 세포 성장속도를 보였다.

[0117] 또한, 구형 부유성 구조체는 회분식 배양에서 대조군(0.366 day⁻¹)에 비해 SGR(0.490 d⁻¹)이 1.34배 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 배양주기가 반복됨에 따라, 초기 세포 농도(1.32 ~ 1.82배)에 의해 야기되는 음영 효과로 인해 구형 부유성 구조체의 SGR(0.546 d⁻¹ 및 0.376 d⁻¹)은 대조군(0.614 d⁻¹ 및 0.418 d⁻¹)의 SGR보다 낮았다. 그럼에도 불구하고 부유성 구조체는 여전히 높은 최종 세포 농도를 유지했다. 따라서 부유성 구조체는 낮은 초기 세포 밀도를 유지하기 위해 반연속 배양을 수행할 때 세포 성장속도를 향상시킬 수 있다.

[0118] 구형 부유성 구조체를 사용한 반연속 배양의 환경 영향을 정량화하기 위해, 수명 주기 평가(life cycle assessment, LCA) 하에서 수명 주기 인벤토리(life cycle inventory, LCI)를 수행했다. 미세조류 생산 과정에서 LCA 결과에 영향을 미치는 주요 환경 요인은 가스 배출, 에너지 자원, 물 소비, 폐액 및 고형 폐기물이다. 본 발명에서 반연속 배양 공정은 배양 배지를 재활용하고 바이오매스 생산성 향상으로 CO₂ 고정률을 높여 물 소비량을 줄이고 온실가스 배출량을 줄임으로써, LCA 성능을 향상시킨다. PLA로 제작된 구형 부유성 구조체는 지속적인 기포 발생에도 불구하고 파손으로 인한 현저한 성능저하가 없어 장기간 사용이 가능하다. 또한 PLA는 폴리(에틸렌-테레프탈레이트)(PET)와 같은 석유 기반 플라스틱에 비해 CO₂ 배출량 및 수생 생태계 독성 측면에서 환경적 이점이 있는 것으로 보고되고 있다. 생분해성 측면에서의 환경적 이점에도 불구하고 PBR의 규모가 커짐에 따라 부유성 구조체의 수는 비례적으로 증가한다. 이에 따라 제조원가가 상승하고, 장기간 운전시 파손된 소수의 구조체를 점검하고 교체하는 것이 용이하지 않을 수 있다. 그럼에도 불구하고 지속 가능성과 경제성 측면에서 지속적인 운영 비용이 발생하는 다른 오염 방지 방법과 비교할 때 3D 프린팅을 이용한 부유성 구조체가 유리하다.

[0120] 2.6 배가스 CO₂를 이용한 미세조류의 대규모 옥외배양

[0121] 대규모 고분자 PBR에서 부유성 구조체의 영향을 확인하기 위해서, 연도가스(flue gas)의 CO₂를 사용하여 미세조류를 옥외배양하였다. 자연광과 배가스 CO₂를 동시에 사용하는 미세조류 배양공정에서, 생산성을 극대화하기 위해서는 추가적인 인공조명이나 유기탄소원이 필요하지만, 에너지 투입과 추가 탄소원 공급에서 파생되는 간접적인 CO₂ 배출량을 크게 줄일 수 있기 때문에 탄소 발자국(carbon footprint) 감소 측면에서 환경적 지속 가능성이 우수하다. LNG 발전소의 연돌(stack)에서 배출되는 배가스 CO₂는 가스 버블링 시스템을 사용하여 200L 고분자 PBR에 직접 공급했다(도 8A). 대규모 반응기에서는 배양액의 높이가 상대적으로 높아서 큰 기포가 발생하므로, 바이오필름과 바이오파울링이 넓은 영역에 걸쳐 나타날 수 있다. 그러나 부유성 구조체를 적용한 PBR에서는 바이오필름과 바이오파울링이 거의 생성되지 않았다. 이에 따라 부유성 구조체를 사용하는 배양에서 바이오매스 손실이 크게 개선되었으며, 구조체가 사용되지 않는 조건에 비해 성장 단계(10일)에서 세포 농도가 157% 향상되었다(도 8B). 염분 스트레스를 통한 지질 유도 단계 이후에도 세포 농도의 차이는 꾸준히 증가했다. 배양 환경의 개선은 광합성 및 세포 대사를 향상시키므로, 구형 부유성 구조체를 이용한 배양의 경우, 지질 유도 단계에

서 대조군에 비해 일일 바이오매스 및 지질 생산성이 각각 1.86배 및 2.09배 증가(89.79 및 75.83 mg L⁻¹ d⁻¹)하는 것으로 나타났으며(도 8C), 부유성 구조체를 사용했을 때 총 지질 함량은 17.95% 향상되었다(도 8D).

또한 미세조류 세포에서 풍부하고 고품질의 바이오디젤 생산에 기여하는 C16 ~ C18 지방산의 분포를 조사하고, 그 결과를 아래 [표 1]에 나타냈다.

[표 1]

		Without buoyant ball	With buoyant ball
FAME composition (mg L ⁻¹)	C16:0	32.399 ± 0.489	25.527 ± 0.341
	C16:1	15.687 ± 0.797	35.625 ± 0.089
	C16:2	4.702 ± 0.541	15.118 ± 0.092
	C16:3	5.032 ± 0.220	15.118 ± 0.092
	C16:4	18.878 ± 0.131	19.995 ± 0.083
	C18:0	11.396 ± 0.721	23.917 ± 0.246
	C18:1 trans	5.423 ± 0.237	15.477 ± 0.137
	C18:1 cis	-	3.484 ± 0.016
	C18:2 cis	12.060 ± 0.629	24.962 ± 0.408
	C18:3	12.826 ± 0.780	32.935 ± 0.636
Total FAME (mg L ⁻¹)		118.402 ± 4.435	207.837 ± 1.831

C16:0을 제외하고 모든 유형의 지방산은 부유성 구조체가 있는 상태에서 배양하는 동안 증가했고, 특히 MUFA(monounsaturated FAME)의 비율은 구조체가 있는 경우가 26.3%로 부유성 구조체가 없는 경우(17.8%)보다 높았다. 높은 비율의 MUFA는 바이오디젤의 성능에 영향을 미칠 수 있는 산화 안정성과 콜드플로우(cold flow)을 조화시키는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서 부유성 구조체를 사용하여 미세조류를 배양하는 방법은 바이오디젤 생산을 위한 최적의 전략이 될 수 있다. 광독립영양배양에서 미세조류 세포의 성장 속도는 CO₂ 고정률(R_{CO2})에 비례하기 때문에 바이오매스 생산 분석은 CO₂ 처리 관련 성능(CO₂ sequestration-related performance)을 직접적으로 나타낼 수 있는데, [표 2]와 같이 구형 부유성 구조체는 바이오매스 생산성 향상 효과로 인해 CO₂ 고정률을 1.83배 향상시켰다.

[표 2]

	Without buoyant ball	With buoyant ball
Biomass productivity, P (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0.133 ± 0.009	0.224 ± 0.016
CO ₂ fixation rate, R _{CO2} (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0.244 ± 0.017	0.410 ± 0.030

CO₂ 유래 미세조류 바이오매스는 바이오에너지 생산을 위한 열화학적 방법인 반탄화(torrefaction)를 통해 더 높은 발열량(higher heating value, HHV)과 탄소 함량을 개선할 수 있다. 따라서 반탄화 바이오매스는 뛰어난 에너지 이용 효율 등으로 인해 고체 연료를 대체할 수 있다. 옥외배양은 오염 물질에 직접 노출되기 때문에 오염 위험이 더 높을 수 있다. 바이오필름과 바이오파울링을 통해 외부 환경에 노출되면 직접적인 배양 오염으로 이어질 수 있다. 이에 옥외배양에서 부유성 구조체가 오염 제어에 미치는 영향을 조사했다. PCR을 이용한 세균 오염 분석 결과, 구형 부유성 구조체 도입을 통한 바이오필름 방지 기술이 오염을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다. NCBI(National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스를 사용하여 *N. oleoabundans*(분류 ID:1127754)의 ITS1-ITS4 PCR 산물의 크기를 계산한 결과, 그 크기는 783 bp이었다. 구형 부유성 구조체 및 소포체를 사용하는 광생물반응기로부터 수집된 바이오매스 샘플의 PCR 분석은 *N. oleoabundans*의 밴드(band)만을 나타내는데, 부유성 구조체와 소포체가 없는 대조군 PBR에서는 아가로스 젤

(agarose gel) 전기영동에서 세균 오염이 나타났다. 증폭된 ITS 영역을 시퀀싱하고 BLAST 검색을 수행했다. *N. oleoabundans*의 ITS 데이터가 NCBI BLAST 데이터베이스에서 제공되지 않아 *N. oleoabundans*와 완전히 매칭되는 데이터는 없지만, 증폭된 ITS의 업스트림 영역(upstream region)에 해당하는 18s rRNA의 일부 영역이 NCBI에 등록된 참조 서열(JX978410.1)과 일치했다. 따라서 증폭된 ITS 대역(band)은 *N. oleoabundans*에서 유래되었다고 결론지을 수 있다. 기포가 터지면서 광생물반응기 내벽에 흘러내린 미세조류 세포배양액은 영양분 고갈로 인해 세균, 곰팡이 등 오염물질에 취약해지고, 미세조류는 오염물질의 유기 탄소원이 될 수 있기 때문에, 바이오필름이 PBR에 오랫동안 남아 있으면 PBR의 오염 가능성은 높아진다. PCR 데이터는 구형 부유성 구조체와 소포체를 이용한 기포 파괴 방지가 오염물질에 대한 유기탄소원의 공급을 최소화하여 오염을 방지할 수 있음을 보여준다.

[0130] 3. 결론

[0131] 본 발명은 PBR에서 바이오파울링을 방지할 수 있는 부유성 구조체를 제안한다. 부유성 구조체는 3D 프린팅을 이용해 제작되고, 직경 10mm의 구형 부유성 구조체는 기포 터짐 공간을 최소화하고 큰 기포 형성을 억제하여 미세조류 배양에서 바이오매스 손실을 줄이는데 기여했다. 이러한 구조체는 *N. oleoabundans*의 반연속 배양에서 우수한 바이오파울링 방지 효과를 발휘했으며, 배가스 CO₂를 이용한 대규모 옥외배양에서 오염 없이 고품질의 미세조류 바이오매스를 대량생산하는 데 기여했다. 또한, 3D 프린팅 구조체는 생분해성 플라스틱인 PLA를 사용하여 제작되기 때문에 기존 석유 유래 플라스틱에 비해 CO₂ 배출량 및 수생 생태 독성을 감소할 수 있어 환경적 이점이 있다. 결과적으로, 신규의 3D 프린팅 부유성 구조체를 이용한 바이오파울링 억제 기술은 미세조류 가치화를 촉진할 수 있을 것으로 기대된다.

[0133] 이상 본 발명을 구체적인 실시예 및 실험예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

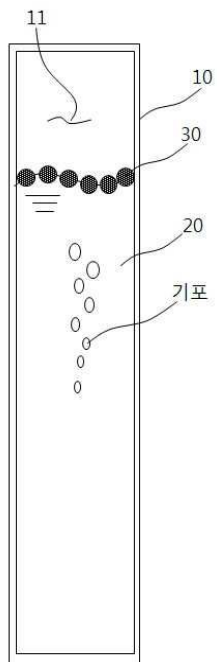
[0134] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

부호의 설명

[0136] 10: 광생물반응기 11: 헤드스페이스
20: 배양액 30: 부유성 구조체
31: 본체 31a: 공동
33: 기저체

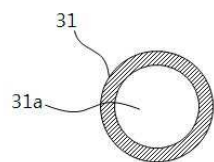
도면

도면1

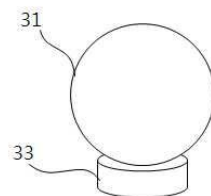


도면2

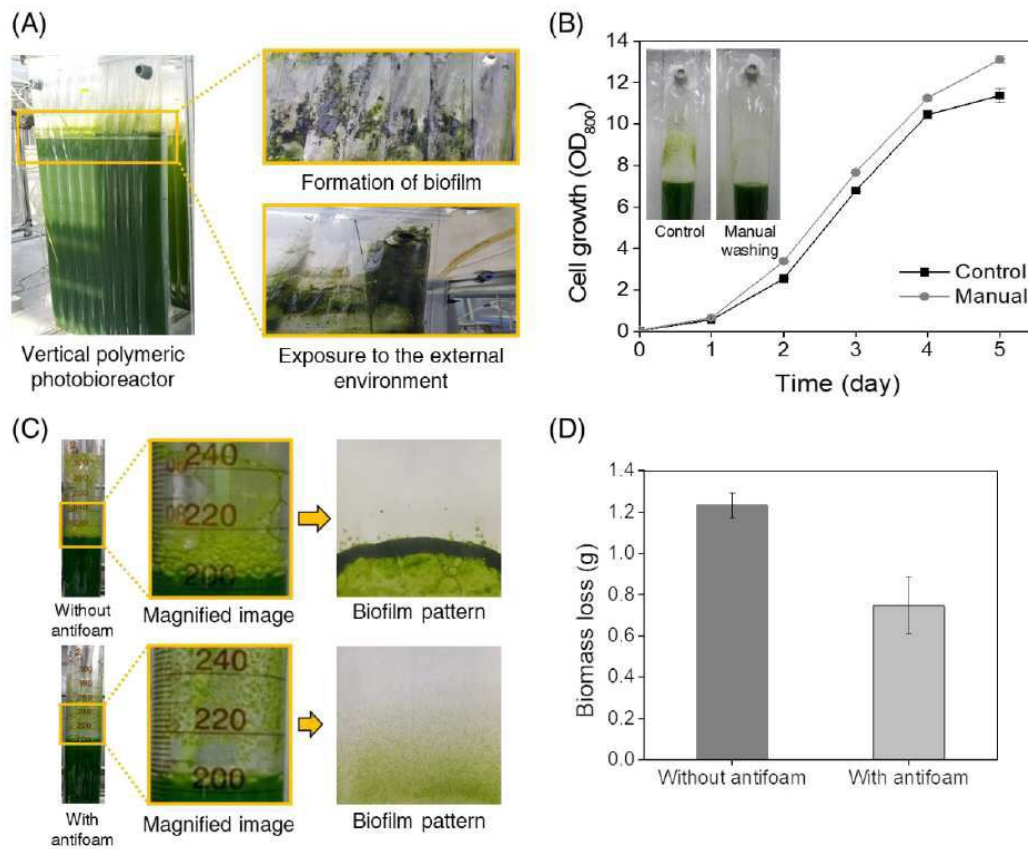
(A)



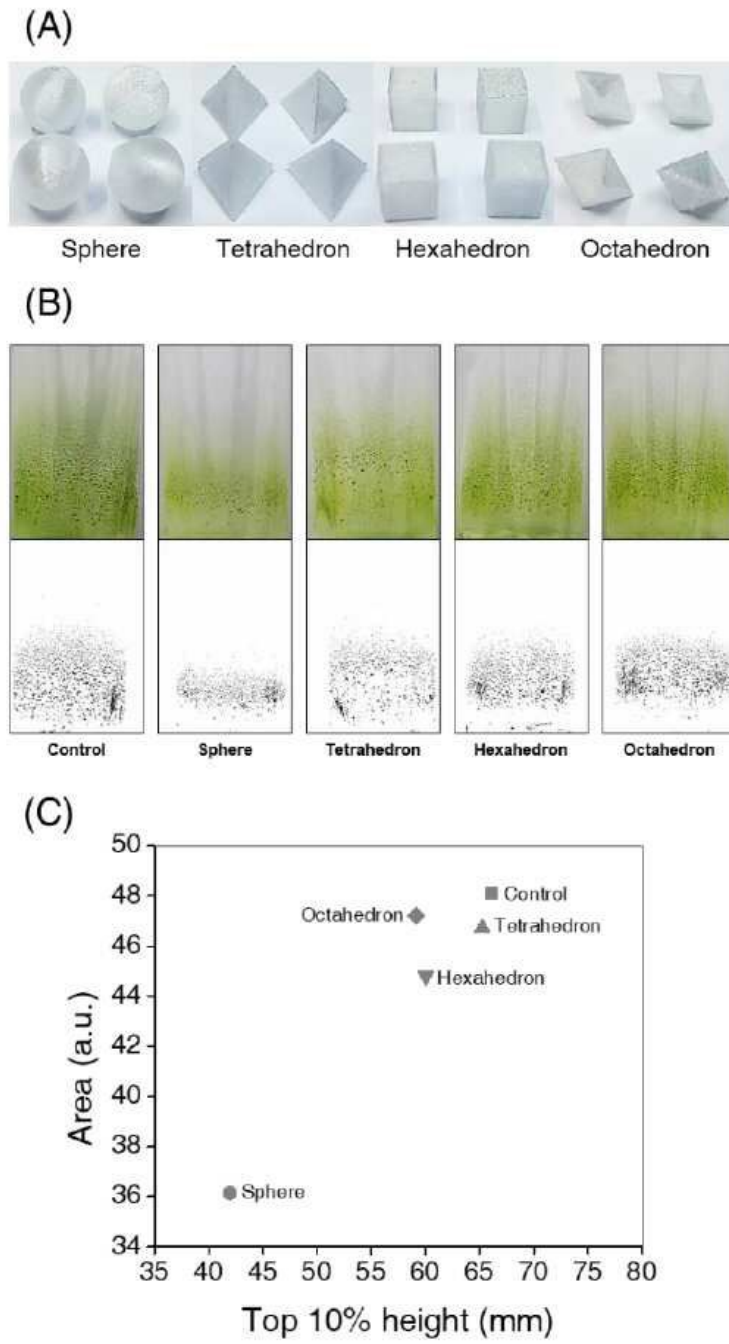
(B)



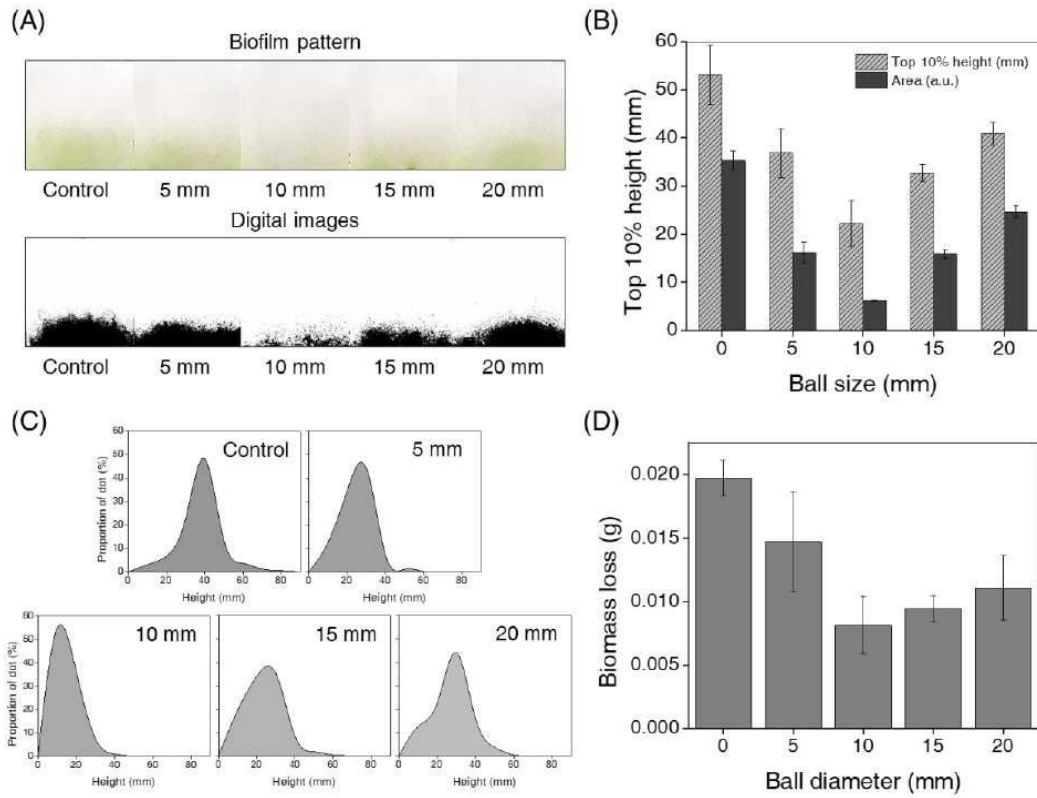
도면3



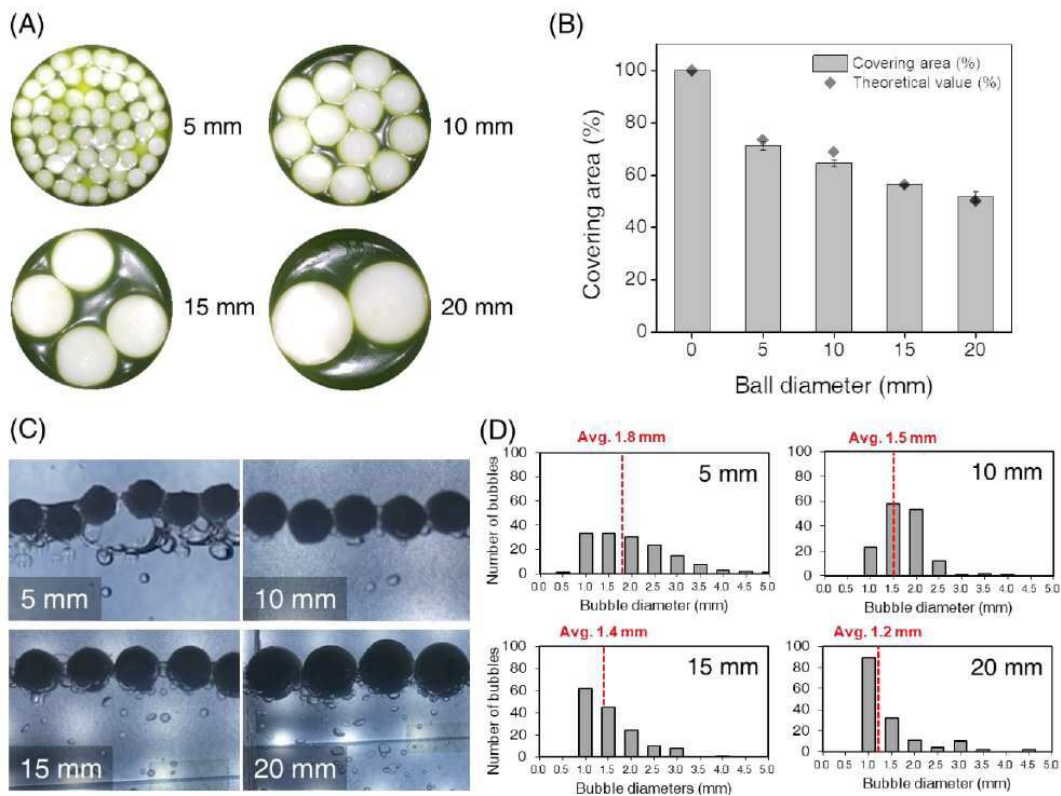
도면4



도면5

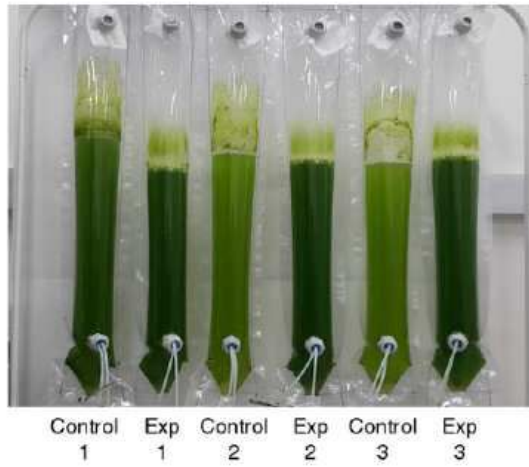


도면6

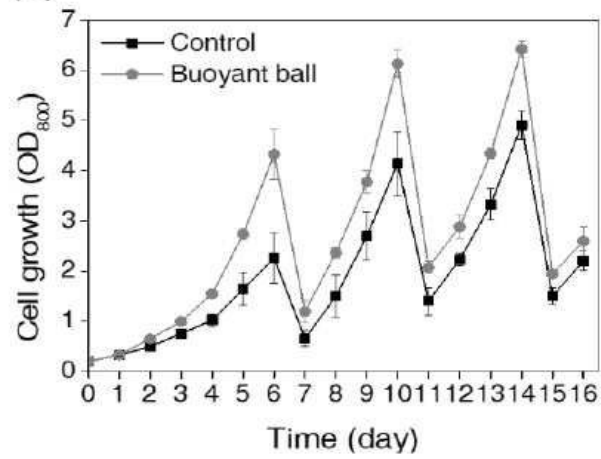


도면7

(A)



(B)



도면8

