

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0093073

(43) 공개일자 2021년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/12 (2019.02)**C12N 2500/02** (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0006796

(22) 출원일자 2020년01월17일

심사청구일자 2020년01월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호

심성진

경기도 성남시 분당구 양현로 272, 310동 402호

홍민의

경기도 성남시 수정구 위례동이로 24, 5905동 102호

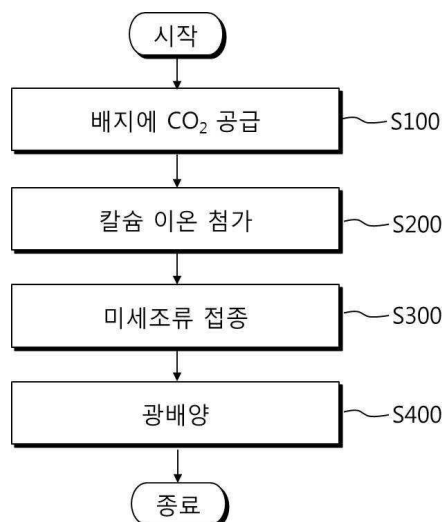
(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법****(57) 요약**

본 발명은 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 관한 것으로, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법은 (a) 배지에 이산화탄소를 공급하는 단계(S100), (b) 이산화탄소가 공급된 배지에 5 ~ 20 mM의 칼슘 이온을 첨가하는 단계(S200), (c) 칼슘 이온이 첨가된 배지에, 미세조류를 접종하는 단계(S300), 및 (d) 접종된 미세조류를 소정의 배양 기간 동안 광배양하는 단계(S400)를 포함한다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류
C12N 2500/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R1725963
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지기술개발사업
연구과제명	배기가스내 이산화탄소 포집 및 탄소자원화 하이브리드 동시처리 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국지역난방공사 미래개발원
연구기간	2019.05.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 배지에 이산화탄소를 공급하는 단계;
- (b) 상기 이산화탄소가 공급된 상기 배지에 5 ~ 20 mM의 칼슘 이온을 첨가하는 단계;
- (c) 상기 칼슘 이온이 첨가된 상기 배지에, 미세조류를 접종하는 단계; 및
- (d) 접종된 상기 미세조류를 소정의 배양 기간 동안 광배양하는 단계;를 포함하는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 상기 이산화탄소는 4 ~ 6 %(v/v)의 함량으로 공급되는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계의 배지는 탄소 결핍 배지(TAP-C)인 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 배지에 염화칼슘을 공급하여 상기 칼슘 이온을 첨가하는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 미세조류는 클로렐라 속(*Chlorella* sp.), 스피루리나(*Spirulina* sp.) 또는 네오클로리스 속(*Neochloris* sp.)인 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 미세조류는 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)인 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 (d) 단계는 15 ~ 25 ℃에서 광배양되는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 (d) 단계에서 상기 배양 기간은 7 ~ 9일인 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 (d) 단계를 통해 배양된 상기 미세조류를 회수하고, 상기 (c) 단계에 재접종하는 단계;를 더 포함하는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 내 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화석 연료의 사용에 따른 대규모 온실가스의 배출로 야기된 지구 온난화 현상은 인류를 비롯한 지구 생명체의 생존을 위협하고 있다. 이에 따라 이산화탄소 감축을 위한 이산화탄소 포집 및 저장 기술(CCS, Carbon Capture & Sequestration) 개발이 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. CCS 기술은 화력발전소를 비롯한 다양한 탄소 배출원에서 방출되는 다량의 이산화탄소를 고농도로 포집한 후 지중이나 해저에 주입하여 대기로부터 격리시키는 방법이다. 이러한 CCS 기술은 단기간에 다량의 이산화탄소를 저감하는 효과가 있으나 안정적인 저장 문제, 위치 선정 및 높은 설치비용 등은 국내에서 실질적인 CCS의 현실화를 막는 장애 요인이다. 따라서 CCS 기술과 달리 이산화탄소를 저장이 아닌 산업적 용도로 직접 활용하거나 부가가치가 높은 물질로 전환하는 CCU (Carbon Capture & Utilization) 기술이 각광받고 있고, 국내에서도 이산화탄소를 다양한 고부가 물질로 전환하는 공정 개발이 시도되고 있다. 그중에서도 광합성 미생물인 미세조류를 활용한 이산화탄소의 생물학적 전환 공정은 이산화탄소 감축과 동시에 바이오연료, 바이오플라스틱, 의약품 등 다양한 고부가 물질 생산이 가능한 경제적인 이산화탄소 저장 기술로 주목받고 있다. 식물성 플랑크톤이라 불리는 미세조류는 광합성을 하는 수중 단세포 생물로 에너지 및 산업 소재 생산과 동시에 온실가스 저감이 가능하기 때문에 그 잠재력이 매우 큰 바이오매스 자원으로 관심을 받고 있으며 에너지·화학·환경 분야를 중심으로 미래에 그 이용가치가 확대될 전망이다.

[0004] 에너지 분야에서 미세조류는 모든 바이오디젤 생산 작물 중 오일 생산성이 가장 우수하다. 대두, 유채, 해바라기, 오일팜 등은 재배 주기가 4 ~ 8개월인 반면, 미세조류는 매일 수 배로 증식하여 1일 단위로 재배가 가능하며 단위 무게 당 지방 함량도 높아 연간 오일 생산량이 대두의 100배 이상이다. 또한, 식량자원의 에너지화라는 비판에서 자유로운 생명자원으로, 석유계 디젤과 유사한 물성을 가진 바이오 연료를 생산할 수 있다.

[0005] 화학 분야에서 미세조류는 다양한 유용물질을 생산할 수 있는 장점이 있으며, 현재 식품 분야를 중심으로 산업화되어 있고, 향후 바이오케미컬 및 바이오플라스틱 분야로 산업화가 확대될 전망이다. 단백질 함량이 높은 미세조류인 클로렐라, 스피룰리나, 클라미도모나스 외에도 아스타잔틴이라는 고부가가치 물질을 만들어내는 헤마토코쿠스 등을 활용해 각종 아미노산, 항산화물질, 지방산을 보충하는 건강기능식품이 상용화된 상태이다.

[0006] 환경 분야에서 미세조류는 상기에 기술한 것처럼 이산화탄소 저감이 가능하다는 측면에서 가장 큰 관심을 받고 있으며 세계적으로 관련 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 미세조류는 바이오매스 중량의 2배 정도의 이산화탄소를 흡수할 수 있으며 이는 육상 식물 대비 10 ~ 50배 높은 흡수 효율 수치에 해당한다. 또한, 미세조류는 특

정한 토양이나 수질을 가리지 않고 배양이 가능하다. 이에 관련 기업들은 이산화탄소 저감 및 공장폐수 정화 사업에 미세조류를 활용하려는 시도를 확대하고 있다.

[0007] 현재 많은 기업을 비롯한 연구자들이 미세조류를 연구하고 있으며 국내뿐만 아니라 해외에서도 미세조류의 배양 규모를 확대하는 상황이다. 미세조류의 배양 방법은 2가지로 구분할 수 있다.

[0008] 첫째, Open pond 방식으로 약 0.1m ~ 0.3m 정도의 깊이를 가진 수로로 이루어져 있다. 이들은 모터로 paddle wheel을 작동시켜 pond 내에 배양액을 비롯한 미세조류들을 순환시켜 배양하고, 배양액의 pH를 높임으로써 대기 중의 이산화탄소를 용해시켜 공급한다. 이러한 방식은 설치 및 유지비용이 저렴하며, 스케일업과 보수가 용이하다는 장점을 가지고 있다. 그러나 open pond는 개방되어있는 특성으로 인해 물이 증발하여 점차 줄어들게 되고, 이산화탄소도 비효율적으로 사용할 수밖에 없으며, 스케일이 커짐에 따라 배양액의 섞임에도 한계가 발생하므로 바이오매스가 낮게 유지될 수밖에 없는 문제점을 가지고 있다. 또한, 다른 종류의 미세조류나 미생물에 의한 오염과 날씨의 영향(온도, 습도, 비. 눈)에도 취약하다.

[0009] 둘째, Closed system 방식으로, 일반적으로 반응기를 제작하여 미세조류를 배양하는 방식이다. 밀폐형이기 때문에 오염의 문제가 거의 없고 온도 조절이 가능하며 배양액의 영양분을 효율적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 이산화탄소 또한 효율적으로 사용할 수 있어서 높은 저감 효과를 기대할 수 있고, 높은 성장성도 얻을 수 있다. 하지만, 설치 및 유지에 고비용이 소요되며 스케일업의 한계를 해결해야 하는 문제가 있다.

[0010] Open pond 방식과 비교하였을 때 스케일 규모에서의 문제점을 극복하기 위해서는, 바이오매스의 증가와 이를 통해 생산되는 지질·오메가-3 등과 같은 유용물질들의 함량을 향상시킬 필요가 있다. 하기 선행기술문헌의 특허 문헌에 개시된 바와 같이, 일반적으로 미세조류의 배양은 성장단계와 유도단계로 구분되는데, 유용물질을 얻기 위해 유도단계(질소가 결핍되는 단계)에서 질소가 없는 배지로 교체하거나 과도한 염분을 추가 공급한다. 하지만, 이러한 단계에서 질소가 고갈된 배지로 바꿔주거나 과도한 양의 염분을 넣어주는 적절한 시기를 정하는 것이 어렵다. 특히, 대량 배양에서는 배지 교체가 힘들고, 과도한 염분의 추가 공급은 오염의 원인이 될 수 있다.

[0011] 이에 성장단계와 유도단계를 거치는 종래 미세조류 이단배양 방법의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) KR 10-2016-0143327 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 미세조류의 세포막 유동성 증가를 유도하는 칼슘 이온을 배지에 첨가하여 미세조류를 배양하는 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법은 (a) 배지에 이산화탄소를 공급하는 단계; (b) 상기 이산화탄소가 공급된 상기 배지에 5 ~ 20 mM의 칼슘 이온을 첨가하는 단계; (c) 상기 칼슘 이온이 첨가된 상기 배지에, 미세조류를 접종하는 단계; 및 (d) 접종된 상기 미세조류를 소정의 배양 기간 동안 광배양하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 상기 이산화탄소는 4 ~ 6 %(v/v)의 함량으로 공급될 수 있다.

- [0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 배지는 탄소 결핍 배지(TAP-C)일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (b) 단계는 상기 배지에 염화칼슘을 공급하여 상기 칼슘 이온을 첨가할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 미세조류는 클로렐라 속(*Chlorella* sp.), 스피루리나(*Spirulina* sp.) 또는 네오클로리스 속(*Neochloris* sp.)일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 미세조류는 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (d) 단계는 15 ~ 25 °C에서 광배양될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (d) 단계에서 상기 배양 기간은 7 ~ 9일일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에 있어서, 상기 (d) 단계를 통해 배양된 상기 미세조류를 회수하고, 상기 (c) 단계에 재접종하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.
- [0027] 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

- [0029] 본 발명에 따르면, 미세조류 배양 배지에의 칼슘 이온 첨가를 통해 세포막 유동성 증가를 유도함으로써, 단기간에 세포 내 지질 및 오메가-3 함량을 증대시킬 수 있다.
- [0030] 또한, 배지에 첨가된 칼슘 이온에 의해 응집 과정이 회수 공정 시에 발생하여, 추가의 이온 주입 없이도 바이오매스를 회수할 수 있고, 반복적 회분(repeated-batch) 공정으로 바이오매스를 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법의 순서도이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에서 칼슘 이온의 기능을 설명하기 위한 개략도이다.
- 도 3 내지 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법의 순서도이다.
- 도 5는 실시예 1 및 비교예 1에 따른 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 배양법의 실험 조건을 나타내는 개략도이다.
- 도 6은 실시예 1에 따른 염화칼슘(CaCl_2) 농도별 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 성장성(a), 및 지질 함량(b)을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 세포수(a), 및 세포 밀도(b)를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나

(*Chlorella sorokiniana*)의 지질 함량을 나타내는 그래프이다.

도 9는 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 총 오메가-3와 오메가-3의 성분인 ALA, SDA, EPA 각각의 생산성(a), 및 10일째 세포 크기(b)를 나타내는 그래프이다.

도 10은 실시예 1 및 비교예 1에 따라 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 세포의 주사전자 현미경(SEM) 이미지이다.

도 11은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 세포막 유동성을 나타내는 그래프이다.

도 12는 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서의 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)를 나타내는 그래프이다.

도 13은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서의 Chlorophyll a/b ratio를 나타내는 그래프이다.

도 14는 실시예 2, 및 비교예 2에 따른 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 재현용 실험을 통해 얻은 세포 밀도(a), 및 지질 함량(b)을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0034] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0036] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법의 순서도이고, 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법에서 칼슘 이온의 기능을 설명하기 위한 개략도이다.
- [0037] 도 1 내지 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 일실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법은 (a) 배지에 이산화탄소를 공급하는 단계(S100), (b) 이산화탄소가 공급된 배지에 5 ~ 20 mM의 칼슘 이온을 첨가하는 단계(S200), (c) 칼슘 이온이 첨가된 배지에, 미세조류를 접종하는 단계(S300), 및 (d) 접종된 미세조류를 소정의 배양 기간 동안 광배양하는 단계(S400)를 포함한다.
- [0039] 본 발명은 미세조류 내 지질 및 오메가-3 함량을 증진시키기 위한 미세조류 배양 방법에 관한 것이다. 식물성 플랑크톤이라 불리는 미세조류는 광합성을 하는 수중 단세포 동물로서, 박테리아와 함께 먹이그물의 기초를 형성하며 그 상위의 모든 영양 단계에 에너지를 공급하는 역할을 한다. 미세조류의 생물체량은 엽록소 농도를 이용해 측정하며, 잠재적 생산의 지표가 된다. 미세조류의 화학적 조성은 종과 배양 조거에 따라 다양하게 변한다. 일부 미세조류는 환경적 변동성에 대응하며, 화학적 조성을 변경함으로써 환경 조건의 변화에 적응 가능한 능력을 가진 것으로 알려져 있다. 다양한 종류의 미세조류들은 배양장에서 생산되는데, 온도, 조도, pH, 이산화탄소 공급, 염, 영양소 등과 같은 환경적 요인을 변화시킴으로써 미세조류에서 원하는 생성물을 다량 축적할 수 있다. 종래 미세조류의 이단배양은 성장단계와 유도단계로 구분되고, 지질, 오메가-3 등과 같은 유용물질을 얻기 위해 유도단계에서 질소가 없는 배지로 교체하거나 다량의 염분을 추가 공급한다. 그러나 종래 미세조류 이단배양 방법에서는 질소가 고갈된 배지 교체 시기 내지 염분 투입 시기를 적절하게 정하기 곤란하고, 대량 배양의 경우에는 배지 교체가 힘들며 과도한 염분의 추가 공급이 오염을 유발하기도 하는바, 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로서 본 발명이 안출되었다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법은, 이산화탄소 공급 단계

(S100), 칼슘 이온 첨가 단계(S200), 미세조류 접종 단계(S300), 및 광배양 단계(S400)를 포함한다.

[0042] 이산화탄소 공급 단계(S100)에서는 미세조류를 광배양 하기 위해서 배지에 이산화탄소를 공급한다. 여기서, 배지는 소정의 반응 용기에 채워질 수 있다. 또한, 배지는 미세조류의 성장을 가능하게 하는 한 특별한 제한은 없고, 일례로 자가영양 배지(autotrophic medium)로서 탄소 결핍 배지(TAP-C)를 사용할 수 있다. 여기서, 배지에 공급되는 이산화탄소는 4 ~ 6 %(v/v)의 함량으로 공급되고, 바람직하게는 5 %(v/v)의 이산화탄소가 공급될 수 있다.

[0044] 칼슘 이온 첨가 단계(S200)는 이산화탄소가 공급된 상기 배지에 칼슘 이온(Ca^{2+})을 투입하는 공정이다. 여기서, 칼슘 이온은 염화칼슘(CaCl_2)을 공급함으로써 첨가될 수 있다. 다만, 칼슘 이온을 첨가하기 위해서 반드시 염화칼슘을 공급해야 하는 것은 아니고, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 등과 같이 배지에 용해되어 칼슘 이온을 공급할 수 있는 공지의 모든 칼슘염을 사용할 수 있다. 여기서, 칼슘 이온의 농도는 5 ~ 20 mM일 수 있고, 바람직하게는 8 ~ 15 mM일 수 있다.

[0046] 미세조류 접종 단계(S300)에서는 이산화탄소 및 칼슘 이온이 투입된 상기 배지에 미세조류를 접종한다. 여기서, 미세조류는 클로렐라 속(*Chlorella* sp.), 스피루리나(*Spirulina* sp.) 또는 네오클로리스 속(*Neochloris* sp.)일 수 있다. 일례로, 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)를 접종할 수 있다. 클로렐라 소로키니아나는 녹조류과 단세포 생물로서, 분류학상 Chlorellales 강, Chlorellaceae 목, *Chlorella* 속으로서, 광합성을 이용하여 성장증식하며, 그 속도가 매우 빠르다. 상기 클로렐라는 보통 담수에서 생육하며 직경이 2 ~ 10 μm 로 매우 작다. 또한, 엽록소를 다량 함유하고 있으며 세포 표면은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 세포막으로 이루어져 있다. 다른 식물이나 미세조류와 마찬가지로 광합성 과정은 빛과 물을 에너지원과 전자 공여체로 이용하여 당을 합성하며 이산화탄소를 고정한다. 또한, 상기 클로렐라는 단백질이 풍부하고, 그 외 여러 카로테노이드, 엽록소를 함유하고 있으며, 여타 배양 조건의 조절에 따라 지질, 오메가-3 등을 축적한다. 특히 클로렐라에는 세포의 빠른 성장 속도에 기여하는 CGF(*Chlorella* growth factor)라는 생리활성 물질이 함유되어 있어, 어린이, 환자 등의 건강 기능 식품 원료로 주목받고 있다.

[0047] 본 발명은 미세조류를 배양하여 미세조류의 세포 내 지질 및 오메가-3의 축적 함량을 증대시키는 방법으로서, 이를 위해 칼슘 이온이 활용된다. 칼슘은 미세조류의 필수적인 미량원소로 다양한 작용을 통해 미세조류의 성장과 발달에 영향을 끼친다. 먼저, 초기에 증가된 칼슘 이온은 초기 세포 농도에 비해 과량인 농도로써 염분 스트레스(salt-stress)로 작용하여 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 증가시키지만, 세포가 성장하고 배양 조건에 적응하면서 칼슘 이온은 세포의 항산화 효소(SOD, POD)를 촉진시켜 높은 활성산소를 완화시킨다. 이로써 세포의 성장 저해가 방지될 수 있다. 한편, 칼슘 이온은 오메가-3 합성에도 관여한다. 칼슘 이온은 미세조류 세포벽의 음전하를 띄는 분자인 펙틴(pectins)에 결합하여 영양소들의 유동을 다소 떨어뜨리고 세포벽을 경직시킨다. 또한, 세포막의 칼슘 결합 부위(Ca-binding sites)에 결합하여 세포막의 구성성분들을 질서있게 만들어 세포막을 단단하게 한다. 여기서, 미세조류는 점성유지적응(homeoviscous adaptation) 작용을 하여 스스로 세포막의 구성성분들을 바꾸고 세포 유동성을 조절한다. 이때, 칼슘 이온에 의해 단단해진 세포의 유동성을 증가시키고자 미세조류는 긴 사슬의 불포화지방산을 더 많이 축적하게 된다. 즉, 본 발명은 칼슘 이온에 의한 세포막 유동성 증가를 유도하여 세포 내 지질과 오메가-3 함량을 높인다.

[0049] 광배양 단계(S400)는 광을 조사하여 접종된 미세조류를 배양하는 공정이다. 이러한 미세조류 광배양은 배양기에 이루어질 수 있지만, 배양을 위해 반드시 배양기를 사용해야 하는 것은 아니다. 한편, 광배양은 상온에서 이루어질 수 있다. 일례로, 배양 온도는 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 범위 내일 수 있다. 또한, 배양 기간에 특별한 한정은 없지만, 7 ~ 9일 동안의 단기간 배양으로 지질 및 오메가-3 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있다.

[0050] 성장단계와 유도단계로 구분되는 종래 이단배양과 비교할 때에, 본 발명에 따른 배양은 유도단계에서 배지를 교체하거나 과도한 염을 추가 공급하지 않는 단일배양으로 이루어진다. 이러한 본 발명에 따른 칼슘 기반 단일배양은 종래 이단배양에 비해 단기간 내에, 제어가 어려운 2차적인 유도단계를 거치지 않고, 세포 성장의 저해 내

지 바이오매스의 손실 없이, 높은 함량의 지질 및 오메가-3 함량을 축적할 수 있다.

- [0052] 도 3 내지 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법의 순서도이다.
- [0053] 도 3 내지 도 4를 참고로, 본 발명의 다른 실시예에 따른 지질 및 오메가-3 함량 증진을 위한 미세조류 배양 방법은 미세조류 회수 및 재접종 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 미세조류 회수 및 재접종 단계에서는 전술한 광배양을 통해 배양된 미세조류를 회수하고, 이산화탄소 및 칼슘 이온이 첨가된 배지에 회수된 미세조류를 재접종한다. 이는 바이오매스의 재활용 공정에 해당한다. 여기서, 주입된 칼슘 이온에 의한 미세조류 응집 과정이 회수 공정 시에 발생하기 때문에, 추가적인 이온 주입 없이도 회수가 가능하다. 한편, 재접종되는 미세조류는 회수된 미세조류 중 일부일 수 있고, 나머지는 다양한 용도로 활용될 수 있다. 이러한 바이오매스 재활용 공정은 반복적으로 수행될 수 있다. 이에 반복적 회분(repeated-batch) 공정으로써 바이오매스를 지속적으로 활용할 수 있다.
- [0055] 한편, 미세조류가 재접종되는 배지는 이산화탄소 및 칼슘 이온이 첨가된 배지로서, 처음 배양에 사용되었던 배지를 사용할 수 있다. 이때, 재접종 전에, 그 배지의 칼슘 이온 농도를 측정하고 농도가 감소한 경우에는 칼슘 이온을 추가로 첨가할 수 있다. 또한, 재접종을 위해 새로운 배지를 사용할 수도 있는데, 이때에는 재접종되는 미세조류 내의 칼슘 이온 농도를 고려하여 배지 내 칼슘 이온 농도를 조절한다. 일례로, 재접종을 위한 배지의 칼슘 이온 농도가 10 mM로 정해진 경우에, 재접종되는 미세조류 내의 칼슘 이온 농도가 a mM이라면, 재접종을 위한 배지의 칼슘 이온 농도는 10-a mM로 조절될 수 있다.
- [0057] 종합적으로, 본 발명에 따르면, 초기에 칼슘 이온을 배지에 주입함으로써, 정확한 유도단계 진입 시점을 설정하기 어려운 종래 이단배양 기술의 단점을 해결할 수 있다. 또한, 종래 이단배양의 유도단계에서 지질 축적을 위해 사용하였던 방법(N-starvation, NaCl 주입)보다 단기간에 더 많은 지질을 생산해 낼 수 있으며 지질 내 오메가-3 함량 증가를 기대할 수 있다. 나아가, 칼슘 이온 첨가의 효과로 미세조류 내 막 유동성의 활성화를 통하여 바이오매스의 손실 없이 유용물질의 함량을 높일 수 있으며 유도단계 설정의 어려움과 스케일업이 됨에 따라 늘어나는 배양 기간 중 배지를 바꿔주거나 염을 첨가하는 번거로움과 그에 따라 발생할 수 있는 오염 또한 해결할 수 있다. 또한, 배양 기간 단축과 높은 지질 축적을 이용하여 미세조류 바이오매스 재활용을 통해 반복적 회분(repeated-batch) 공정을 실행할 수 있다.
- [0059] 이하에서는 보다 구체적인 실시예 및 비교예를 들어 본 발명에 대해 더욱 상세하게 설명한다. 도 5는 실시예 1 및 비교예 1에 따른 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 배양법의 실험 조건을 나타내는 개략도이다.
- [0061] 실시예 1: 칼슘 기반 클로렐라 소로키니아나 단일배양
- [0062] 500mL의 삼각 플라스크 5개를 준비하고, 각각에 탄소 결핍 배지(TAP-C)를 채운 후에, 그 중 1개에는 염화칼슘을 첨가하지 않고(일반 배지), 나머지 4개에 5, 10, 20, 50 mM의 염화칼슘을 각각 첨가한 다음에 미세조류를 접종하고, 광배양을 실시하였다.
- [0063] 여기서, 미세조류는 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*, UTEX2714)를 사용하였고, 초기 접종량을 optical density 800nm 파장 (OD 800nm) 기준 0.01로 하여 총 배양 부피를 300mL이 되도록 접종하였다. 광배양은 이산화탄소가 5%인 CO₂ 인큐베이터에서, 120 rpm의 shaking 속도로, 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 광을 조사하면서 진행했다.
- [0064] 또한, 바이오광물화로 인한 탄산칼슘 생성에 의한 효과를 제거하고자 KOH를 이용하여 pH를 6.5 ~ 7.0으로 맞추어 배양을 진행하였고 어떠한 추가적 주입 없이 12일 동안 연속 배양하였다.

- [0066] 실시예 2: 10 mM 염화칼슘 기반 클로렐라 소로키니아나 단일배양을 이용한 바이오매스 재활용
- [0067] 상기 실시예 1의 10 mM 염화칼슘을 첨가한 배지에서 배양 중인 클로렐라 소로키니아나를 회수하고, 그 중 5%을 새로운 배지에 재접종하였다. 이때, 새로운 배지의 염화칼슘은, 10 mM 농도에서 재접종되는 클로렐라 소로키니아나 내 칼슘 농도를 뺀 농도로 조절되었다. 이러한 클로렐라 소로키니아나를 회수하고 재접종하는 바이오매스 재활용은 6회에 걸쳐 진행되었다.
- [0069] 비교예 1: 종래 클로렐라 소로키니아나 이단배양
- [0070] 500mL의 삼각 플라스크에 TAP-C 배지를 채우고, HEPES 완충액을 이용해 배지의 pH를 유지한 다음에 미세조류를 접종하였다. 미세조류는 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*, UTEX2714)를 사용하였고 초기 접종량을 optical density 800nm 파장 (OD 800nm) 기준 0.01로 하여 총 배양 부피를 300mL이 되도록 접종하였다. 성장단계에서 미세조류를 배양한 후, 배지 내의 질소가 고갈되기 전인 5일 차에 질소 결핍 배지(TAP-N)로 갈아주고 7일 동안 유도단계를 진행했다.
- [0072] 비교예 2: 종래 클로렐라 소로키니아나 이단배양을 바이오매스 재활용
- [0073] 상기 비교예 1의 유도단계가 진행 중인 클로렐라 소로키니아나를 회수하고, 다시 상기 비교예 1의 성장단계와 유도단계를 진행하는 방식으로, 6회에 걸쳐 바이오매스 재활용을 진행하였다.
- [0075] 평가예 1: 염화칼슘 농도 최적화
- [0076] 최적의 염화칼슘 농도를 확인하기 위해서, 실시예 1의 염화칼슘 농도별 배지에서의 바이오매스 성장성 및 지질 함량을 측정하고, 그 결과를 도 6에 나타냈다. 도 6의 (a)는 실시예 1에 따른 염화칼슘(CaCl_2) 농도별 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 성장성을, 및 도 6의 (b)는 그 지질 함량을 각각 나타내는 그래프이다.
- [0077] 도 6을 참고로, 세포의 성장성 저해가 없고 지질 축적이 가장 많은 배지는 10 mM 염화칼슘 배지이고, 염화칼슘의 양이 그 이상 증가할수록 바이오매스가 감소하는 것을 알 수 있다.
- [0079] 평가예 2: 세포 성장성 평가
- [0080] 평가예 1에서 최적화된 10 mM 염화칼슘 배지에서의 배양방법과 비교예 1의 배양방법에서의 세포 성장성을 비교하기 위해서, 세포 밀도(cell density), 및 세포수(cell number)를 각각 측정하였다. 여기서, 샘플링은 매일 동일한 시간에 진행하였고 모든 측정은 triplicate로 하여 분석하였다. 샘플 내 침전물들을 용해시키기 위해 먼저 10mL를 샘플링하고 centrifuge(3000 rpm, 10 min)를 돌려 배지를 제거한 후 0.1 mM HCl로 pH를 6 이하로 낮추고 세척하여 세포 밀도를 측정하였다.
- [0081] 그 결과는 도 7에 나타냈는데, 도 7의 (a)는 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 세포 밀도를, 도 7의 (b)는 그 세포수를 각각 나타내는 그래프이다.
- [0082] 도 7를 참고로, 최적화된 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양하는 동안에 세포 밀도, 및 세포수에 저해가 없는 것을 확인할 수 있다. 또한, 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양하는 경우, 7일 차를 기점으로 종래 이단배양(비교예 1)에 비해 세포 밀도, 및 세포수가 늘어나는 것으로 보아, 세포 성장성이 우수한 것으로 평가된다.
- [0084] 평가예 3: 지질 함량 분석
- [0085] 평가예 1에서 최적화된 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양한 경우와 비교예 1에 따라 배양한 경우의 지질 함량을 분석하였다. 지질 함량은 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography)로 측정하였다. 도 8은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 지질 함량을 나타내는 그래프이다.

[0086] 도 8를 참고로, 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양된 단일배양인 경우에 배양 기간이 길어질수록 지질 함량이 증가하는 경향을 보였고, 10일까지는 종래 이단배양(비교예 1)에 비해 클로렐라 소로키니아나에 축적된 지질 함량이 높게 나타났다. 특히, 단일배양의 7일째 지질 함량은 42.3%에 이르렀고 9일째에 최대 함량을 기록하였는바, 종래 이단배양과 비교할 때, 상대적으로 빠르게 지질 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있다.

[0088] 평가예 4: 오메가-3 생산성 및 세포 크기 분석

[0089] 평가예 1에서 최적화된 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양한 경우와 비교예 1에 따라 배양한 경우의 오메가-3 생산성 및 세포 크기를 측정하고 분석하였다. 가스 크로마토그래피 오메가-3 생산성(Omega-3 productivity), 및 오메가-3 주성분인 ALA(alpha-Linolenic acid), SDA(Stearidonic acid), EPA(Eicosapentaenoic acid) 생산성을 측정하고, 10일 동안 배양한 후에 세포 크기를 측정하였다. 그 결과는 도 9에 나타났다. 도 9의 (a)는 10 mM 염화칼슘(CaCl₂) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 총 오메가-3와 오메가-3의 성분인 ALA, SDA, EPA 각각의 생산성을, 도 9의 (b)는 10일째 세포 크기(b)를 각각 나타내는 그래프이다.

[0090] 도 9의 (a)와 같이, 각 성분 모두의 생산성이 10mM 염화칼슘을 첨가한 배지에서 높았고, 특히 오메가-3 생산성이 종래 이단배양법(비교예 1)으로 배양한 미세조류보다 2.5배 정도 높았으며 오메가-3 성분 중 가장 사람 건강에 유익한 EPA의 생산성은 종래 이단배양법(비교예 1)으로 배양한 미세조류보다 10배 정도 높은 것을 확인할 수 있다.

[0092] 또한, 일반 배지(TAP-C)에서의 배양(실시예 1에서 염화칼슘 미첨가), 종래 이단배양(비교예 1), 및 염화칼슘 농도별 단일배양(실시예 1에서 염화칼슘 첨가)의 지방산 구성성분들의 함량을 분석하고, 아래 [표 1]에 그 결과를 나타냈다.

[0093] [표 1]

	TAP-C (7 day)	TAP-C to TAP- N (12 day)	TAPC/Ca 5 mM (7 day)	TAPC/Ca 10 mM (7 day)	TAPC/Ca 20 mM (6 day)	TAPC/Ca 50 mM (6 day)
Fatty acid concentration (mg L⁻¹)						
Saturated fatty acids						
C16:0	305.55	641.49	445.77	527.44	410.00	240.76
C18:0	57.96	136.35	94.73	123.46	76.82	46.49
Unsaturated fatty acids						
C16:1	12.60	24.67	14.64	19.76	13.81	8.75
C16:2	5.04	7.79	4.88	7.25	4.32	3.22
C16:3	1.89	2.60	0.98	1.25	1.73	0.92
C18:1	103.95	215.56	164.9	232.34	153.64	72.73
C18:2	69.93	145.44	118.07	172.58	110.48	55.24
C18:3n3	59.22	106.48	130.43	138.30	73.37	26.24
C18:4n3	9.45	12.99	10.73	13.92	6.04	1.84
C20:5n3	4.41	5.19	17.56	30.37	12.95	4.14
Total SFA	363.51	777.84	540.57	630.90	486.81	287.25
Total MUFA	116.55	240.23	179.54	252.10	167.45	81.48
Total PUFA	149.94	280.49	255.65	363.67	208.88	91.61
Total ω-3 FA	73.08	124.66	131.73	182.59	92.36	32.22
Total FA	631.12	1302.04	975.06	1266.70	864.41	460.34
Fraction of total FA (% lipid)						
Saturated fatty acids	57.7	59.9	55.4	51.4	56.4	62.4
Unsaturated fatty acids	42.3	40.1	44.6	48.6	43.6	37.6
Total omega-3 fatty acids	11.6	9.6	13.5	14.4	10.7	7.0
C18:3n3	9.4	8.2	10.6	10.9	8.5	5.7
C18:4n3	1.5	1.0	1.1	1.1	0.7	0.4
C20:5n3	0.7	0.4	1.8	2.4	1.5	0.9

[0094]

[0095] [표 1]을 참고로, 10 mM의 칼슘 기반 단일배양에서 종래 이단배양보다 불포화지방산의 함량이 더 높은 것을 확인할 수 있다. 불포화지방산 중에 긴사슬의 불포화지방산인 오메가-3 함량 또한 높았고 오메가-3 중 EPA 함량이 6배 높았다.

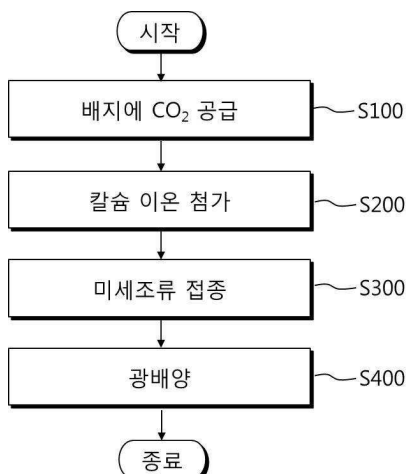
[0097] 도 9의 (b)를 참고로, 오메가-3를 포함한 지질 축적이 높은 10mM 염화칼슘 기반 단일배양의 경우 공정이 종료된 후의 세포 크기가 종래 이단배양보다 큰 것을 알 수 있다. 이는 다량의 지질 축적에 의한 결과로 보인다.

- [0099] 평가예 5: 탄산칼슘 생성에 의한 효과 평가
- [0100] 전술한 평가예 1 내지 4의 결과가 배양 중 탄산칼슘 생성에 의한 것인지 확인하기 위해서, 주사전자현미경(SEM)을 이용해 실시예 1의 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양된 클로렐라 소로키니아나, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나 각각의 세포를 관찰하였다. 도 10은 실시예 1 및 비교예 1에 따라 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 세포의 주사전자현미경(SEM) 이미지로서, 도 10의 (a)는 실시예 1의 10 mM 염화칼슘 배지에서 배양된 클로렐라 소로키니아나 세포를, 도 10의 (b)는 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나 세포의 SEM 이미지이다.
- [0101] 도 10의 SEM 이미지 관찰 결과로부터, 세포 표면의 탄산칼슘 생성에 의한 세포 성장 및 지질 축적이 아님을 알 수 있다. 즉, 단기간 내에 세포의 성장성을 저해하지 않고 지질 및 오메가-3 함량이 높아지는 이유는 칼슘 이온에 의한 것으로, 칼슘 이온이 세포막 유동성 증가를 유도하고, 증가한 활성산소를 완화하여 세포 성장의 저해를 방지하였기 때문으로 분석된다.
- [0103] 평가예 6: 세포막 유동성 평가
- [0104] 칼슘 기반의 단일배양에서 칼슘 이온이 세포막 유동성 증가를 유도하는지 확인하기 위해, 세포막 유동성을 평가하였다. 도 11은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서 배양된 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*)의 세포막 유동성을 나타내는 그래프이다.
- [0105] 일반 배지(TAP-C)보다 첨가된 칼슘은 세포의 세포벽과 세포막에 작용한다. 첫 번째로 칼슘은 세포벽의 음전하를 띄는 분자인 펙틴(pectins)과 결합한다. 이는 세포벽을 경직되게 하고 영양소의 유입을 다소 저해하는 작용을 한다. 두 번째로 칼슘은 세포막에 있는 칼슘 결합 부위(Ca-binding sites)에 결합하여 세포막을 단단하게 하고 세포막의 구성들을 질서있게 한다. 이렇게 칼슘의 작용에 의해 단단해진 세포들은 미세조류의 점성유지작용(homeoviscous) 작용을 통해 스스로 세포막에 불포화지방산들을 축적함으로써 유동성을 증가시킨다. 칼슘 기반의 단일배양은 증가된 칼슘 농도로 인한 미세조류의 점성유지작용 작용으로 배양 초기 빠르게 유동성이 높아진 것을 확인할 수 있다. 이는 단단해진 세포가 스스로 불포화지방산들을 많이 쌓아 세포막의 유동성이 커진다는 것을 의미한다.
- [0107] 평가예 7: 활성산소 평가
- [0108] 칼슘 기반의 단일배양에서 칼슘 이온이 활성산소를 완화하는지, 즉 세포 성장성 저해를 방지하는지 확인하기 위해, DCF 형광물질을 이용해 활성산소를 분석하였다. 도 12는 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서의 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)를 나타내는 그래프이다.
- [0109] 도 12를 참고로, 배양 초기, 10 mM의 칼슘은 초기 세포 농도 대비 과량으로 미세조류에 염분 스트레스(salt-stress)로 작용하여 활성산소를 높인다. 그러나 세포가 성장하면서 칼슘은 항산화 효소인 SOD와 POD를 촉진시켜 증가한 활성산소를 완화시키는 작용을 하는 것으로 분석되었다. 반면, 종래 이단배양의 경우 질소가 고갈된 배지로 바뀌준 5일째 이후로 급격하게 미세조류가 스트레스를 받아 활성산소가 급격히 증가하였다.
- [0111] 평가예 8: 광합성 저해 평가
- [0112] 실시예 1에서 염화칼슘을 첨가했을 때, 초기 0일째와 1일째에 조금의 탁도가 보이는데 1일째에서 2일째로 넘어가면서 탁도가 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 탁도로 인한 광합성에 저해가 있는지 확인하기 위해 Chlorophyll a/b ratio를 측정하고, 그 결과를 도 13에 나타냈다. 도 13은 10 mM 염화칼슘(CaCl_2) 배지를 사용한 실시예 1, 및 비교예 1에서의 Chlorophyll a/b ratio를 나타내는 그래프이다.
- [0113] 도 13을 통해서, 염화칼슘의 첨가로 인한 광합성 저해는 없는 것으로 확인되었다. 또한, 미세조류의 2차 대사산물을 생산하는 시점이 지나도 종래 이단배양법(비교예 1)보다 Chlorophyll a/b ratio가 높게 유지되는 것으로 보아 칼슘이 오히려 광합성에 좋은 영향을 끼치는 것을 알 수 있다.

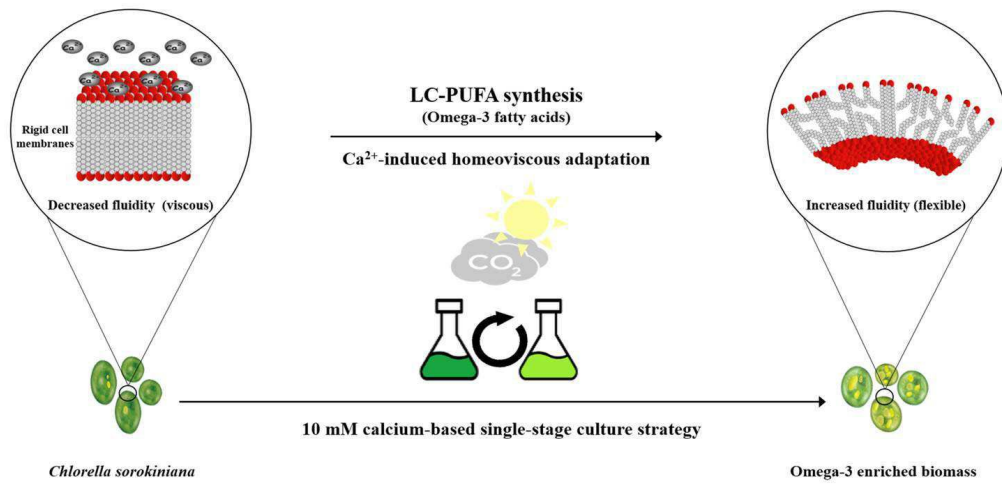
- [0115] 평가예 9: 바이오매스 재활용 평가
- [0116] 미세조류의 대량 배양 공정에서 바이오매스 재활용 가능성을 평가하기 위해서, 상기 실시예 2 및 비교예 2를 실행하였다. 도 14는 실시예 2, 및 비교예 2에 따른 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 재활용 실험을 통해 얻은 세포 밀도(a), 및 지질 함량(b)을 나타내는 그래프이다.
- [0117] 종래 이단배양법의 경우 짧은 시간 안에 세포 성장성을 최대로 높이고 2차 대사산물인 지질을 축적하기 위해서 처음 배지를 질소가 고갈된 배지로 교체한다(실제 대량 배양에서는 배지를 바꿔주는 것이 현실적으로 어려워 과도한 염을 첨가하거나 질소가 고갈된 영양분을 주입해준다). 여기서, 세포는 질소가 고갈된 불리한 환경을 견디기 위해 지질을 축적하는 것이다. 이러한 유도단계는 장시간 동안 지속된다. 그러나 장시간 동안 영양분이 고갈된 배지에서 배양되기 때문에, 세포 내의 효소 활성이 떨어지게 되고 이로 인해 세포들이 사멸하게 된다.
- [0118] 비교예 2에서는 종래 이단배양법에서 효소 활성이 많이 떨어진 미세조류들을 회수하여 새로운 배지에 재활용하였다. 그 결과, 도 14와 같이 세포가 성장하고 다시 지질을 축적하는데 오랜 시간이 걸린다. 반면에 10 mM 염화칼슘을 이용한 단일배양법은 세포 성장과 높은 지질 축적이 동시에 일어나 7일째에 가장 높은 지질 함량을 나타낸다. 이때 회수한 미세조류들은 종래 이단배양법의 미세조류들과 달리 세포 활성이 어느 정도 유지되는 상태이기 때문에 또다시 단시간 동안 세포 내 지질 함량이 높아진다. 도 14를 참고로, 총 배양 기간 50일 동안 종래 이단배양의 경우에는 4번의 재활용을 채 못 끝내는 반면, 10 mM 염화칼슘 기반 단일배양은 6번이 넘는 재활용이 가능했다. 또한, 6번의 재활용 동안 높은 지질 함량을 유지하였다. 따라서, 10 mM 염화칼슘 기반 단일배양 공정을 이용하는 경우 대량 배양에서 오염 없이 바이오매스 재활용이 가능하게 된다.
- [0119]
- [0120] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 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.
- [0121] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

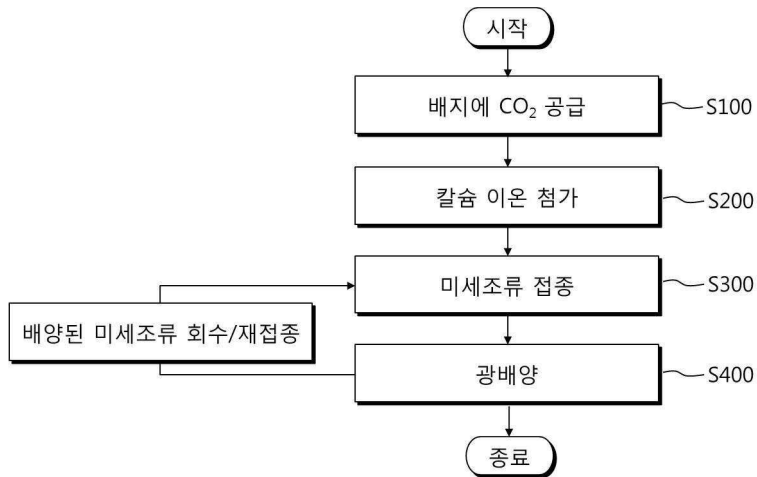
도면1



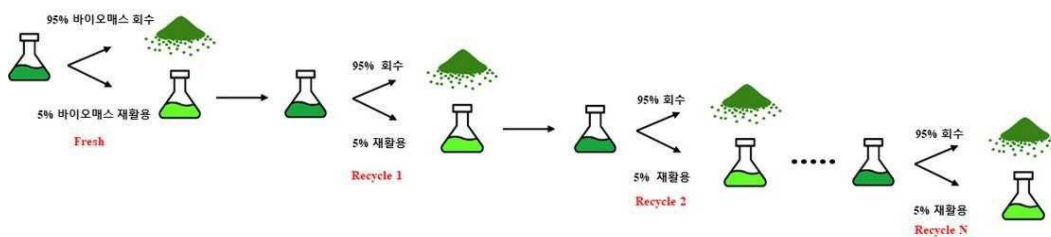
도면2



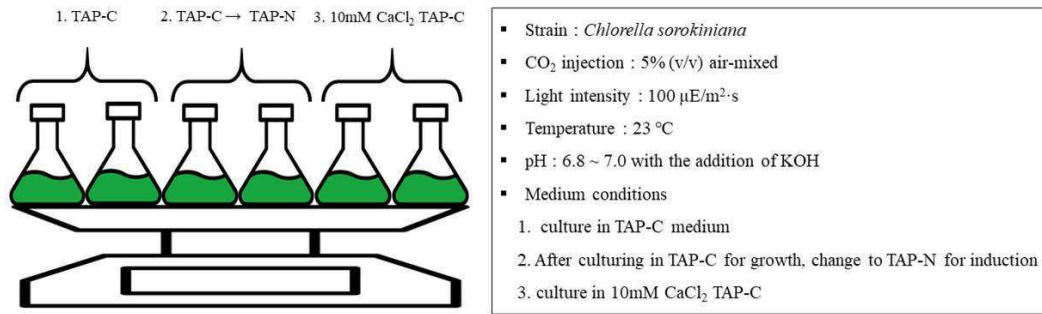
도면3



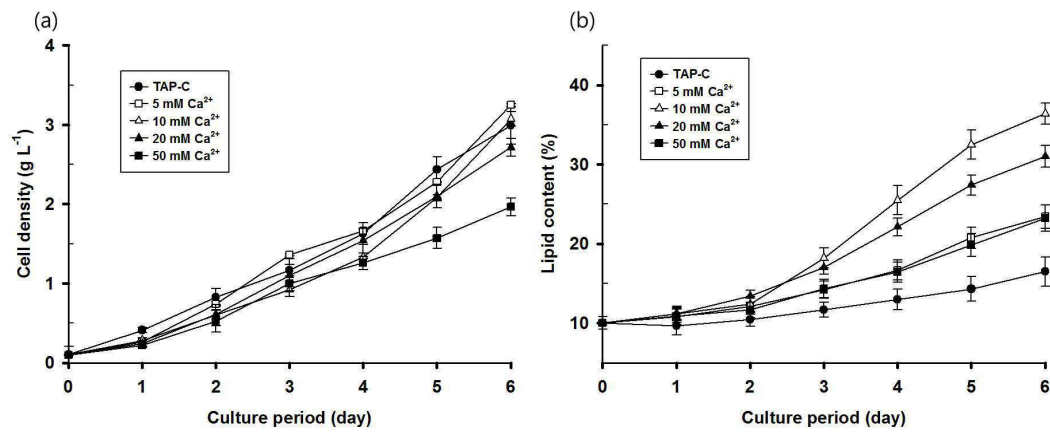
도면4



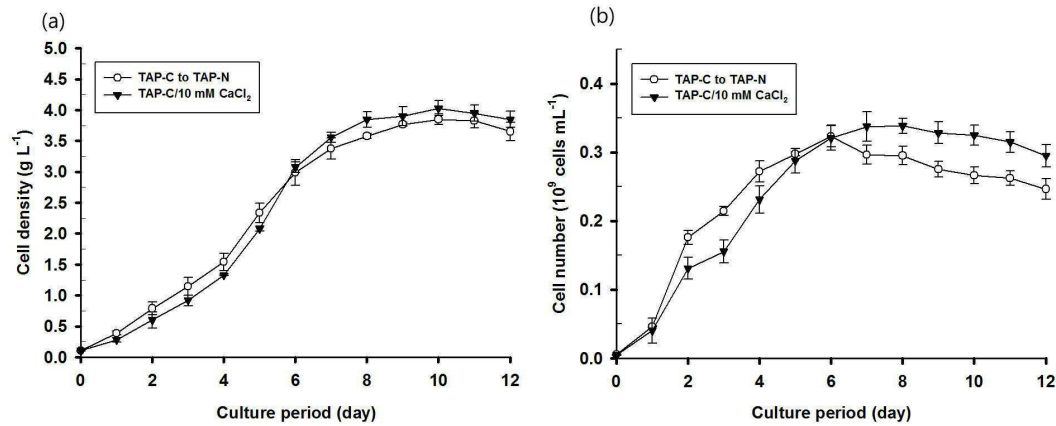
도면5



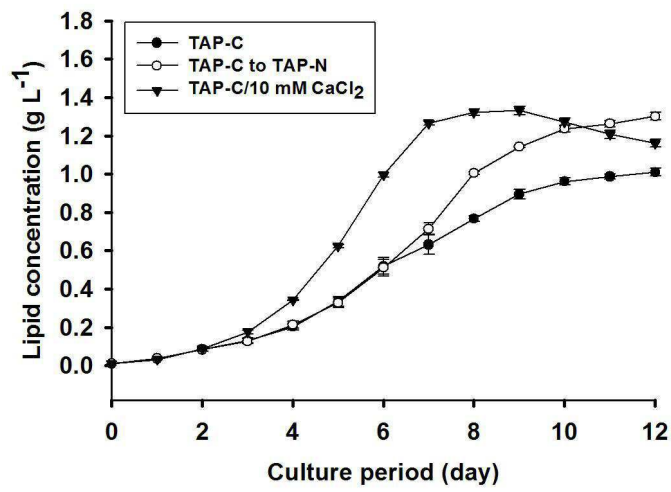
도면6



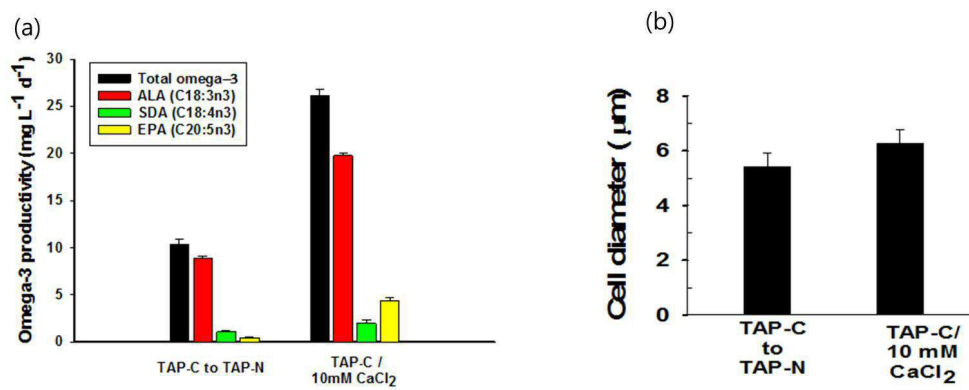
도면7



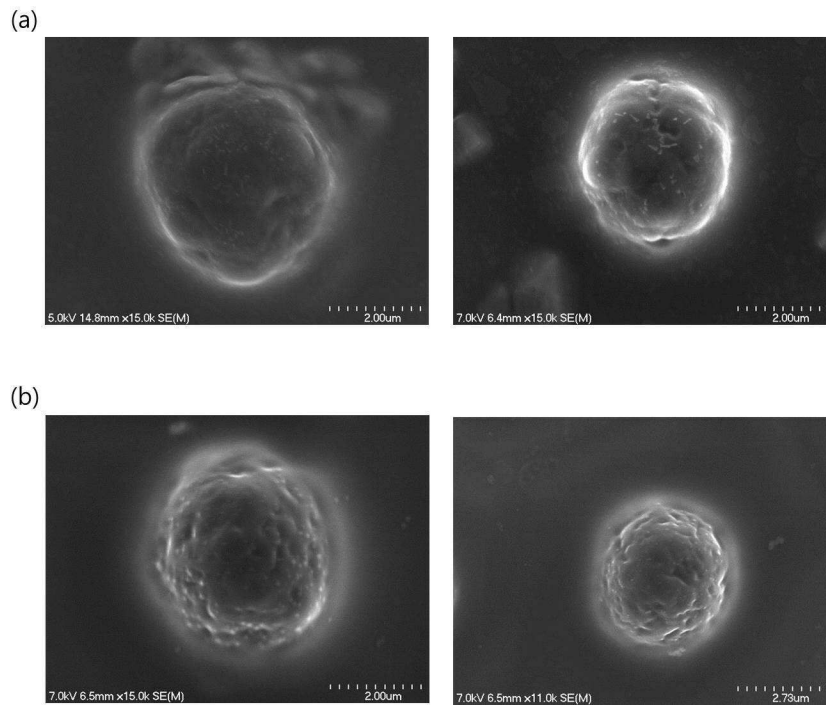
도면8



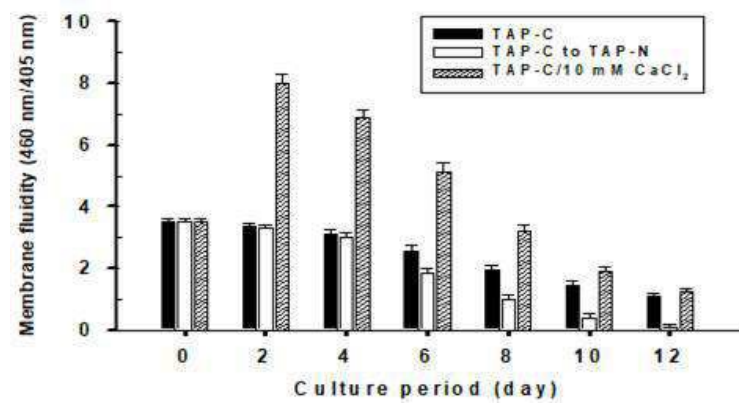
도면9



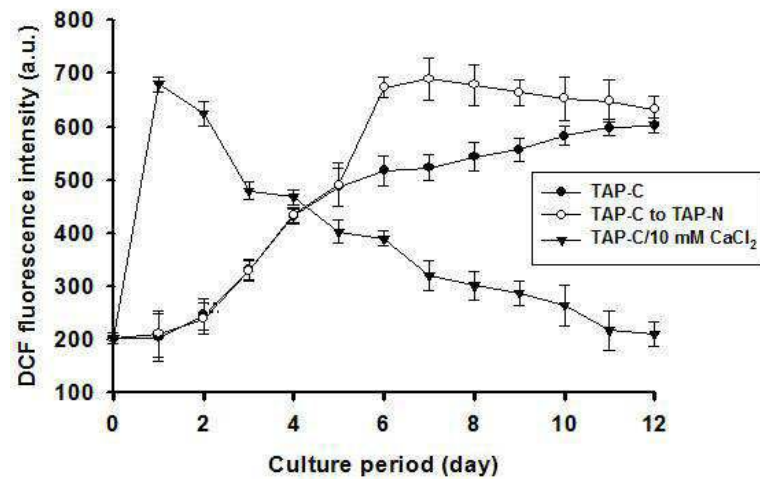
도면10



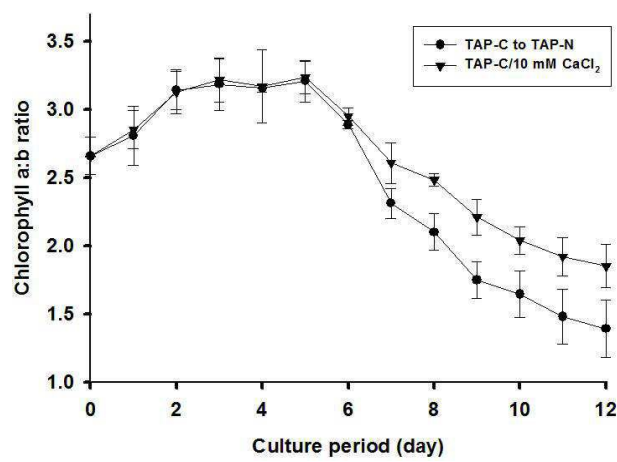
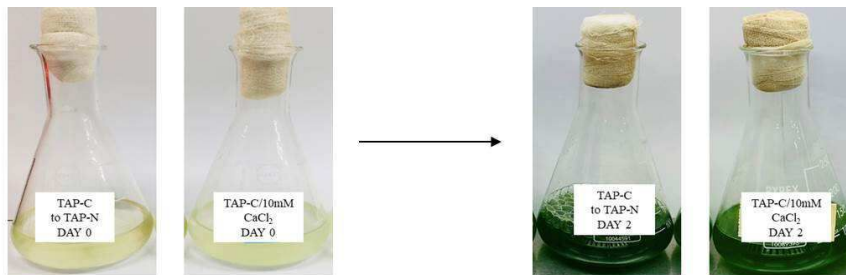
도면11



도면12



도면13



도면14

