(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월01일
(11) 등록번호 10-1883984
(24) 등록일자 2018년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2013.01)
C12N 2529/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0053883
(22) 출원일자 2017년04월26일
심사청구일자 2017년04월26일
(56) 선행기술조사문헌
WO2010123848 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
이태윤
경기도 고양시 일산서구 중앙로 1557 1012호 (대화동,삼운트루아오피스텔)
(74) 대리인
특허법인 신태양

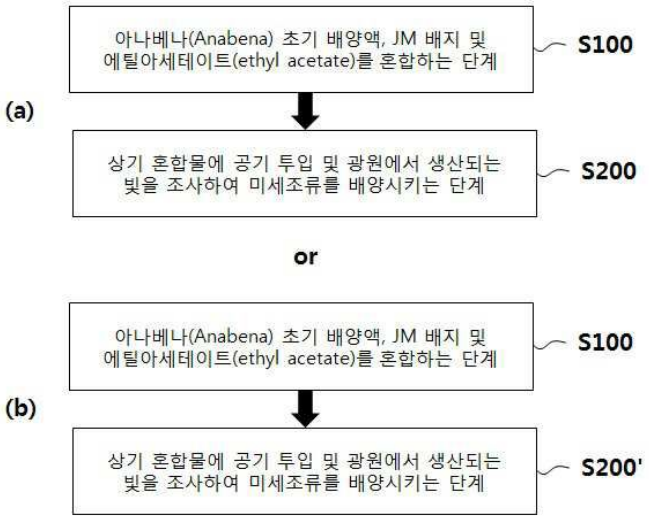
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 **유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법**

(57) 요 약

본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 미세조류인 아나베나를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류의 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A2A1A11053120
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 멤버레인 모듈과 수중 LED를 이용한 클로렐라 지속적 농축배양 및 경제적 수확시스템 개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서,

아나베나(Anabena) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및

상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200');를 포함하여 이루어지되,

상기 아나베나 초기 배양액은 초기 농도가 0.13 ~ 0.18 g/L이며,

상기 S100 단계는, 아나베나 초기 배양액 40 ~ 80 중량% 및 JM 배지 20 ~ 60 중량%로 이루어진 미세조류 배양액 100 ml에 대하여, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 5 ~ 40 mM를 혼합하고,

상기 S200' 단계는, 공기를 0.12 ~ 1.08 vvm의 속도로 투입하고, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 2,000 ~ 2500 Lux, 광량 30 ~ 50 μmol/m^2/s으로 조사되도록 하는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류인 아나베나(Anabena)의 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 남조류(Cyanobacteria)는 대기중의 이산화탄소 및 질소고정(nitrogen fixation)을 하는 광독립(photoautotrophic) 미세조류이다. 남조류는 태양빛 에너지, 물, 이산화탄소, 그리고 필수적인 영양물질(N, P, S, K, 그리고 Fe)이 있으면 쉽게 자라는 특징이 있다(비특허문헌 1). 남조류는 또한 다양한 형태의 유기물질을 포함한 농업폐수나 산업폐수를 이용하여 배양되기도 한다(비특허문헌 2). 남조류는 햇빛, 이산화탄소, 수중의 인과 질소 등과 같은 필수요소가 제공되어 지면 일반 육지식물에 비해 성장속도가 빠르기 때문에 바이오디젤 생산에 효과적으로 사용되어 질 수 있다. 최근의 연구에 의하면 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산에 있어서 1갤론당 $18 이하가 되어야 경제성이 있는 것으로 보고 되었다(비특허문헌 3). 현재로서는 이 기준에 맞추기가 어렵기 때문에 미세조류 생산의 전과정 모두에 대해 성능개선이 필요한 실정이다.

[0003] 경제성을 개선하기 위한 중요한 방법 중 하나는 저에너지를 이용한 대량배양 방법의 개발이다. 효율적인 대량배양 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 생산비용과 미세조류 성장에 필요한 영양분의 확보이다. 대량배양에 있어서 가장 중요한 제한요소는 인과 질소와 같은 상업적 비료성분 확보 혹은 이를 대체할 수 있는 영양분의 확보라고 할 수 있다(비특허문헌 4). 하폐수를 이용한 배양연구가 많이 진행되고 있지만 대량배양에 있어서 필요한 영양성분을 지속적으로 확보하는 것에 대해서는 많은 논쟁이 있어 사용에 신중을 기할 필요가 있다(비특허문헌 5).

[0004] 미세조류의 배양방식은 생산된 바이오매스의 경제성에 큰 영향을 주는 요소이므로 최적의 배양방식을 선정하는 것이 중요하다고 할 수 있다(비특허문헌 6). 배양방식은 독립영양(autotrophy), 종속영양(heterotrophy), 혼합영양(mixotrophy), 그리고 광종속영양(photoheterotrophy)으로 구분되어 진다. 독립영양 배양방식은 대기중의 이산화탄소를 탄소원으로 사용하고 태양빛을 에너지원으로 하여 바이오매스를 생산한다. 종속영양 배양방식은 무기탄소인 이산화탄소를 사용하지 않고 배양액속에 포함된 유기탄소를 탄소원 및 에너지원으로 사용한다. 혼합영양 배양방식은 이산화탄소와 유기탄소를 탄소원과 에너지원으로 사용하여 바이오매스를 생산하는 방법이며, 광종속영양 배양방식은 태양빛을 이용하여 광합성을 하지만 이산화탄소를 이용하지 않고 유기탄소를 탄소원으로 사용하는 방식이다. 독립영양 방식은 오래전부터 사용되는 전통적인 방법으로 광범위하게 사용되지만 생산된 바이오매스의 농도가 낮아 수확효율을 고려하면 비경제적인 배양방식이라고 할 수 있다(비특허문헌 7). 대량배양 시 미세조류의 농도가 높아지면 빛이 침투할 수 없는 지역이 발생하게 되어 전체적인 배양효율을 낮추는 결과를 초래한다. 이러한 경우 혼합영양 배양방식을 적용하면 낮은 미세조류 농도에서는 독립영양 방식에 의해 미세조류가 성장하고 높은 미세조류 농도에서는 빛이 필요 없는 종속영양 방식에 의해 미세조류가 성장할 수 있다고 보고되었다(비특허문헌 8). 실제 혼합영양 방식을 적용한 경우 독립영양 방식에 비해 Nannochloropsis sp. 의 경우 1.6배(비특허문헌 9), Neochloris oleoabundans의 경우 1.5배(비특허문헌 10) 이상 농도가 증가하는 것으로 보고되었다.

[0005] 이에 대하여, 본 발명의 출원인은 남조류인 아나베나(Anabena)를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용할 경우 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대바이오매스 생산효율을 향상시킬 수 있음을 도출하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1 : Markou, G., Vandamme, D. and Muylaert, K. (2014), Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients, Water Res., Vol. 65, No. 1, pp. 186~202.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2 : Markou, G. and Georgakakis, D. (2011), Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review, Appl. Energy, Vol. 88, No. 10, pp. 3389~401.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3 : Pete, R., Klise, G. and Wu, B. (2011), Resource demand implications for US algae biofuels production scale-up, Appl. Energy, Vol. 88, No. 10, pp. 3377~3388.

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4 : Canter, C. E., Blowers, P, Handler, R. M. and Shonnard, D. R. (2015), Implications of widespread algal biofuels production on macronutrient ferilizer supplies: Nutrient demand and evaluation of potential alternate nutrient sources, Appl. Energy, Vol. 143, No. 1, pp. 71~80.

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5 : Pittman, J. K., Dean, A. P. and Osundeko, O. (2011), The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, Bioresour. Technol., Vol. 102, No. 1, pp. 17~25.

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6 : Chen, H., Qiu, T., Rong, J., He, C. and Wang, Q. (2015), Microalgal biofuel revisited: an informatics-based anlaysis of developments to date and future prospects, Appl. Energy, Vol. 155, No. 2, pp. 585~598.

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7 : Endo, H., Sansawa, H. and Nakajima, K. (1977), Studies on Chlorealla regularis, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and

acetate concentration. Plant Cell Physiol., Vol. 18, No. 1, pp. 199~205.

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8 : Zhan, J., Rong, J. and Wang, Q. (2016), Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect, international journal of hydrogen energy, Vol. 7, No. 1, pp. 1~13.

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9 : Andrade, M. R. and Costa, J. A. V. (2007), Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. Aquaculture, Vol. 264, No. 1, pp. 130~134.

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10 : Giovanardi, M., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Tedeschi, P., Maietti, A. and Pantaleoni, L. (2013), Morphophysiological analyses of Neochloris oleoabundans (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product, Protoplasma, Vol. 250, No. 1, pp. 161~174.

(비특허문헌 0011) 비특허문헌 11 : Lee, J. K., Koh, T. H., Kim, S. K. and Lee, T. Y. (2009), A study on the Adsorptive removal of heavy metals using inflated vermiculites, Journal of Korean Geo-Environmental Society, Vol. 10, No. 6, pp. 61~68 (In Korean).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 미세조류인 아나베나(Anabena)를 혼합영양 배양방식으로 배양하되, 유기탄소원으로 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 사용하고, 특히 에틸아세테이트의 함량(농도), 공기 투입 및 광배양 조건 등을 최적화함으로써, 미세조류의 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시킬 수 있도록 함을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서, 아나베나(Anabena) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200);를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 과제의 해결 수단으로 한다.

[0009] 본 발명은 다른 실시예로써, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 있어서, 아나베나(Anabena) 초기 배양액 및 JM 배지로 이루어진 미세조류 배양액에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계(S100); 및 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200');를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 과제의 다른 해결 수단으로 한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 종래 미세조류 배양 보다 매우 높은 생산성과 경제성을 제공할 수 있으며, 이로 인해 환경적 측면에서 하폐수 처리 및 해양, 담수 생물 서식지의 오염을 제거하는 생물복원에도 미세조류 배양이 크게 기여할 수 있으며, 호소 부영양화의 문제를 해결하기 위해서는 방류수의 영양염류 농도를 현저히 감소시켜야 하고 이를 위해서는 하폐수의 3차 처리(고도처리)가 필수적인데, 이때 질소와 인에 대한 높은 축적기능을 갖는 미세조류를 이용하여 방류수 중에서 질소와 인의 제거효율을 높일 수 있으며, 미세조류를 이용한 폐수처리의 대표적인 예로는 폐수로 채워진 산화지로 불리는 연못에서 미세조류를 배양하면 '알바조드(albazod)'라고 불리는 미세조류, 세균, 동물성 플랑크톤, 잔재물의 결합체가 형성되는데, 이와 같은 산화지 처리에서 본 발명을 활용한다면 처리효율을 향상시켜 수질정화에 큰 역할을 할 수 있을 것이며, 폐수중에 존재하는 중금속 처리에 미세조류 배양 시스템을 적용할 수 있고, 일부 해산 또는 담수산 미세조류는 중금속을 선택적으로 흡수하여 체내에 축적하는 기능이 탁월한 것으로 알려져 있으므로, 본 발명을 적용하여 오염물질을 제거할 수 있는 새로운 방안을 확보할 수 있는 효과가 있다.

[0011] 또한, 경제적산업적 측면에서 미세조류 배양을 통하여 산업적으로 중요한 유용물질을 생산할 수 있을 뿐만 아니

라 바이오매스 및 산업적 유용물질은 종에 따라 건강보조식품, 사료, 화장품, 신약 개발원료, 수송연료나 교통에너지 등 여러 방면으로 활용될 수 있고, 수산 인공양식업의 발달에 따라 양어사료로써 미세조류의 수요가 증가하고 있으며 미네랄, 비타민, 필수 아미노산을 다량 함유하고 있다는 특징과 다양한 생리활성을 가지고 있어 사료첨가제, 식품첨가물 및 화장품, 의약품으로서 이용가능성을 지니고 있으므로 이러한 추세에 맞는 선도적인 발명으로 활용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 타나낸 공정 흐름도

도 2는 본 발명에서 사용된 아나베나의 400배 확대 사진

도 3은 본 발명에서 사용된 실험용 반응시스템을 나타낸 개략도

도 4는 아나베나 초기 농도에 따른 성장 특성을 나타낸 도면

도 5는 공기 주입에 따른 아나베나의 성장곡선을 나타낸 도면

도 6은 아세테이트를 첨가한 경우 아나베나의 성장곡선을 나타낸 도면

도 7은 에틸아세테이트 농도에 따른 배양 결과를 나타낸 도면

도 8은 에틸아세테이트 투입량에 따른 비증식속도, 최대 바이오매스 생산성, 최대 농도를 나타낸 도면

도 9는 공기와 에틸아세테이트의 동시 주입 시 아나베나의 배양에 미치는 영향을 파악하기 위한 아나베나의 성장곡선을 나타낸 도면

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 상기의 효과를 달성하기 위한 본 발명은 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로서, 본 발명의 기술적 구성을 이해하는데 필요한 부분만이 설명되며 그 이외 부분의 설명은 본 발명의 요지를 흩트리지 않도록 생략될 것이라는 것을 유의하여야 한다.

[0014] 이하, 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0015] 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법은 도 1의 '(a)'에 도시된 바와 같이, 아나베나 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트를 혼합하는 단계(S100) 및, 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200)를 포함하여 이루어지거나, 또는 도 1의 '(b)'에 도시된 바와 같이, 아나베나 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트를 혼합하는 단계(S100) 및, 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계(S200')를 포함하여 이루어진다.

[0016] 보다 구체적으로 상기 S100 단계는. 초기농도가 0.13 ~ 0.18 g/L인 아나베나 초기 배양액 40 ~ 80 중량% 및 JM 배지 20 ~ 60 중량%로 이루어진 미세조류 배양액 100 ml에 대하여, 에틸아세테이트 5 ~ 40 mM를 혼합한다.

[0017] 여기서, 상기 아나베나 초기 배양액의 초기 농도가 상기 범위를 벗어나거나 또는 그 함량이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다. 한편, 상기 아나베나 초기 배양액은 아나베나를 배지를 이용하여 배양시킨 후, 희석시킨 용액으로 이미 공지된 기술이며, 아나베나 초기 배양액과 JM 배지에 대한 상세 조성은 후술하기로 한다.

[0018] 상기 에틸아세테이트는 미세조류의 배양효율, 인과 질소 등의 제거효율 및 최대 바이오매스 생산효율 등을 향상시키기 위해 첨가되는 것으로 그 함량이 5 mM 미만일 경우 상기 효과의 구현이 어려우며, 40 mM를 초과할 경우 사용량 대비 상기 효과의 향상효율이 미비하여 비경제적일 우려가 있다.

[0019] 상기 S200 단계는, 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계로써, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 2,000 ~ 2500 Lux, 광량 30 ~ 50 $\mu mol/m^2/s$으로 조사되도록 한다. 여기서 상기 광배양 조건이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다.

[0020] 한편, 상기 S200' 단계는, 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계로써, 공기는 0.12 ~ 1.08 vvm의 속도로 투입하고, 광원은 600 ~ 700nm 파장의 적색 LED를 광원으로 사용하되, 조도값 2,000 ~ 2500 Lux, 광량 30 ~ 50 $\mu mol/m^2/s$으로 조사되도록 한다. 여기서 상기 공기 투입 및 광

배양 조건이 상기 범위를 벗어날 경우 배양효율이 저하될 우려가 있다.

[0021] 이하 본 발명을 아래 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0022] 1. 실험 재료 및 방법

[0023] 1.1 사용 미세조류 및 배지

[0024] 본 발명에서 사용된 미세조류는 아나베나(Anabena azollae)(LIMS-PS-2162)로 한국해양미세조류은행(KMMCC, Korea)로부터 분양받았다(도 2 참조). 사용된 배지는 아래 [표 1]에 나타낸 바와 같은 성분의 JM배지(Jaworski's Medium)와 필요 시 고농도 인과 질소 및 아세테이트를 포함한 인공배지를 조제하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

표 1

[0025] (단위: mg/L 탈이온수)

조성	함량
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	20
KH_2PO_4	12.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50
$NaHCO_3$	15.9
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	36
$NaNO_3$	80
EDTA FeNa	2.25
$EDTANa_2$	2.25
H_3BO_3	2.48
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.39
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1.00
cyanobalamin	0.04
thiamine HCl	0.04
biotin	0.04
Total PO_4^{3+} : 18.2 Total NO_3^- : 68.9	

[0026] 1.2 실험방법

[0027] 1.2.1 광배양 시스템

[0028] 아나베나의 성장 실험은 공기 공급 속도에 따른 성장 속도를 비교하기 위해서 에어 펌프를 이용하여 공기의 공급 속도를 0, 0.12, 0.54, 그리고 1.08 vvm의 범위로 달리하였다. 광원으로는 660nm 파장으로 발광하는 적색 LED를 사용하였는데 이는 비특허문헌 11의 연구에서 녹색계통의 조류의 배양에는 적색 LED를 사용하였을 때 가장 우수하다고 보고하였기 때문이다. 반응기는 가로 60cm, 세로 60cm, 높이 30cm의 크기로 반응시스템을 제작하였으며 LED 램프는 S-tech LED사로부터 bar 형식의 LED램프를 구입하여 실험하였다. 광원은 반응기의 상부에 설치하여 위에서 아래로 광을 공급하였다. 조도 및 광량은 조도 2,260lux, 38 μmol/m^2/s로 하였으며, 조도계(I-346 Illuminometer, Sekonic Co. ,Philippines)와 광량계 (MQ-306, Apogee Instruments. Inc., Logan, UT)를 사용하여 측정하였다. 반응시스템은 도 3과 같이 구성되었으며 반응조건에 따라 배양조의 크기는 100 혹은 500 mL로 변경하여 사용하였다.

[0029] 1.2.2 미세조류 배양 방법 및 바이오매스 측정

[0030] 아나베나의 성장특성 실험은 100 혹은 500mL 용량의 코니칼 비이커를 사용하여 희석한 초기배양액을 주입하여 계획한 초기농도로 맞춘 후 파라필름을 이용해 비커의 입구를 막은 후 미세 구멍을 뚫어 주었다. 공기 공급 속

도 따른 성장 속도를 비교하기 위하여 반응기의 바닥 부분에 산기석(porosity)을 고정시켜 에어펌프를 조정하여 공급 속도를 조절하였다. 아세테이트 주입 실험의 경우에는 100 ml 비이커에 20mM의 아세틱에시드(Acetic acid), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부틸아세테이트(butyl acetate), 암모늄아세테이트(ammonium acetate)를 넣은 후 JM 배지로 채운 후 배양 실험을 실시하였다. 온도조절은 실험실에 설치된 온도 조절장치를 이용하여 반응기의 온도를 21 ~ 23℃로 일정하게 유지하였다. 배양액의 온도는 수은온도계를 이용하여 측정하였다.

[0031] 반연속 배양은 바이오매스의 농도가 최대치에 도달하였을 때, 용액의 일부를 새로운 배지로 희석하여 배양하는 방법이다. 새로운 용액으로의 치환정도를 나타내는 식은 아래 수학식 1과 같이 표시한다. 여기서, D는 치환율, Vr은 반응기에서 운전되고 있는 배양액의 부피, Vn은 치환된 용액의 부피를 의미한다.

[0032] (수학식 1)

[0033] $D = Vn/Vr$

[0034] 미세조류의 성장은 UV 흡광광도계(UV-vis Spectrophotomter SP 3000, Optima, Tokyo)를 이용하여 약 2mL의 샘플을 취한 후 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 관찰하였다. 미세조류 바이오매스양(g/L)과 흡광도의 관계는 흡광도 측정 후 샘플을 원심분리기에 넣어 고액분리하고 냉동건조한 후 측정된 바이오매스량을 이용하여 구하였다.

[0035] 1.2.3 미세조류 비증식속도와 최대 바이오매스 생산성 계산

[0036] 주어진 배양 조건에서의 아나베나의 비증식속도(specific growth rate)는 아래 수학식 2로 계산하였다.

[0037] (수학식 2)

[0038] $\mu_{max} = (\ln N_2 - \ln N_1)/(t_2-t_1)$

[0039] 여기서, μ_{max}는 비증식속도(day^{-1}), N_1 및 N_2는 대수증가 단계에서의 초기(t=0) 및 일정 배양 시간 후의 아나베나의 최대 농도(g/L), 그리고 t는 배양 시간(day)을 나타낸다.

[0040] 최대바이오매스 생산성(maximum biomass productivity)은 아래 수학식 3으로 계산하였다.

[0041] (수학식 3)

[0042] $P_{max} = (X_t-X_0)/(t_x-t_0)$

[0043] 여기서, P_{max}는 최대 바이오매스 생산성(g/L/day), Xt는 최종 배양시간(t_x)에 측정된 바이오매스의 농도를 의미한다.

[0044] 1.2.4 질소와 인 농도 측정

[0045] 배지 내 아나베나의 성장에 필요한 성분인 질소와 인의 농도 변화를 분석하기 위해 COLORIMETER(DT/870, Hach, U.S.A.)를 사용하여 분석하였다. 질소 측정에서는 배지의 질소원으로 질산염(nitrate)가 사용되었으므로 NO_3-N(method 10020)를 측정하였고, 인의 경우 인산염(phosphate)이 사용되었으므로 $PO4^{3-}$(method 8114)을 측정하였다. NO_3-N와 $PO4^{3-}$의 측정 시 각각의 측정 농도는 0 ~ 30.0mg/L, 0 ~ 45.0mg/L 였고 오차 범위는 ±0.5mg/L, ±0.1mg/L 였다.

[0046] 2. 실험 결과 및 고찰

[0047] 2.1 아나베나 초기 농도에 따른 성장특성

[0048] 초기 농도를 다르게 하기 위해 원 배양용액으로부터 배양액을 추출한 후 100 ml 비이커에 배양액 40, 60, 그리고 80 ml를 넣은 후 JM 배지를 추가하여 100 ml로 맞추었다. 초기 농도는 각각 0.13 g/L, 0.15 g/L, 0.18 g/L 였으며, 초기 농도에 따른 아나베나의 성장 특성은 도 4에 표시하였다. 비성장속도와 최대바이오매스 생산성은 아래 [표 2]에 요약하였다.

표 2

[0049]

실험조건		μ_{max} (day^{-1})	P_{max} ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$)	C_{max} ($g\ L^{-1}$)
초기농도(Initial Con.) (g/L)	0.13	0.147	0.028	1.15
	0.15	0.097	0.026	1.10
	0.18	0.064	0.031	1.25
공기주입(Aeration) (vvm)	0	0.184	0.043	1.02
	0.12	0.309	0.047	1.02
	0.54	0.345	0.181	3.92
	1.08	0.286	0.184	4.01
아세테이트 화합물 (Acetate Compounds) (20 mM)	아세틱에시드 (Acetic acid)	dead	dead	dead
	에틸아세테이트 (Ethyl acetate)	0.503	0.092	1.49
	부틸아세테이트 (Butyl acetate)	dead	dead	dead
	암모늄아세테이트 (Ammonium acetate)	0.143	0.041	0.65
에틸아세테이트 (Ethyl acetate)	5 mM	0.376	0.103	0.81
	10 mM	0.458	0.126	0.98
	20 mM	0.558	0.230	1.68
	30 mM	0.776	0.289	2.01
	40 mM	0.979	0.293	2.08
공기주입(Aeration) (0.54 vvm)	1 단계 실험 (First period)	0.345	0.181	3.92
공기주입(Aeration) (0.54 vvm) + 에틸아세테이트 (Ethyl acetate) (40 mM)	2 단계 실험 (Second period)	0.145	0.143	5.91

[0050] 상기 도 4 및 [표 2]에서와 같이, 초기 농도가 0.13 g/L인 경우에는 초기배양에서부터 600 시간까지는 성장속도가 빨랐으나 이후 에는 다른 실험과 비슷한 성장 특성을 보이고 있다. 비성장속도는 초기농도가 증가함에 따라 0.147, 0.097, 0.064 day^{-1}로 감소하였으나 최대바이오매스 생산성은 반대로 0.028, 0.026, 0.031 $g\ L^{-1}\ d^{-1}$로 증가하는 것을 알 수 있었다. 본 실험조건에서는 초기농도가 아나베나의 성장특성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

[0051] 2.2 공기주입 속도에 따른 아나베나의 성장특성

[0052] 공기 주입은 배양액에 대기중의 이산화탄소 공급 및 배양액의 혼합을 통해 광합성에 필요한 빛을 내부로 유입시키는 역할을 하게 된다(비특허문헌 4; 비특허문헌 11). 공기 주입에 따른 아나베나의 성장곡선은 도 5에 나타내었다.

[0053] 도 5에 나타낸 바와 같이, 공기를 주입하지 않은 경우와, 0.12 vvm의 경우 성장이 매우 느렸으나, 0.54 vvm의 공기주입 시 성장이 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 0.54 vvm 보다 약 2배정도 공기공급을 증가시킨 경우에도 0.54 vvm과 거의 흡사한 결과를 보여주었다. 비성장속도의 경우 0.54 vvm에서 0.345 day^{-1}로 가장 높았으며 최대바이오매스 생산성도 0.181 $g\ L^{-1}\ d^{-1}$ 로 1.08 vvm 실험에서 도출한 0.184 $g\ L^{-1}\ d^{-1}$과 차이가 나지 않는 것을 확인하였다. 이는 공기주입의 경우 실험조건에 따라 최적의 값이 존재한다는 기존의 연구결과와 일치한다(비특허문헌 11).

[0054] 2.3 다양한 형태의 아세테이트 주입에 따른 아나베나의 성장특성

[0055] 혼합영양 방식의 배양에 있어서 본 발명에서는 유기탄소원으로써 아세틱에시드, 에틸아세테이트,부틸아세테이트, 암모늄아세테이트를 선정였다. 각 100 ml 코니칼 비이커에 20 mM의 아세테이트

를 함유한 용액을 주입 후 20 ml의 미세조류 배양액을 넣은 후 JM 배지를 채워주었다.

[0056] 아세테이트를 첨가한 경우의 아나베나의 성장곡선은 도 6에 표시하였다. 아세틱에시드와 부틸아세테이트를 첨가한 경우에는 아나베나가 성장하지 않았으나 에틸아세테이트와 암모늄아세테이트를 첨가한 경우에는 시간에 따라 성장하는 것이 확인되었다. 이 중 에틸아세테이트를 첨가한 경우에는 비성장속도가 0.503 day^{-1}로 가장 높았으며 암모늄아세테이트의 경우보다 3배 이상 큰 값을 나타내었다. 최대바이오매스 생산성도 0.092 g L^{-1} d^{-1}로 암모늄아세테이트의 0.041 g L^{-1} d^{-1} 보다 2배 이상 큰 값을 나타내었다. 따라서, 아나베나 배양에는 에틸아세테이트를 유기탄소원으로 사용하는 것이 가장 효과가 큰 것으로 파악되었다.

[0057] 2.4 최적 에틸아세테이트 투입량 선정 실험

[0058] 위의 실험에서 에틸아세테이트가 가장 효과적인 유기탄소원으로 판명이 되었으므로 최적 투입량을 알아보기 위해 100 ml 코니컬 비이커에 5, 10, 20, 30, 40 mM의 에틸아세테이트를 주입한 후 아나베나 배양액과 JM 배지를 채운 후 배양을 하였다. 배양 결과는 도 7에 표시하였다.

[0059] 도 7에 도시된 바와 같이, 에틸아세테이트의 투입량이 증가할수록 비성장속도와 최대바이오매스 생산성도 투입량에 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 8에 도시된 바와 같이, 40 mM의 에틸아세테이트를 주입하였을 경우 비성장속도는 0.979 day^{-1}, 최대바이오매스 생산성은 0.293 g L^{-1} d^{-1}이었으며 최대 농도는 2.08 g/L로 급격히 배양속도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0060] 2.5 공기주입과 에틸아세테이트 주입의 혼합효과

[0061] 공기와 에틸아세테이트의 동시 주입이 아나베나의 배양에 미치는 영향을 파악하기 위해 2.2에서 0.54 vvm 실험을 계속 연장하여 후속 실험을 실시하였다. 0.54 vvm 실험에서 최고 농도에 도달한 후 40%의 배양액을 0.1 M의 에틸아세테이트로 치환하여 최종적으로 40 mM로 맞추어 주었다. 이 후 0.54 vvm의 공기를 주입하여 배양 특성을 파악하였고 결과는 도 9에 나타내었다.

[0062] 도 9에 도시된 바와 같이, 에틸아세테이트로 치환한 후의 비성장속도는 0.145 day^{-1}로 0.54 vvm 실험의 0.345 day^{-1}보다 감소한 것으로 나타났으며, 최대바이오매스 생산성도 0.181에서 0.143 g L^{-1} d^{-1}로 감소하였다. 이는 희석 후의 초기 농도가 높기 때문에 아나베나의 성장이 빠르더라도 비성장속도와 최대바이오매스 생산성은 낮은 값을 나타내게 된다. 최대 농도의 경우 0.54 vvm 실험의 경우 3.92 g/L였으나, 에틸아세테이트를 투입한 경우에는 5.91 g/L로 크게 증가한 것을 알 수 있다.

[0063] 3. 결론

[0064] 혼합영양 배양에서의 아나베나의 생산성을 높이기 위한 아세테이트의 종류와 농도 결정을 위한 실험을 수행하였고 공기주입이 아세테이트를 유기탄소원으로 한 배양에 미치는 영향을 파악하였다.

[0065] (1) 아나베나의 초기농도는 성장속도에 큰 영향을 주지 않았다.

[0066] (2) 공기주입의 경우 0.54 vvm에서 가장 높은 비성장속도와 최대 바이오매스 생산성을 보여주었다.

[0067] (3) 4종류의 아세테이트 염을 배양에 사용하였는데 아세틱에시드와 부틸아세테이트의 경우 아나베나가 성장을 하지 못하였으나 에틸아세테이트와 암모늄아세테이트의 경우에는 아나베나의 성장이 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 이 중 에틸아세테이트가 사용된 아세테이트 염 중에서 가장 효과가 좋은 것으로 판명되었다.

[0068] (4) 에틸아세테이트를 첨가한 배양실험에서는 농도를 5 mM에서 40 mM로 변화시켰으며 농도가 증가함에 따라 비성장속도, 최대바이오매스 생산성, 그리고 최대농도 모두 증가하였다.

[0069] (5) 0.54 vvm 공기 주입 실험 후 에틸아세테이트를 첨가한 실험에서는 비성장속도, 최대 바이오매스 생산성 모두 감소하였으나 최대 농도는 가장 높은 5.91 g/L 값을 나타내었다.

[0070] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 유기탄소원을 이용한 미세조류의 배양방법을 상기의 바람직한 실시 예를 통해 설명하고, 그 우수성을 확인하였지만 해당 기술 분야의 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

부호의 설명

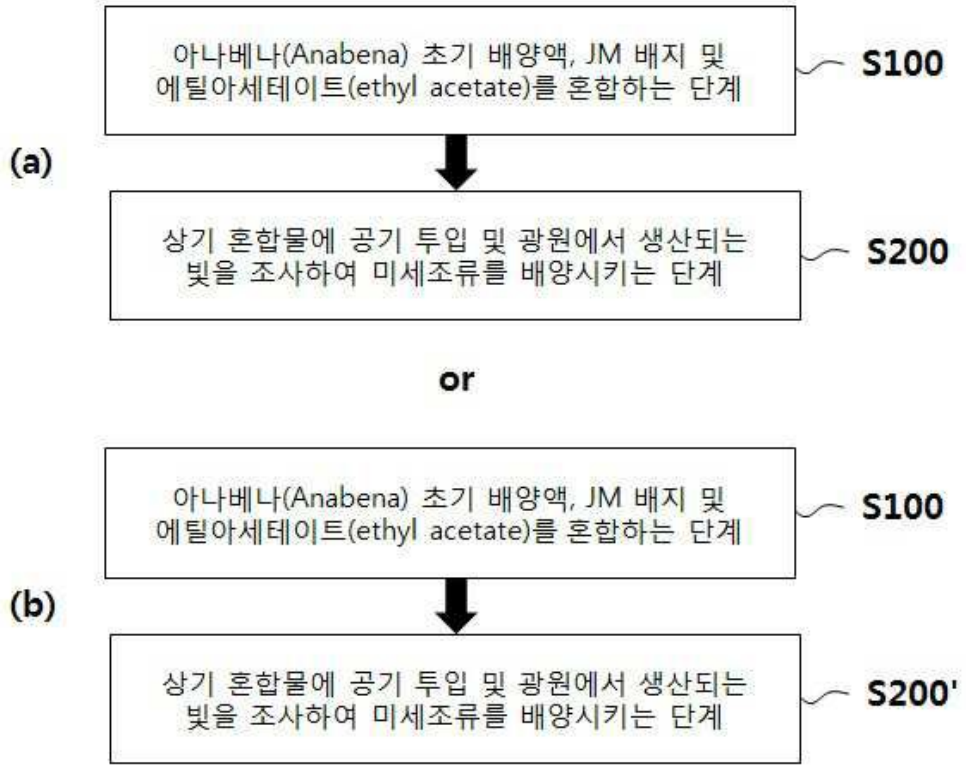
[0071] S100 : 아나베나(Anabena) 초기 배양액, JM 배지 및 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 혼합하는 단계

S200 : 상기 혼합물에 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계

S200' : 상기 혼합물에 공기 투입 및 광원에서 생산되는 빛을 조사하여 미세조류를 배양시키는 단계

도면

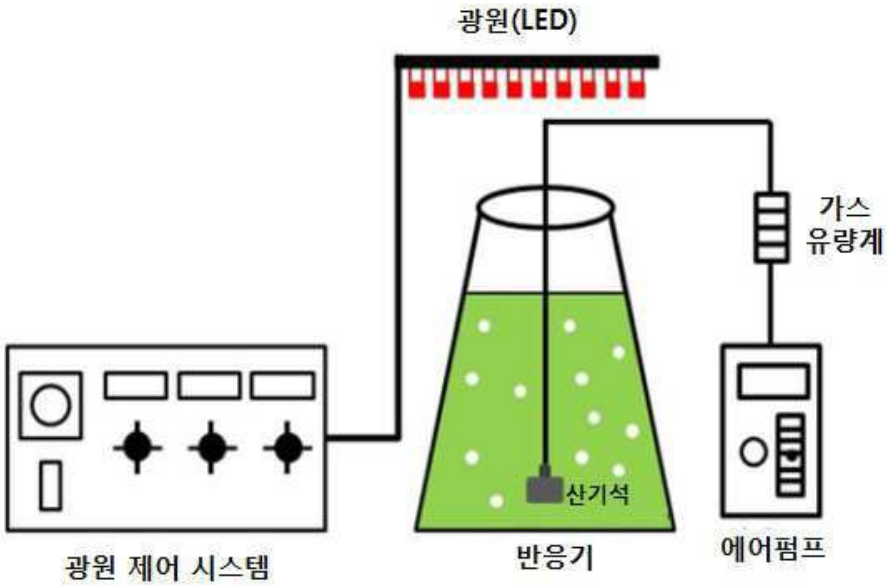
도면1



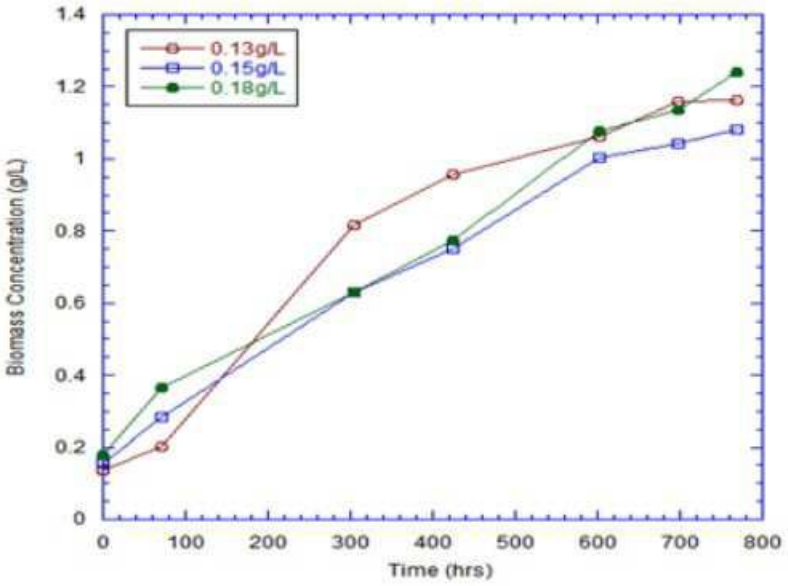
도면2



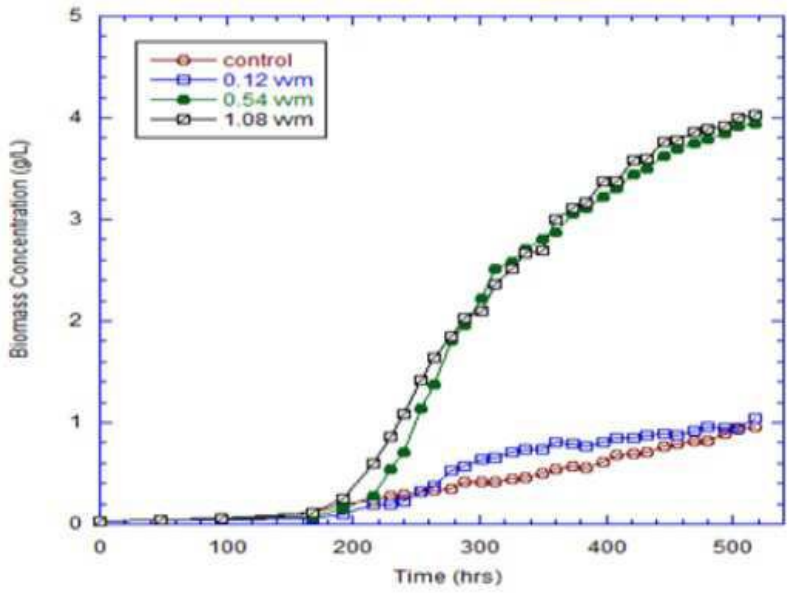
도면3


광원(LED)
가스
유량계
산기석
광원 제어 시스템
반응기
에어펌프

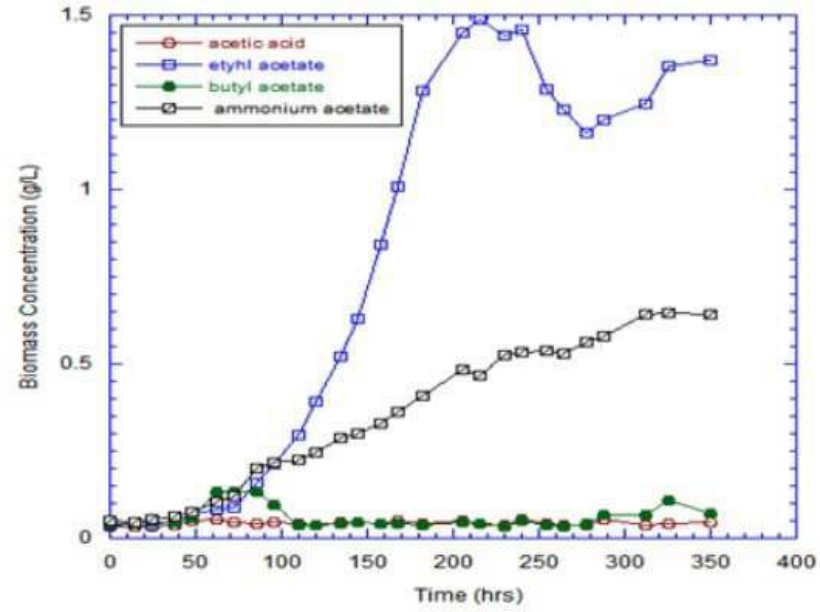
도면4


0.13g/L
0.15g/L
0.18g/L
Biomass Concentration (g/L)
Time (hrs)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
0
100
200
300
400
500
600
700
800

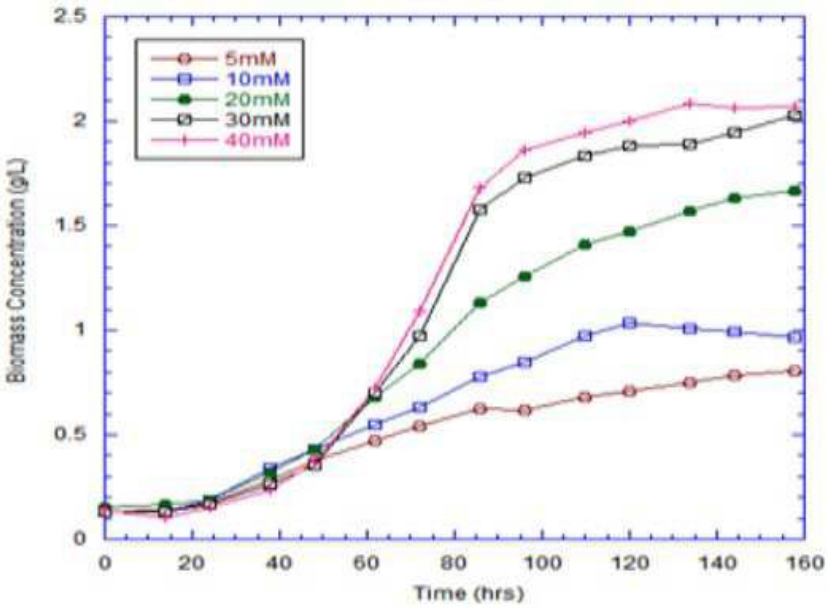
도면5


control
0.12 wm
0.54 wm
1.08 wm
Biomass Concentration (g/L)
Time (hrs)
0
1
2
3
4
5
0
100
200
300
400
500

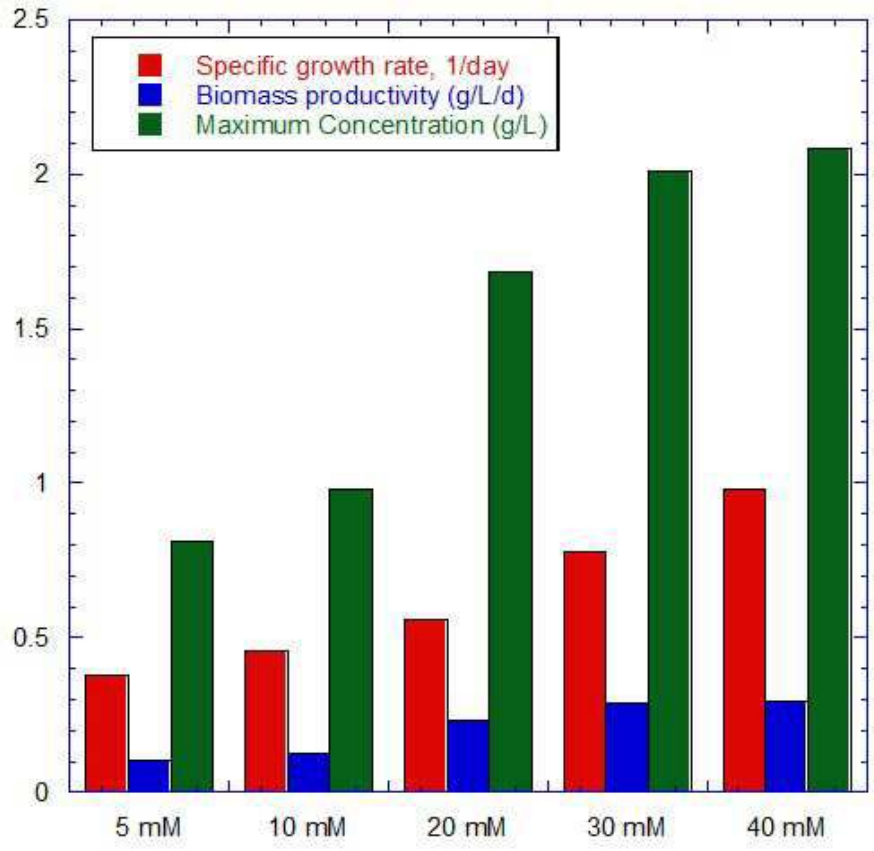
도면6


acetic acid
etyhl acetate
butyl acetate
ammonium acetate
Biomass Concentration (g/L)
Time (hrs)
0
0.5
1
1.5
0
50
100
150
200
250
300
350
400

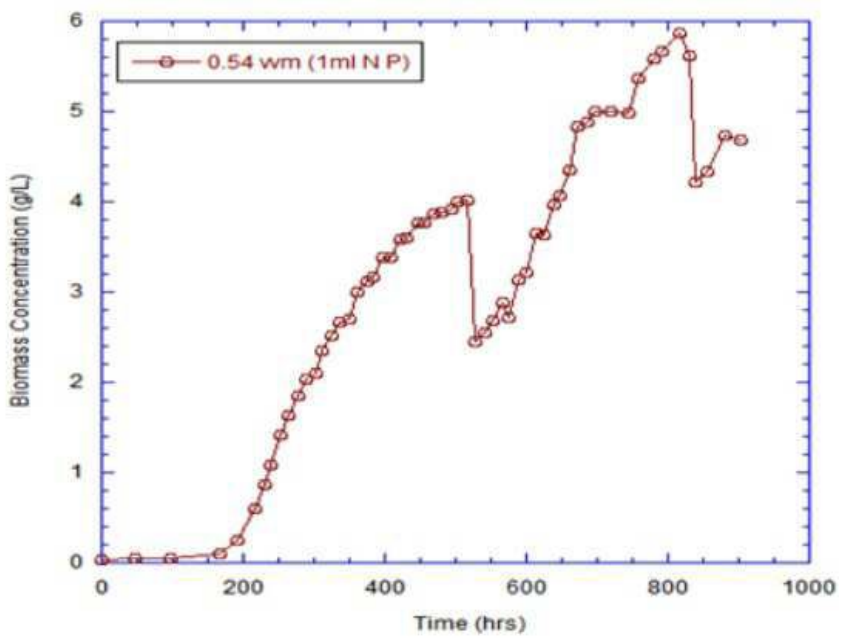
도면7


5mM
10mM
20mM
30mM
40mM
Biomass Concentration (g/L)
Time (hrs)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
0
20
40
60
80
100
120
140
160

도면8


Specific growth rate, 1/day
Biomass productivity (g/L/d)
Maximum Concentration (g/L)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
5 mM
10 mM
20 mM
30 mM
40 mM

도면9


0.54 wm (1ml N P)
Biomass Concentration (g/L)
Time (hrs)
0
1
2
3
4
5
6
0
200
400
600
800
1000