

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 1월 25일 (25.01.2024)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/019516 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 1/12 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/010390

(22) 국제출원일:

2023년 7월 19일 (19.07.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0088732 2022년 7월 19일 (19.07.2022) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 한국서부발전 주식회사 (KOREA WESTERN POWER CO., LTD.) [KR/KR]; 32140 충청남도 태안군 태안읍 중앙로 285, Chungcheongnam-do (KR).

(72) 발명자: 심상준 (SIM, Sang Jun); 07331 서울특별시

영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호, Seoul (KR). 유병선 (YU, Byung Sun); 02851 서울특별시 성북구 고려대로1길 13, 403호, Seoul (KR). 성영준 (SUNG, Young Joon); 07324 서울특별시 영등포구 여의동로 3길 10, 201동 501호, Seoul (KR). 박원서 (PARK, Won Seo); 16930 경기도 용인시 수지구 만현로 79, 505동 1502호, Gyeonggi-do (KR). 고현진 (KO, Hyun Jin); 32140 충청남도 태안군 태안읍 중앙로 215, C-301호, Chungcheongnam-do (KR).

(74) 대리인: 정은열 등 (JUNG, Eun Youl et al.);

06149 서울특별시 강남구 테헤란로55길 21, 402호 (정앤김 특허법률사무소), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR CULTURING MICROALGAE

(54) 발명의 명칭: 미세조류 배양방법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for cultivating microalgae, and the method for cultivating microalgae according to the present invention comprises: a step (S100) of injecting a KOH aqueous solution into a reaction vessel and supplying carbon dioxide so as to generate bicarbonate ions; a step (S200) of injecting a KHCO₃ aqueous solution into the reaction vessel in which the bicarbonate ions are generated so as to form a first buffer system; and a step (S300) of adding a medium to the first buffer system, inoculating microalgae, and then photoculturing the microalgae while supplying carbon dioxide.

(57) 요약서: 본 발명은 미세조류 배양방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은 반응 용기에 KOH 수용액을 주입하고, 이산화탄소를 공급하여 중탄산이온을 생성하는 단계(S100), 중탄산이온이 생성된 반응 용기에 KHCO₃ 수용액을 주입하여, 제1 버퍼 시스템을 조성하는 단계(S200), 및 제1 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 미세조류를 접종한 다음, 이산화탄소를 공급하면서 광배양하는 단계(S300)를 포함한다.



WO 2024/019516 A1

명세서

발명의 명칭: 미세조류 배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 미세조류 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 안전하고 지속 가능한 버퍼 시스템을 조성하여 미세조류를 효율적으로 배양하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현재 인류가 직면한 가장 큰 문제 중의 하나는 화석 연료의 사용에 따른 대규모 온실가스의 배출로 야기된 지구 온난화 현상이다. 2015년 파리기후 협약에 서 알 수 있듯이 전 세계적으로 이산화탄소 감축을 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 이에 따라 이산화탄소 감축을 위한 이산화탄소 포집 및 저장 기술(CCS, Carbon Capture & Sequestration) 개발이 전 세계적으로 활발히 진행 중에 있다. CCS 기술은 화력발전소와 같은 산업 시설로부터 배출되는 이산화탄소를 포집하고 압축한 후 지하 깊은 곳에 저장하는 기술이다. 즉, 다양한 탄소 배출원에서 방출되는 다량의 이산화탄소를 고농도로 포집한 후 지중이나 해저에 주입하여 대기로부터 격리시키는 방법이다. 이러한 CCS 기술은 단기간에 다량의 이산화탄소를 저장시키는 효과가 있으나, 안정적인 저장 문제, 위치 선정 및 높은 설치비용 등이 국내에서 실질적인 CCS의 현실화를 막는 장애요인이 되고 있다. 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. 그 중에서도 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. 미세조류는 바다나 민물에 서식하는 단세포 광합성 생물로서 식물성 플랑크톤이라 불린다. 이들은 지구 전역에 광범위하게 분포하고 있는 매우 흔한 생물이기 때문에, 해양 생태계의 먹이 사슬 중 가장 아래층을 구성하고 있다. 또한, 미세조류는 광합성을 하는 수중 단세포 생물로 에너지 및 산업 소재 생산과 동시에 온실가스 저감이 가능한 바이오매스 자원으로 관심을 받고 있으며 에너지·화학·환경 분야를 중심으로 미래에의 이용가치가 확대될 전망이다.
- [4] 에너지 분야에서 미세조류는 모든 바이오디젤 생산 작물 중 오일 생산성이 가장 우수하다. 대두, 유채, 해바라기, 오일팜 등은 재배 주기가 4~8개월인 반면 미세조류는 세포분열로 아주 쉽게 매일 수배로 증식하여 1일 단위로 재배가 가능하며 단위 무게당 지방 함량치도 높아 연간 오일 생산량이 대두의 100배 이상이다. 또한, 식량자원의 에너지화라는 비판에서 자유로운 생명자원으로 일반 식물

처럼 줄기나 뿌리 등의 조직이 필요 없기 때문에, 모든 세포가 광합성에 참여할 수 있다. 모든 세포가 광합성을 한다는 것은 바이오매스 생산에 더 유리하다는 의미이기 때문에 같은 면적에서 재배를 할 때 미세조류에서 얻어지는 바이오연료의 양은 옥수수나 콩과 같은 식물에서 확보하는 바이오연료보다 훨씬 많아진다.

- [5] 화학 분야에서 미세조류는 다양한 유용물질을 생산할 수 있는 장점이 있으며, 현재 식품 분야를 중심으로 산업화되어 있지만, 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 상용화 된 상태이다.
- [6] 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 효율에 해당한다. 또한, 미세조류는 특정한 토양이나 수질을 가리지 않고 배양이 가능하며 농경지에서 재배를 할 필요가 없기 때문에 기회비용을 발생시키지 않는다. 이에 관련 기업들은 이산화탄소 저감 및 공장폐수 정화 사업에 미세조류를 활용하려는 시도를 확대하고 있다.
- [7] 미세조류를 배양하는 방법은 autotrophic(독립영양방식), heterotrophic(종속영양방식), mixotrophic(혼합영양방식)으로 나누어질 수 있다. Autotrophic 조건은 배양을 하는데 있어서 탄소원을 공급하지 않고 이산화탄소를 고정화하여 탄소원으로 사용하는 방식으로 빛 에너지를 이용하여 유기 화합물을 합성한다. 이 방법은 높은 지질함량 또는 헤마토코쿠스 플루비아리스를 배양하는데 있어서는 높은 아스타잔틴 함량을 가진 바이오매스를 생산할 수 있지만 배양기간이 길다는 한계를 가지고 있다. Heterotrophic 조건은 추가적인 탄소원을 제공하여 이를 에너지원으로 사용하는 방식으로 배양 기간이 짧아 생산성이 높지만 배양 기간으로 인해 높은 함량의 고부가가치 물질을 얻는 것에 한계가 발생하고 박테리아 곰팡이와 같은 오염에 취약하다는 문제가 있다. Mixotrophic 조건은 autotrophic과 heterotrophic 조건을 융합한 것으로 빠른 기간 내에 고함량의 고부가가치 물질을 함유한 바이오매스를 생산해 낼 수 있지만 오염에 취약하여 스케일업에 한계가 존재한다. 많은 연구들에서, 배양하고자 하는 미세조류의 조건에 맞추어 각각의 배양 방식을 채택하고 있다.
- [8] 그럼에도 불구하고, 생물공정의 특성상 단위 면적당 이산화탄소(CO_2) 저감 속도가 낮은 한계점을 가지고 있으므로 대량의 이산화탄소를 처리해야만 하는 온실가스 대량배출업체 측면에서 보았을 때 미세조류 기반 바이오매스화 공정은 이산화탄소 저감 능력(capacity) 측면에서 향상이 필요하다. 이에 따라 배양 규모에서의 획기적인 증가가 필요하고, 이를 해결하기 위해 다양한 배양기들이 개발

되고 있다. 배양 시스템은 크게 옥외 대량 배양과 실내 대량 배양으로 나눌 수 있다. 세계적으로 널리 활용되는 옥외 대량 배양장치의 경우, 철근 콘크리트 구조물을 제작하여 연못 형태의 개방형 배양 시설물을 구축하거나 강화유리, 아크릴을 활용한 폐쇄형 광 생물반응기를 활용하고 있다. 이 시스템은 스케일업이 용이하고 설치 및 유지비용이 저렴하지만 배양 규모가 증가될수록 성장성이 낮아지며 오염에 취약해질 뿐만 아니라 관리 유지비 또한 매우 높아진다는 단점이 있다. 반응기를 사용한 실내 대량 배양의 경우 높은 성장성과 오염에서 자유로워지지만 설치 및 유지비용이 높으며 스케일업에서의 한계가 발생한다. 하지만, 이산화탄소 제거 측면에서는 반응기를 활용한 배양이 필수적이기 때문에 많은 연구진들이 스케일업이 용이한 반응기들을 개발하여 사용 중에 있다. 한편, 배양 규모가 커질수록 미세조류 배양에 있어서 가장 중요한 최적의 pH 조건을 유지하기 위한 버퍼 시스템을 만드는 것이 더욱 필수적이다. 현재 이산화탄소가 지속적으로 공급되는 버블 시스템에서는 강염기를 반응기에 공급하여 버퍼 시스템을 만드는 것이 일반적으로 사용된다. 그러나 이러한 배양 시스템을 사용하는 경우, 배양 규모가 커짐에 따라 강염기 제조 및 사용상 안전 문제가 발생하게 된다. 또한, 이 시스템을 사용하여 배양하던 중에 이산화탄소의 공급이 부득이하게 중단되었을 경우에는 버퍼 시스템이 파괴되어 pH 증가로 인한 바이오매스의 손실이 발생하게 된다.

[9] 이에 종래 미세조류 배양 버퍼 시스템의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 KOH 수용액에 이산화탄소를 공급하여 중탄산이온을 생성하고, KHCO_3 수용액을 주입하여 안정적인 버퍼 시스템을 조성하여 미세조류를 배양하는 방법을 제공하는 데 있다.

[12] 또한, 본 발명의 다른 측면은 배가스를 통한 이산화탄소의 공급이 중단된 상황에서, KH_2PO_4 와 Urea를 공급하여 손실 없이 미세조류를 배양하는 방법을 제공하고자 한다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법은 (a) 반응 용기에 KOH 수용액을 주입하고, 이산화탄소를 공급하여 중탄산이온을 생성하는 단계; (b) 상기 중탄산이온이 생성된 상기 반응 용기에 KHCO_3 수용액을 주입하여, 제1 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및 (c) 상기 제1 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 미세조류를 접종한 다음, 상기 이산화탄소를 공급하면서 광배양하는 단계;를 포함한다.

- [15] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 KOH 수용액의 농도는 4mM 이하일 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 KHCO₃ 수용액의 농도는 6 ~ 10mM일 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 (c) 단계는, 산업시설에서 배출되고 상기 이산화탄소를 함유하는 배가스를, 상기 배지에 공급하여, 상기 이산화탄소를 공급할 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 산업시설로부터 상기 배가스의 공급이 중단된 경우에, KH₂PO₄ 수용액, 및 요소(Urea) 수용액을 상기 배지에 첨가하여, 제2 버퍼 시스템을 조성하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [19] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 KH₂PO₄ 수용액의 농도는 1 ~ 10mM일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 요소 수용액의 농도는 1 ~ 10mM일 수 있다.
- [21] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 미세조류는, 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 스피룰리나(*Spirulina*) 속, 두나리엘라(*Dunaliella*) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 스킨조키텐트리움(*Schizochytrium*) 속, 크립테코디니움(*Cryptocodinium*) 속, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속, 네오클로리스(*Neochloris*) 속, 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 속, 및 시아노박테리아(*Cyanobacteria*)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상일 수 있다.
- [22]
- [23] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.
- [24] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 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.

[25]

발명의 효과

- [26] 본 발명에 따르면, 미세조류 배양에 있어서 그 규모에 상관없이 pH를 조절할 수 있는 안전하고 효율적인 버퍼 시스템을 제공함으로써, 안정적으로 대량의 바이오매스를 생산할 수 있으며, 동시에 이산화탄소의 생물학적 전환을 통해 이산화탄소 저감에 기여할 수 있다.

- [27] 또한, 산업시설로부터 이산화탄소가 함유된 배가스를 공급하여 미세조류를 배양하는 과정에서, 부득이하게 배가스의 공급의 중단되더라도 배양의 중단 없이 지속적이고 효율적으로 바이오매스를 생산할 수 있다.

[28]

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 배양방법의 순서도이다.
- [30] 도 2는 실시예 4에 따른 미세조류 배양방법의 모식도이다.
- [31] 도 3은 실시예 4에 따른 KHCO_3 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프이다.
- [32] 도 4는 실시예 4에 따른 KHCO_3 와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프이다.
- [33] 도 5는 실시예 4에 따른 KHCO_3 와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 지질 함량(Lipid content), 지질 생산성(Lipid productivity) 및 FAME 생산성(FAME productivity)을 나타내는 그래프이다.
- [34] 도 6은 실시예 4에 따른 KHCO_3 와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 클로로필 함량 변화를 나타내는 그래프이다.
- [35] 도 7은 실시예 4에 따른 최적 KHCO_3 와 KOH 농도에서 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 O_2 evolution 값을 나타내는 그래프이다.
- [36] 도 8은 실시예 4에 따른 최적 KHCO_3 와 KOH 농도에서 *Chlorella sorokiniana*를 배양했을 때의 O_2 evolution 값을 나타내는 그래프이다.
- [37] 도 9는 실시예 4에 따른 KHCO_3 농도별로 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 pH 변화를 나타내는 그래프이다.
- [38] 도 10은 실시예 4에 따른 KHCO_3 와 KOH 농도별로 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 pH 변화를 나타내는 그래프이다.
- [39] 도 11은 실시예 5에 따른 5%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프이다.
- [40] 도 12는 실시예 5에 따른 5%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Chlorella sorokiniana*의 cell density를 나타내는 그래프이다.
- [41] 도 13은 실시예 5에 따른 15%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density, 및 pH 변화를 나타내는 그래프이다.

[42]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. "제 1", "제 2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하,

본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[44] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[45]

[46] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 배양방법의 순서도이다.

[47] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은 반응 용기에 KOH 수용액을 주입하고, 이산화탄소를 공급하여 중탄산이온을 생성하는 단계(S100), 중탄산이온이 생성된 반응 용기에 KHCO_3 수용액을 주입하여, 제1 버퍼 시스템을 조성하는 단계(S200), 및 제1 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 미세조류를 접종한 다음, 이산화탄소를 공급하면서 광배양하는 단계(S300)를 포함한다.

[48]

[49] 본 발명은 안전하고 지속 가능한 버퍼 시스템을 조성하여 미세조류를 효율적으로 배양하는 방법에 관한 것이다. 생물공정은 그 특성상 단위 면적당 이산화탄소(CO_2) 저감 속도가 낮은 한계점을 가지고 있으므로, 미세조류 기반 바이오매스화 공정은 이산화탄소 저감 능력(capacity)의 향상을 위해 점차 배양 규모를 확장하고 있다. 이렇듯 배양 규모가 커질수록 미세조류 배양에 있어 필수적 요구되는 것이 최적의 pH 조건을 유지하기 위한 버퍼 시스템으로, 종래에는 강염기를 반응기에 공급하여 버퍼 시스템을 조성하였다. 그러나 종래 버퍼 시스템은 배양 규모가 커짐에 따라 강염기를 제조하고 사용해므로, 안전상 문제가 발생할 수 있고, 이산화탄소의 공급이 부족하게 중단되었을 경우에는 버퍼 시스템이 파괴되어 pH 증가로 인한 바이오매스의 손실이 발생하게 될 수 있는바, 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로서 본 발명이 안출되었다.

[50] 구체적으로, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은, 중탄산이온 생성단계(S100), KHCO_3 주입단계(S200), 및 미세조류 배양단계(S300)를 포함한다.

[51]

[52] 중탄산이온 생성단계(S100)는 반응 용기에 KOH 수용액을 주입하고, 이산화탄소를 공급하는 공정이다. 여기서, 반응 용기는 미세조류가 배양되는 장소를 제공한다. 반응 용기에 주입되는 KOH 수용액의 농도는 4mM 이하일 수 있다. 이러한 KOH 수용액에 이산화탄소가 공급되면, 중탄산이온(HCO_3^-)이 생성된다.

[53]

[54] KHCO_3 주입단계(S200)는 이산화탄소가 공급된 KOH 수용액에 KHCO_3 수용액을 주입하는 공정이다. 여기서, KHCO_3 수용액의 농도는 6 ~ 10mM일 수 있다. KHCO_3 주입단계(S200)를 통해 제1 버퍼 시스템이 조성되고, 제1 버퍼 시스템은 미세조류 배양에 적합하게 pH를 7.0 ~ 8.0으로 유지시킨다. 한편, KOH 수용액 및 KHCO_3 수용액의 주입 방식, 즉 KOH 수용액을 주입하고 이산화탄소를 공급하여

중탄산이온을 생성한 다음에 KHCO_3 수용액을 주입하는 방식, 및 KOH 수용액 및 KHCO_3 수용액 각각의 농도 범위에서, 탄소원이 증가되어 셀 밀도와 지질 함량 등이 높은 바이오매스를 생산할 수 있다. 또한, 순차적인 KOH 및 KHCO_3 의 주입은, 배양 규모가 커질 때에 강염기인 KOH 만을 단독으로 사용할 때 발생할 수 있는 안전성 문제, 및 KOH 를 전량 KHCO_3 로 대체하는 경우에 배양 규모가 확장될수록 증가하는 비용 문제를 해소할 수 있는 방안이 된다.

[55]

[56] 미세조류 배양단계(S300)는 위에서 조성된 제1 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 여기에 미세조류를 접종한 다음, 광배양하는 공정이다. 이때, 배지에 이산화탄소가 공급된다. 옥외 또는 실내에서 자가영양조건으로 미세조류를 대량으로 배양하는 경우에, 이산화탄소의 공급은 배가스를 이용할 수 있다. 발전소, 제철·시멘트 공장 등의 산업시설은 이산화탄소를 함유하는 가스를 배출하므로, 그 배가스를 배지에 공급함으로써, 탄소원으로 사용하게 한다. 이때, 배가스는 탈진, 탈황, 탈질소, 탈염소 등의 정화 과정을 거쳐 배지에 공급될 수 있다.

[57] 여기서, 미세조류는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 스피룰리나(*Spirulina*) 속, 두나리엘라(*Dunaliella*) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 스킨조트리움(*Schizochytrium*) 속, 크립테코디니움(*Cryptocodinium*) 속, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속, 네오클로리스(*Neochloris*) 속, 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 속, 및 시아노박테리아(*Cyanobacteria*)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상일 수 있으나, 반드시 이에 한정되어야 하는 것은 아니다.

[58]

[59] 한편, 산업시설의 배가스를 이용하여 미세조류를 배양하는 경우, 산업시설은 시설의 특성상 설비 내지 기계 장비 등의 동작을 멈추고 이를 점검 내지 수리하는 오버홀(overhaul) 기간을 필수적으로 가지게 되는데, 그 기간에는 이산화탄소의 공급이 중단된다. 이 경우, 버퍼 시스템이 파괴되기 때문에, pH가 최대 12까지 증가하여, 셀(cell)의 성장단계에서는 바이오매스에, 유도단계에서는 지질 축적에 막대한 손실이 야기된다. 이를 해결하기 위한 방안으로서, 그 기간 동안 본배가스를 직접 공급할 수 있지만, 특히 대량 배양의 경우에 경제적 한계로 인해 현실성이 떨어진다.

[60]

이에 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은, 배양 중에 산업시설로부터 배가스의 공급이 중단되어 이산화탄소 공급이 불가능한 경우에 대비하여, KH_2PO_4 수용액, 및 요소(Urea) 수용액 주입단계(S400)를 더 포함할 수 있다.

[61]

KH_2PO_4 수용액, 및 요소 수용액 주입단계(S400)는, 산업시설로부터 배가스의 공급이 중단된 경우에 실행되는 제2 버퍼 시스템을 조성하는 공정이다. 여기서, 이산화탄소의 공급이 중단될 때에, KH_2PO_4 수용액, 및 요소 수용액을 배지에 첨

가하여, pH를 8이하로 유지할 수 있다. 이때, KH_2PO_4 수용액의 농도는 1 ~ 10mM 이고, 요소 수용액의 농도는 1 ~ 10mM일 수 있다. 여기서, KH_2PO_4 수용액, 및 요소 수용액은 그 농도 범위에서 1:0.8~1.2의 농도 비율로, 바람직하게는 1:1의 농도 비율로 주입될 수 있다. 예를 들면, 농도가 동일하게 5mM의 KH_2PO_4 수용액과 5mM의 요소 수용액을 주입할 수 있다.

[62] 제2 버퍼 시스템에서, KH_2PO_4 는 인산 버퍼 역할을 하고, 요소(Urea)는 수용액에서 암모늄이온과 이산화탄소로 분해되어 질소원을 제공함과 동시에 이산화탄소를 공급하는 역할을 하게 되므로, 배가스의 공급이 중단되더라도 안정적으로 pH를 8이하로 유지하며 미세조류의 배양을 가능하게 한다.

[63]

발명의 실시를 위한 형태

[64] 이하에서는 구체적인 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[65]

[66] 실시예 1. 광합성 생물 반응과 광물화 공정을 위한 구성 요소들의 제작 과정

[67] 우선적으로, 최적의 버퍼 시스템 조건을 찾기 위해 airlift 방식이 도입 가능한 500ml(가로: 5cm, 높이: 60cm) 매스실린더 10개를 준비하였다. 또한, 이산화탄소의 공급이 중단되었을 때 공급해주는 KH_2PO_4 와 Urea의 최적 농도를 찾기 위해 250ml 플라스크 20개를 준비하였다.

[68]

[69]

[70] *실시예 2. 구성 요소들의 세부 제작 과정

[71] 준비된 매스실린더의 주입구를 막고 가스 주입과 샘플링을 할 수 있기 위해 실리콘 재질의 다용도 입/출구를 사용하였다. 가스 라인과 샘플링 라인을 설치하기 위해 실리콘 재질의 다용도 입/출구에 2 ~ 3mm의 구멍을 천공하고 2개의 테플론 튜브를 매스실린더 높이에 맞게 절단하여 만들어진 구멍 안으로 넣어주었다. 가스가 공급되는 테플론 튜브의 하단에는 stone 스파저를 연결하여 이산화탄소가 5% 포함된 공기(air)를 공급하였다. 또한, 광도를 매스실린더에 일정하게 공급하기 위해 LED판을 구입하여 벽면에 부착하였다. 플라스크 실험의 경우 5% CO_2 인큐베이터서 배양을 진행하였다.

[72]

[73] 실시예 3. 미세조류 광배양 과정

[74] 도 2는 실시예 4에 따른 미세조류 배양방법의 모식도이다. 도 2를 참고로, 배지는 TAP-C를 사용하였으며 매스실린더에 450ml씩 주입한 후 에어레이션(aeration)을 진행하였다. 이후 최적의 버퍼시스템 조건을 찾기 위해 매스실린더 4개에 10mM의 KOH, 2mM KOH, 3mM KOH, 4mM KOH 수용액을 각각 주입한 후 aeration을 진행하였다. 나머지 6개 중 5개에는 10mM KHCO_3 , 8mM KHCO_3 , 6mM KHCO_3 , 4mM KHCO_3 , 2mM KHCO_3 수용액을 각각 주입한 후 aeration을 진행하

였으며 나머지 1개는 비교군(control) 실험을 위해 아무것도 넣지 않았다. 또한, 2mM KOH가 들어간 매스실린더에는 8mM KHCO₃, 3mM KOH가 들어간 매스실린더에는 7mM KHCO₃, 4mM KOH가 들어간 매스실린더에는 6mM KHCO₃를 공급하여 전체적으로 10mM로 농도를 맞추었다. 넣어준 KOH와 KHCO₃의 완충 효과로 이산화탄소가 지속적으로 공급되어도 pH는 7.5에서 8사이로 유지될 수 있다. 미세조류는 *Neochloris oleoabundans*와 *Chlorella sorokiniana*를 사용하였으며 초기 접종량은 바이오매스 기준 0.05g/ℓ로 하였으며 플라스크와 매스실린더에서 각각 3 ~ 4일간의 성장단계, 4 ~ 6일간의 유도단계에서 빛은 300 μE/m²/s으로 조사하였다. 매스실린더의 최종 배양 부피는 500mℓ로 하였다.

[75] 이산화탄소의 공급이 중단되었을 때의 KH₂PO₄와 Urea 주입 시 최적의 농도를 찾기 위해 10개의 플라스크에는 1ℓ 유리 용기에 10mM KOH를 주입하고 aeration 시키어 버퍼 시스템을 제조한 후 TAP-C 배지를 주입한 용액을 각각 100mℓ씩 주입한 후 상기 균주 2개를 배양하였다.

[76]

[77] 실시예 4. 성장단계(Growth stage)와 유도단계(Induction stage)에서의 바이오매스 공정

[78] 최적의 버퍼 시스템을 제조하기 위한 농도를 찾기 위해 매스실린더에서 상기 조건으로 배양을 진행하고, 그 결과를 도 3 내지 도 10에 나타냈다. 도 3은 실시예 4에 따른 KHCO₃ 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프, 도 4는 실시예 4에 따른 KHCO₃와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프, 도 5는 실시예 4에 따른 KHCO₃와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 지질 함량(Lipid content), 지질 생산성(Lipid productivity) 및 FAME 생산성(FAME productivity)을 나타내는 그래프, 도 6은 실시예 4에 따른 KHCO₃와 KOH 농도별로 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 클로로필 함량 변화를 나타내는 그래프, 도 7은 실시예 4에 따른 최적 KHCO₃와 KOH 농도에서 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 O₂ evolution 값을 나타내는 그래프, 도 8은 실시예 4에 따른 최적 KHCO₃와 KOH 농도에서 *Chlorella sorokiniana*를 배양했을 때의 O₂ evolution 값을 나타내는 그래프, 도 9는 실시예 4에 따른 KHCO₃ 농도별로 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 pH 변화를 나타내는 그래프, 도 10은 실시예 4에 따른 KHCO₃와 KOH 농도별로 *Neochloris oleoabundans*를 배양했을 때의 pH 변화를 나타내는 그래프이다.

[79] 도 3 내지 도 5를 참고로, 2mM의 KOH를 주입하고 aeration 시킨 후 8mM KHCO₃를 주입하는 조건에서 가장 높은 cell density(g/ℓ)와 지질함량 그리고 FAME 생산성을 가진다는 것을 확인하였다. 또한, 도 6과 같이, 클로로필 함량을 분석해본 결과 상기 조건일 때 클로로필 감소 추이가 10mM KOH를 사용했을 때와 KOH 8mM, KHCO₃ 2mM를 사용했을 때보다 더디어 지는 것을 확인하였

다. 이를 통해 KHCO_3 8mM과 KOH 2mM을 주입하였을 때 광합성 효율이 우수하다는 것을 입증하였으며, 보다 확실하게 증명하기 위해 광합성 효율을 알 수 있는 O_2 evolution을 측정하였다. 측정 결과 *Neochloris oleoabundans*와 *Chlorella sorokiniana*에서 모두 상기 조건에서 우수하다는 것을 도 7 및 도 8을 통해 확인할 수 있었다. 이를 통해, 탄소원으로 중탄산이온을 직접적으로 넣어주는 것이 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 도 9 내지 도 10을 참고로, 배양 과정에서의 pH는 모든 조건이 7.0 ~ 8.0 사이로 일정하게 유지되었으며, 유도단계를 위해서는 바이오매스가 1.0 ~ 1.5 g/l에 도달하였을 때, 대용량 원심분리기를 사용하여 상층액인 배지를 제거하고 10ℓ 유리용기에 제조해 둔 TAP-N 배지로 교체하여 배양을 계속해서 진행하였다.

[80]

[81] 실시예 5. 배양 과정에서 이산화탄소 공급 중단

[82] 이산화탄소의 공급이 중단되었을 때의 KH_2PO_4 와 Urea 주입 시 최적의 농도를 찾기 위해 CO_2 인큐베이터에서 배양 중이던 상기 균주 2개가 바이오매스가 0.8g/l이 되었을 때, 이산화탄소의 공급을 중단시키었다. 중단시키고 하루 만에 *Neochloris oleoabundans*, *Chlorella sorokiniana* 모두 pH가 9.5까지 증가하였으며 바이오매스에서 막대한 손실이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 해결하기 위해 6개의 플라스크에 10mM KH_2PO_4 , 5mM KH_2PO_4 + 5mM Urea, 10mM Urea를 duplicate로 넣어주었다. 나머지 4개의 플라스크에는 이산화탄소의 공급이 중단되고 아무것도 넣어주지 않는 조건과 이산화탄소를 지속적으로 공급하는 조건을 duplicate로 진행하고, 그 결과를 도 11 내지 도 14에 도시하였다. 도 11은 실시예 5에 따른 5%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density를 나타내는 그래프, 도 12는 실시예 5에 따른 5%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Chlorella sorokiniana*의 cell density를 나타내는 그래프, 도 13은 실시예 5에 따른 15%의 CO_2 공급 중단 후 KH_2PO_4 와 Urea를 공급했을 때 배양된 *Neochloris oleoabundans*의 cell density, 및 pH 변화를 나타내는 그래프이다.

[83] 도 11 내지 도 12와 같이, 실험을 진행한 결과 모든 조건에서 pH는 8 이하로 낮아졌지만, KH_2PO_4 와 Urea를 동시에 넣어주었을 때 바이오매스가 가장 높다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 KH_2PO_4 가 인산 버퍼 역할을 하게 되고 Urea는 물에 녹을 경우 암모늄이온과 이산화탄소로 분해되어 질소원 제공 역할 뿐만 아니라 이산화탄소를 공급하는 효과 또한 얻을 수 있기 때문이다. 이산화탄소가 차단되는 시점과 그 때의 바이오매스 농도에 따라 넣어주는 양은 바뀔 수 있지만 농도비는 1:1로 맞춰야 한다는 것 또한 확인할 수 있었다.

[84] 상기 최적화된 조건을 가지고 15%의 고농도 이산화탄소가 공급되는 태안 화력 발전소에서도 적용할 수 있는지 확인해보았다. 그 결과, 도 13과 같이, 15%의 이산화탄소가 공급됨에 따라 전체적인 바이오매스는 감소하였지만, 배양 중 이산

화탄소의 공급이 중단되었을 때, Urea와 KH_2PO_4 를 각각 공급할 경우에도 pH를 8 이하로 유지하면서 바이오매스의 손실을 최소화할 수 있었지만, Urea와 KH_2PO_4 를 5mM씩 주입하였을 때 최적의 pH를 유지하였을 뿐만 아니라 바이오매스 손실 또한 최소화할 수 있었다.

[85]

[86] 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.

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

[88]

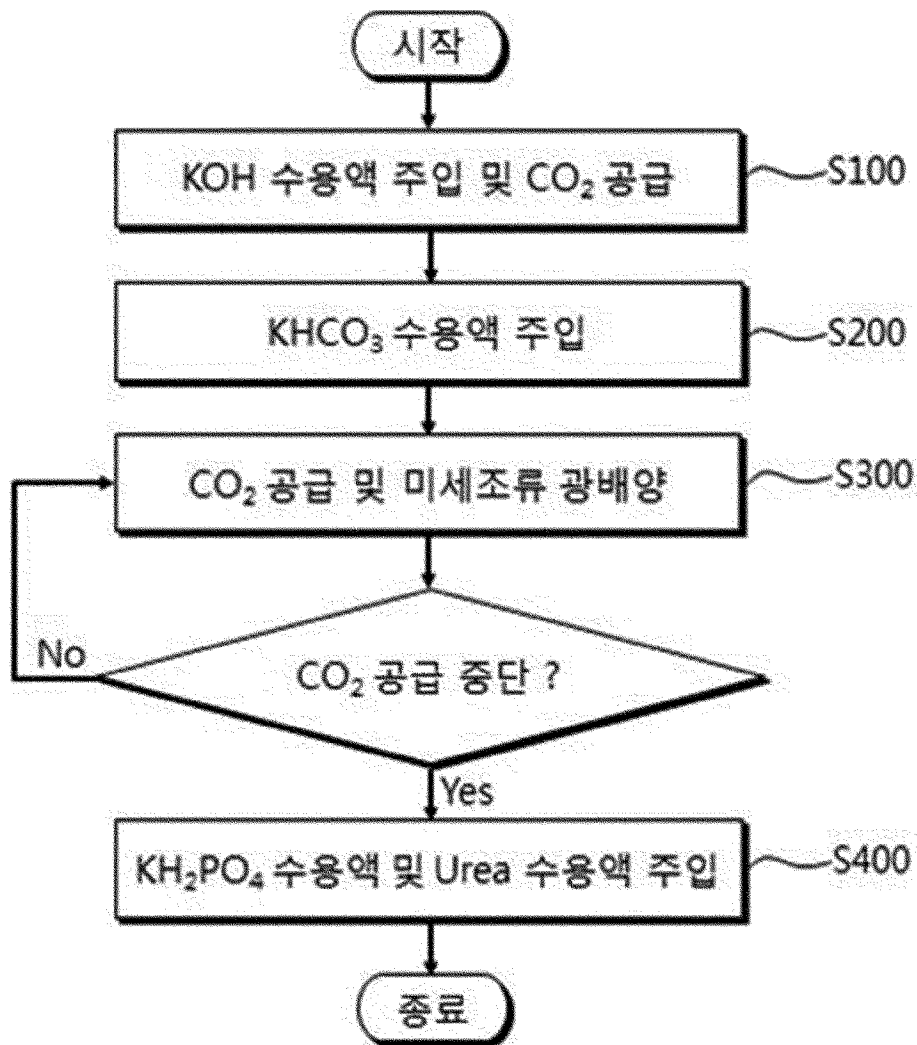
산업상 이용가능성

[89] 본 발명은 KOH 수용액에 이산화탄소를 공급하여 중탄산이온을 생성하고, KHCO_3 수용액을 주입하여 안정적인 버퍼 시스템을 조성하여 미세조류를 배양하는 방법으로서, 안정적으로 대량의 바이오매스를 생산할 수 있으며, 동시에 이산화탄소의 생물학적 전환을 통해 이산화탄소 저감에 기여할 수 있으므로 산업상 이용가능성이 인정된다.

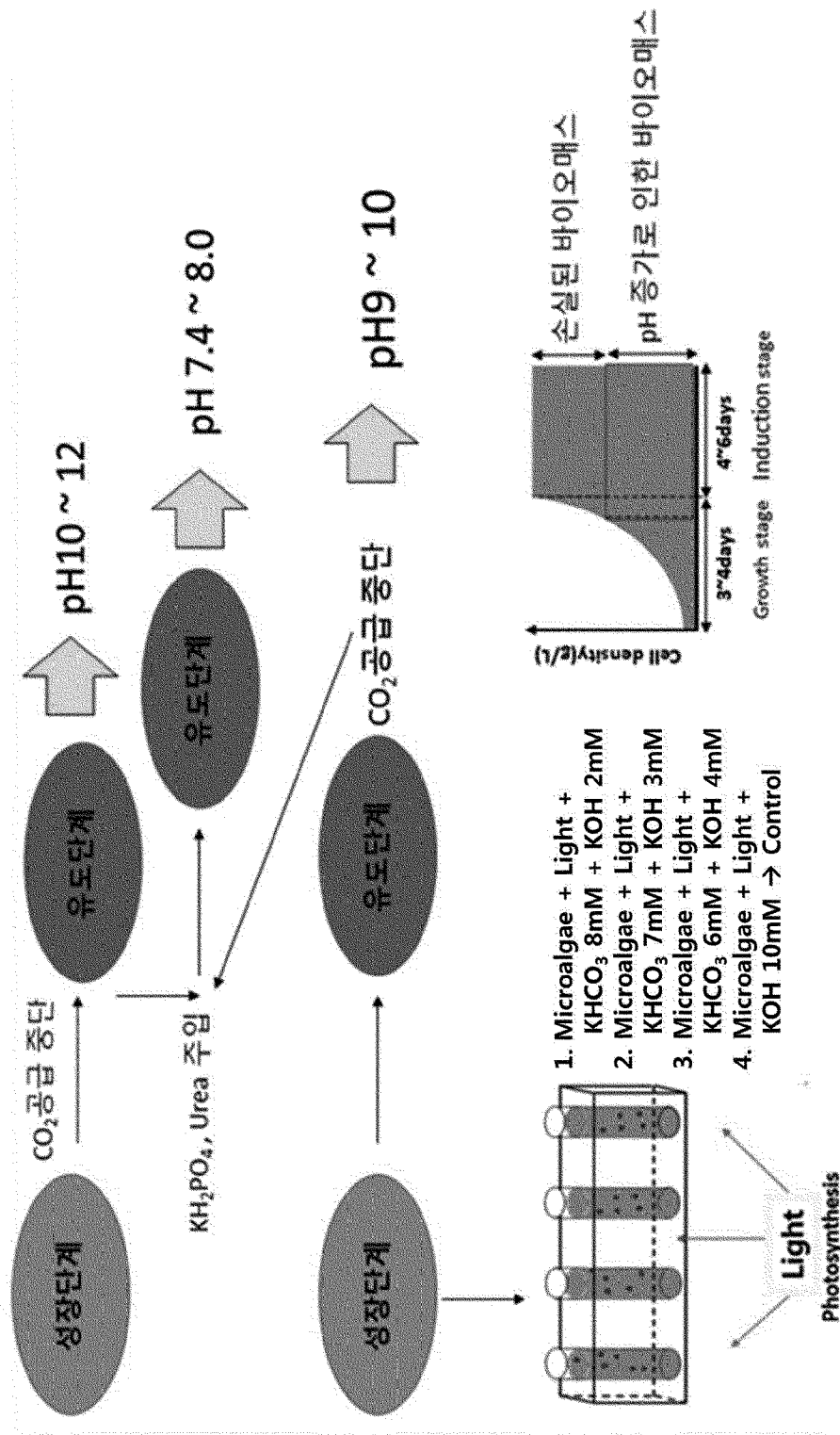
청구범위

- [청구항 1] (a) 반응 용기에 KOH 수용액을 주입하고, 이산화탄소를 공급하여 중탄산 이온을 생성하는 단계;
 (b) 상기 중탄산이온이 생성된 상기 반응 용기에 KHCO_3 수용액을 주입하여, 제1 버퍼 시스템을 조성하는 단계; 및
 (c) 상기 제1 버퍼 시스템에 배지를 첨가하고, 미세조류를 접종한 다음, 상기 이산화탄소를 공급하면서 광배양하는 단계;를 포함하는 미세조류 배양방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
 상기 KOH 수용액의 농도는 4mM 이하인 미세조류 배양방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
 상기 KHCO_3 수용액의 농도는 6 ~ 10mM인 미세조류 배양방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
 상기 (c) 단계는,
 산업시설에서 배출되고 상기 이산화탄소를 함유하는 배가스를, 상기 배지에 공급하여, 상기 이산화탄소를 공급하는 미세조류 배양방법.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
 상기 산업시설로부터 상기 배가스의 공급이 중단된 경우에,
 KH_2PO_4 수용액, 및 요소(Urea) 수용액을 상기 배지에 첨가하여, 제2 버퍼 시스템을 조성하는 단계;를 더 포함하는 미세조류 배양방법.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
 상기 KH_2PO_4 수용액의 농도는 1 ~ 10mM인 미세조류 배양방법.
- [청구항 7] 청구항 5에 있어서,
 상기 요소 수용액의 농도는 1 ~ 10mM인 미세조류 배양방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
 상기 미세조류는,
 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*), 스피룰리나(*Spirulina*) 속, 두나리엘라(*Dunaliella*) 속, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*), 스킨조키트리움(*Schizochytrium*) 속, 크립테코디니움(*Cryptocodinium*) 속, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 속, 네오클로리스(*Neochloris*) 속, 아파니조메논(*Aphanizomenon*) 속, 및 시아노박테리아(*Cyanobacteria*)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상인 미세조류 배양방법.

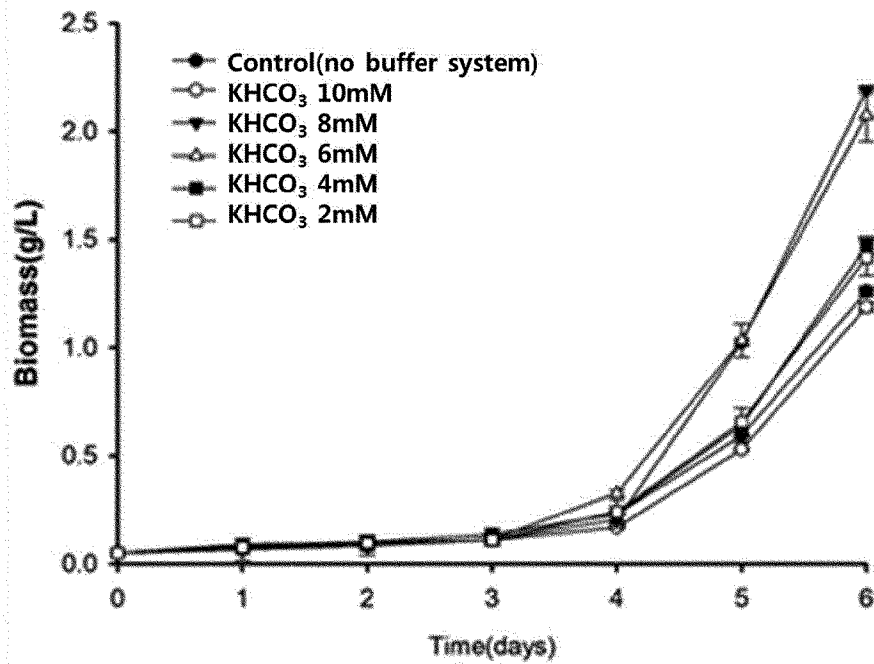
[도1]



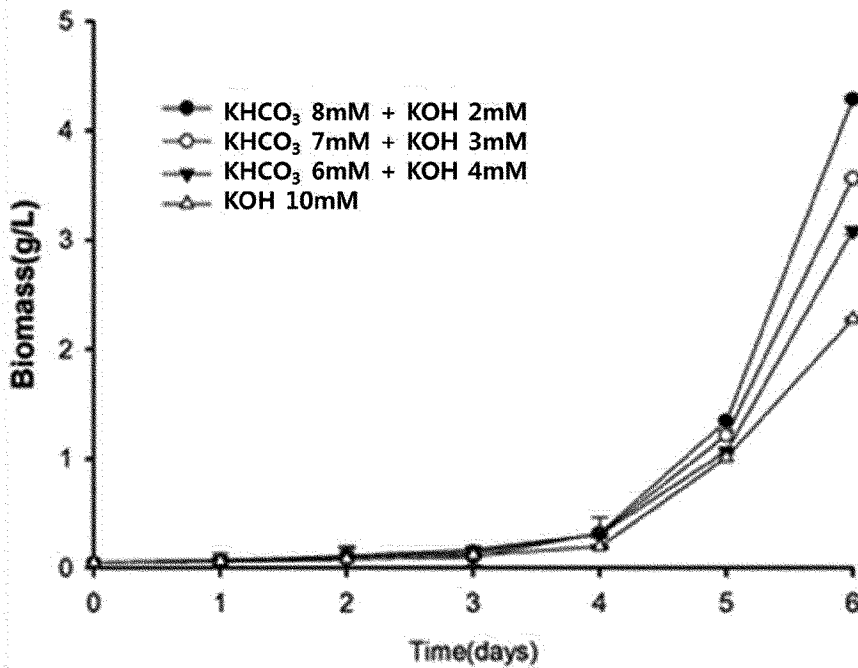
[도2]



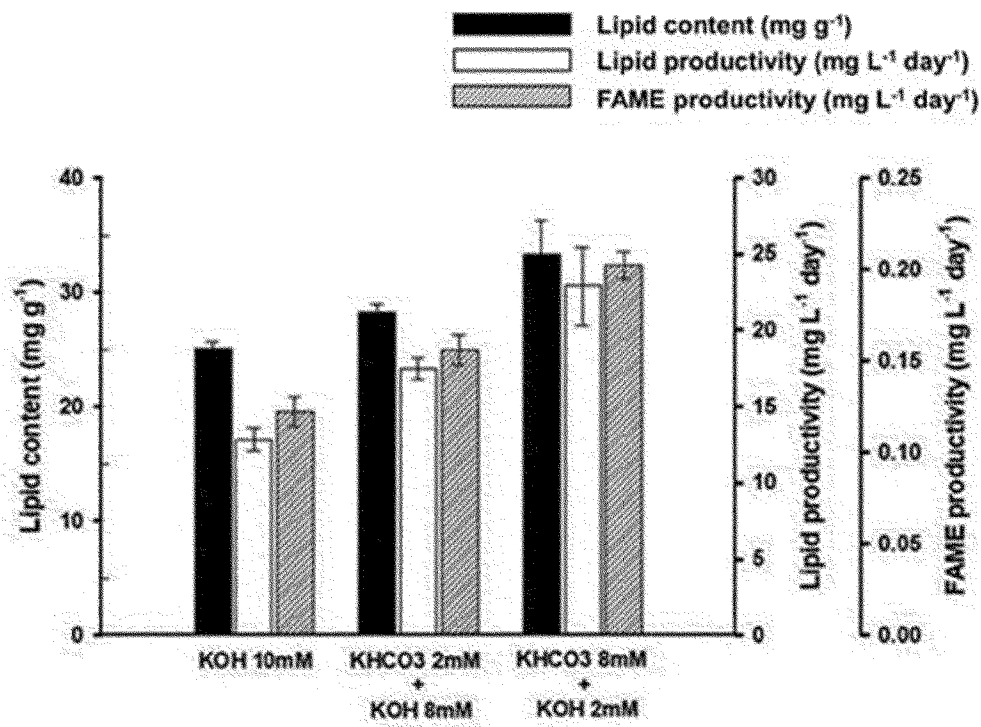
[도3]

KHCO₃ buffer system

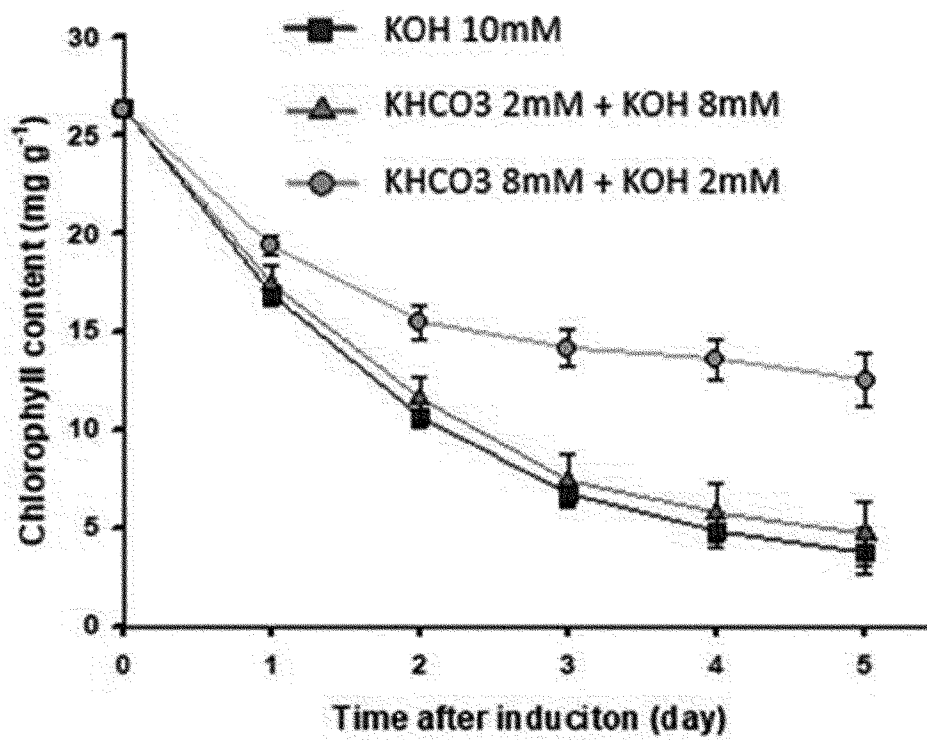
[도4]

KOH + KHCO₃ buffer system

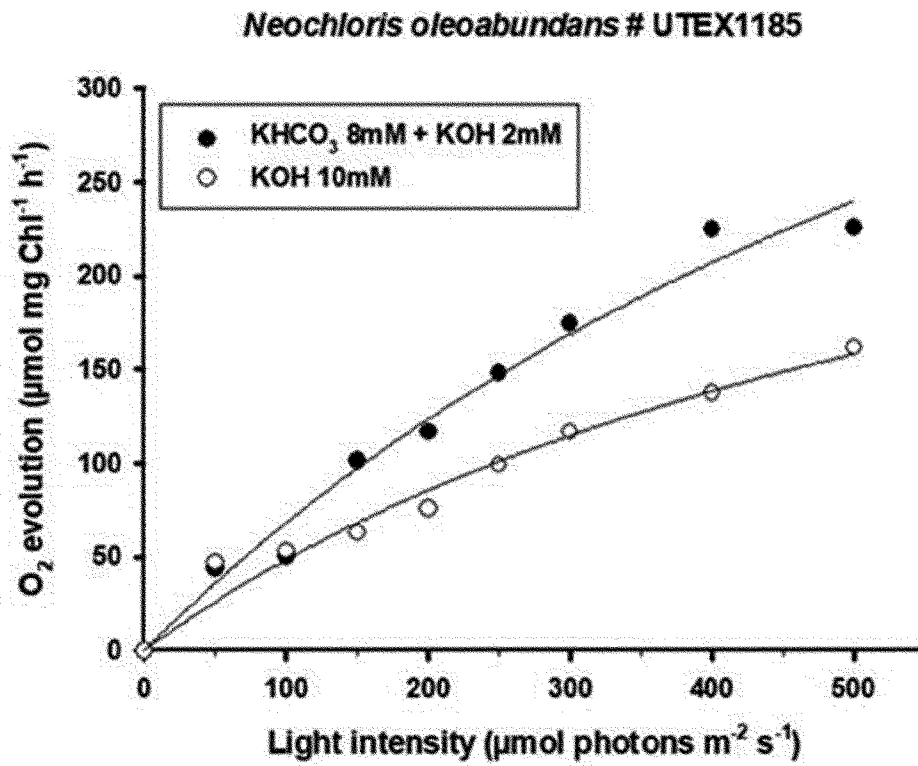
[도5]



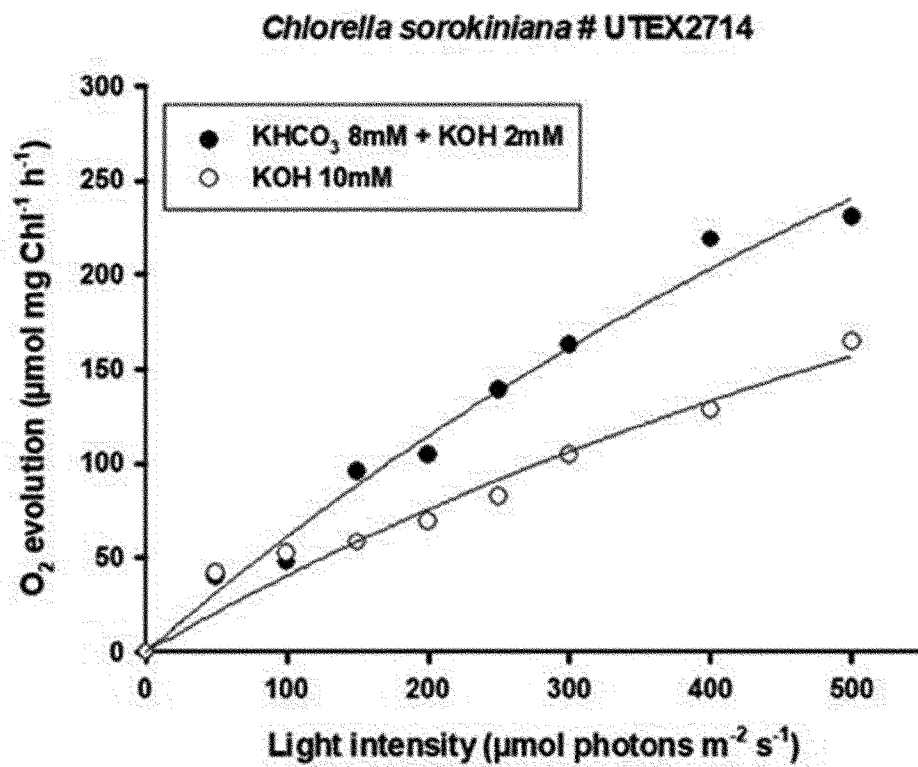
[도6]



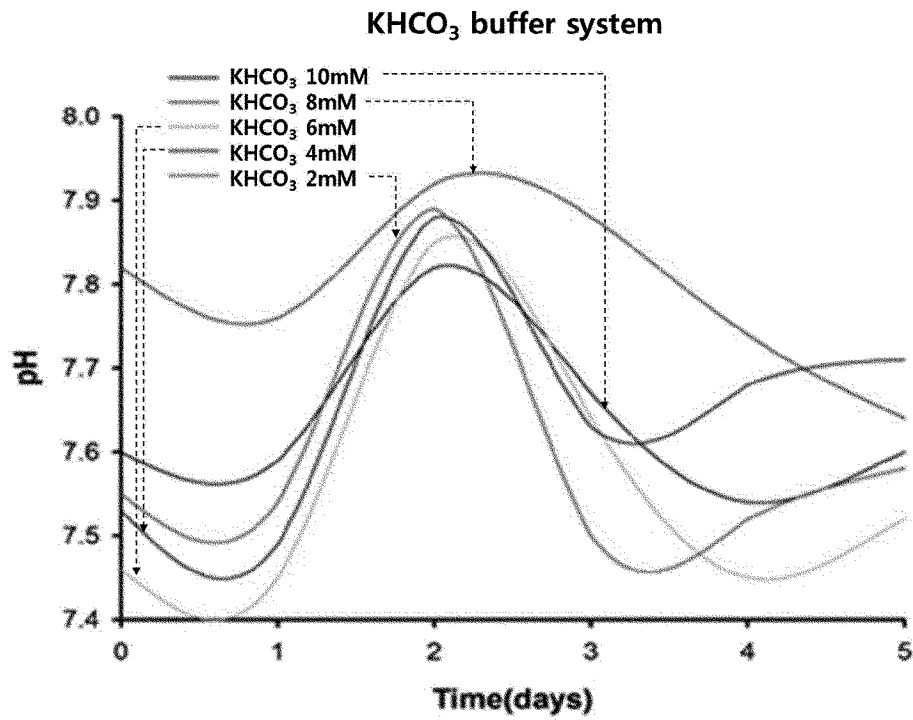
[도7]



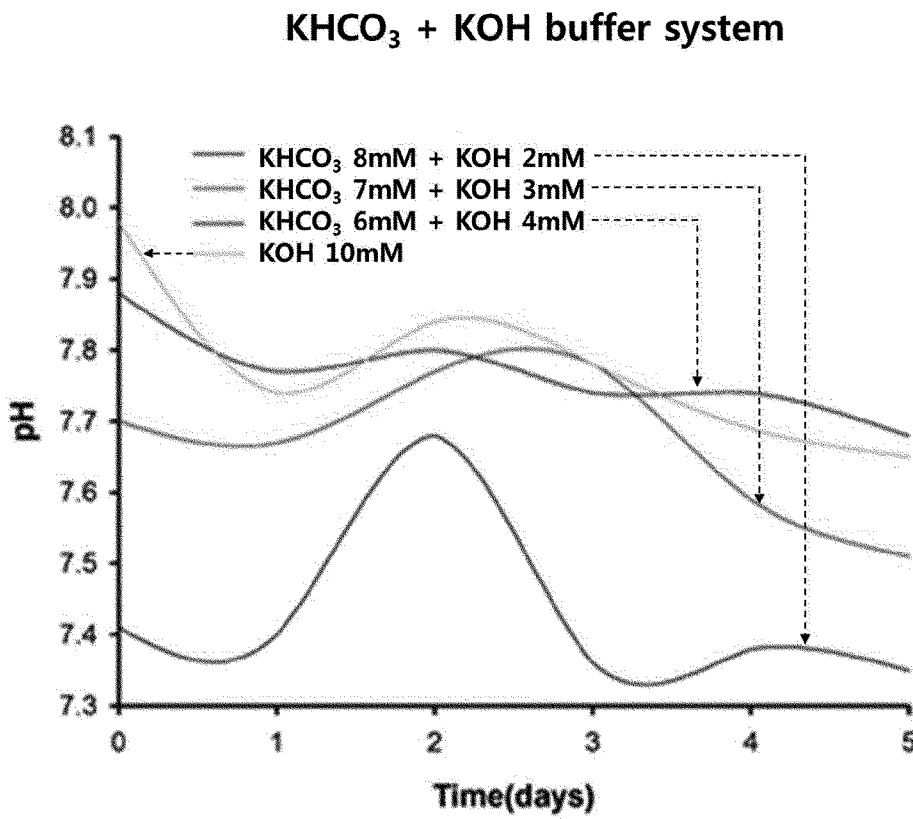
[도8]



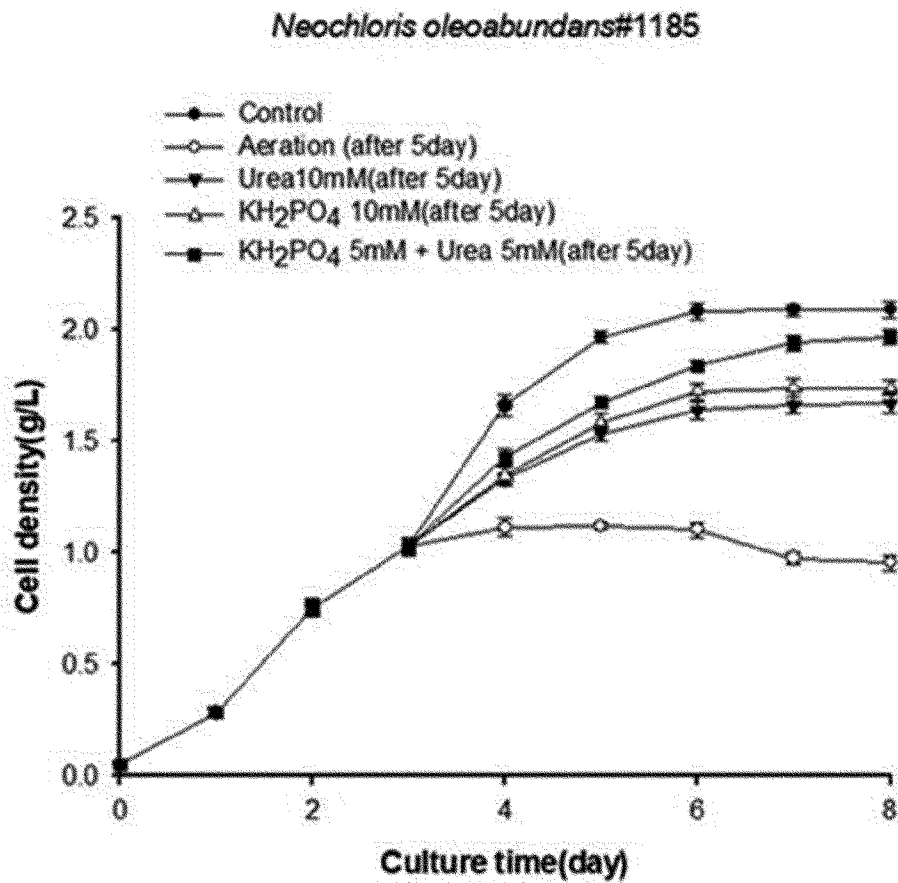
[도9]



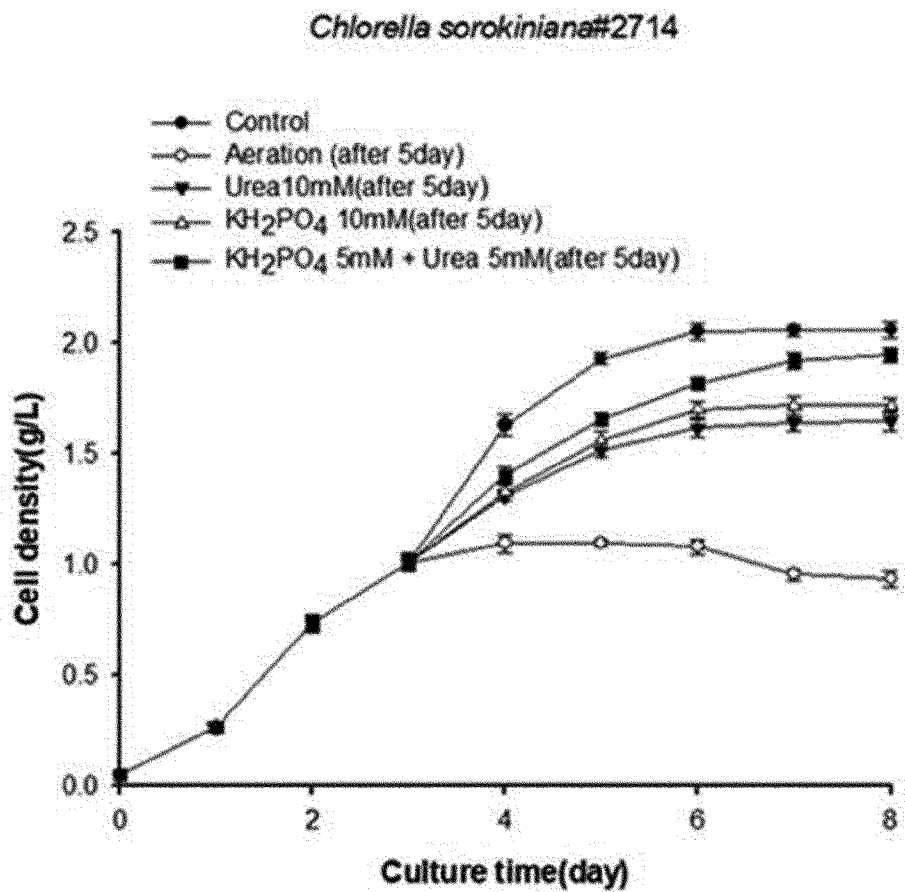
[도10]



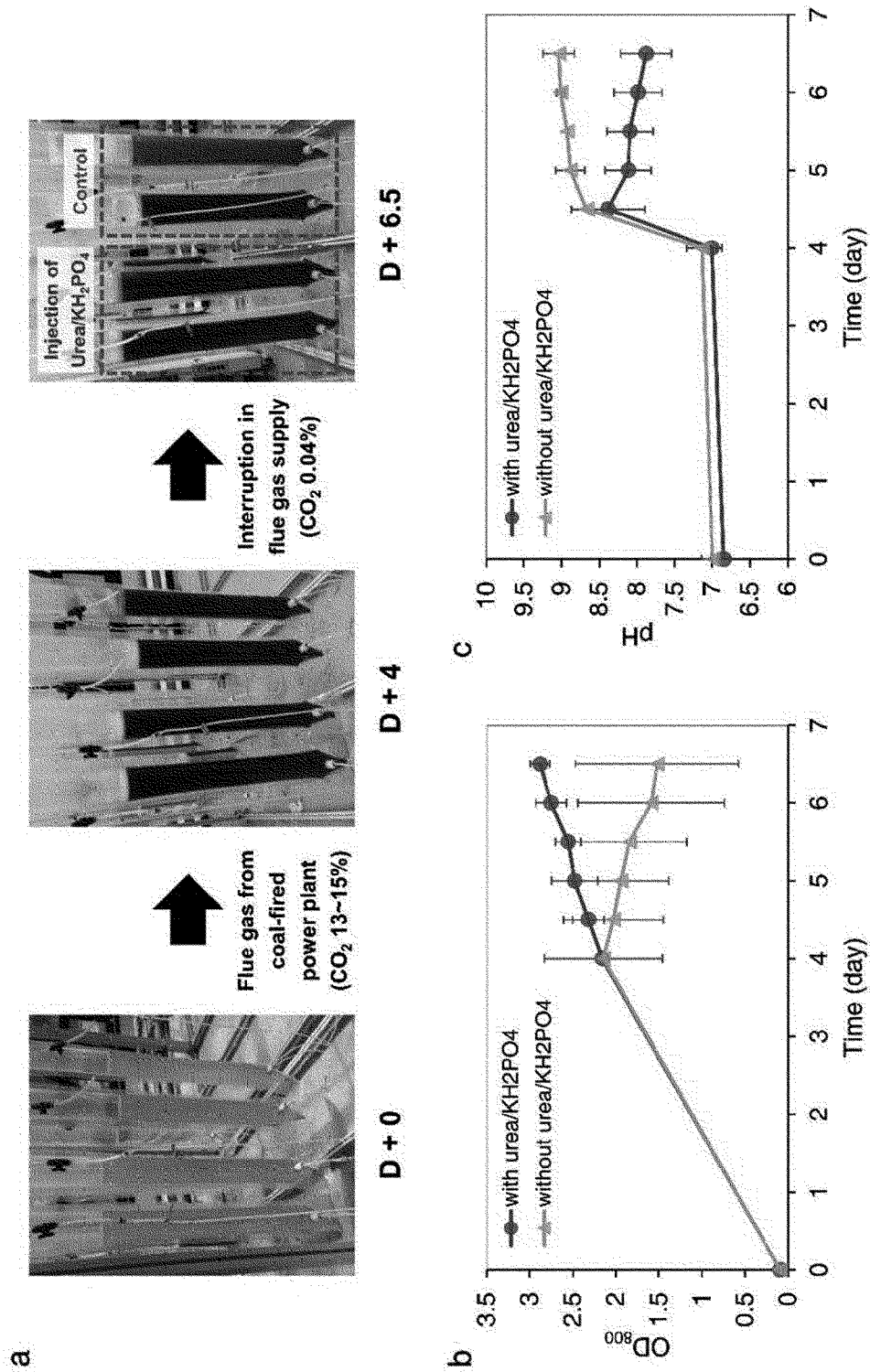
[도11]



[도12]



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/010390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/12(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/12(2006.01); C10L 1/02(2006.01); C12N 1/38(2006.01); C12P 1/00(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 미세조류(microalgae), 수산화칼륨(KOH), 이산화탄소(CO ₂), 중탄산이온(HCO ₃ ⁻), 중탄산칼륨(탄산수소칼륨, KHCO ₃), 배양(culture), 제일인산칼륨(KH ₂ PO ₄), 요소(urea)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2018-0110781 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 11 October 2018 (2018-10-11) See abstract; claims 1-9; paragraphs [0006] and [0018]; and figure 1.	1-8
Y	US 2017-0313972 A1 (THE UNIVERSITY OF TOLEDO) 02 November 2017 (2017-11-02) See abstract; claims 1-10 and 18-21; and paragraphs [0004], [0050], [0055] and [0063].	1-8
Y	YU, B. S. et al. Improvement of Photoautotrophic Algal Biomass Production after Interrupted CO ₂ Supply by Urea and KH ₂ PO ₄ Injection. Energies. 02 February 2021, vol. 14, thesis no. 778, pp. 1-14. See abstract; conclusions; pages 3-4; and figures 1-2.	5-7
Y	KR 10-2017-0021100 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 27 February 2017 (2017-02-27) See abstract; claims 1-7; and paragraphs [0007] and [0024].	1-8
A	KR 10-1765833 B1 (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 08 August 2017 (2017-08-08)	1-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 November 2023		Date of mailing of the international search report 06 November 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/010390

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0110781	A	11 October 2018	KR	10-2009554	B1	09 August 2019
				WO	2018-182100	A1	04 October 2018
US	2017-0313972	A1	02 November 2017	US	10457909	B2	29 October 2019
				US	11015167	B2	25 May 2021
				US	2020-0017820	A1	16 January 2020
KR	10-2017-0021100	A	27 February 2017	KR	10-1731554	B1	28 April 2017
KR	10-1765833	B1	08 August 2017	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/12(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/12(2006.01); C10L 1/02(2006.01); C12N 1/38(2006.01); C12P 1/00(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세조류(microalgae), 수산화칼륨(KOH), 이산화탄소(CO2), 중탄산이온(HCO3-), 중탄산칼륨(탄산수소칼륨, KHCO3), 배양(culture), 제일인산칼륨(KH2PO4), 요소(urea)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2018-0110781 A (고려대학교 산학협력단) 2018.10.11 요약; 청구항 1-9; 단락 [0006], [0018]; 도면 1	1-8
Y	US 2017-0313972 A1 (THE UNIVERSITY OF TOLEDO) 2017.11.02 요약; 청구항 1-10, 18-21; 단락 [0004], [0050], [0055], [0063]	1-8
Y	YU, B. S. 등, 'Improvement of Photoautotrophic Algal Biomass Production after Interrupted CO2 Supply by Urea and KH2PO4 Injection', Energies, 2021.02.02, 14권, 논문번호 778, 페이지 1-14 초록; 결론; 페이지 3-4; 도면 1-2	5-7
Y	KR 10-2017-0021100 A (고려대학교 산학협력단) 2017.02.27 요약; 청구항 1-7; 단락 [0007], [0024]	1-8
A	KR 10-1765833 B1 (인하대학교 산학협력단) 2017.08.08	1-8
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년11월03일(03.11.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년11월06일(06.11.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2023/010390

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0110781 A	2018/10/11	KR 10-2009554 B1	2019/08/09
		WO 2018-182100 A1	2018/10/04
US 2017-0313972 A1	2017/11/02	US 10457909 B2	2019/10/29
		US 11015167 B2	2021/05/25
		US 2020-0017820 A1	2020/01/16
KR 10-2017-0021100 A	2017/02/27	KR 10-1731554 B1	2017/04/28
KR 10-1765833 B1	2017/08/08	없음	