



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0094069
(43) 공개일자 2007년09월20일

(51) Int. Cl.

C12M 1/36 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0024244

(22) 출원일자 2006년03월16일

심사청구일자 2006년03월16일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

이철균

서울 서초구 반포본동 주공아파트 91동 401호

김지훈

인천 서구 가좌3동 13통 3반 신한연립 바동 1호

(74) 대리인

이원희

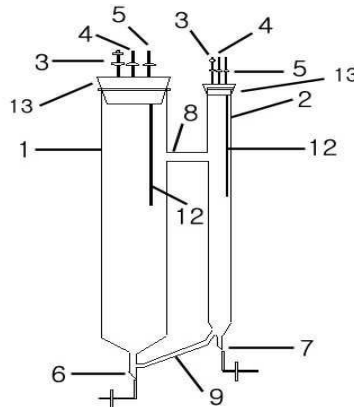
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 세포 순환 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의배양 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 순환 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 배양 세포와 배양액을 순환시키며 상대적으로 작은 부피의 배양액에 빛을 공급하면서 세포의 성장이나 유용물질의 생산량은 같게 하는 세포 순환 광생물반응기 및 상기 반응기를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법을 제공한다. 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 외부에서 일정한 빛 에너지를 공급하는 수직 원통형 광생물반응기와는 달리 반응기를 크기가 다른 제 1 반응기와 제 2 반응기로 분리시켜 제작하였고, 광합성 미생물이 배양액과 함께 제 1 반응기와 제 2 반응기를 순환하도록 배양하면서, 제 1 반응기보다 폭과 크기가 작은 제 2 반응기에 강한 빛 에너지를 공급하였다. 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 고농도 배양시 일정 깊이 이상에는 빛이 도달하지 못하고, 세포 간의 간섭 효과로 인해 빛 에너지가 비효율적으로 이용되는 문제를 해소함으로써 기존의 광생물반응기보다 적은 양의 빛 에너지를 이용하여 광합성 미생물 및 광합성 미생물이 생산하는 유용생산물을 생산하는데 유용하다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

분리된 제 1 반응기(1) 및 제 2 반응기(2)를 구비한 광생물반응기에 있어서 내부에 구비된 순환장치에 의하여 미생물의 순환이 가능하고, 양 반응기 중 어느 하나 이상에 장착된 광원에 의하여 전체 미생물의 일부에만 빛을 조사할 수 있거나 양 반응기에 서로 다른 광도로 빛을 조사될 수 있는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

청구항 2

제 1항에 있어서, 순환장치는 공기부양식(air-lift type)인 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

청구항 3

제 1항에 있어서, 광원은 태양광, 형광램프, 광섬유, 네온관, 발광다이오드(LED) 소자 등으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

청구항 4

제 1항에 있어서, 광원은 광원의 종류, 반응기의 형태 및 크기, 운전되는 세포의 농도와 생산되는 유용 물질의 특성에 따라 내부 또는 외부에 부착되는 것을 특징으로 하는 광생물반응기.

청구항 5

제 1항에 있어서,

배양하고자 하는 광합성 미생물을 수용할 수 있는, 크기가 다른 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2);

상기 제 1 반응기(1)와 2 반응기(2)를 일체형으로 연결시켜 주는 상단에 구비된 제 1 연결통로(8)과 하단에 구비된 제 2 연결통로(9);

가스를 주입하여 세포 및 배양액의 이동을 위한 상기 제 1 반응기(1)의 하단에 구비된 제 1 가스 주입구(6);

배양액 주입구(3), 가스 배출구(4), 샘플링 출입구(5)가 구비된 제 1 반응기(1) 상부의 입구(13); 및

상기 제 2 반응기(2)의 배양 세포에 빛 에너지를 공급하기 위한 광원(10)을 포함하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 6

제 5항에 있어서, 제 2 반응기(2)는 제 1 반응기(1)보다 높이 및 지름이 작은 것을 특징으로 하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 7

제 5항에 있어서, 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)의 형태는 직육면체 평판형(flat plate), 원통형(cylinder), 튜브형(tubular) 반응기로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 8

제 5항에 있어서, 제 1 반응기(1)의 입구(13)에 내부 광원을 설치하기 위한 유리 튜브(11)가 구비되는 것을 특징으로 하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 9

제 5항에 있어서, 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)의 하부 외부면의 소정 위치로부터 하단까지 원뿔형 상으로 이루어진 것을 특징으로 하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 10

제 5항에 있어서, 제 1 반응기(1)보다 제 2 반응기(2)에 광원을 통해 빛 에너지를 많이 공급해 주는 것을 특징

으로 하는 세포 순환 광생물반응기.

청구항 11

- 1) 외부에서 일정한 빛 에너지를 공급하는 광생물반응기를 이용하여 광합성 미생물을 배양하는 단계;
- 2) 단계 1)에서 배양한 광합성 미생물을 청구항 1의 세포 순환 광생물반응기에 주입하는 단계;
- 3) 세포 순환 광생물반응기의 일부에만 빛 에너지를 공급하거나 양 광생물반응기에서 서로 다른 광도의 빛 에너지를 공급하고, 배양액을 순환시켜 광합성 미생물의 생체 중량 및 유용생산물을 증가시키는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 배양액을 수확하여 광합성 미생물의 유용생산물을 획득하는 단계를 포함하는 광합성 미생물 배양 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 단계 3)의 일부는 제 1 반응기(1) 또는 제 2 반응기(2)인 것을 특징으로 하는 광합성 미생물 배양 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 단계 3)의 배양액의 순환은 가스를 공급하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 광합성 미생물 배양 방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 광합성 미생물은 해마토코쿠스, 듀나리엘라, 클로로코쿰, 클로렐라, 아세타불라리아, 미크로시스티스, 토스톡 및 오실라토리아를 포함하는 것을 특징으로 하는 광생물 미생물 배양 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <26> 본 발명은 세포 순환 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법에 관한 것이다.
- <27> 현재 미세조류의 다양한 능력에 기인하여, 폐수의 처리, 이산화탄소의 고정화, 연료물질의 생산, 의약품, 화장품 등의 그 사용 범위가 확대되었으며, 요구도가 증가되고 있다. 하지만, 생체 중량 및 유용생산물을 대량으로 생산하기 위해서는 경제적, 기술적으로 효율적인 배양기의 개발이 절실히 필요하다.
- <28> 미세조류의 생체 중량 및 유용생산물 증가에 영향을 미치는 요소들은 배지의 조성, 온도, pH, 광도, 광량 등의 많은 요인들이 존재하지만, 그중에서도 광합성 미세조류의 특성상 빛이 차지하는 비중은 가장 크게 존재한다. 빛의 공급의 효율성이야말로 광생물반응기를 제작하는데 중요하게 고려되어야 할 사항이다.
- <29> 광생물반응기의 형태에 따라 다르지만, 일반적으로 광생물반응기의 규모가 커지면 커질수록 빛의 공급의 효율성은 떨어질 수밖에 없다(도 1 참조). 낮은 세포 농도에 빛을 공급할 때는 큰 문제로 작용하지 않지만, 높은 세포 농도에서는 빛이 투과되는 한계가 있으며, 세포 간의 상호 간섭효과(mutual shading)로 인해 광생물반응기 표면에는 강한 광도가 공급되어도 광생물반응기 중심에는 빛이 거의 도달되지 못해 불균형적인 빛의 분포도를 갖게 된다(도 2 참조). 특히 빛 에너지에 영향을 크게 받아 생산되는 유용생산물을 미세조류로부터 생산할 경우에는 많은 빛 에너지를 공급함으로써 더욱 상기에 언급한 문제가 크게 발생할 수 있다.
- <30> 최근에 광합성 미생물에 유래된 여러 고부가 산물들이 개발되면서 이를 고농도 배양하기 위한 다양한 배양 장치가 개발되고 있다. 적도 지방과 같이 기후가 온난하고 토지 비용이 저렴한 지역에서는 연못(pond) 형태나 외륜(paddle wheel)으로 배지를 순환시키는 수로(raceway) 형태의 옥외 배양법을 주로 사용하였으나, 상기 방법의 경우에는 설치비와 운영비가 적게 드는 반면 고농도 배양이 힘들고 다른 미생물에 의해 오염 가능성이 높아 목

적 산물의 분리 회수 비용이 증가한다는 단점이 있다.

- <31> 이를 극복하기 위하여 고농도 대량 배양에 적합한 여러 형태의 광생물반응기가 구미 선진국과 일본, 이스라엘, 호주 등을 중심으로 개발되고 있다. 널리 사용되고 있는 광생물반응기로는 외부 광원으로 태양광을 이용하는 관형 광생물반응기(tubular photobioreactor)와 판넬형 광생물반응기(thin-panel photobioreactor) 등이 알려져 있다(대한민국 등록특허 제 220310호). 상기 반응기의 구조는 태양광에 노출되는 조사 면적을 최대화하고 배양액 내부로의 빛 투과 거리를 짧게 하기 위하여, 좁고 긴 직사각형 또는 원통형 파이프를 조밀하게 밀착시켜 루프를 만들고, 루프 중간의 한 부분을 세워 공기 부양을 통해 배양액을 순환시키는 구조를 가지는 것일 특징이다.
- <32> 한편, 국내의 경우나 일본 등과 같이 사계절의 변화가 뚜렷하고, 토지 비용이 고가인 지역에서는 내부 조명으로 광섬유, 형광램프, 발광다이오드 소자 등을 다수 설치함으로써 단위부피당 조사 표면적을 최대화할 수 있는 구조를 갖는 여러 형태의 내부조사형 광생물반응기(internally radiating photobioreactor)가 개발되어 있다(대한민국 등록특허 제 283026호).
- <33> 그러나 이와 같은 광생물반응기를 이용한 광합성 미생물의 옥외배양 방법에 비해 소용량 고농도 배양에는 유리하지만 대용량으로 배양하는 경우에는 반응기 구조의 복잡성으로 인한 고가의 설치비와 운전비 때문에 대규모화가 곤란하다는 단점이 있어 주로 고부가 가치 물질의 생산에 제한적으로 활용되고 있다.
- <34> 현재 국내에서 개발 중인 광생물반응기의 형태는 원통형 내부도관(innerdraft tube)를 발광체로 이용한 공기부양식 광생물반응기(air-lift photobioreactor)(대한민국 등록특허 제 283026호)와 교반기를 발광체로 이용한 발광터빈형 광생물반응기(stirred-link photobioreactor)(대한민국 특허 공개공보 제 2003-18196호)가 알려져 있다. 반면에 가장 간단한 구조로 되어 있으면서 대용량의 미생물 배양에 적합하고, 광합성 미생물을 배양하기 위한 빛 에너지의 효과적인 공급, 배양액의 온도 조절 및 혼합에 관한 기술 개발은 미진한 실정이다.
- <35> 본 발명자들은 수직 원통형 광생물반응기를 적절한 비율로 나누었고, 두 부분을 서로 연결하여 세포와 배양액을 순환하게 하였다. 그리고 제 1 반응기보다 폭과 크기가 작은 제 2 반응기에 많은 빛 에너지를 공급함으로써 상기 언급했던 빛의 불균형적인 분포와 세포 간의 상호 간섭에 의한 비효율적인 문제를 해결하였다. 이를 통해, 전체적인 빛 에너지는 일반적으로 배양하는 경우보다 적게 소비하거나, 같은 양의 빛 에너지로 더욱 많은 유용 생산물을 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <36> 본 발명의 목적은 적은 양의 빛 에너지를 공급하여 효율적으로 광합성 미생물 및 상기 미생물이 생산하는 유용 생산물을 생산할 수 있는 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <37> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 적은 양의 빛 에너지를 공급하여 효율적으로 광합성 미생물 및 상기 미생물이 생산하는 유용생산물을 배양할 수 있는 세포 순환 광생물반응기를 제공한다.
- <38> 또한, 본 발명은 상기 광생물반응기를 이용하는 광합성 미생물 배양 방법을 제공한다.
- <39> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <40> 본 발명은 광생물반응기를 제공한다.
- <41> 본 발명의 광생물반응기는 분리된 제 1 반응기(1) 및 제 2 반응기(2)를 구비한 광생물반응기이며, 상기 광생물 반응기는 내부에 구비된 순환 장치에 의하여 미생물의 순환이 가능하고, 양 반응기 중 어느 하나 이상에 장착된 광원에 의하여 전체 미생물의 일부에만 빛을 조사하거나 양 반응기에 서로 다른 광도로 빛을 조사할 수 있는 것을 특징으로 한다. 상기 광생물반응기의 순환장치는 공기부양식(air-lift type)인 것을 특징으로 하나 다른 기계적 또는 물리적인 방법을 사용할 수도 있다. 광원은 태양광, 형광램프, 광섬유, 네온관, 발광다이오드(LED) 소자 등으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하며, 광원의 설치는 광원의 종류, 반응기의 형태 및 크기, 운전되는 세포의 농도와 생산되는 유용 물질의 특성 등에 따라 내부 또는 외부에 부착하는 것이 바람직하다.
- <42> 이에 더하여, 본 발명은 세포 순환 광생물반응기를 제공한다.
- <43> 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 배양하고자 하는 광합성 미생물을 수용할 수 있는, 크기가 다른 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2); 상기 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)를 일체형으로 연결시켜 주는 상단에 구비된 제

1 연결통로(8)와 하단에 구비된 제 2 연결통로(9); 가스를 주입하여 세포 및 배양액의 이동을 위한 상기 제 1 반응기(1)의 하단에 구비된 제 1 가스 주입구(6); 배양기 주입구(3), 가스 배출구(4), 샘플링 출입구(5)가 구비된 제 1 반응기 상부의 입구(13); 및 상기 제 2 반응기(2)의 배양 세포에 빛 에너지를 공급하기 위한 광원(10)으로 구성되어 있다(도 4 참조).

<44> 상기 세포 순환 광생물반응기의 형태는 여러 가지 형태로 제작할 수 있으며, 직육면체 평면판(flat plate), 원통형(cylinder), 튜브형(tubular) 반응기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 원통형이나 이에 한정되지 않는다. 상기 세포 순환 광생물반응기는 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)로 나누어져 있으며, 상기 세포 순환 광생물반응기의 제 2 반응기(2)는 제 1 반응기(1)보다 높이 및 지름이 작은 것이 바람직하다. 또한 본 발명의 광생물반응기의 반응기는 하부 외부면의 소정의 위치로부터 하단까지 원뿔형상으로 이루어져 있다(도 3 참조).

<45> 본 발명의 세포 순환 광생물반응기의 제 1 반응기(1)의 높이는 500 ~ 600 mm이고, 지름은 80 ~ 90 mm인 것이 바람직하며, 제 2 반응기의 높이는 400 ~ 500 mm이고, 지름은 40 ~ 50 mm인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니며, 반응기의 폭과 지름은 원하는 유용생산물의 획득량에 따라 더욱 크게 제작할 수 있다(도 4 참조).

<46> 상기 세포 순환 광생물반응기의 제 1 반응기(1)는 입구(13)를 구비할 수 있으며, 제 1 반응기(1) 뿐 아니라 제 2 반응기(2)도 입구(13)를 구비할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 순환 광생물반응기의 제 1 반응기(1) 또는 제 2 반응기(2)의 입구(13)에는 배양액 주입구(3), 가스 방출구(4), 샘플링 주입구(5)를 통하여 세포 및 배양액을 주입하고, 가스를 방출할 수 있도록 제작하였다. 또한, 제 1 반응기(1)의 입구(13)에는 내부 광원을 설치하기 위한 유리 튜브(11)를 설치할 수 있다(도 5 참조).

<47> 상기 세포 순환 광생물반응기의 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)는 상단 및 하단에 구비된 제 1 및 제 2 연결통로(8, 9)를 통해 일체형이 되도록 설계되었으며, 상기 연결통로는 세포와 배양액이 반응기 안에서 순환할 수 있는 통로를 제공한다. 상단에 구비된 제 1 연결통로(8)의 길이는 10 ~ 30 mm, 지름은 10 ~ 20 mm인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 하단에 구비된 제 2 연결통로(9)의 길이는 30 ~ 80 mm, 지름은 5 ~ 15 mm인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 하단에 구비된 제 2 연결통로(9)는 제 2 반응기(2)에서 제 1 반응기(1) 쪽으로 기울어져 있는 것이 바람직하다.

<48> 상기 광생물반응기에는 세포가 이동하게 하기 위하여 제 1 반응기(1)의 하단에 구비된 제 1 가스 주입구(6) 측면에 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)를 연결하는 제 2 연결통로(9)를 연결하고 제 1 반응기(1)의 하단에 구비된 제 2 가스 주입구(6)를 통해 가스를 공급하여 주면 압력차에 의하여 제 2 배양기(2)의 배양액이 자동적으로 제 1 반응기(1)로 빨려 올라간다. 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)를 연결하는 하단에 구비된 제 2 연결통로(9)는 제 2 반응기(2)에서 제 1 반응기(1) 쪽으로 기울어져 있어 가스 주입만으로도 자연스럽게 제 1 반응기(1)로 배양액이 이동할 수 있다. 또한, 반응기의 상단에 구비된 제 1 연결통로(8)는 하단에 구비된 제 2 연결통로(9)처럼 세포가 이동하게 하는 힘(driving force)이 없기 때문에 하단에 구비된 제 2 연결통로(9)와는 다르게 연결 부위의 크기를 상단에 구비된 제 1 연결통로(8)를 보다 넓게 제작하여(약 직경 10 mm) 세포와 배양액이 자발적으로 원활하게 이동하도록 제작하였다. 전술한 바와 같이 양 반응기간의 이동은 다른 기계적인 방법이나 물리적인 방법을 사용할 수 있다.

<49> 또한, 상기 세포 순환 광생물배양기의 제 2 가스 주입구(7)를 추가적으로 설치할 수 있다. 배양시 세포의 침전을 방지하기 위하여 제 2 반응기(2)의 하단에 구비된 제 2 가스 주입구(7)에 가스를 주입하여 광합성 미생물을 배양할 수 있도록 하였다(도 3 참조).

<50> 본 발명의 광원은 제 2 반응기(2)의 내부 또는 외부에 부착하는 것이 가능하다. 광원을 내부에 설치시 빛의 효율성은 높아지나 열의 발생, 공간적인 문제 등이 있을 수 있으므로, 반응기의 형태 및 크기, 광원의 종류, 운전하고자 하는 세포의 종류와 농도, 생산하고자 하는 물질의 농도 및 생산량 등을 고려하여 외부 또는 내부로 설치할 수 있다. 본 발명의 광원은 이에 특별히 제한되지 않으나, 태양광, 형광램프, 광섬유, 네온관, 발광다이오드(LED) 소자 등으로 구성된 군으로부터 선택하여 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 광생물반응기는 제 1 반응기(1)의 내부에 추가적으로 광원을 설치하는 것이 바람직하다. 제 1 반응기(1)에 설치된 광원은 청색 발광다이오드(LED) 소자 또는 적색 발광다이오드(LED) 소자를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 제 2 반응기(2)에 설치된 광원(10)은 형광램프를 외부 광원으로 설치하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다(도 3 참조). 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 제 1 반응기(1)보다 높이 및 지름이 작은 제 2 반응기(2)에 많은 빛 에너지를 공급한다.

<51> 일반적으로 광생물반응기를 제작할 때 가장 크게 고려하는 것은 빛 에너지를 어떻게 공급하는가이며, 빛 에너지의 공급 및 분포는 세포를 배양하거나 원하는 유용생산물을 얻기 위해 가장 중요한 요소이다. 그러나 광합성 기작과 기구는 아주 민감하게 빛을 흡수하고 산란하는 기능을 하기 때문에, 외부에서 빛을 높은 광도로 공급하여 준다고 해도 반응기 내부에서 세포가 흡수하는 빛 에너지는 상대적으로 반응기 표면의 광도에 비해 상당히 낮은 수준이다. 실제 세포 배양시 빛이 투과되는 면을 고려하여 보았을 때 세포가 5×10^5 세포/ml 이상의 농도가 되면 빛은 배양액의 2 cm를 투과하지 못한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 발명의 광생물반응기는 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)로 분리 제작하였고, 특히 제 2 반응기(2)는 빛의 투과도를 고려하여 제 1 반응기(1)보다 작게 제작하되 광원을 설치하여 다량의 빛 에너지를 공급함으로써 제 2 반응기(2)에 들어온 세포들은 균등하게 빛 에너지를 공급받을 수 있도록 하였다. 또한, 미생물 배양액을 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)를 순환하도록 하므로써 반응기 내의 모든 세포들이 균등하게 빛을 공급받도록 하고, 세포 간의 상호 간섭 효과를 최소화하였다.

<52> 본 발명자들은 상기 세포 순환 광생물반응기를 제작하여 녹조류의 하나인 헤마토코쿠스를 배양하였다. 대조구로는 종래의 수직 원통형 광생물반응기를 사용하였다. 본 발명자들은 대조구에는 39 $\mu\text{E/s}$ 빛 에너지를 공급하였고, 세포 순환 광생물반응기에는 7(0:7), 15(0:15), 48(33:15), 70(0:70) $\mu\text{E/s}$ (제 1 반응기(1)에 공급한 빛 에너지:제 2 반응기(2)에 공급한 빛 에너지) 빛 에너지를 공급하고 42일간 헤마토코쿠스를 배양하여 세포 농도와 헤마토코쿠스가 생산하는 유용생산물인 아스타잔틴의 농도를 측정하였다. 아스타잔틴은 높은 빛에 의해 세포로부터 유도되며, 그 기작은 세포가 높은 빛에 노출되는 것을 보호하기 위해 생성된다고 알려져 있다. 그 결과, 대조구의 경우 4.9×10^5 세포/ml를 얻었고, 세포 순환 광생물반응기(빛 에너지: 7, 15, 48, 70 $\mu\text{E/s}$)의 경우 4.3×10^5 세포/ml, **3.9×10^5 세포/ml**, 4.5×10^5 세포/ml, 4.4×10^5 세포/ml를 얻었다(표 1 및 도 6 참조). 또한 유용생산물인 아스타잔틴의 농도의 경우 대조구에서는 185 mg/l 이었고, 세포 순환 광생물반응기에서는 각각 117 mg/l, 165 mg/l, **251 mg/l**, 224 mg/l 였다(표 1 및 도 7 참조). 세포 순환 광생물반응기의 세포 농도 및 아스타잔틴의 농도를 대조구와 비교하여 보면, 그 수치는 유사하나 공급한 빛 에너지를 대비하여 보면 본 발명의 세포 순환 광생물반응기가 대조구보다 적은 빛 에너지양을 소모하면서 유용생산물의 생산을 효율적으로 배양할 수 있다. 본 발명자들은 상기 세포 순환 광생물반응기의 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)에 빛 에너지를 적절히 분배하여 헤마토코쿠스를 배양하였다. 세포 순환 광생물반응기에는 제 1 반응기(1)에 청색 LED 또는 적색 LED를 내부조명으로 사용하여 3.4 $\mu\text{E/s}$ 빛 에너지를 공급하였고, 제 2 반응기(2)에는 빛 에너지 공급장치(10)를 이용하여 15 $\mu\text{E/s}$ 빛 에너지를 공급하였다. 대조구 1로는 수직 원통형 광생물반응기에 33 $\mu\text{E/s}$ 빛 에너지를 공급하였고, 대조구 2로는 수직 원통형 광생물반응기에 세포 순환 광생물반응기와 동일한 18.4 $\mu\text{E/s}$ 빛 에너지를 공급하였다. 그 결과, 대조구 1의 세포 농도는 4.98×10^5 세포/ml, 대조구 2의 세포 농도는 4.33×10^5 세포/ml이었고, 청색 LED를 사용한 세포 순환 광생물세포기의 세포 농도는 4.28×10^5 세포/ml, 적색 LED를 사용한 세포 순환 광생물세포기의 세포 농도는 4.63×10^5 세포/ml로, 대조구와 세포 순환 광생물세포기의 세포 농도에서는 커다란 변화가 없었다(도 8 참조). 아스타잔틴의 농도를 측정할 결과 대조구 1은 188 mg/l 을 생산하였고, 세포 순환 광생물세포기와 동일한 빛 에너지를 공급한 대조구 2의 경우 124 mg/l 을 생산하였다. 세포 순환 광생물세포기는 제 1 반응기(1)에 내부조명으로 청색 LED를 사용했을 경우 180 mg/l 을 생산하였으며, 적색 LED를 사용하였을 경우 175 mg/l 의 아스타잔틴을 생산하였다(도 9 참조). 동량의 빛 에너지를 사용했을 경우 수직 원통형 광생물세포기보다 세포 순환 광생물세포기가 더 높은 아스타잔틴 생산 농도를 보였으며, 더 높은 빛 에너지를 공급한 수직 원통형 광세포 반응기의 경우와 비슷한 아스타잔틴 생산 농도를 보임으로 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 광합성 미생물로부터 유용생산물과 생체 중량을 생산함에 있어서 동일한 빛 에너지를 공급하여도 높은 생산성을 나타냄을 확인하였다.

<53> 본 발명은 상기 세포 순환 광생물반응기를 이용하는 광합성 미생물 배양 방법을 제공한다.

<54> 본 발명은 하기와 같은 광합성 미생물 배양 방법을 제공한다: 1) 외부에서 일정한 빛 에너지를 공급하는 광생물반응기를 이용하여 광합성 미생물을 배양하는 단계; 2) 단계 1)에서 배양한 광합성 미생물을 본 발명의 세포 순환 광생물반응기에 주입하는 단계; 3) 세포 순환 광생물반응기의 일부에만 빛 에너지를 공급하거나 양 광생물반응기에 서로 다른 광도의 빛 에너지를 공급하고, 배양액을 순환시켜 광합성 미생물의 생체 중량 및 유용생산물을 증가시키는 단계; 및 4) 단계 3)의 배양액을 수확하여 광합성 미생물의 유용생산물을 획득하는 단계.

<55> 단계 1)은 광합성 미생물의 세포 농도를 키우는 것을 목적으로 하고 있으며, 단계 1)에서 배양한 광합성 미생물을 단계 2)에서 본 발명의 세포 순환 광생물반응기에 배양하면서 광원을 통한 강한 빛 에너지를 공급하여 유용

생산물을 생산할 수 있다. 본 발명에서는 단계 1)에서 헤마토코쿠스를 배양하여 세포 농도를 높이고, 단계 2)를 통하여 유용생산물인 아스타잔틴이 과도한 빛으로부터 유도되도록 하였다.

<56> 상기 방법에 있어서 광합성 미생물의 종류와 배양 목적에 따라 단계 1)을 생략할 수 있다. 당업자의 배양 목적이 광합성 미생물의 고농도 배양이라면 단계 1)을 거치지 않고 단계 2)의 세포 순환 광생물반응기에서 직접 배양할 수 있다. 그러나 당업자의 배양 목적이 빛 에너지에 의해 유도되는 광합성 미생물이 생산하는 유용생산물이라면 단계 1)의 과정을 거치는 것이 바람직하다.

<57> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 광합성 미생물은 헤마토코쿠스, 듀나리엘라, 클로로코쿰, 클로렐라, 아세타볼라리아, 마이크로시스티스, 토스톡 및 오실레토리아로 이루어진 군에서 선택된 것을 배양할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

<58> 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 광합성 미생물의 유용생산물을 획득하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업자에게 공지된 방법을 사용하여도 무방하다.

<59> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

<60> 단, 하기 실시예에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<61> <실시예 1> 세포 순환 광생물반응기와 수직 원통형 광생물반응기에서의 유용 생산물의 농도 비교

<62> 본 발명자들은 세포 순환 광생물반응기(2.5 ℓ) 및 수직 원통형 광생물반응기(2.5 ℓ)를 이용하여 헤마토코쿠스 (*Haematococcus pluvialis*)로부터 아스타잔틴(astaxanthin)의 생산량을 비교하였다. 이를 위하여 수직 원통형 광생물반응기에는 빛 에너지를 39 $\mu\text{E/s}$ 를 공급하였고, 세포 순환 광생물반응기에는 7(0:7), 15(0:15), 48(33:15), 70(0:70) $\mu\text{E/s}$ (제 1 반응기(1)에 공급한 빛 에너지: 제 2 반응기(2)에 공급한 빛 에너지)로 다양한 빛 에너지를 공급하여 헤마토코쿠스를 배양하였다. 배양조건으로는 배지는 MBBM, 배양온도는 25℃를 유지하였고, 쿨터카운터를 이용하여 정밀하게 세포수를 측정하였다.

<63> 그 결과, 대조구의 광생물반응기에서 배양한 최대 농도는 4.9×10^5 세포/ml을 얻었고, 세포 순환 광생물반응기(광량 7, 15, 48, 70 $\mu\text{E/s}$)에서는 각각 4.3×10^5 세포/ml, 3.9×10^5 세포/ml, 4.5×10^5 세포/ml, 4.4×10^5 세포/ml,를 얻었다(도 6). 또한, 유용생산물인 아스타잔틴의 농도의 경우는 대조구에서는 185 mg/ℓ 였고 세포 순환 광생물반응기에서는 각각 117 mg/ℓ, 165 mg/ℓ, 251 mg/ℓ, 224 mg/ℓ 였다. 낮은 광량에서의 아스타잔틴의 농도는 대조구보다 낮은 수치를 기록하였지만, 공급된 광량과 아스타잔틴의 효율성을 비교하였을 때에 세포 순환 광생물반응기는 효율성이 높게 나타났다(표 2 및 도 7).

【표 1】

	공급한 빛 에너지량 ($\mu\text{E/s}$)		배양 세포의 최대 농도	아스타잔틴의 농도 (mg/ℓ)
	큰 쪽 반응기	작은 쪽 반응기		
수직 원통형 광생물반응기	39		4.9×10^5 세포/ml	185
세포 순환 광생물반응기	0	7	4.3×10^5 세포/ml	117
	0	15	3.9×10^5 세포/ml	165
	33	15	4.5×10^5 세포/ml	251
	0	70	4.4×10^5 세포/ml	224

<65> <실시예 2> 효율적인 빛 분배로 인한 세포 순환 광생물반응기에서의 배양시간과 아스타잔틴의 농도 증대.

<66> <실시예 1>에서는 세포 순환 광생물반응기가 빛 에너지당 아스타잔틴을 생산하는 효율적인 면을 보여주었다.

이후, 적절한 빛 에너지의 분배를 통하여 아스타잔틴의 증대를 위해서 빛 에너지가 상대적으로 많이 공급되는 작은 쪽의 광생물반응기에 15 $\mu\text{E/s}$ 의 빛 에너지를 공급하고 큰 쪽의 광생물반응기에는 빛 에너지의 효율성의 증대를 위해 청색, 적색의 LEDs(light emitting diodes, 3.4 $\mu\text{E/s}$)를 사용하여 내부광원으로 사용하였다. 또한, 대조구 1로서 외부에서 33 $\mu\text{E/s}$ 공급한 것과 대조구 2로서 세포 순환 광생물반응기에 들어가는 총 광량과 같은 18.4 $\mu\text{E/s}$ 를 광생물반응기 외부에서 공급한 것으로 정하고 실험을 수행하였다.

<67> 이 결과, 세포의 전체적인 농도는 4가지 모두 비슷한 경향성을 보였다(도 8). 또한, 유용생산물인 아스타잔틴의 농도는 세포 순환 광생물반응기를 사용한 것이 대조구 1(188 mg/l)과 비교했을 때 빛 에너지는 전체적으로 약 절반밖에 들어가지 않았지만 아스타잔틴의 농도는 대조구 1과 각각 비슷한 농도(청색 LED : 180 mg/l , 적색 LED : 175 mg/l)를 나타냈다(표 2 및 도 9). 또한 같은 광량을 공급한 대조구 2(124 mg/l)와 세포 순환 광생물반응기의 아스타잔틴의 농도를 비교할 경우 청색 LED와 적색 LED로 빛 에너지를 공급했을 경우 각각 168%, 164% 증가를 나타냈다.

<68> 또한, 공급된 광량과 아스타잔틴의 효율성을 비교했을 때, 세포 순환 광생물반응기는 대조구 1에 비해 빛 에너지 효율성이 각각 168%, 164%의 증가하는 것을 알 수 있었고, 대조구 2와 비교했을 경우에는 142%, 142%로 증가됨을 알 수 있었다.

<69> 이를 통해 세포 순환 광생물반응기는 광합성 미생물로부터 유용생산물과 생체중량을 생산함에 있어 같은 빛에너지를 가지고 높은 생산성을 나타냄을 알 수 있었다.

【표 2】

		공급한 빛 에너지량 ($\mu\text{E/s}$)		배양 세포의 최대 농도	아스타잔틴의 농도 (mg/l)
		제 1 반응기(1)	제 2 반응기(2)		
수직 원통형 광생물반응기	대조구 1	33		4.98×10^5 세포/ ml	188
	대조구 2	18.4		4.33×10^5 세포/ ml	124
세포 순환 광생물반응기	청색 LED	3.4	15	4.28×10^5 세포/ ml	180
	적색 LED	3.4	15	4.63×10^5 세포/ ml	175

발명의 효과

<71> 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 외부에서 일정한 빛 에너지를 공급하는 수직 원통형 광생물반응기와는 달리 반응기를 크기가 다른 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)로 분리시켜 제작하였으며, 광합성 미생물이 배양액과 함께 제 1 반응기(1)와 제 2 반응기(2)를 순환하도록 배양하면서, 제 1 반응기(1)보다 폭과 크기가 작은 제 2 반응기(2)에 강한 빛 에너지를 공급하였다. 이에 따라 본 발명의 광생물반응기는 빛의 투과 거리를 짧게 하여 세포 간의 간섭 효과를 최소화하며, 세포 순환을 통하여 모든 세포들이 균등하게 빛 에너지를 공급받으므로 효율적인 유용생산물을 생산할 수 있다. 본 발명의 세포 순환 광생물반응기는 광합성 미생물을 생산할 때 가장 큰 비중을 차지하는 빛 에너지의 공급 방법을 획기적이고 경제적으로 향상시켜 같은 양 또는 적은 양의 빛 에너지를 이용하여 광합성 미생물 및 광합성 미생물이 생산하는 유용생산물을 생산하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 광생물반응기에서 세포 농도에 따른 빛의 분포를 나타낸 모식도이다:
- <2> (A) : 낮은 세포 농도;
- <3> (B) : 높은 세포 농도;
- <4> 왼쪽 화살표 : 공급되는 빛 에너지; 및

- <5> 오른쪽 화살표: 배양액을 통과하는 빛 에너지.

<6> 도 2는 도 1에서 나타낸 빛의 분포 감소 현상을 도식적으로 그린 그래프이다.

<7> 도 3은 세포 순환 광생물반응기의 모식도이다.

<8> 도 4는 세포 순환 광생물반응기의 측면도이다.

<9> 도 5는 세포 순환 광생물반응기의 단면도이다.

<10> 도 6은 수직 원통형 광생물반응기 및 세포 순환 광생물반응기에서 배양한 헤마토코쿠스의 세포 농도를 나타낸 그래프이다:

<11> 괄호 안의 왼쪽 값: 제 1 반응기(1)에 공급된 빛 에너지; 및

<12> 괄호 안의 오른쪽 값 : 제 2 반응기(2)에 공급된 빛 에너지.

<13> 도 7은 수직 원통형 광생물반응기 및 세포 순환 광생물반응기에서 배양한 헤마토코쿠스가 생산하는 아스타잔틴의 농도를 나타낸 그래프이다:

<14> 괄호 안의 왼쪽 값 : 제 1 반응기(1)에 공급된 빛 에너지; 및

<15> 괄호 안의 오른쪽 값 : 제 2 반응기(2)에 공급된 빛 에너지.

<16> 도 8은 청색 및 적색 LED를 통해 빛 에너지를 공급하는 세포 순환 광생물반응기에서 배양한 헤마토코쿠스의 세포 농도를 나타낸 그래프이다.

<17> 도 9는 청색 및 적색 LED를 통해 빛 에너지를 공급하는 세포 순환 광생물반응기에서 배양한 헤마토코쿠스의 세포 농도를 나타낸 그래프이다.

<18> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

<19> 1 : 제 1 반응기 2 : 제 2 반응기

<20> 3 : 배양액 주입구 4 : 가스 방출구

<21> 5 : 샘플링 출입구 6 : 제 1 가스 주입구

<22> 7 : 제 2 가스 주입구 8 : 제 1 연결통로

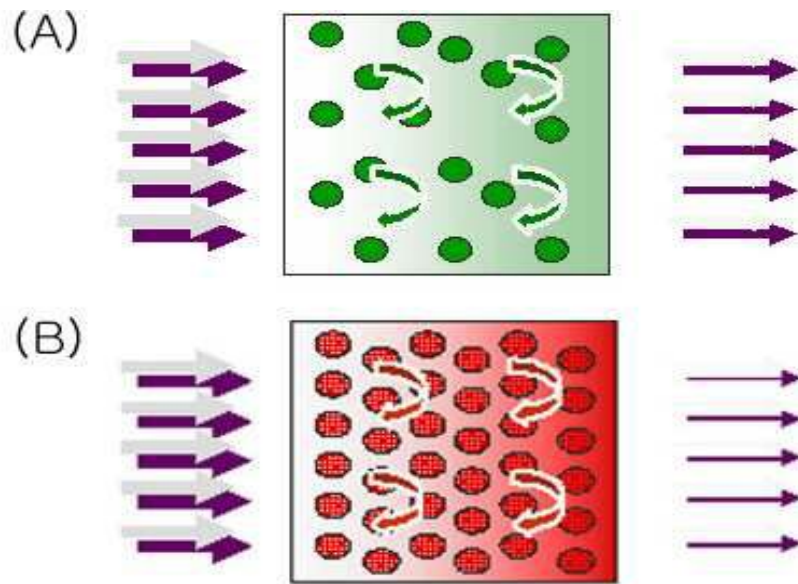
<23> 9 : 제 2 연결통로 10 : 광원

<24> 11 : 유리 튜브 12 : 온도계

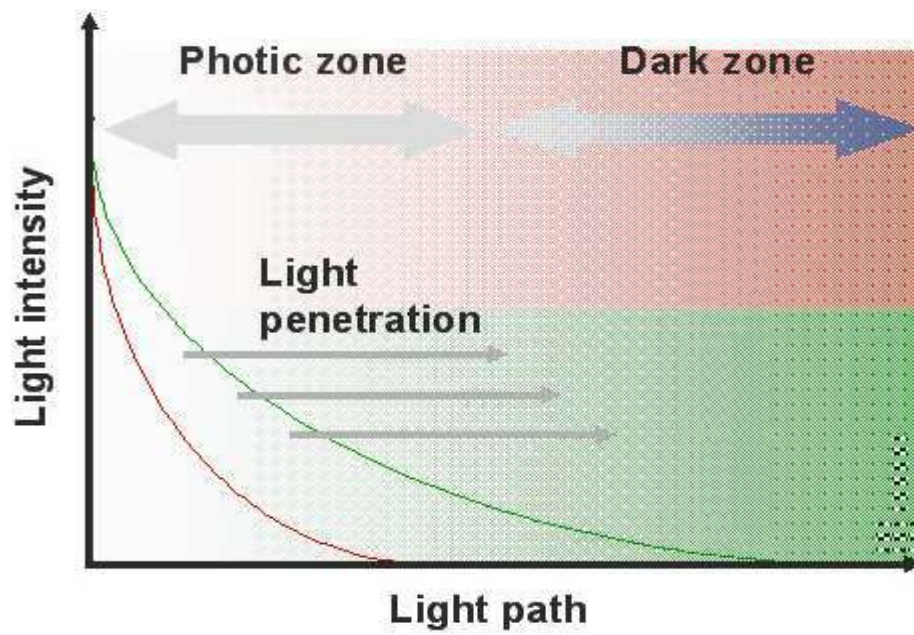
<25> 13 : 입구

도면

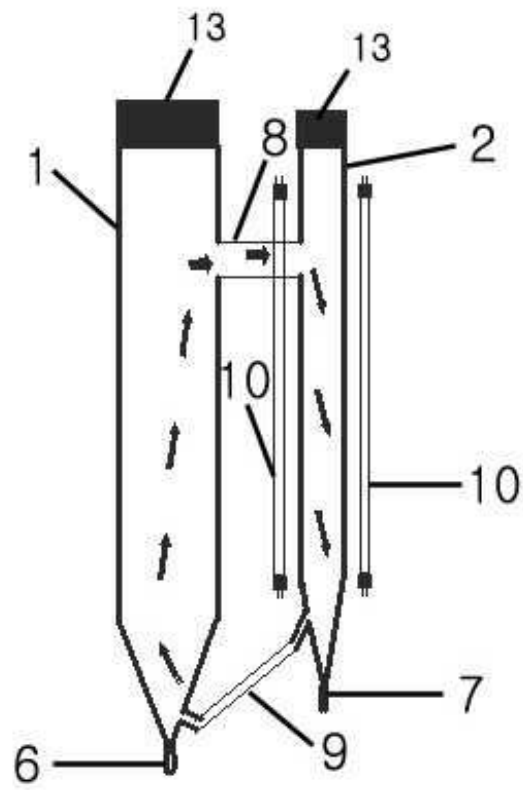
도면1



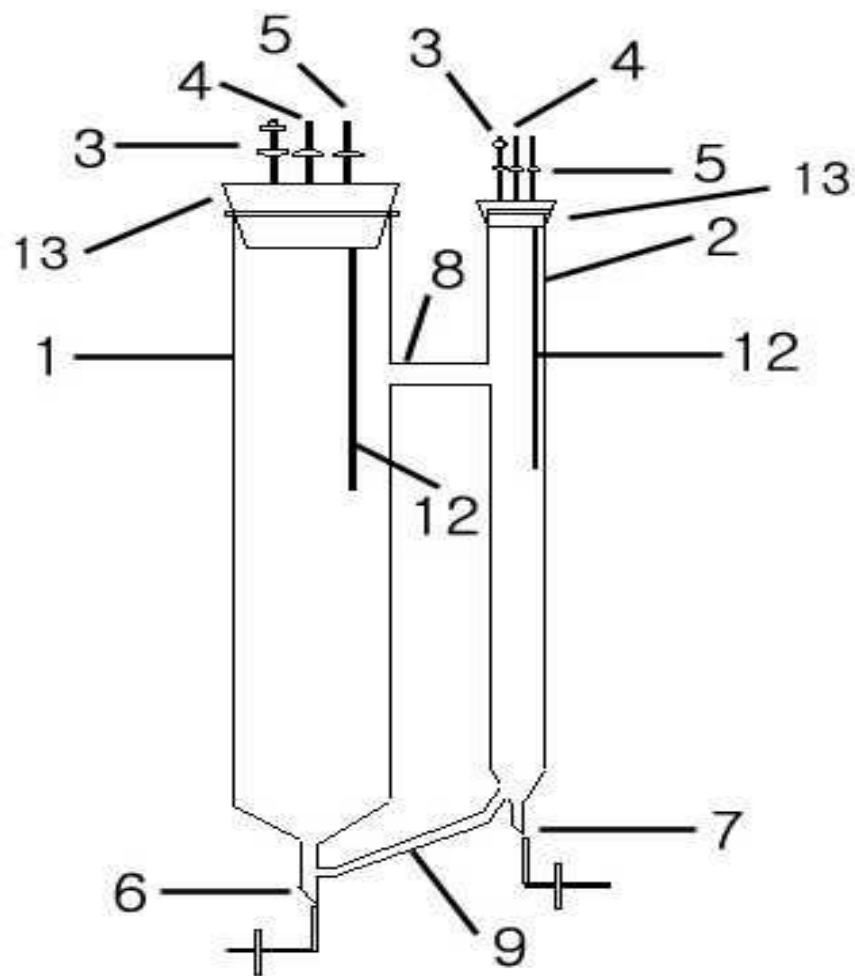
도면2



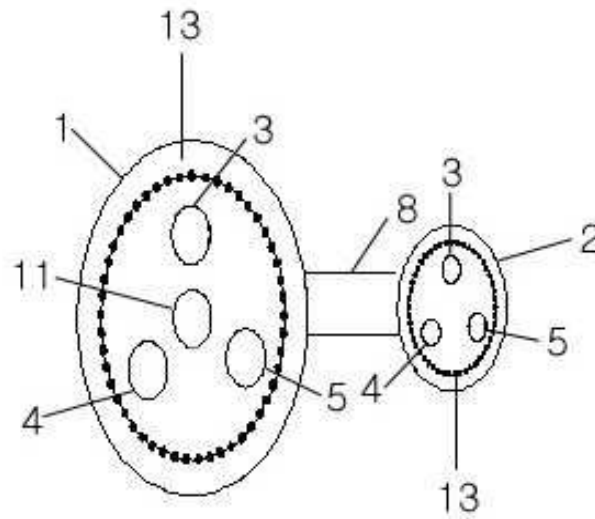
도면3



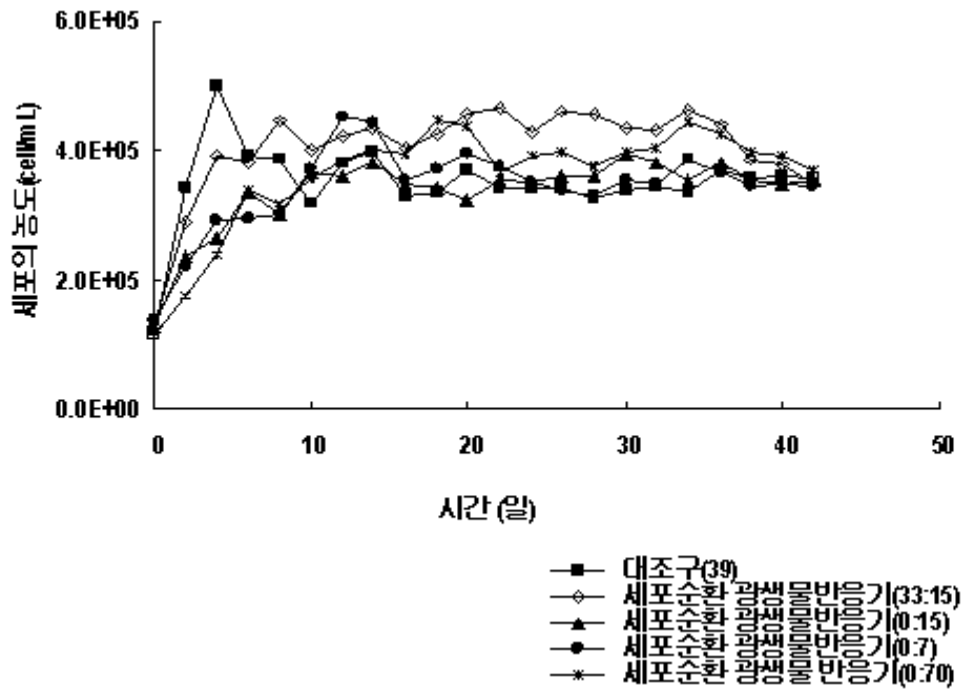
도면4



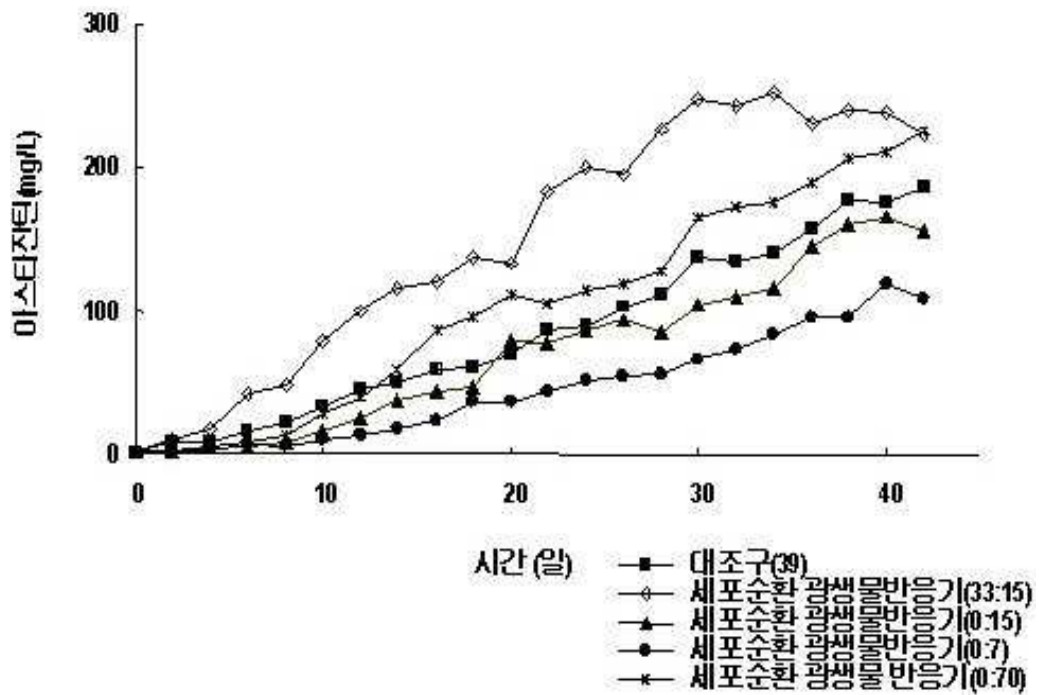
도면5



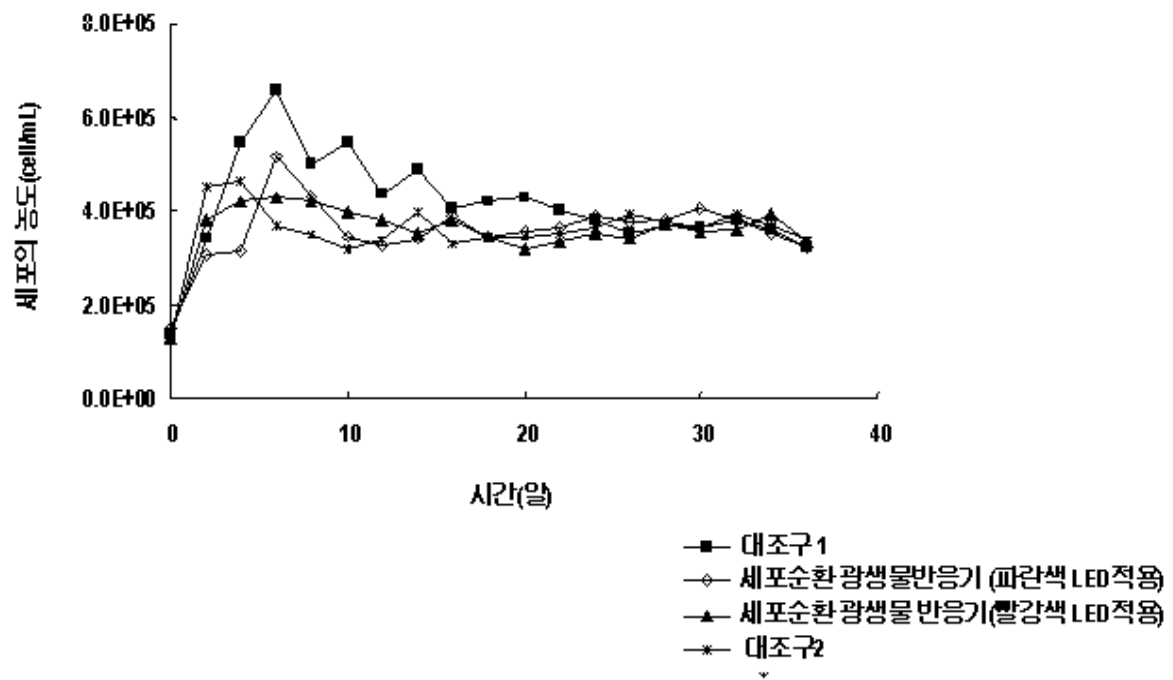
도면6



도면7



도면8



도면9

