



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0132097
(43) 공개일자 2020년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12M 23/58 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0057017
(22) 출원일자 2019년05월15일
심사청구일자 2020년11월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호
전재민
서울특별시 동작구 사당로2자길 2-2
아닐 쿠말 파텔
서울특별시 성북구 고려대로 30, 706호
(74) 대리인
정은열

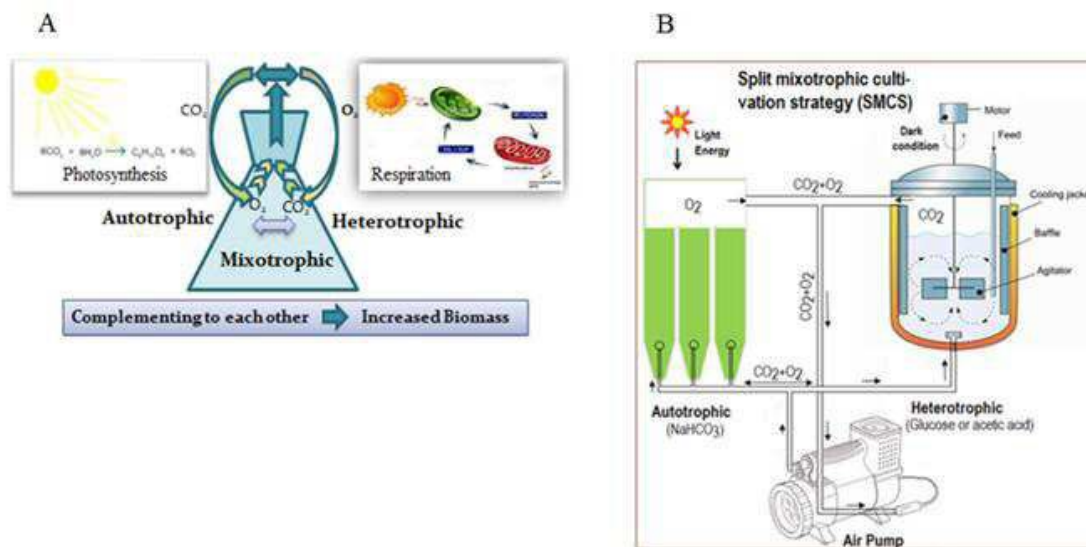
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 분할 혼합영양 배양 전략을 이용한 미세조류의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 분할 혼합영양 배양 전략을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 독립영양방식과 종속영양방식의 비접촉적 연결을 통해 기체교환을 이용하는 분할 혼합영양 배양 전략을 이용하여 바이오매스 수율이 향상된 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20172010202050
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	에너지수요관리핵심기술개발(에특)
연구과제명	배기가스내 이산화탄소 포집 및 탄소자원화 하이브리드 동시처리 공정 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	한국지역난방공사 미래개발원
연구기간	2019.05.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019012346
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(부처자체분류명: KOREA CCS 2020 사업)
연구과제명	생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율	30/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.02.01 ~ 2020.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

독립영양방식과 종속영양방식의 배양기를 연결하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분할 혼합영양 배양 전략을 이용한 미세조류의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 독립영양방식과 종속영양방식의 비접촉적 연결을 통해 기체교환을 이용하는 분할 혼합영양 배양 전략을 이용하여 바이오매스 수율이 향상된 미세조류의 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세조류 바이오 프로세스의 상업화 측면에서, 연속적인 CO₂ 공급은 종종 간과되었던 큰 과제이다. 배양방식 중, 독립영양방식과 종속영양방식 모두 대기 중 0.04%의 낮은 농도로 존재하는 CO₂의 가용성에 크게 의존한다. 또한 CO₂의 낮은 농도는 미세조류 성장에 필요한 원하는 CO₂의 물질 전달을 제한한다. 이러한 단점은 농축된 CO₂의 외부 공급으로 극복할 수 있다. 외부 CO₂ 공급의 경제성을 충족시키기 위하여, 발전소나 바이오매스 기반 화력 발전이나 발전소로부터 얻은 배가스와 합성가스가 주로 이용되며, 이러한 가스를 사용함으로써 대규모 미세조류 배양에서의 CO₂ 제한을 해결할 것으로 예상된다. 또 다른 과제는 값비싼 폐기물 CO₂ 포획 인프라와 배출원으로부터 미세조류 배양 시설로 운송하는데 드는 추가적인 비용을 해결해야 하는 것이다. 이러한 배출원들 중 극소수만이 대규모의 미세조류배양 시설과 가까운 곳에 위치해 있으며, CO₂ 배출원 근처에 미세조류배양시설을 설치하는 것은 쉬운 일이 아니다. 따라서, 외부 CO₂ 공급에 대한 의존도를 줄이기 위한 대체 전략과 추가 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

[0003] 분할혼합영양배양방식은 종속영양방식의 세포의 호흡으로부터 생성된 CO₂를 CO₂원으로 쓸 수 있기 때문에 이러한 문제를 완화할 수 있다. 일반적인 혼합영양배양방식은 독립영양배양방식과 종속영양배양방식으로 구성되어 있고, 두 배양방식에 모두 영향을 미친다. 혼합영양배양방식은 엽록소 손실, 음영효과, 유기탄소 흡수억제 등과 같은 몇 가지 해결해야 할 주요 과제들이 알려져 있다. 따라서 이러한 과제에 대처하기 위해서는 더 많은 개선이 필요하며, 이러한 개선책들은 더 많은 기술적, 경제적 이점을 가져올 것이다.

[0004] 혼합영양배양 방식은 미세조류 바이오 프로세스에서의 비용절감이라는 장점 뿐 아니라 탄소격리로 비롯된 환경적 장점도 갖고 있기 때문에 현재 각광 받고 있는 연구 주제이다. 혼합영양배양은 생산물과 바이오매스 생산량, 생산물의 품질, 내구성 측면 등에서 독립적인 독립영양배양 방식이나 종속영양방식보다 우위를 갖고 있다. 혼합영양배양은 독립영양배양과 종속영양배양의 이중 시스템으로 구성 되어있다. 이 중 독립영양배양 시스템에서는 빛 에너지를 이용하여 광합성 과정을 통해 이를 화학적 에너지로 전환하며, 종속영양배양시스템에서는 유기물의 이화작용을 촉진하며 호흡을 통해 세포 분열에 필수적인 에너지를 얻는다. 이는 혼합영양배양 방식에서는 광합성과 산화성 유기탄소 대사가 공존함을 의미한다. 따라서, 혼합영양배양 방식의 생산량은 개별적인 독립영양배양방식과 종속영양배양방식의 생산량의 합과 같다고 가정할 수 있다. 혼합영양배양 과정에서 포도당, 아세트산 등과 같은 유기탄소는 세포 생합성 작용을 위한 아세틸-CoA, NADPH 및 기타 매개체의 형태로 보조 에너지를 제공한다. 한편, 세포 호흡에서 발생한 이산화탄소는 빛 조건에서 광합성을 위해 재사용될 수 있다. 따라서 두 배양방식을 하나로 통합하여 시너지 효과를 얻을 수 있다면, 혼합영양배양방식에서의 질량과 세포 숫자로 확인된 세포의 성장량은 독립영양배양방식 및 종속영양배양방식에서의 세포 성장량보다 클 것으로 예상된다. 혼합영양배양방식은 외부 CO₂에 대한 의존도를 감소시켜, 단위 바이오매스 당 성장을 위한 무기질과 유기물을 암-종속영양방식(dark heterotrophic)보다 눈에 띄게 적게 소비한다. 따라서, 혼합영양배양은 바이오프로세스의 규모를 증가시킬 때 가격의 효율성 측면에서 가장 적절한 미세조류 재배 방식으로 보고 되고 있다. 이러한 배양 방식은 바이오매스와 생산물 수율을 개선할 뿐만 아니라, 종속배양방식에서는 제공하지 않는 상업적 미세조류 공정의

탄소 발자국을 개선할 수 있는 지속적인 CO₂ 격리 능력을 갖고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 독립영양과정과 종속영양과정이 동일한 혼합영양배양 시스템에서 독립적으로 발생하므로, 공정의 복잡성은 그들 간의 상호작용으로 인한 성장 조건에 따라 달라진다. 과거의 보고에 따르면, 유기 탄소원은 대개 광합성보다는 호흡에 먼저 영향을 미치며, 바이오매스의 농도가 높아짐에 따라 광합성의 효율성이 저해된다. 또 다른 가능한 이유로는 유기탄소의 동화가 엽록소의 생산을 방해하는 환경이나 유기탄소 소모와 관련 있는 효소 합성의 억제에 의해, 종속이적이며 비경쟁적인 혼합영양 성장이 현저하게 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 이러한 효과들 뿐만 아니라, 혼합배양방식의 전반적인 수율은 독립배양방식 및 종속배양방식보다 더 나은 것으로 보고되었지만, 문제점 또한 남아있다. 혼합영양방식에 영향을 미치는 요인들은 (1) 유기탄소원으로 인한 엽록소 합성의 감소와 캘빈 회로 및 TCA 회로의 기능저하가 종합되어 광합성 효율을 일괄적으로 크게 감소시키며, (2) 높은 조명 조건에서는 유기 탄소 소모의 억제되며, (3) pH 유지를 위한 아세트산염의 동화작용은 숙신산 생산을 촉진하며, 이로 인해 미세조류의 성장 손실이 발생한다. (4) 혼합영양방식과 잘 맞지 않는 종은 광합성 효율의 감소와 함께 O₂축적이 감소하며 (5) 몇몇 혼합영양방식에 사용되는 종들은 혼합영양방식 중 종속영양방식의 비율이 현저하게 낮았으며, 또한 독립영양방식 또한 음영효과 같은 요소들에 의해 부정적인 영향을 받은 경우도 존재하였다.

[0006] 이러한 단점들을 극복하기 위하여, 본 발명에서는 분리된 독립배양 및 종속배양에서와 발생하는 기체(CO₂ 및 O₂) 들을 이용하거나 다른 요소들을 이용하여, 최대한의 혼합영양방식에서의 이득을 얻는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 독립영양방식과 종속영양방식의 배양기를 연결하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에서는 분할 혼합영양 배양 전략(Split Mixotrophy Cultivation Strategy; SMCS)을 이용하여, 각각 분리된 액체환경에서 성장하는 독립영양방식의 환경과 종속영양방식의 환경에서의 가스 교환 효과의 긍정적인 시너지를 이용하고자 한다. 더욱이, 일반적인 혼합배양방식과 비교하여 SMCS의 성장 측면에서의 이점 뿐 아니라 모델의 기술적 이점 또한 고려하였다. 이는 특히 비용적인 측면에서 효율적인 대규모 혼합영양 바이오프로세스를 개발하기 위한 혼합영양 현상에 대한 더 많은 지식과 깊은 통찰력을 가져다 줄 것으로 기대된다.

[0009] 본 발명에 따른 분할혼합영양배양전략(Split Mixotrophic Cultivation Strategy, SMCS)을 이용할 경우, 혼합영양배양 방식의 장점을 누릴 수 있을 뿐만 아니라, 통상적인 혼합영양배양 방식 보다 바이오매스와 기타 생산물의 생산량을 더욱 향상시킬 수 있다. 본 발명에 따른 배양 모델은 경제적인 조류를 이용한 바이오 정유의 길을 제시한다. 유기 탄소 보충과 관련된 과제는 엽록소 손실, 유기 탄소 흡수 억제 등과 같은 이 배양 모델을 채택하여 해결할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 배양 전략은 경제적 생존을 위해 박테리아 과정을 조류와 통합하는 돌파구가 될 수 있다. 본 발명에 따른 배양방식을 채택함으로써, 유기탄소를 이용한 배양 시 문제가 되는 엽록소 손실, 유기 탄소 소비 억제 등의 문제를 해결할 수 있으며, 이러한 배양 전략은 경제적 성공 가능성을 위한 박테리아 과정을 조류와 통합하는 돌파구가 될 수 있다. 또한 오염을 방지하기 위한 항생제 같은 화학 물질을 따로 투입할 필요가 없어, 회수 이후에 이러한 물질을 제거하기 위한 추가적인 단계를 거칠 필요가 없다. 또한 본 발명은 유기탄소원을 쓸 때 발생하는 문제점들인 1)독립영양방식 내에서의 엽록소 감소, 2)배양 중에 발생하는 음영효과, 3)빛이 공급되지 않은 종속배양에서의 효소 조절, 4)두 배양 조건 사이의 기체 물질 전달과 대사 유동의 제한을 경감시켜줄 수 있으므로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1의 A는 종래 통상적인 독립, 종속, 혼합영양배양방식을 나타낸 것이고, B는 본 발명에 따른 분할혼합영양배양전략(Split Mixotrophic Cultivation Strategy, SMCS)을 도식화한 것이다.

도 2의 A는 유기탄소원으로 포도당을 썼을 때의 NaHCO₃의 소모량과 포도당의 소모량 및 바이오매스 수율을 측정

한 결과를 나타낸 것이고(CA;SMCS에서의 독립영양방식, CH;SMCS에서의 종속영양방식, M;혼합영양방식, A;독립영양방식, H;종속영양방식), B는 Optical Density(750nm)를 이용하여 측정한 성장값을 나타낸 것이다.

도 3의 A는 유기탄소원으로 아세트산을 썼을 때의 NaHCO_3 의 소모량과 아세트산의 소모량 및 바이오매스 수율을 측정한 결과를 나타낸 것이고(CA;SMCS에서의 독립영양방식, CH;SMCS에서의 종속영양방식, M;혼합영양방식, A;독립영양방식, H;종속영양방식), B는 Optical Density(750nm)를 이용하여 측정한 성장값을 나타낸 것이다.

도 4는 *Chlorella protothecoides*의 독립영양방식과 종속영양방식에서의 총 O_2 발생량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

기존에 미세조류 배양에 사용되는 영양조건은, 독립영양방식(Autotrophy), 종속영양방식(Heterotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy)인 반면, 본 발명에 따른 방법은 독립영양방식과 종속영양방식의 배양기를 연결하여 배양하는 것이다.

배양에 사용되는 미세조류는 특정 종류에 국한되지는 않지만, 유기탄소원을 효율적으로 이용할 수 있는 종인 *Chlorella protothecoides*를 사용하였다.

독립영양방식의 경우 배지를 TAP-C 배지를 이용하였고, 종속영양방식과 혼합영양방식에서는 TAP-C에 포도당이나 아세트산을 5g/L 씩 추가하여 유기탄소원으로 이용하였다.

성장에 미치는 기체효과에 대한 명확한 확인을 위해, CO_2 와 O_2 의 공급을 지양하였으며, 이를 위해 본 발명에서는 NaHCO_3 를 무기탄소원으로 사용하였으며, 유기탄소원으로는 포도당과 아세트산을 이용하였다. 외부와의 기체 교환을 차단하기 위해 독립영양배양방식의 플라스크와 종속영양방식의 플라스크를 빈틈없이 연결하는 것이다.

독립영양방식과 종속영양방식의 배양기를 연결한 경우, 호흡과정에서 생성된 CO_2 는 광합성에 이용될 수 있으며, 광합성과정에서 생성된 O_2 는 호흡에 이용될 수 있기 때문에 서로의 성장에 도움을 준다. 이러한 장점 외에도, 각 배양방식을 적용할 때 CO_2 와 O_2 의 축적 의해 발생할 수 있는 성장 저해 효과와 호흡물과 광합성물의 감소를 막아 줄 수 있다는 장점 또한 갖고 있다.

SMCS 방식은 배양조건이 다른 두 액체배지가 분리되어 있기 때문에, 액체 간 흐름 및 교환에서 발생하는 다른 알려지지 않은 매개체에 의해 발생할 수 있는 바이오매스 수율 증가 가능성을 배제하며, CO_2 와 O_2 의 가스 교환만이 두 가지 보완적 배양방식에서 바이오매스 수율을 증가시키기 위해 중요한 역할을 한다.

도 1의 B에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 방법은 독립영양방식(Combined Autotrophy; CA), 혼합영양방식(Combined Heterotrophy; CH)이 서로 연결되어 있으며, 이 경우 산소와 이산화탄소의 기체교환이 발생하지만, 액체배지들은 서로 분리되어 교환되지 않는다.

이하, 본 발명의 이해를 위하여 구체적인 실시예를 통하여 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기의 실시예에 의해서 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.

[실시예1] 유기탄소원인 포도당을 이용한 SMCS 시스템 내에서 발생된 기체의 효과(Effect of evolved gases on combined autotrophic and heterotrophic yields of split mixotrophic cultivation regime in glucose media)

성장에 미치는 기체효과에 대한 명확한 확인을 위해, CO_2 와 O_2 의 공급을 지양하였고, 이를 위해, 유기탄소원을 포도당으로, NaHCO_3 를 무기탄소원으로 사용하였으며, 외부와의 기체 교환을 차단하기 위해 독립영양배양방식의 플라스크와 종속영양방식의 플라스크를 빈틈없이 연결하였다(표 1). 또한 대조군으로서, 서로 연결되지 않은 독립영양배양방식의 플라스크, 종속영양배양방식의 플라스크, 혼합영양배양방식의 플라스크를 사용하였으며, 이들의 경우에는 일반적인 배양 과정에서 수행되는 것처럼 먼 패드로 입구를 막았다.

- [0024] *Chlorella protothecoides*를 이용하여 실험한 결과, 혼합영양배양방식으로 얻은 바이오매스량이 독립영양방식 및 종속영양방식으로 얻은 바이오매스 산출량의 합보다 더 많다는 결과를 얻을 수 있었다(도 2a). 각각의 영양 배양과정에서, 영양배양방식에 따라 유기탄소원과 빛의 공급을 변경하였고, 그 외의 다른 물리-화학적 변수인 pH, 온도, 탄소원의 농도, 접균량, 배양 시간 등은 일정하게 유지하였다. 4일간의 배양 후에, 정의된 성장 조건 하에서 탄소원을 포도당으로 썼을 경우, 일반적인 혼합영양방식에서의 바이오매스는 독립영양방식에서의 바이오매스와 종속영양방식에서의 바이오매스에 비해 각각 3.3배와 1.5배 더 많았다(도 2 참조). 이러한 독립적인 바이오매스 생산량을 SMCS 방식의 수율과 비교했을 때, 고무적인 결과가 나타났다. SMCS 방식의 독립영양방식 부분의 바이오매스는 일반적인 독립영양배양방식보다 49.2% 더 높은 반면, SMCS 방식의 종속영양방식 부분의 바이오매스는 일반 종속영양배양방식보다 40.8% 더 많은 바이오매스 수율을 보였다. 또한, SMCS 방식으로 얻은 바이오매스 총량 (5.9 g/l)을 다른 배양방식과 비교했을 때, 일반적인 독립영양방식과 종속영양방식의 바이오매스의 합(4.0 g/l)보다 47.5%, 혼합영양배양방식의 바이오매스 수확량(4.2 g/l)보다 40.5% 더 많았다. 상기한 결과로부터 SMCS 방식 내에서의 종속영양방식과 독립영양방식에서 각각 생성된 CO₂와 O₂는 상호보완적으로 작용하여 서로의 성장을 촉진시켰음을 보여준다. 즉, 호흡과정에서 생성된 CO₂는 광합성에 이용될 수 있으며, 광합성과정에서 생성된 O₂는 호흡에 이용될 수 있기 때문에 서로의 성장에 도움을 준다. 이러한 장점 외에도, 각 배양방식을 적용할 때 CO₂와 O₂의 축적 의해 발생할 수 있는 성장 저해 효과와 호흡물과 광합성물의 감소를 막아줄 수 있다는 장점 또한 갖고 있다. 본 실험의 수율은 광도 및 연결된 독립배양환경의 NaHCO₃ 농도, 연결된 종속배양환경의 포도당 농도, 배양 기간 및 두 보완적 배양방식에 대한 부피비율 조절 등의 모든 성장 매개변수의 최적화가 달성되면 더욱 개선될 가능성이 있다. 또한 SMCS 방식은 배양조건이 다른 두 액체배지가 분리되어 있기 때문에, 액체 간 흐름 및 교환에서 발생하는 다른 알려지지 않은 매개체에 의해 발생할 수 있는 바이오매스 수율 증가 가능성을 배제하며, CO₂와 O₂의 가스 교환만이 두 가지 보완적 배양방식에서 바이오매스 수율을 증가시키기 위해 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 관점에서 볼 때, 통상적인 혼합영양배양방식의 바이오매스가 독립영양배양방식과 종속영양배양방식의 바이오매스의 합과 다른 것도 기체 교환 작용뿐 아니라 동일한 배지 내에서의 상호작용에 의해 일어나는 현상이라고 볼 수 있다. SMCS 은 상호보완적인 기체 효과에 의해 성장의 측면에서 이익을 발휘할 수 있다는 측면에서 중요한 시스템이다. SMCS 하에서는 두 배양 방식 모두 긍정적인 시너지 효과가 발생하여 바이오매스 수율을 높이는 데에 기여한다. 이 실험은 또한 두 개의 독립된 독립영양방식과 혼합영양방식 세트를 연결함으로써, 기체상(gaseous phase) 조합이 상호적인 혼합영양적 효과를 가져왔음을 보여준다.
- [0025] 게다가, SMCS로부터 얻은 바이오매스는 일반적인 혼합영양방식으로 얻은 바이오매스보다 많음이 관찰되었다. 이러한 바이오매스의 증가는 SMCS 내에서는 각각의 배지들이 분리되어 있다고 하더라도, 기체교환의 효과로 인해 혼합영양현상이 더 활발히 일어났음을 시사한다. 이러한 시스템은 또한 유기탄소원을 쓸 때 발생하는 문제점들인 1)독립영양방식 내에서의 엽록소 감소, 2)배양 중에 발생하는 음영효과, 3)빛이 공급되지 않은 종속배양에서의 효소 조절, 4)두 배양 조건 사이의 기체 물질 전달과 대사이동의 제한을 경감시켜줄 수 있으므로 유용하다.
- [0026] 도 2a는 무기탄소원(NaHCO₃) 및 유기탄소원(포도당)의 이용 개요도이다. SMCS 내에서의 독립영양방식의 경우, 일반적인 독립영양방식에 비해 10% 많은 소모를 보였지만, 바이오매스 수율은 대략 49.2% 증가하였다. 내부에서 생성된 CO₂는 CH내의 호흡으로 발생한 후 CA에서 광합성에 대한 무기 탄소 수요를 충족시켰을 뿐만 아니라, CA에서의 탄산나트륨의 소비를 증가시켰다고 볼 수 있다. 내부에서 생성된 CO₂와 NaHCO₃의 조합은 더 나은 바이오매스 수율을 보여주었다. NaHCO₃가 CO₂ 격리과정에서 함께 사용되었을 때, *C. vulgaris* 배양 시 엽록소 함량과 세포 바이오매스가 상대적으로 더 높았다는 최근의 보고 또한 이러한 주장을 뒷받침한다. 이 두 요인이 A보다 CA에서의 바이오매스 생산량을 49.2% 증가시켰을 수 있다. 전자의 경우 두 개의 탄소원의 가용성에 기인할 수 있다. 이전의 연구들은 포도당이 빛이 없는 상태에서 *Chlorella protothecoides*의 종속영양방식의 성장을 잘 지원해왔으며, 포도당은 4-5일 동안 배양한 후에 완전히 소진되었고 최적의 초기 포도당 농도가 유지되었을 때 잔류 포도당이 관찰되지 않았다는 것을 보여주었다. 더욱이, 높은 조명 조건에서 아세트산을 이용한 혼합영양방식에서 지연 단계(lag phase)는 평소보다 길었으며, 효소 방출이 지연될 수 있다. 또한 최근의 연구에서, 대부분의 포도당이 어두운 상태에서 소비될 뿐 아니라, 다른 빛 조건에서도 소비되었다는 것이 발견되었다. NaHCO₃의 이용은 각 배양방식마다 다양했지만 CA 체제에서 상대적으로 더 잘 활용되었다.
- [0027] SMCS(분할 시스템)을 사용하는 경우 일반 혼합배양시스템보다 가스 교환의 측면에서 우수하다고 할 수 있으며,

CO₂와 O₂로 인해 발생하는 성장저해를 극복할 수 있다. 이 모든 요소들은 바이오매스 수확량의 추가적인 개선을 위해 함께 기여하고 있다.

[0028] 상호적인 가스 교환의 정도와 그 것이 미세조류 신진대사에 미치는 영향을 설명하기 위해, 광합성 및 호흡률을 분할 혼합영양 세트(SMCS)와 함께 세 가지 조건(독립영양, 종속영양, 혼합영양)에서 용해 무기 탄소(DIC)와 용존 산소(DO)를 측정하여 정량화했다. 포도당을 탄소원으로 쓴 경우에서 A와 H 성장에 비해 CA와 CH에서 DIC 농도가 각각 12.2%와 14.3% 증가했다. 반면, A와 H 농도에 비해 CA와 CH의 DO 농도의 각각 32%와 26%가 증가했다. DIC와 DO의 이러한 향상된 수치는 광합성과 호흡률의 현저한 증가에 기여했을 수 있다. 이러한 데이터는 *C. protothecoides* 세포 내 또는 세포 간에 분할된 혼합영양 가스 교환의 가설을 강력하게 뒷받침한다. 이 전략은 향상된 바이오매스와 생산물 수율 외에도, 에어레이션 및 O₂제거 비용의 감소를 가능케 하여 광범위하게 상업적 용도로 사용될 수 있다.

[0029] SMCS 내에서는 혼합영양배양과정의 호흡으로부터 내부에서 CO₂가 생성되므로, 연속적인 외부 CO₂공급으로 인한 문제를 해결할 수 있는 잠재력을 지니고 있다. 이전의 실험들 중 하나는 *Chlorella regularis*의 배양 방식을 비교했고, 광합성과 종속영양적 호흡이라는 두 개의 독립적인 대사 경로가 혼합영양식 성장 하에서 비경쟁적으로 작용한다는 것을 다루었다.

[0030] 도 2b에 나타난 성장 개요를 통해 성장 패턴을 분석해보면 포도당을 이용한 SMCS내에서의 종속영양 성장이 혼합영양 성장과 유사하게 배양으로부터 24시간이 지난 후 급격히 증가하지만, 일반적인 종속영양성장의 경우에는 성장이 점차적으로 증가했음을 알 수 있다. 결합된 종속영양배양(CH)에서의 *Chlorella protothecoides*의 최대 평균 P와 Pmax는 각각 0.12와 0.30 /h였으며, 혼합영양배양에서는 0.11과 0.27/h로 측정되었다. 반면에 결합된 독립영양배양(CA)에서는 P와 Pmax의 값이 각각 0.056과 0.076/h로 나타났다. 따라서, 분할 혼합영양 배양 전략으로 인해, CH는 가스 교환 혜택을 통해 설정된 혼합영양 성장처럼 거동한다고 결론지을 수 있다. 또한 CA는 내부에서 생성된 CO₂가 성장에 도움을 주며, CH로부터 CO₂가 충분히 제공될 수 있을 것으로 보이는 시간인 배양으로부터 24시간 이후부터는 일반적인 독립영양 성장보다 더 나은 성장값을 보였다.

[0032] [실시예2] 유기탄소원인 아세트산을 이용한 SMCS 시스템 내에서 발생된 기체의 효과 (Effect of evolved gases on combined autotrophic and heterotrophic yields of split mixotrophic cultivation regime in acetic acid media)

[0033] 성장에 미치는 기체효과에 대한 명확한 확인을 위해, CO₂와 O₂의 공급을 지양했다. 이를 위해, 본 실험에서는 유기탄소원으로 아세트산을 사용하였고 NaHCO₃를 무기탄소원으로 사용하였으며, 외부와의 기체 교환을 차단하기 위해 독립영양배양방식의 플라스크와 종속영양방식의 플라스크를 빈틈없이 연결하였다(표 1). 또한 대조군으로서, 서로 연결되지 않은 독립영양배양방식의 플라스크, 종속영양배양방식의 플라스크, 혼합영양배양방식의 플라스크를 사용하였으며, 이들의 경우에는 일반적인 배양 과정에서 수행되는 것처럼 먼 패드로 입구를 막았다.

[0034] 유기탄소원으로 아세트산을 사용했을 경우, 유기탄소원으로 포도당을 썼을 경우와 비슷한 경향성을 보였지만, 규모의 측면에서 상당한 차이가 있었다. 모든 배양방식으로 얻은 산출량은 도 3a의 그래프에 나타났다. 4일간의 배양 후, 혼합영양방식에서의 성장량은 정의된 성장 조건 하의 독립영양방식과 종속영양방식에 비해 각각 2.7배와 1.4배 더 높은 바이오매스 수율을 보였다.

[0035] SMCS에서의 독립영양배양(CA)의 경우 일반적인 독립영양배양방식에 비해 바이오매스 산출량이 26.2% 더 높았고 SMCS에서의 종속영양배양(CH)의 경우 일반적인 종속영양배양방식보다 바이오매스 산출량이 28.5% 더 높았다. 또한, SMCS에서의 독립영양배양(CA)와 SMCS에서의 종속영양배양(CH)의 바이오매스의 합(4.8 g/l)은, 일반적인 독립영양배양방식과 종속영양배양방식의 바이오매스합(3.75 g/l)보다 27.7%, 혼합배양방식의 바이오매스 수확량(3.44 g/l)보다 39.2% 더 높았다. 또한, 포도당을 유기탄소원으로 쓴 경우와 유사하게, 아세트산을 유기탄소원으로 쓴 경우 역시 각각 발생한 두 기체 CO₂와 O₂가 SMCS 하에서 상호 보완적으로 작용하여 바이오매스량을 향상시켰다는 것을 보여주었다.

[0036] SMCS에서의 독립영양배양(CA)의 경우, 탄산수소의 소모량이 일반적인 독립영양방식에 비해 17% 정도 적었지만, 바이오매스의 수율은 26.2% 더 크게 나타났다(도 3a). 아세트산을 첨가한 배지의 경우, SMCS를 적용했을 때 DIC 값이 대조군에 비해 독립영양방식의 경우 16.3%, 종속영양방식의 경우 7.6% 증가했음을 확인했다(표 3). 또한

SMCS를 적용했을 때 DO값은 대조군에 비해 독립영양방식의 경우 31.1%, 종속영양방식의 경우 12.2% 증가했음을 확인했다.

본 실험에서는 최대평균 P와 Pmax 값이 혼합영양방식의 경우 0.0097, 0.20/h, SMCS를 적용한 종속영양방식에서는 0.095, 0.15/h, SMCS를 적용한 독립영양방식에서는 0.048, 0.062/h로 각각 나타났다.

[실시예 3] 독립영양방식과 혼합영양방식에서의 산소발생량 분석

이 실험에서는, [실시예 1],[실시예 2]에 사용된 모든 배양방식에서의 산소발생량을 측정하였다(M_G : glucose, M_{AA} : acetic acid). 하지만, 종속영양배지의 경우에는 빛을 주지 않았기 때문에 광합성이 일어나지 않아 생략하였다. M_G , M_{AA} 배지의 경우 빛의 세기는 $100-400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 측정되었다. 도 4에 나와 있듯, 빛의 세기가 $100-300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 였을 때 가장 광합성이 활발하게 일어나며 빛의 세기가 증가할수록 광합성량이 증가함을 보였다. 최대광합성 속도(P_{max})는 $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서의 O_2 발생량과 암호흡의 합으로 판단하였다. 유기탄소원이 배지 내에 존재하는 경우에, 광합성 효율이 일반적인 독립영양방식에 비해 떨어지게 된다. 반면에 SMCS를 적용한 독립영양방식의 경우, 종속영양방식의 배지가 분리되어 있기 때문에 혼합영양방식과는 달리 광합성 효율이 떨어지지 않으며, 일반적인 독립영양방식의 광합성 효율과 비슷한 수치를 보인다 (도 4 참조). 즉, 이러한 분리혼합 영양배양전략은 배지의 유기탄소원 성분에 의한 광합성 효율의 감소를 막아주며, 이를 통해 광합성이 바이오매스 수율 증가와 엽록소 함량에 온전히 기여할 수 있게 해준다. 따라서 분리혼합 영양배양전략은 유기탄소원과 독립영양방식의 배지의 분리를 통해 바이오매스 수율 증가에 긍정적인 영향을 미치게 된다.

[실시예 4] 독립영양방식과 혼합영양방식에서의 지질함량 분석

각 배양 방식별 Total lipid 와 Lipid content를 표 4에 정리하였다. 유기탄소원으로 포도당을 이용한 SMCS의 경우 CA:CH(1.17g/l) 가장 높은 지질 농도를 나타냈고, 이는 일반적인 혼합배양방식에 비해 33%, 일반적인 독립영양배양방식과 혼합영양배양방식으로 얻은 지질 함량에 비해 48% 높은 수치이다. 한편 유기탄소원으로 아세트산을 이용한 SMCS의 경우 CA:CH(0.88g/l) 가장 높은 지질 농도를 나타냈고, 이는 일반적인 혼합배양방식에 비해 35%, 일반적인 독립영양배양방식과 혼합영양배양방식으로 얻은 지질 함량에 비해 37.5% 높은 수치이다. 4일이라는 배양시간은 지질축적에 부족한 것임에도 불구하고, 이처럼 SMCS 방식을 적용하였을 경우 유의미한 증가량을 보여주었다.

표 1: 실험에 사용된유기 및 무기 탄소원의 농도

표 1

탄소원	Normal independent set			Combined set	
	A	H	M	CA	CH
NaHCO ₃ (g/l)	7.0	0.0	7.0	7.0	0.0
Glucose/ acetic acid (g/l)	0.0	5.0	5.0	0.0	5.0

Autotrophic; H: Heterotrophic; M: Mixotrophic; CA: Combined autotrophic; CH: Combined heterotrophic

표 2: 배양방식별 바이오매스 함량

표 2

Mode of growth		Glucose set		Acetic acid set	
Trophic	modes	DCW (g/l)	SUM (A&H) DCW (g/l)	DCW (g/l)	SUM (A&H) DCW (g/l)
A		1.26±0.04	4.00±0.05	1.26±0.03	3.75±0.04
H		2.84±0.05		2.49±0.04	
M		4.2±0.03	4.2±0.06	3.44±0.05	3.44±0.05
CA		1.9±0.05	5.9±0.08	1.6±0.02	4.8±0.07
CH		4.0±0.02		3.2±0.04	

A: Autotrophic; H: Heterotrophic; M: Mixotrophic; CA: Combined autotrophic; CH: Combined heterotrophic

[0049]

표 3: 정체기에서의 *Chlorella protothecoides*의 DIC와 DO의 측정값

표 3

Substrate	Glucose set					Acetic acid set				
	A	H	M	CA	CH	A	H	M	CA	CH
DIC (mg/l)	490±20	1050±36	1100±28	550±28	1200±48	490±24	985±38	1050±34	570±32	1060±54
DO (mg/l)	12.2±0.7	11.2±0.5	13.7±0.5	16.1±0.8	14.1±0.4	12.2±0.6	12.3±0.4	13.7±0.5	16.0±0.5	13.8±0.3

A: Autotrophic; H: Heterotrophic; M: Mixotrophic; CA: Combined autotrophic; CH: Combined heterotrophic

[0052]

표 4: 배양방식별 지질 농도 및 함량

[0054]

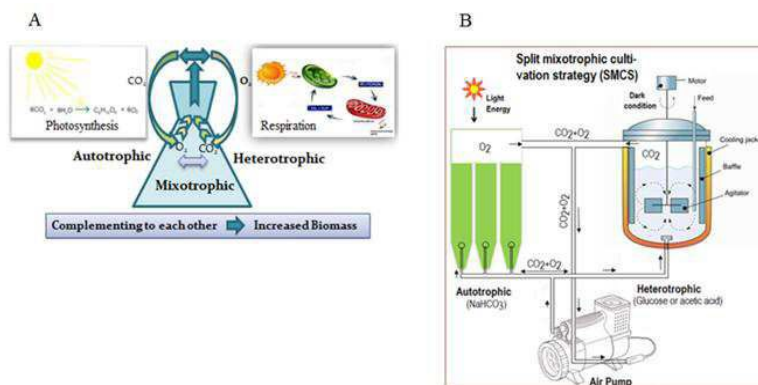
표 4

Mode of growth	Glucose set			Acetic acid set		
Trophic modes	Lipid (g/l)	SUM (A&H or M) Lipid (g/l)	Lipid content (%)	Lipid (g/l)	SUM (A&H or M) Lipid (g/l)	Lipid content (%)
A	0.19±0.03	0.79±0.11	15.1±0.3	0.19±0.03	0.65±0.08	15.1±0.3
H	0.60±0.08		20.7±0.3	0.46±0.05		18.4±0.4
M	0.88±0.08	0.88±0.08	20.9±0.4	0.64±0.07	0.64±0.07	18.6±0.4
CA	0.31±0.04	1.17±0.13	16.4±0.3	0.26±0.04	0.88±0.10	16.3±0.2
CH	0.86±0.9		21±0.5	0.60±0.06		18.4±0.3

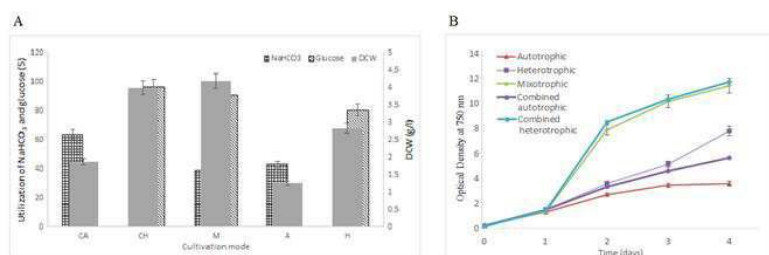
A: Autotrophic; H: Heterotrophic; M: Mixotrophic; CA: Combined autotrophic; CH: Combined heterotrophic

도면

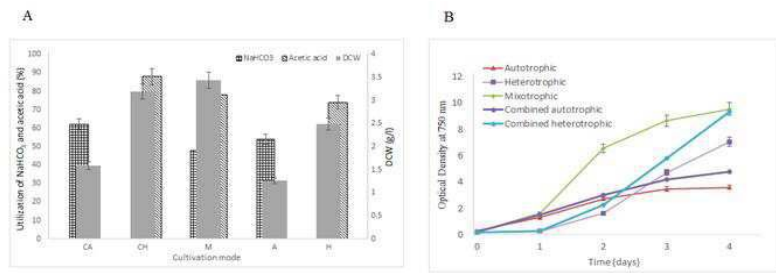
도면1



도면2



도면3



도면4

