

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0010898 (43) 공개일자 2014년01월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/12 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)	
(21) 출원번호 10-2013-0083530	(72) 발명자 심상준	
(22) 출원일자 2013년07월16일 심사청구일자 2013년07월16일	서울특별시 강남구 선릉로 221 도곡렉슬아파트 301동 803호 홍민의	
(30) 우선권주장 1020120077403 2012년07월16일 대한민국(KR)	서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 창의관 615호	
	(74) 대리인 이처영, 장재환	

전체 청구항 수 : 총 8 항

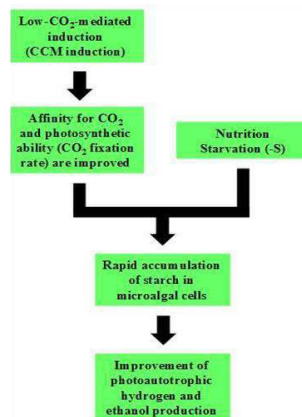
(54) 발명의 명칭 황결핍과 낮은 이산화탄소 매개유발과정의 결합에 의한 자가영양조건에서 미세조류 배양에 의한 전분축적, 수소 및 에탄올 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 황결핍과 낮은 이산화탄소 매개유발과정의 결합에 의한 자가영양조건에서 미세조류 배양에 의한 전분축적, 수소 및 에탄올 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 황결핍 및 낮은 CO₂ 농도에서 유발되는 CO₂ 농축메커니즘(CCM, CO₂ concentrating mechanism)을 통한 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)에서 전분축적 및 축적된 전분을 이용하여 고수율로 수소 및 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 황결핍 및 CO₂ 농축메커니즘을 통한 미세조류의 전분축적 능력 향상은 수소 및 에탄올 생산을 증가시킬 뿐만 아니라 온실가스 저감 능력의 향상 및 축적된 전분을 사용하여 다양한 대사 산물들의 생산성을 증가시킬 수 있으므로 산업 전반에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110031349

부처명 한국연구재단

연구사업명 (원천)글로벌프론티어

연구과제명 에탄올 생산을 위한 미세조류의 수확 및 전처리 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법:

- (a) 미세조류를 3~8%의 높은 CO₂ 농도에서 늦은 지수기(late exponential phase)단계 까지 배양하는 단계; 및
- (b) 0.02~0.05%의 낮은 CO₂ 농도에서 4시간 동안 유지시켜 CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발한 다음, 3~8%의 높은 CO₂ 농도로 20시간 동안 유지시킴과 동시에 황결핍을 통한 미세조류의 성장억제를 통하여 전분축적을 가속화하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX90인 것을 특징으로 하는 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 미세조류는 (a)단계에서는 22~24℃의 온도에서 20~40 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하고, (b)단계에서는 22~24℃의 온도에서 120~140 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b)단계의 황결핍은 황성분이 결핍된 배지에서 미세조류를 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 미세조류에서 수소를 생산하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 광발효하여 수소를 생산하는 단계; 및
- (b) 상기 생성된 수소를 회수하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a)단계의 광발효는 22~24℃의 온도에서 120~140 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류에서 수소를 생산하는 방법.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 미세조류에서 에탄올을 생산하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 암발효하여 에탄올을

생산하는 단계; 및

(b) 상기 생성된 에탄올을 회수하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a)단계의 암발효는 29~31℃의 온도에서 빛을 차단한 상태로 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류에서 에탄올을 생산하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 황결핍과 낮은 이산화탄소 매개유발과정의 결합에 의한 자가영양조건에서 미세조류 배양에 의한 전분 축적, 수소 및 에탄올 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 황결핍 및 낮은 CO₂ 농도에서 유발되는 CO₂ 농축메커니즘(CCM, CO₂ concentrating mechanism)을 통한 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)에서 전분축적 및 축적된 전분을 이용하여 고수율로 수소 및 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 화석연료의 고갈우려와 가격폭등 및 이들의 연소로 인하여 발생하는 온실가스(CO₂)의 축적은 각종 지구온난화문제들을 발생시키기 때문에, 현재 지속가능한 청정에너지원의 개발이 요구되고 있다. 그 중 수소는 연소시 순수한 물이 나오는 청정에너지로서 기존의 화석연료를 대체할 수 있는 지속가능한 미래에너지원으로서 여겨지고 있으나 기존의 대용량 수소생산방법들은 대부분 수소생산중 이산화탄소를 동시에 배출하기 때문에 환경친화적이지 못하다는 단점이 있었다.

[0003] 미세조류는 CO₂를 포집하여 성장하며, 강한 빛과 더불어 강력한 혐기조건의 조성 시 하이드로게나아제(hydrogenase)를 발현하여 수소를 생산하는 대사체계가 갖추어져 있기 때문에 미세조류를 활용하면 환경친화적인 수소생산시스템의 구축이 가능하다 (Gyeong Taek Gong *et al.*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 18(1):51, 2003; Mi-Sun Kim *et al.*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 20(6):393, 2005; H. Gaffron, and J. Rubin, *J. Gen. Physiol.*, 26:219, 1942). 그러나 미세조류를 기반으로 하는 광전환수소생산시스템(MHPS, Microalgae-mediated hydrogen photo-production system)의 생산성은 제한적이기 때문에 현재까지 최적화와 관련하여 많은 연구들이 수행되어왔으며, 앞으로도 지속적인 개발이 필요한 실정이다 (M. L. Ghirardi *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 18:506, 2000; U. Miura, *Process Biochem.*, 30:1, 1995).

[0004] 광합성미생물인 클라미도모나스와 같은 미세조류세포는 일반적으로 영양소가 풍부한 배지 내에서 지수성장하다 영양소가 결핍된 상태가 되면(주로 황이나 질소성분의 결핍), 전분이나 지질과 같은 저장성 대사물질들을 세포 내 축적하려는 경향이 있는데, 이때 대체로 클라미도모나스가 생리적 특성상 자가영양조건에서 영양소결핍을 통한 전분을 축적할 수 있는 기간은 24시간 이내로 한정되어 있으며, 이 중 전분은 혐기적 조건에서 발효를 통하여 수소, 에탄올 및 아세트산과 같은 대사산물들로 전환되며 특히, 광에 의한 발효 시 다른 대사산물들에 비해서 수소로 과반량 전환하여 방출하는 것으로 알려져 있으며, 암발효시 수소보다는 에탄올을 비롯한 다른 유기물로 과반량 전환하여 방출하는 것으로 알려져 있다 (도 1).

[0005] 미세조류를 이용한 수소생산에 절대적인 영향을 미치는 하이드로게나아제(hydrogenase)의 발현은 산소에 매우 민감하기 때문에 혐기조건의 조성이 매우 중요하며(J. R. Benemann, *J. Appl. Phycol.*, 12:291, 2000), 미세조류 세포 내 광합성에 의하여 축적된 전분(starch)은 세포 내 혐기조건 조성을 위하여 사용되기도 하지만, H⁺이온에 전자공여체(electron donor) 역할을 하여 H₂(수소)로 환원시키는 역할도 한다(A. A. Tsygankov *et al.*, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 31:1574, 2006). 또한, 유기산을 사용하지 않는 자가영양조건에서의 광전환수소생산시스템(autotrophic MHPS)의 경우 유기영양생물들에 의한 오염방지에 효과적이지만 혐기조건에서는 이산화탄소의 고정화로 세포 내 축적된 전분(starch)만이 에너지원으로 사용되기 때문에 이산화탄소만을 이용한 수소생산시스템의 개량을 위해서는 자가영양조건에서 짧은 시간 내에 (24시간 전 후로) 미세조류 내 전분 축적능력을 향

상시킬 수 있는 새로운 공정의 개발이 필요하다 (D. D. Wykoff *et al.*, *Plant Physiol.*, 117:129, 1998).

[0006] 이에 본 발명자들은 미세조류의 전분축적을 증가시키고, 축적된 전분을 이용하여 수소 및 에탄올 생산 수율을 향상시키기 위해 예의 노력한 결과, 황결핍 및 낮은 CO₂ 농도에서 유발되는 이산화탄소농축 메커니즘(CCM, CO₂ concentrating mechanism)을 이용하면 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)에서 전분축적이 증가하고, 수소 및 에탄올 생산 수율이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 황결핍 및 CO₂ 농축메커니즘을 통해 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법 및 축적된 전분을 이용한 수소 및 에탄올 고수율 생산 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 (a) 미세조류를 3~8%의 높은 CO₂ 농도에서 늦은 지수기(late exponential phase)단계 까지 배양하는 단계; 및 (b) 0.02~0.05%의 낮은 CO₂ 농도에서 4시간 동안 유지시켜 CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발한 다음, 3~8%의 높은 CO₂ 농도로 20시간 동안 유지시키고 동시에 황결핍을 통한 미세조류의 성장억제를 통하여 전분축적을 가속화하는 단계를 포함하는 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, (a) 상기 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 광발효하여 수소를 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 수소를 회수하는 단계를 포함하는 미세조류에서 수소를 생산하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 상기 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 암발효하여 에탄올을 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 미세조류에서 에탄올을 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 황결핍 및 CO₂ 농축메커니즘을 통한 미세조류의 전분축적 능력 향상은 수소 및 에탄올 생산을 증가시킬 뿐만 아니라 온실가스 저감 능력의 향상 및 축적된 전분을 사용하여 다양한 대사 산물들의 생산성을 증가시킬 수 있으므로 산업 전반에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 클라미도모나스의 광발효 시 전분(starch)으로부터 수소 및 에탄올이 생산되는 대사경로를 도식화한 것이다.

도 2는 클라미도모나스의 자가영양조건에서 배양 시 전분축적, 수소 및 에탄올 생산 향상을 위한 공정 개발 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 이산화탄소를 이용한 자가영양조건에서 클라미도모나스의 배양공정시스템의 구축을 도식화한 것이다.

도 4는 클라미도모나스의 자가영양조건에서 대조군과 실험공정 1(experiment 1)의 전분축적 과정 및 수소/에탄올 생산 과정을 도식화하고, 생산된 전분, 수소 및 에탄올의 생산량을 비교한 그래프이다.

도 5는 클라미도모나스의 자가영양조건에서 실험공정 1(experiment 1) 및 실험공정 2(experiment 2)의 전분축적 과정 및 수소/에탄올 생산 과정을 도식화하고, 생산된 전분, 수소 및 에탄올의 생산량을 비교한 그래프이다.

도 6은 클라미도모나스의 자가영양조건에서 실험공정 1(experiment 1) 및 실험공정 3(experiment 3)의 전분축적 과정 및 수소/에탄올 생산 과정을 도식화하고, 생산된 전분, 수소 및 에탄올의 생산량을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 높은 CO₂ 농도(5%, v/v) 조건에서 성장해온 미세조류를 낮은 농도의 CO₂(Air level, 0.035% (v/v))으로 유지시키면 CO₂ 농축메커니즘(CCM)이 유발되는 것으로 잘 알려져 있으며, CO₂ 농축메커니즘이 유발되면 무기탄소원(inorganic carbon source)인 이산화탄소(CO₂)와 탄산수소이온(HCO₃⁻)의 운송 단백질 및 이산화탄소를 고정화하는데 주된 효소인 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase)의 발현이 증가하게 된다. 이때, 클라미도모나스에서 CO₂ 농축메커니즘에 관여하는 단백질들의 활성은 24시간 지속하는 것으로 밝혀졌으며, 그 유발기간은 4시간 정도면 충분한 것으로 밝혀졌다 (A. A. TsygankoV *et al.*, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 31:1574, 2006; Z. Ramazanov *et al.*, *Planta*, 195:210, 1994; S. Fouchard *et al.*, *Appl. Environ. Microb.*, 71:6199, 2005).
- [0015] 본 발명은 이러한 특성을 미세조류에 적용하여 4시간 동안 CO₂ 농축메커니즘 유발과정을 통하여 일차적으로 CO₂에 대한 고정화능력을 강화하고, CO₂ 고정화능력이 증가된 상태에서 다시 고농도의 CO₂를 공급하는 동시에 황결핍을 통하여 전분생산을 극대화하였다 (도 2).
- [0016] 본 발명은 일 관점에서, (a) 미세조류를 3~8%의 높은 CO₂ 농도에서 늦은 지수기(late exponential phase)단계까지 배양하는 단계; 및 (b) 0.02~0.05%의 낮은 CO₂ 농도에서 4시간 동안 유지시켜 CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발한 다음, 3~8%의 높은 CO₂ 농도로 20시간 동안 유지시킴과 동시에 황결핍을 통한 미세조류의 성장억제를 통하여 전분축적을 가속화하는 단계를 포함하는 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX90인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 미세조류는 바람직하게는 녹조류일 수 있으며, 녹조류는 바람직하게는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0019] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이가 일반적으로 높은 CO₂ 농도에 노출되는 조건은 보통 최소 3% 이상이며, 세포가 과도한 CO₂ 농도에 노출되어 생육이 저해되는 시점의 농도는 대략 8%이다. 따라서, 본 발명에서 높은 CO₂ 농도 범위는 바람직하게 3~8%이며, 더욱 바람직하게는 5%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 또한, CO₂ 농축메커니즘의 유발시 낮은 CO₂ 농도 범위의 경우, 대개 대기 중의 CO₂ 농도인 약 0.035%의 위아래 수준에서 이루어지며, CO₂ 농축메커니즘의 유발시 0.05% 이상의 CO₂ 농도가 공급되면 효과적인 유발이 이루어지지 않아 전분축적 능력이 감소되고, 이에 따라 수소 및 에탄올의 생산수율이 감소한다. 따라서, 본 발명에서 낮은 CO₂ 농도의 범위는 바람직하게는 0.02~0.05%이며, 더욱 바람직하게는 0.035%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 미세조류는 (a)단계에서는 22~24℃의 온도에서 20~40 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하고, (b)단계에서는 22~24℃의 온도에서 120~140 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 미세조류에서 전분축적유도 및 수소생산을 위하여 20~40 μmol/m²/s의 빛 세기로 배양한 미세조류에 120~140 μmol/m²/s 세기의 강한 빛을 조사하는데, 낮은 빛 세기에 적응한 세포를 높은 빛 세기에 노출시키면 황결핍과 더불어 광시스템 II(photosystem II)의 활성이 급속히 감소하여 산소발생이 정지되므로 하이드로게나아제(hydrogenase)의 활성이 유지되어 수소 생산이 증가하게 된다.

- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 황결핍은 황성분이 결핍된 배지에서 미세조류를 배양하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 황결핍 조건에서는 황함유 아미노산인 시스테인과 메테오닌의 합성이 이루어지지 않고 단백질 합성도 저해를 받기 때문에 미세조류의 성장 억제되어 전분축적능력이 향상되며 또한, 광시스템 II(photosystem II)의 활성도 저해되므로 수소 생산이 증가하게 된다.
- [0025] 본 발명의 황결핍 및 CO₂ 농축메커니즘을 통한 미세조류의 전분축적을 증가시키는 방법은 축적된 전분을 이용하여 수소 및 에탄올을 생산할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 전분을 탄소원으로 하여 생산되는 바이오에너지를 제공할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 광발효하여 수소를 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 수소를 회수하는 단계를 포함하는 미세조류에서 수소를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계의 광발효는 22~24℃의 온도에서 120~140 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 배양하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 미세조류의 전분생산을 증가시키는 방법으로 전분이 축적된 미세조류를 혐기조건에서 암발효하여 에탄올을 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생성된 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 미세조류에서 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계의 암발효는 29~31℃의 온도에서 빛을 차단한 상태로 배양하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서, 미세조류에서 전분축적을 증가시키고 축적된 전분을 이용하여 수소 및 에탄올의 생산 수율을 향상시키기 위하여 CO₂ 농축메커니즘 및 황결핍을 이용하여 미세조류를 배양하였다(실험공정 1). 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX 90을 12시간(광):12시간(암) 광주기 조건으로 30 μmol/m²/s세기의 빛에서 5%(v/v) 이산화탄소 및 23℃ 조건으로 TAP-C 배지를 이용하여 배양하였다. 미세조류가 늦은 지수기(late exponential phase)단계에 접어들면 전분축적유도 및 수소생산을 위하여 130 μmol/m²/s세기의 빛을 조사하였으며, CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발시키기 위해 CO₂의 농도를 대기의 수준 (0.035%)으로 낮추어 4시간 동안 세포를 유지시켜 미세조류의 CO₂에 대한 친화도 및 고정화능력을 증가시켰다. 그 다음 다시 5% CO₂를 20시간 동안 재공급하였으며, 이때 전분축적을 가속화하기 위하여 기존의 배지를 TAP-S로 교체하여 황결핍을 동시에 진행하였다. 전분이 축적된 미세조류를 혐기상태에서 배양하여 수소를 생산하기 위해 질소가스를 이용하여 배지 내 산소를 제거한 후 혐기챔버안에서 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 23℃의 온도에서 130 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 광발효(light-fermentation)를 하여 수소를 생산하였다. 실험 공정 1에 의한 방법으로 미세조류에서 자가영양조건에서 광발효(light-fermentation)에 의한 수소를 생산한 결과, CO₂ 농축메커니즘 및 황결핍에 의해 전분축적 능력이 기존의 방법보다 80% 향상되었으며, 미세조류 내 전분축적 능력이 향상됨에 따라 수소의 생산율도 160%(2.6배)향상되었다(도 4).
- [0031] 또한, 실험공정 1에 의한 방법으로 자가영양조건에서 미세조류를 배양하여 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 30℃의 온도에서 암발효(dark-fermentation)를 하여 에탄올을 생산한 결과, 80% 향상되었으며, 미세조류 내 전분축적 능력이 향상됨에 따라 에탄올의 생산율도 80%(1.8배)향상되었다(도 4).
- [0032] 본 발명의 실험공정 1의 방법에 대한 효과를 검증하기 위하여 실험공정 2 및 실험공정3과 비교실험을 실시하였다. 실험공정 2에서는 CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발시키기 위해 CO₂의 농도를 대기의 수준 (0.035%)으로 낮추어 배양하는 단계에서 황성분이 제거된 배지로 교환하여 탄소농축메커니즘과 황결핍을 동시에 진행한 후, 다시 높은 농도의 CO₂를 주입하여 전분축적을 하였으며, 실험공정 3에서는 실험공정 2와 마찬가지로 탄소농축메커니즘과 황결핍을 동시에 진행한 후 계속 낮은 CO₂ 농도에서 배양하여 전분축적을 하였다.
- [0033] 전분이 축적된 미세조류를 혐기적 상태에서 23℃의 온도, 130 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 광발효(light-

fermentation)를 하여 수소를 생산한 결과, 실험공정 2 및 실험공정 3에서 이산화탄소저장 메커니즘의 유발과 황결핍의 동시적용은 전분축적 및 수소생산의 향상효과를 확인할 수 없었으며(도 5 및 도 6), 오히려 대조군보다 낮은 전분축적 및 수소생산성을 보였다. 또한, 전분이 축적된 미세조류를 혐기적 상태에서 30℃의 온도로 빛을 차단시켜 암발효(dark-fermentation)하여 에탄올을 생산한 결과, 수소생산 공정과 마찬가지로, 실험공정 2 및 실험공정 3에서 이산화탄소저장 메커니즘의 유발과 황결핍의 동시적용은 전분축적 및 에탄올 생산의 향상효과를 확인할 수 없었으며(도 5 및 도 6), 오히려 대조군보다 낮은 전분축적 및 에탄올 생산성을 보였다. 이와 같은 결과는 황결핍에 따른 전분축적기작과 CO₂ 농축메커니즘의 유발에 따른 전분축적 기작의 교란에 따른 결과로 추정된다.

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0035] **실시예 1: 미세조류에서 전분축적 및 수소/에탄올 생산 수율을 향상**

[0036] 미세조류에서 전분축적을 증가시키고 축적된 전분을 이용하여 수소 및 에탄올의 생산 수율을 향상시키기 위하여 CO₂ 농축메커니즘 및 황결핍을 이용하여 미세조류를 배양하였다 (실험공정 1).

[0037] 먼저, 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX 90을 30 μmol/m²/s세기의 빛을 12시간(광):12시간(암) 광주기 조건으로 5% CO₂ 및 23℃ 조건에서 TAP-C 배지를 이용하여 배양하였다. 미세조류가 늦은 지수기(late exponential phase)단계에 접어들면 전분축적유도 및 수소생산을 위하여 130 μmol/m²/s세기의 빛을 조사하였으며, CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발시키기 위해 CO₂의 농도를 대기의 수준 (0.035%)으로 낮추어 4시간 동안 세포를 배양시켜 미세조류의 CO₂에 대한 친화도 및 고정화능력을 증가시켰다. 그 다음 다시 5% CO₂를 20시간 동안 재공급하였으며, 이때 전분축적을 가속화하기 위하여 기존의 배지를 TAP-S(표 1)로 교체하여 황결핍을 동시에 진행하였다.

표 1

[0038] TAP-C 및 TAP-S의 배지 조성

TAP-C		TAP-S	
성분	함량(/ ℓ)	성분	함량(/ ℓ)
Tris base	2.42 g	Tris base	2.42 g
TAP-salts (per liter)	25ml	TAP-salts (per liter)	25ml
NH ₄ Cl 15 g		NH ₄ Cl 15 g	
MgSO ₄ H ₂ O 4 g		MgCl ₂ H ₂ O 4 g	
CaCl ₂ H ₂ O 2 g		CaCl ₂ H ₂ O 2 g	
Phosphate solution (per liter)	1ml	Phosphate solution (per liter)	1ml
K ₂ HPO ₄ 288 g		K ₂ HPO ₄ 288 g	
KH ₂ PO ₄ 144 g		KH ₂ PO ₄ 144 g	

Trace elements solution (Hunter trace elements) (per liter)	1mℓ	Trace elements solution (Hunter trace elements) (per liter)	1mℓ
Na ₂ EDTA H ₂ O 50 g		Na ₂ EDTA H ₂ O 50 g	
ZnSO ₄ H ₂ O 22 g		ZnCl ₂ H ₂ O 22 g	
H ₃ BO ₃ 11.4 g		H ₃ BO ₃ 11.4 g	
MnCl ₂ H ₂ O 5 g		MnCl ₂ H ₂ O 5 g	
FeSO ₄ H ₂ O 5 g		FeCl ₃ H ₂ O 5 g	
CoCl ₂ H ₂ O 1.6 g		CoCl ₂ H ₂ O 1.6 g	
CuSO ₄ H ₂ O 1.6 g		CuCl ₄ H ₂ O 1.6 g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ H ₂ O 1.1 g		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ H ₂ O 1.1 g	

[0039] 전분이 축적된 미세조류를 혐기상태에서 배양하여 수소를 생산하기 위해 질소가스를 이용하여 배지 내 산소를 제거한 후 혐기챔버안에서 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 23℃의 온도에서 130 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 광발효(light-fermentation)를 하여 수소를 생산하였다.

[0040] 대조군은 5% CO₂ 조건에서 TAP-S 배지로 교체하여 황결핍에 24시간 배양하였으며, 이후 상기와 같은 방법을 이용하여 혐기용 배양기로 옮긴 후 30 μmol/m²/s세기의 빛 세기에서 광유발을 하여 23℃에서 배양하여 수소를 생산하였다.

[0041] 실험공정 1에 의한 방법으로 자가영양조건에서 미세조류를 배양하여 광발효(light-fermentation)에 의한 수소를 생산한 결과, CO₂ 농축메커니즘 및 황결핍에 의해 전분축적 능력이 기존의 방법보다 80% 향상되었으며, 미세조류 내 전분축적 능력이 향상됨에 따라 수소의 생산율도 160%(2.6배)향상되었다 (도 4).

[0042] 또한, 실험공정 1에 의한 방법으로 자가영양조건에서 미세조류를 배양하여 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 30℃의 온도에서 암발효(dark-fermentation)를 하여 에탄올을 생산한 결과, 80% 향상되었으며, 미세조류 내 전분축적 능력이 향상됨에 따라 에탄올의 생산율도 80%(1.8배)향상되었다 (도 4).

[0043] 비교예 1 : 실험공정 1 및 실험공정 2의 전분축적 및 수소/에탄올 생산성 비교

[0044] 상기 실시예 1의 실험공정 1의 방법에 대한 효과를 검증하기 위하여 다음의 실험공정 2와 비교실험을 실시하였다.

[0045] 실험공정 2에서는 상기 실험공정 1과 동일한 방법으로 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX 90을 TAP-C 배지를 이용하여 배양하였다. 미세조류가 늦은 지수기(late exponential phase)단계에 접어들면 전분축적유도 및 수소생산을 위하여 130 μmol/m²/s세기의 빛을 조사하였으며, CO₂ 농축메커니즘(CCM ; CO₂ concentrating mechanism)을 유발시키기 위해 CO₂의 농도를 대기의 수준 (0.035%)으로 낮추어 4시간 동안 미세조류를 배양하였으며, 이때 전분축적을 가속화하기 위하여 기존의 배지를 TAP-S로 교체하여 황결핍을 동시에 진행하였다. 그 후 다시 5% CO₂를 20시간 동안 재공급하였으며, 실험공정 1과 마찬가지로 전분이 축적된 미세조류를 혐기상태에서 배양하여 수소를 생산하기 위해 질소가스를 이용하여 배지 내 산소를 제거한 후 혐기챔버안에서 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 23℃의 온도에서 130 μmol/m²/s의 빛 세기 조건으로 광발효(light-fermentation)를 하여 수소를 생산하였다.

[0046] 또한, 실험공정 1 및 실험공정 2의 방법으로 미세조류를 배양하여 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 30℃의 온도에서 암발효(dark-fermentation)를 하여 에탄올을 생산하였다.

[0047] 그 결과, 실험공정 2에서의 CO₂ 농축메커니즘의 유발과 황결핍의 동시적용은 전분축적 및 수소/에탄올 생산의 향상효과를 확인할 수 없었으며(도 5), 오히려 실시예 1의 대조군보다 낮은 전분축적 및 수소/에탄올 생산성을 보였다. 이와 같은 결과는 황결핍에 따른 전분축적 기작과 CO₂ 농축메커니즘의 유발에 따른 전분축적 기작의 교란

에 따른 결과로 추정된다.

[0048] **비교예 2 : 실험공정 1 및 실험공정 3의 전분축적 및 수소/에탄올 생산성 비교**

[0049] 상기 실시예 1의 실험공정 1의 방법에 대한 효과를 검증하기 위하여 다음의 실험공정 3과 비교실험을 실시하였다.

[0050] 실험공정 3에서는 상기 실험공정 1과 동일한 방법으로 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) UTEX 90을 TAP-C 배지를 이용하여 배양하였다. 미세조류가 늦은 지수기(late exponential phase)단계에 접어들면 전분축적유도 및 수소생산을 위하여 $130 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 세기의 빛을 조사하였으며, CO_2 농축메커니즘(CCM ; CO_2 concentrating mechanism)을 유발시키기 위해 CO_2 의 농도를 대기의 수준 (0.035%)으로 낮추어 24 시간 동안 세포에 노출시켰으며, 이때 전분축적을 가속화하기 위하여 기존의 배지를 TAP-S로 교체하여 황결핍을 동시에 진행하였다. 전분축적이 완료된 후에는 실험공정 1과 마찬가지로 전분이 축적된 미세조류를 혐기상태에서 배양하여 수소를 생산하기 위해 질소가스를 이용하여 배지 내 산소를 제거한 후 혐기챔버안에서 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 23°C 의 온도에서 $130 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 의 빛 세기 조건으로 광발효(light-fermentation)를 하여 수소를 생산하였다.

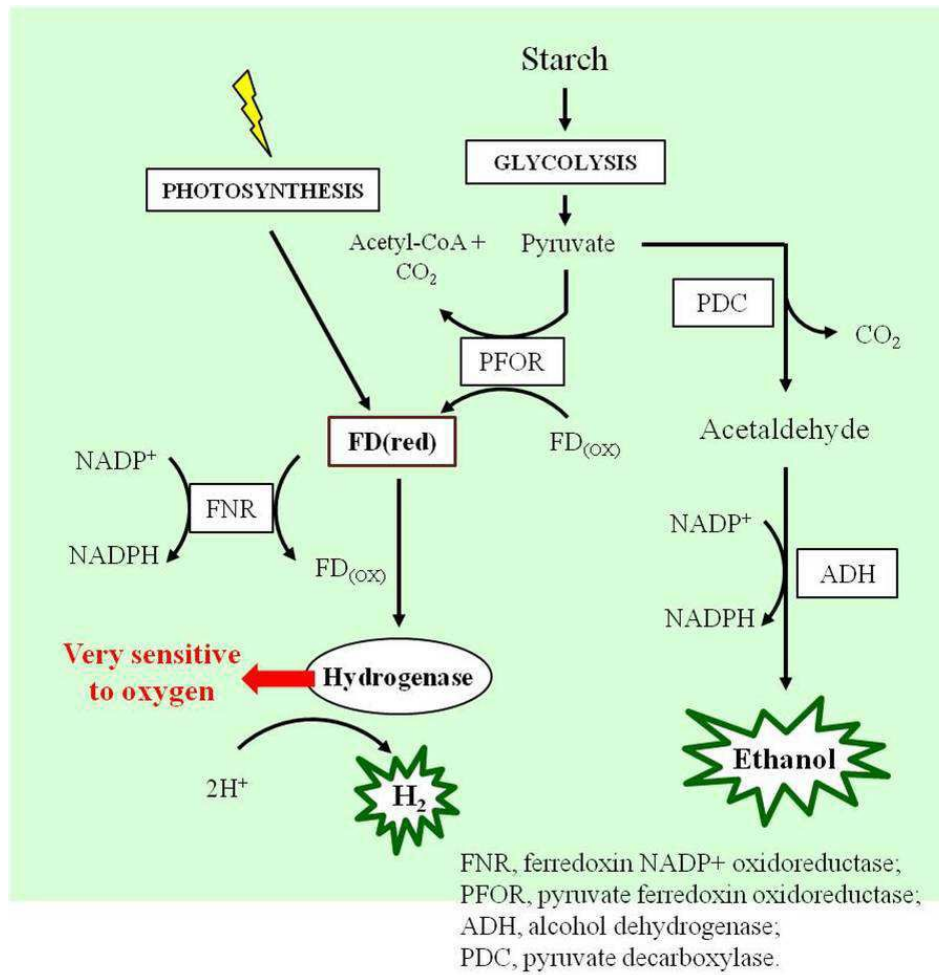
[0051] 또한, 실험공정 1 및 실험공정 3의 방법으로 미세조류를 배양하여 세포배양액을 혐기용 배양기로 옮긴 다음 30°C 의 온도에서 암발효(dark-fermentation)를 하여 에탄올을 생산하였다.

[0052] 그 결과, 실험공정 3의 CO_2 농축메커니즘의 유발과 황결핍의 동시적용은 비교예 1의 실험공정 2와 마찬가지로 전분축적 및 수소/에탄올 생산의 향상효과를 확인할 수 없었으며(도 6), 오히려 실시예 1의 대조군보다 낮은 전분축적 및 수소/에탄올 생산성을 보였다. 이를 통하여 낮은 CO_2 농도를 매개로 CO_2 농축메커니즘 및 영양소결핍(황결핍)에 의한 전분축적공정의 동시적용은 오히려 전분축적 및 수소/에탄올 생산에 있어서 효과적이지 못함을 확인하였다.

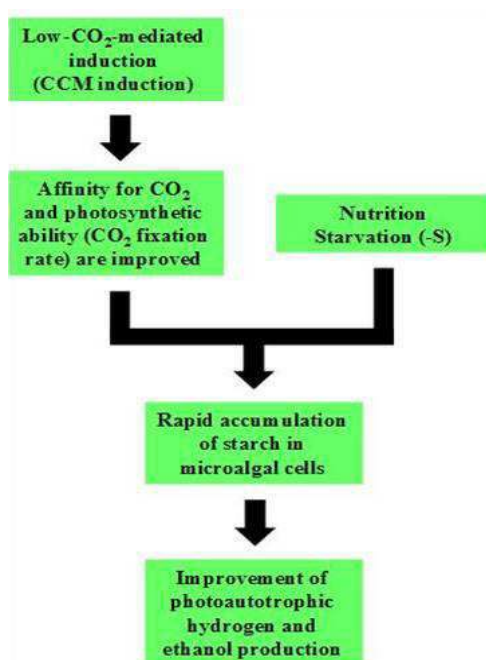
[0053] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

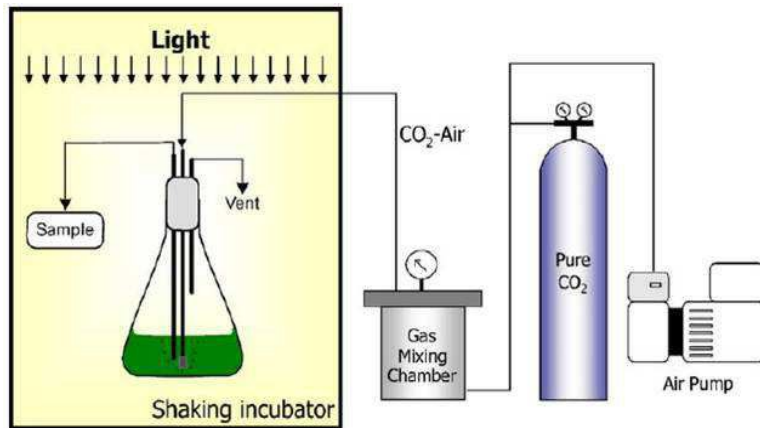
도면1



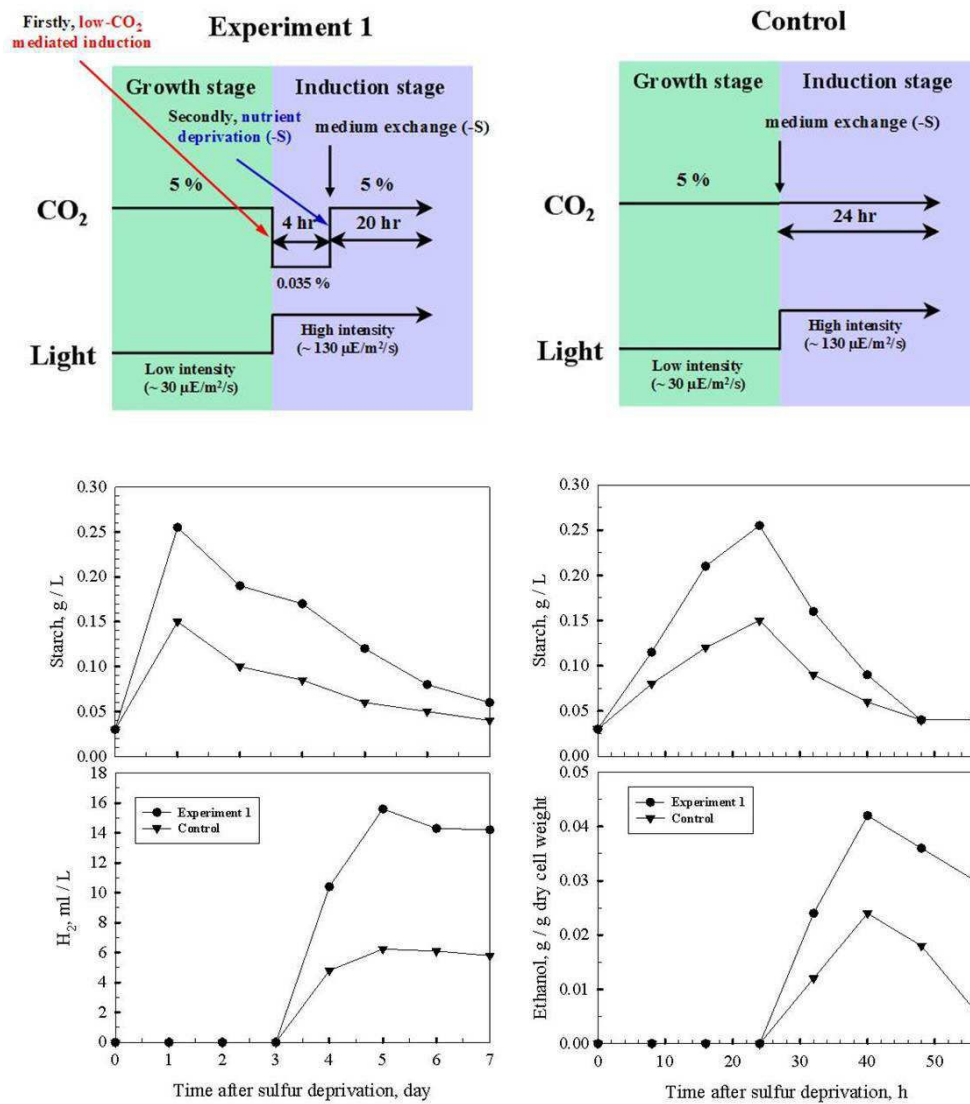
도면2



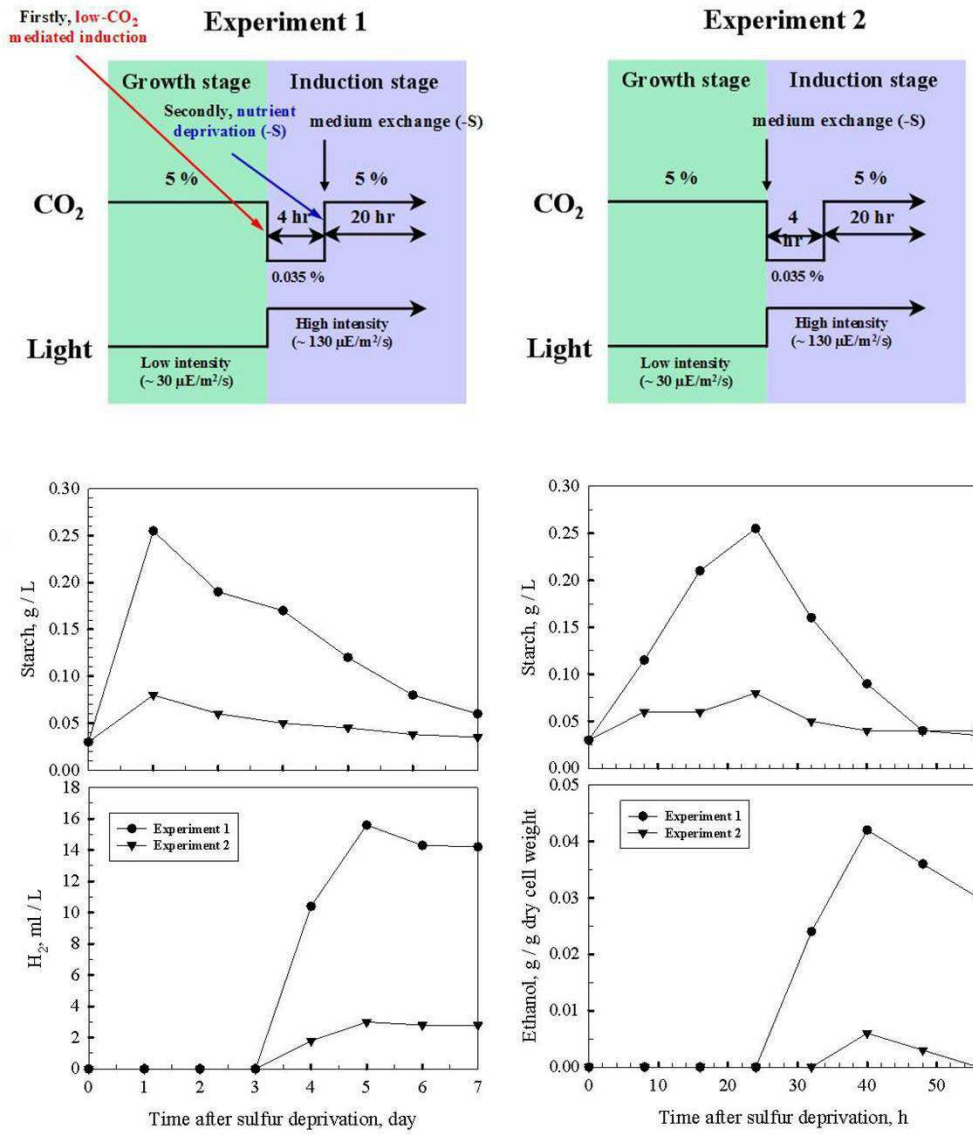
도면3



도면4



도면5



도면6

