



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0018171
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0103216
(22) 출원일자 2016년08월12일
심사청구일자 2016년08월12일

(71) 출원인
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정문근
대한민국 34049 대전광역시 유성구 엑스포로 448
(전민동, 엑스포아파트)407동 1101호
권중희
경상남도 진주시 내동로348번길 10 (가좌동, 가좌
그린빌주공아파트) 104동 302호
(74) 대리인
특허법인 플러스

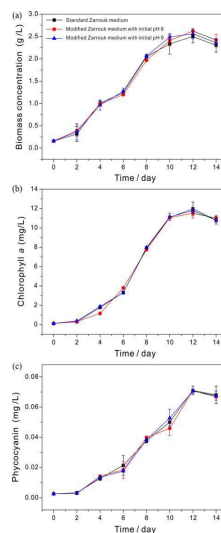
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 강염기를 이용한 이산화탄소 고정을 통한 미세조류 배양방법

(57) 요약

본 발명은 강염기를 이용하여 고정된 이산화탄소를 이용한 미세조류의 배양 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미세조류용 배지를 강염기로 전처리하고 이산화탄소를 공급하여 이산화탄소를 탄산염의 형태로 고정한 후 미세조류를 접종하여 배양하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 강염기를 이용하여 배지의 pH를 조절하므로 화학적 멸균이 가능하며, 이산화탄소를 고정화하므로 화학적으로 멸균된 배지를 이용하여 미세조류의 효과적인 배양이 가능하다. 또한, 화학적인 방법을 통한 이산화탄소 고정 방법에 의해 미세조류를 배양하므로 생물학적 이산화탄소 공정에 비해 높은 효율성을 나타내고 안료 등 유용 물질 생산에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK1607-D06

부처명 한국화학연구원

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 (Study Group) CO₂ to Food and Nutrients (CTF) Study Group

기 여 율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2016.07.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711031197

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원

연구과제명 미세조류를 활용한 고기능성 생리활성물질 생산/전환기술 개발과 광합성 생물합성공장 개

발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 배지에 강염기로 전처리하는 단계;
 - b) 상기 전처리된 배지에 이산화탄소를 공급하여 이산화탄소를 탄산염으로 고정화 하는 단계; 및
 - c) 상기 고정화된 탄산염을 포함하는 배지에 미세조류(microalgae)를 접종하여 배양하는 단계;
- 를 포함하는 이산화탄소 고정을 통한 안료 생산 효율이 향상된 미세조류(microalgae) 배양방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 강염기는 수산화나트륨인 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 미세조류는 *Nanochloropsis*, *Porphyridium* 또는 *Spirulina* 속인 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 탄산염은 중탄산나트륨(NaHCO_3) 또는 탄산나트륨(Na_2CO_3)인 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 배지는 표준 Zarrouk 배지에서 중탄산나트륨 성분이 포함되지 않은 변형된 Zarrouk 배지인 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 6

제 3항에 있어서,
상기 *Nanochloropsis* 속의 미세조류는 *Nannochloropsis gaditana*인 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,
상기 c) 단계에서 미세조류의 배양은 pH 7.5 내지 8.5의 범위에서 배양되는 것을 특징으로 하는 미세조류 배양 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,
상기 c) 단계에서 이산화탄소가 포함된 공기를 연속적으로 공급하는 것을 특징으로 하는 미세조류 배양방법.

청구항 9

제 6항의 미세조류 배양방법을 통해 배양되어 안료 생산 효율이 향상된 개량 미세조류를 포함하는 바이오매스 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 강염기를 이용하여 고정된 이산화탄소를 이용한 미세조류의 배양 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미세조류용 배지를 강염기로 전처리하고 이산화탄소를 공급하여 이산화탄소를 탄산염의 형태로 고정한 후 미세조류를 접종하여 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] *Spirulina platensis*는 남조류(blue-green algae)에 속하며 다양한 유용 특성을 갖고 있는 유용한 생물체이다. *Spirulina*는 아프리카, 아메리카 및 아시아 대륙에서 수세기 동안 식품으로 사용되어 왔다. *Spirulina*는 고품질 단백질(proteins), 탄수화물(carbohydrates), 지질(lipids) 및 다른 무수한 필수 영양분인 비타민, 항산화 물질 등을 포함하고 있다. 현재로서는 *Spirulina*의 배양 생산은 개선되고 있는 상황에 있지만, 배양과 관련된 비용은 여전히 매우 높아 부담이 되는 상황이다. 그중 중탄산(bicarbonate)은 트리아실글리세롤(triacylglycerol) 및 전분(starch)의 생산을 위한 원료로 사용될 뿐만 아니라 *Spirulina*의 생존에 필수적인 알칼리 조건을 유지하는 데에도 도움을 주고 있다.

[0003] *Nannochloropsis*는 바이오디젤(biodiesel) 생산을 위한 주목받는 미세조류 중 하나로, 높은 바이오매스 축적율 및 지질 함량을 갖고 있다. *Nannochloropsis* 균주는 violaxanthin, vaucheriaxanthin 에스테르, xanthophylls 및 카로틴(carotene)을 포함하는 여러 부수적인 안료를 함유하고 있기 때문에 다양한 광원 조건에서 적응할 수 있다.

[0004] *Porphyridium cruentum*은 지방산, 지질, 세포벽 형성을 위한 다당체 및 안료와 같은 물질 생산이 가능한 것으로 고려되고 있는 잠재적인 세포 공장으로, 바이오매스에 다당체를 57% 함유하고 있는 것으로 조사된 바 있다. 이로부터 바이오매스와 외부 다당체를 모아 잠재적 바이오디젤 및 의약품 원료로 활용이 가능하다.

[0005] 이산화탄소 고정(carbon dioxide fixation)은 생물이 이산화탄소를 흡수해서 유기물로 전환되는 것으로, 기구의 차이에 기초하여 무기영양생물이 수행하는 광합성, 세균형 광합성, 화학합성, 무기영양생물 및 유기영양생물에서 모두 볼 수 있는 이산화탄소 암고정으로 크게 분류할 수 있다. 광합성과 세균형 광합성은 모두 동화에 필요한 에너지를 빛으로부터 얻는다는 점은 동일하나, 전자는 동화시 산소를 발생시킨다는 점에서 후자와 구별된다. 화학 합성은 무기물의 산화 에너지를 이용하여 이산화탄소 고정을 하는 경우를 의미한다. 또한 유기영양을 하는 세균이나 동물조직에서도 이산화탄소 첨가 반응에 의한 유기화합물의 탄소수의 증가가 알려져 이를 이산화탄소 암고정이라고 한다. 무기영양생물에는 이산화탄소 고정 및 이와 연결되는 이산화탄소 수용체의 재생을 가능하게 하는 회로가 존재한다. 이들 회로로는 환원적 5탄당 인산화로, C4 경로, 다육식물 유기산 대사 및 환원적 카르본산화로 등이 알려져 있다.

[0006] 산업혁명 이후 대두된 온실가스에 의한 지구온난화와 기후변화는 과학, 환경 분야는 물론, 국제 경제와 정치 분야에서도 중요한 이슈로 등장하고 있다. 특히 온실가스 발생량의 68 %를 차지하는 이산화탄소는 주요 온실가스 중에 하나로 알려지면서 이산화탄소의 배출방법이나 제거에 관심이 집중되고 있다. 이산화탄소의 제거방법에는 물리적, 화학적 탄소고정방법이 개발되어 사용되고 있으나, 대부분 에너지 소모가 크고 넓은 공간이 필요하며 탄소 고정 후 자원화가 어려운 한계가 있다. 따라서 에너지 효율을 높이면서 친환경적인 방법 개발의 필요성이 지속적으로 요구되고 있다.

[0007] 이에 대한 대안으로 광합성을 하는 미세조류를 이용한 미생물학적 고정법이 최근 새롭게 주목을 받고 있다. 미세조류는 전 세계적으로 널리 분포되어 있고, 성장속도가 육상식물 보다 훨씬 빠르며, 환경적 응력이 뛰어나 이산화탄소 고정에 유리하며, 운영비용 또한 낮은 장점이 있다.

[0008] 탄산 이온 형태로 고정화된 이산화탄소는 미세조류의 성장에 필요한 탄소원으로 바이오연료, 의약품, 화장품, 영양식품의 원료로 쓰이는 미세조류의 바이오매스(biomass) 생산에 활용될 수 있다. 하지만, 미세조류에 의한 생물학적 이산화탄소 고정속도는 물리적, 화학적 탄소고정 방법에 비해 낮기 때문에, 미세조류 성장에 필요한 충분한 탄소원을 공급하면서 동시에 대기로 손실되는 이산화탄소의 양을 줄이는 기술의 개발이 절실한 상황이다.

[0009] 대한민국 공개특허공보 2015-0106725 A에 수산화나트륨과 이산화탄소를 이용하여 상술한 바와 같은 *Spirulina platensis*의 미세조류에 탄소원을 공급하는 방법과 수산화나트륨의 멸균 특징을 이용하여 효율성을 개선하고자

하였으나, 바이오매스의 생산량은 종래의 통상적인 배양 방법을 이용하였을 때와 비교하여 크게 향상되지 못한 한계가 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 2013-0093418 A.
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 2013-0036505 A.
(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 2011-0111150 A.
(특허문헌 0004) 대한민국 공개특허공보 2015-0106725 A.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명에서는 이산화탄소의 고정화 효율을 높여 공기 중의 이산화탄소 손실을 낮춤으로써 환경적인 측면을 고려함과 동시에 고정화된 이산화탄소를 미세조류 배양에 활용하여 효율적인 성장과 함께 유용 성분의 생산량을 향상시킬 수 있도록 하고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 a) 배지에 강염기로 전처리하는 단계; b) 상기 전처리된 배지에 이산화탄소를 공급하여 이산화탄소를 탄산염으로 고정화 하는 단계; 및 c) 상기 고정화된 탄산염을 포함하는 배지에 미세조류(microalgae)를 접종하여 배양하는 단계;를 포함하는 이산화탄소 고정을 통한 안료 생산 효율이 향상된 미세조류(microalgae) 배양방법에 관한 것이다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 미세조류 배양방법을 통해 배양되어 안료 생산 효율이 향상된 개량 조류를 포함하는 바이오매스 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 강염기를 이용하여 배지의 pH를 조절하므로 화학적 멸균이 가능하며, 이산화탄소를 고정화하므로 화학적으로 멸균된 배지를 이용하여 미세조류의 효과적인 배양이 가능하다. 또한, 화학적인 방법을 통한 이산화탄소 고정 방법에 의해 미세조류를 배양하므로 생물학적 이산화탄소 공정에 비해 높은 효율성을 나타내고 안료 등 유용 물질 생산에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 수산화나트륨 수용액에 의한 멸균부터 배양까지의 화학 흡수 전체 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 (a) 0.2 M 수산화나트륨을 포함하는 변형된 Zarrouk 배지에 이산화탄소 주입을 통한 흡수를 통해 반응기에서 pH의 변화(실선), 반응기에서 배출되는 이산화탄소의 농도(점선) 및 (b) 배지에 흡수된 전체 무기 탄소 농도의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 3은 변형된 Zarrouk 배지(pH 8, 9) 및 표준 Zarrouk 배지에서 자란 *Spirulina platensis* 균주의 (a) 바이오매스, (b) C-phyocyanin 및 (c) chlorophyll a를 나타낸 것이다.
- 도 4는 변형된 Zarrouk 배지(modified SOT) 및 f/2 배지에서 자란 *Nannochloropsis gaditana* 균주의 성장 곡선을 나타낸 것이다.
- 도 5는 (a) 변형된 Zarrouk 배지(modified SOT) 및 (b) f/2 배지에서 *Porphyridium cruentum* 균주를 배양하였을 때 바이오매스의 차이가 색상으로 구별됨을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 a) 배지에 강염기로 전처리하는 단계; b) 상기 전처리된 배지에 이산화탄소를 공급하여 이산화탄소를 탄산염으로 고정화 하는 단계; 및 c) 상기 고정화된 탄산염을 포함하는 배지에 미세조류(microalgae)를 접종하여 배양하는 단계를 포함하는 이산화탄소 고정을 통한 안료 생산 효율이 향상된 미세조류(microalgae) 배양방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명에서 상기 강염기는 제한되지는 않으나 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH) 등 미세조류의 성장 조건인 알칼리성과 멸균이 효과적으로 이루어질 수 있는 강알칼리성을 유지할 수 있는 염기를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 수산화나트륨을 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 강염기는 배지를 높은 pH 범위로 유지함으로써, 자연적인 멸균 효과를 얻을 수 있으며, 이산화탄소 분자와 반응하여 안정된 탄산염을 형성할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 배지에 전처리를 위해 사용될 수 있는 염기의 농도는 0.05 내지 1.0 M일 수 있으며 종계는 0.1 내지 0.4 M일 수 있다. 염기의 농도가 상기 범위를 벗어날 경우 멸균이 되지 않거나 미세조류가 강염기에 의해 상당량 사멸되어 미세조류가 성장하지 못하여 이산화탄소의 고정화 효율이 감소할 수 있다. 특히 0.1 내지 0.4 M의 염기 농도에서 배지를 효과적으로 멸균시킴과 동시에 미세조류가 염기 조건에서도 사멸하지 않고 빠르게 성장하여 고정화된 탄산염을 경제적으로 처리할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 탄산염은 제한되지는 않으나 중탄산나트륨(NaHCO_3) 또는 탄산나트륨(Na_2CO_3)일 수 있다. 상기 탄산염은 미세조류에 의해 용이하게 흡수되어 탄소원으로 활용될 수 있는 장점이 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 조류는 제한되지는 않으나 *Nanochloropsis*, *Porphyridium* 또는 *Spirulina* 속에 속한 종에서 선택하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 *Nannochloropsis gaditana*, *Porphyridium cruentum* 또는 *Spirulina platensis*를 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 바이오매스 및 클로로필 a의 생산량을 현저히 높일 수 있는 점에서 *Nannochloropsis gaditana*를 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 배지는 제한되지는 않으나 표준 Zarrouk 배지에서 중탄산나트륨 성분이 포함되지 않은 변형된 Zarrouk 배지를 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 c) 단계의 배양시 종계는 0.01 내지 0.5 M, 더욱 종계는 0.03 M 내지 0.3 M, 가장 종계는 0.05 내지 0.2 M의 수산화나트륨 용액을 이산화탄소 투입량에 대하여 화학양론비 내외로 추가로 첨가하여, 미세조류가 잘 성장할 수 있는 pH 조건인 7.5 내지 8.5을 유지할 수 있으며(화학식 1), 이 경우 탄소원인 탄산염의 공급을 보다 효율적이고 연속적으로 유지하고, 세포에 대한 부작용을 거의 나타내지 않음으로써, 바이오매스, 안료 등의 유용 산물의 생산량을 크게 향상시킬 수 있어 더욱 좋다.
- [0023] [화학식 1]
- [0024] $\text{NaOH} + \text{CO}_2 = \text{NaHCO}_3$
- [0025] $2 \text{NaOH} + \text{CO}_2 = \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$
- [0026] 본 발명의 비한정적인 일 예로서, pH 측정장치를 배양기에 설치하고, 연속적으로 배양기 내의 pH 측정을 통해 배양기 내의 pH가 7.5 내지 8.5의 범위내로 유지되도록 상기 수산화나트륨 용액을 배양기에 연속적 또는 비연속적으로 투입할 수 있다. 수산화나트륨 용액의 투입 양 및 투입 시점은 이산화탄소와의 반응을 통한 탄산염으로의 전환이 고려될 수 있으나, 배양기 내에 배양되는 미세조류의 최적 pH에 기초하여 결정될 수 있으며, 배양기에 결합된 제어기를 통해 조절될 수 있다. 투입되는 수산화나트륨 용액은 강염기일 경우 배양기에서 배양되는 미세조류에 국소적으로 사멸을 일으킬 수 있으므로 0.1 M 미만의 농도로 투입되는 것이 좋고, 0.0001 내지 0.02 M의 농도로 투입되는 것이 미세조류의 사멸을 일으키지 않고 배양기의 pH를 조절할 수 있는 점에서 바람직하다.
- [0027] 본 발명의 비한정적인 일 예로서, 이산화탄소의 공급은 기포를 발생시켜 공급될 수 있으며, 기포를 발생시킬 수 있는 수단이라면 제한없이 사용될 수 있으나, 미세조류의 탄소원으로 사용하기 위해서 미세기포가 바람직할 수 있다. 미세기포의 발생을 위해 방법으로는 미세노즐을 통한 기포 토출방법, 고속 선회식 기포 발생방법 등 공지의 방법 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한받지 않는다.
- [0028] 본 발명에서는 미세조류의 배양중 이산화탄소가 포함된 공기를 배양기에 연속적 또는 비연속적으로 공급할 수 있으며, *Spirulina platensis*의 경우 0.01~5% (v/v)의 이산화탄소가 포함된 공기를 공급할 수 있으며, 유속으로는 50 내지 500 mL/min의 유속으로 공급할 수 있다. *Nannochloropsis gaditana* 및 *Porphyridium cruentum*의 경우 1~5% (v/v)의 이산화탄소를 포함하는 공기를 공급할 수 있으며, 유속으로는 50 내지 500 mL/min의 유속으로 공급할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 비한정적인 일 예로서, 배양기 내에 계면활성제가 부가될 수 있다. 이산화탄소가 탄산염으로 효과적으로 전환되기 위해서는 이산화탄소가 배양액내에 고농도로 존재하여야 하며, 계면활성제의 부가에 의해 배양액 내 이산화탄소의 농도가 현격하게 증가할 수 있다. 계면활성제로는 알킬 폴리글루코사이드계 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 (C6-C14)알킬-폴리글루코사이드[(C6-C12)alkyl-polyglucoside]의 당류계 계면활성제가 사용될 수 있다. 사용함량으로는 전체 배양액 중 0.001 내지 0.5 중량%, 총계는 0.005 내지 0.1 중량%일 수 있으나 상기 사용함량은 당류계 계면활성제 알킬기의 탄소수에 의존하는 것이므로 상기 함량에 제한받지 않는다.
- [0030] 상기 당류계 계면활성제는 세포 독성이 거의 없어 미세조류의 배양에 바람직하게 사용할 수 있고, 생산된 미세조류와 함께 추가적인 정제없이 식품, 화장품 등의 용도에 사용할 수 있는 장점이 있다. 상기 당류계 계면활성제를 배양기에 부가함에 따라 이산화탄소 미세기포를 배양액 내에 효과적으로 안정화시켜 고농도로 장시간 체류할 수 있으며, 체류하는 이산화탄소는 탄산염으로 효과적으로 전환되어 이산화탄소 배출량이 최소화될 수 있다.
- [0031] 또한 본 발명은 상기 미세조류 배양방법을 통해 배양되어 안료 생산 효율이 향상된 개량 조류를 포함하는 바이오매스 조성물에 관한 것이다. 상기 바이오매스 조성물은 제한되지는 않으나 *Nannochloropsis* 속의 미세조류를 배양하여 얻을 수 있으며, 보다 바람직하게는 *Nannochloropsis gaditana*를 변형된 Zarrouk 배지에서 배양하는 것이 안료로 사용될 수 있는 클로로필 a(Chlorophyll a)의 양을 200% 이상 증가시킬 수 있어 더욱 좋다.
- [0032] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니고, 당업계에서 통상적으로 주지된 변형, 치환 및 삽입 등을 수행할 수 있으며, 이에 대한 것도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0033] [균주 및 시약]
- [0034] - *Spirulina platensis* strain: Korea Marine Microalgae Culture Center (KMMCC)에서 분양 받아 사용하였다.
- [0035] - *Nannochloropsis gaditana* CCMP526 strain: National Center for Maine Algae and Microbiota에서 분양 받아 사용하였다.
- [0036] - *Porphyridium cruentum* strain: National Center for Maine Algae and Microbiota에서 분양 받아 사용하였다.
- [0037] - 표준 Zarrouk 배지(Zarrouk et al. 1966; pH 8.7): 16.8 g/L NaHCO₃, 0.5 g/L K₂HPO₄, 2.5 g/L NaNO₃, 1.0 g/L K₂SO₄, 1.0 g/L NaCl, 0.2g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.04 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 0.01 g/L FeSO₄ · 7H₂O, 0.08 g/L EDTA, 및 1 mL micronutrient solution.
- [0038] Micronutrient solution: 2.86g/L H₃BO₃, 1.81g/L MnCl₂ · 4H₂O, 0.222 g/L ZnSO₄ · 4H₂O, 0.0177 g/L Na₂MoO₄, and 0.079 g/L CuSO₄ · 5H₂O.
- [0039] - TYG 배지: 5 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 1 g/L glucose, 1 g/L K₂HPO₄, 15 g/L Bacto™ agar.
- [0040] - LB 배지: 25 g/L LB Broth, 15 g/L Bacto™ agar.
- [0041] - 변형된 f/2 배지(Guillard and Ryther, 1962): 30 g/L sea salts, 375 mg/L NaNO₃, 5 mg/L, NaH₂PO₄ · 9H₂O, 3.15 mg/L FeCl₃ · 6H₂O, 4.36 mg/L Na₂EDTA · 2H₂O, 9.8 μg/L CuSO₄ · 5H₂O, 6.3 μg/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 22 μg/L ZnSO₄ · 7H₂O, 10 μg/L CoCl₂ · 6H₂O, 180 μg/L MnCl₂ · 4H₂O, 0.5 μg/L 비타민 B12, 0.5 μg/L biotin, 및 100 μg/L thiamine hydrochloride.
- [0042] - 배출 CO₂ 농도 측정: BCP-CO₂ sensor(BlueSens GmbH, Herten, Germany).
- [0043] - pH 레벨 변화 측정: pH meter(Horiba Co., Ltd., Kyoto, Japan)
- [0044] [실시예 1] 변형된 Zarrouk 배지 제작 및 수산화나트륨을 이용한 이산화탄소의 화학적 흡수
- [0045] 이산화탄소의 화학적 흡수를 위하여, 상기 표준 Zarrouk 배지에서 중탄산나트륨(sodium bicarbonate, NaHCO₃) 성분이 포함되지 않은 변형된 Zarrouk 배지(modified SOT)에 0.2 M 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 pH 13의 농

도가 되도록 하였다. 이 때 수산화나트륨의 농도는 표준 Zarrouk 배지에서 중탄산염(bicarbonate)의 양과 일치하도록 하였다. 0.2 M 수산화나트륨의 멸균 효과와 시간의 함수 관계는 상기 TYG 및 LB를 이용하여 통상적인 $n=10$ 에서 CFU(colony-forming unit) 측정방법을 통해 검증하였다. NaOH를 이용하여 멸균한 후 1시간 배양하고 콜로니를 확인한 결과, 배지 내에 미생물이 존재하지 않는 것을 확인하였다.

[0046] 도 1의 모식도에서와 같이, 2 L의 평면 패널 광합성 시스템에 변형된 Zarrouk 배지(Mod. Zarrouk medium)를 첨가하고, 반응기 끝에 연결된 튜브를 통해 10% (v/v) 이산화탄소를 포함하는 공기를 200 mL/min의 일정한 유속으로 주입한 후 혼합하였다. 그 결과 도 2에서와 같이 pH는 13에서 8보다 낮도록 비선형적으로 감소하였으며, 10 시간 동안 이산화탄소를 주입한 결과 9.87%에서 포화 상태에 도달하였다(도 2a). 10 시간 동안 1 L의 배지에 흡수된 이산화탄소의 양은 154.2 mmol로 측정되었다(도 2b).

[0047] [실시예 2] *Spirulina platensis* 균주의 배양

[0048] 상기 실시예 1에서 멸균/중화된 배양기를 25 °C로 유지하고 *Spirulina platensis* 균주를 접종한 후 배양하였다. 배양 중에는 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광원이 지속적으로 조사되었으며, 0.04% (v/v)의 이산화탄소를 포함하는 공기가 200 mL/min의 유속으로 주입되었다.

[0049] 2주일 동안 배양 결과 2.5 g/L의 바이오매스가 광독립 영양체의(photoautotrophic) 조건에서 축적되었으며, 안료(pigment)의 원료로 사용될 수 있는 안료-단백질 복합체인 피코시아닌(phycocyanin)의 생산량이 유지된 것을 확인하였다(도 3).

[0050] 상기 결과로부터, 공기 중의 이산화탄소를 강염기를 이용하여 고정하여 미세조류인 *Spirulina platensis*의 배양에 활용한 결과, 바이오매스의 생산과 함께, 안료 또한 생산하는 효과를 얻었음을 확인하였다.

[0051] [실시예 3] *Nannochloropsis gaditana*의 배양

[0052] 도 1의 모식도에서와 같이, 두 세트의 2 L의 평면 패널 광합성 시스템을 준비하여 변형된 Zarrouk 배지(Mod. Zarrouk medium or modified SOT) 및 변형된 f/2 배지를 각각 첨가하고, 반응기 끝에 연결된 튜브를 통해 3% (v/v)의 이산화탄소가 포함된 공기를 200 mL/min의 일정한 유속으로 주입한 후 혼합하였다. 배지에 각각 *Nannochloropsis gaditana* CCMP526를 접종한 후 배양하였다.

[0053] 도 4에서와 같이 750 nm에서 광밀도를 측정(Illuminance Transmitter LXT-401, Rixen Tech Co.)한 결과 일반적으로 사용하는 f/2 배지를 이용하여 배양하였을 경우, 초기 성장 속도는 빠르지만, 이후 바이오매스의 축적이 정체되는 경향을 나타내었으며, 변형된 Zarrouk 배지(modified SOT)를 사용한 경우, 완전한 지수 성장의 형태를 나타내어 7일 경과 이후 바이오매스 축적 속도가 증가하는 것을 확인하였다.

[0054] 특히 바이오매스 이외에 클로로필 a(chlorophyll a)의 함량의 경우 8일 배양 후 측정시, 변형된 Zarrouk 배지(modified SOT)를 사용하였을 때 f/2 배지를 이용한 경우에 비해 3배 이상 증가하는 것으로 나타났다.(변형된 Zarrouk 배지 5.204 Chl a $\mu\text{g/ml}$, f/2 배지 1.716 Chl a $\mu\text{g/ml}$). 상기 결과로부터, *Nannochloropsis gaditana*를 미세조류로 배양할 경우 변형된 Zarrouk 배지가 클로로필 a의 대량생산에 특히 유리한 것으로 나타났으며, 이를 통해 화장품의 첨가제로 사용될 수 있는 클로로필 a를 공기 중의 이산화탄소의 고정을 통한 탄소원 공급을 통해 고수율로 생산할 수 있으며, 이는 산업상으로 매우 유용할 것으로 기대된다.

[0055] [실시예 4] *Porphyridium cruentum*의 배양

[0056] 실시예 3과 같은 방법으로, 두 세트의 500 mL의 원통형 광합성 시스템을 준비하여 각각 변형된 Zarrouk 배지(Mod. Zarrouk medium or modified SOT)과 변형된 f/2 배지를 첨가하고, 반응기 끝에 연결된 튜브를 통해 3% (v/v)의 이산화탄소가 포함된 공기를 200 mL/min의 일정한 유속으로 주입한 후 혼합하였다. 배지에 각각 *Porphyridium cruentum*를 접종한 후 배양하였다.

[0057] 그 결과 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 일반적으로 사용하는 f/2 배지 대신 변형된 Zarrouk 배지를 사용하여 배양한 경우, 바이오매스가 4.7배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0058] [실시예 5] pH 적정을 통한 *Spirulina platensis* 균주의 배양

[0059] 실시예 2에서 3 % (v/v)의 이산화탄소를 포함하는 공기를 200 mL/min의 일정한 유속으로 중화기에 주입한 후 혼합하면서 반응기 상부 주입구에 0.01 M 수산화나트륨(NaOH)을 동시에 첨가하여 배양시간동안 배양액의 pH가 8.2이 되도록 배양하는 것을 제외하고 나머지는 동일하게 하여 2 주간 배양하였다.

[0060] *Spirulina platensis* 균주를 2 주간 배양한 실시예 2 및 5에 있어서, 상기 실시예 2의 경우 10일 정도 경과 후 바이오매스의 양이 거의 포화된 반면, 상기 실시예 5의 경우, 염기의 적정을 통해 *Spirulina platensis*의 배양을 위한 최적 pH가 유지됨에 따라 8일 정도 경과 후 바이오매스가 포화되어 더 이상 증가되지 않는 결과를 확인하였다.

[0061] 상기 결과로부터, 염기 적정을 동시에 수행하여 배양할 경우 이산화탄소 공급을 통해 생성되는 탄산에 의한 배양액내 pH의 감소를 저해할 수 있고, 배양액내 용존된 탄산은 적정되는 염기에 의해 탄산염으로 전환됨에 따라 미세조류의 탄소원으로 활용될 수 있으며, 동시에 미세조류 배양에 필요한 최적 pH로 유지할 수 있음을 알 수 있다. 특히 염기 적정을 통해 2일 정도 빠르게 동일한 수준의 바이오매스를 얻을 수 있었으며, 이 때 수득되는 클로로필 a와 피코시아닌의 양 또한 하기 표 1과 같이 증가한 것을 확인하였다.

[0062] 이로부터, 상기 염기의 적정 방법을 대량 생산 방법 등에 적용할 경우, 일정 기간 내에 *Spirulina platensis* 균주 배양 생산성을 크게 증가시킬 수 있는 장점이 있고, 이로부터 얻을 수 있는 바이오매스, 클로로필 a 및 피코시아닌의 양 또한 증가하게 되어 높은 경제성을 얻을 수 있는 장점을 추가로 얻을 수 있다.

[0063] [실시예 6] 알킬 폴리글루코사이드 함유 배양액에서 *Nannochloropsis gaditana*의 배양

[0064] 배지는 변형된 Zarrouk 배지(Mod. Zarrouk medium or modified SOT)를 사용하고, 3% (v/v) 이산화탄소를 포함하는 공기를 50 mL/min, 배지 내에 0.01 중량%의 농도로 알킬 폴리글루코사이드계 계면활성제인 Glucopon 215UP를 추가한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 조건으로 *Nannochloropsis gaditana* CCMP526를 접종하고 배양하였다.

[0065] 먼저 변형된 Zarrouk 배지에서 이산화탄소의 화학적 흡수시 실시예 1에서는 pH는 13에서 8으로 감소되어 탄산염으로 전환되기까지 약 10시간 가량 소요되었으나 Glucopon 215UP가 추가된 실시예 6에서는 약 6시간에 pH 8로 감소되어 대부분의 수산화나트륨이 탄산염으로 전환되었다.

[0066] 또한, 변형된 Zarrouk 배지를 사용한 실시예 3에 비해 이산화탄소의 공급속도가 낮았음에도 불구하고, 동일 배양시간 대비 바이오매스 및 클로로필 a(chlorophyll a)의 함량은 실시예 3과 동등하게 나타났으며, 이는 알킬 폴리글루코사이드계 계면활성제가 이산화탄소 미세기포를 배양액 내에 효과적으로 안정화시켜 고농도로 장시간 체류시킴에 따라 탄소원을 안정적으로 공급시킨 효과에 기인한 것으로 보인다.

[0067] [비교예 1]

[0068] 실시예 1에서 멸균/중화된 배지를 사용하지 않고, 배양기에 표준 Zarrouk 배지를 사용한 점을 제외하고 나머지는 실시예 2와 동일한 조건에서 실험하였다.

[0069] 하기 표 1에는 2 주가 경과한 후 바이오매스와 클로로필 a(chlorophyll a) 및 피코시아닌의 농도를 측정한 결과를 나타내었다.

[0070] [표 1]

	바이오매스(g/L)	클로로필 a(mg/L)	피코시아닌(mg/L)
실시예 2	2.5	11.0	0.07
실시예 5	2.6	16.3	0.12
비교예 1	1.9	9.0	0.05

[0071]

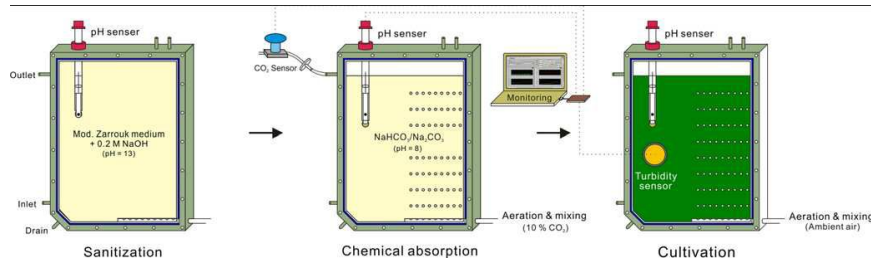
[0072] 상기 결과로부터, *Spirulina platensis* 균주의 배양시 실시예 5와 같이 저농도의 수산화나트륨을 추가적으로 조금씩 적정한 결과, 2 주 경과 후 생산된 바이오매스, 클로로필 a 및 피코시아닌의 양이 실시예 2 대비 4%, 48.2%, 71.4% 증가한 것을 확인할 수 있었던 반면, 배양시 비교예 1과 같이 표준 Zarrouk 배지를 사용한결과, 2 주 경과 후 바이오매스, 클로로필 a 및 피코시아닌의 생산량이 현저하게 감소된 것을 알 수 있었다. 이는 배지가 완전히 멸균되지 않음에 따라 미세조류의 성장 및 유용 산물의 생산이 전반적으로 억제되어 나타난 결과로 해석된다.

[0073] 상기 실시예 및 비교예로부터 본 발명의 미세조류 배양방법은 적정한 농도의 강염기를 사용하여 반응기의 배지를 효과적으로 멸균하는 동시에 지구 온난화의 중요한 원인으로 지목되고 있는 이산화탄소를 효과적으로 고정하여 미세조류의 탄소원으로 활용할 수 있도록 함으로써, 대량 생산시 경제성과 함께, 산업적으로 유용한 안료 등

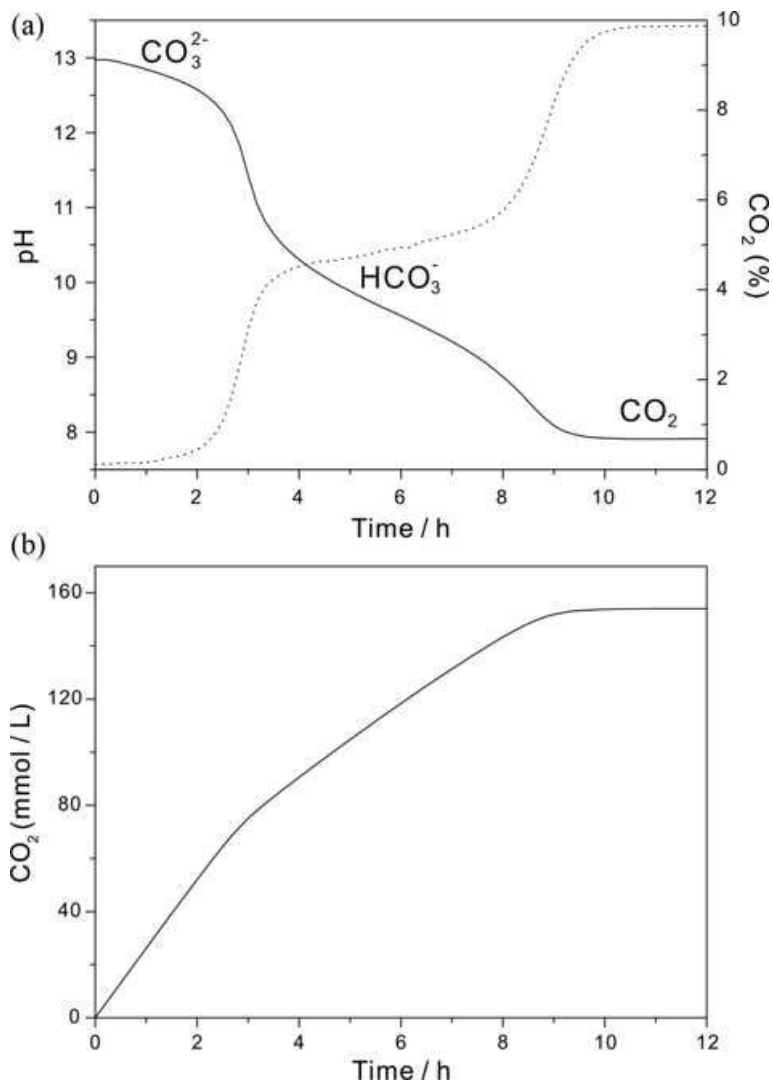
의 성분을 현격하게 고효율로 생산할 수 있다.

도면

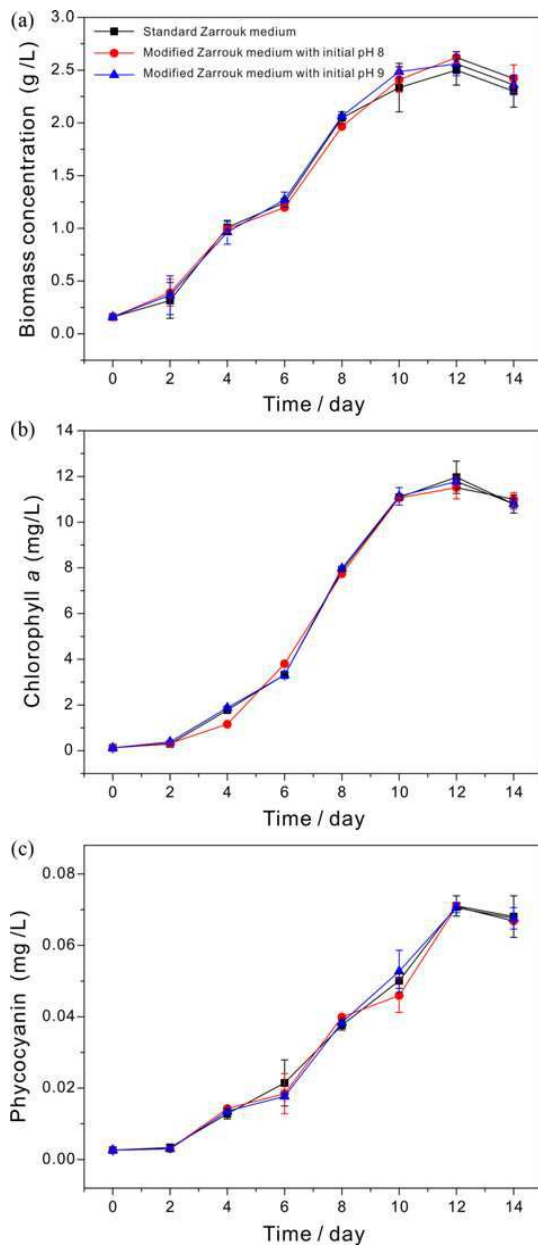
도면1



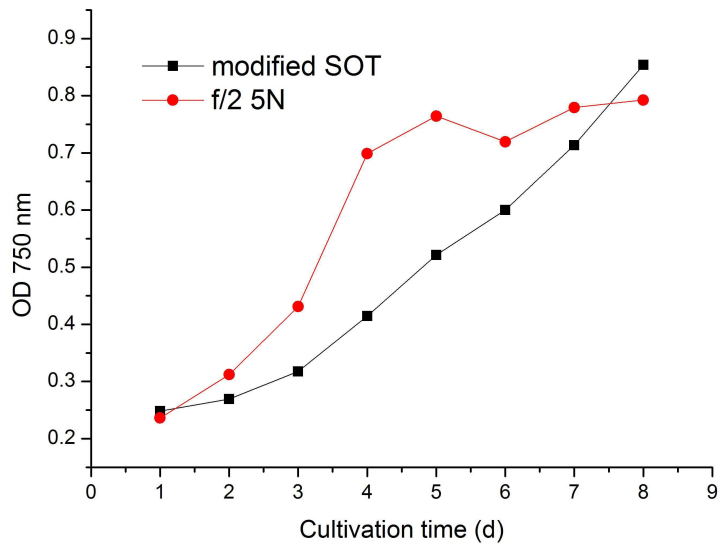
도면2



도면3



도면4



도면5

(a)



(b)

