(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0135533
(43) 공개일자 2023년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01) *C12P 7/6427* (2022.01)
(52) CPC특허분류
C12M 31/02 (2013.01)
C12M 21/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0034370
(22) 출원일자 2023년03월16일
심사청구일자 2023년03월30일
(30) 우선권주장
1020220032926 2022년03월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
유병선
서울특별시 성북구 고려대로1길 13, 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

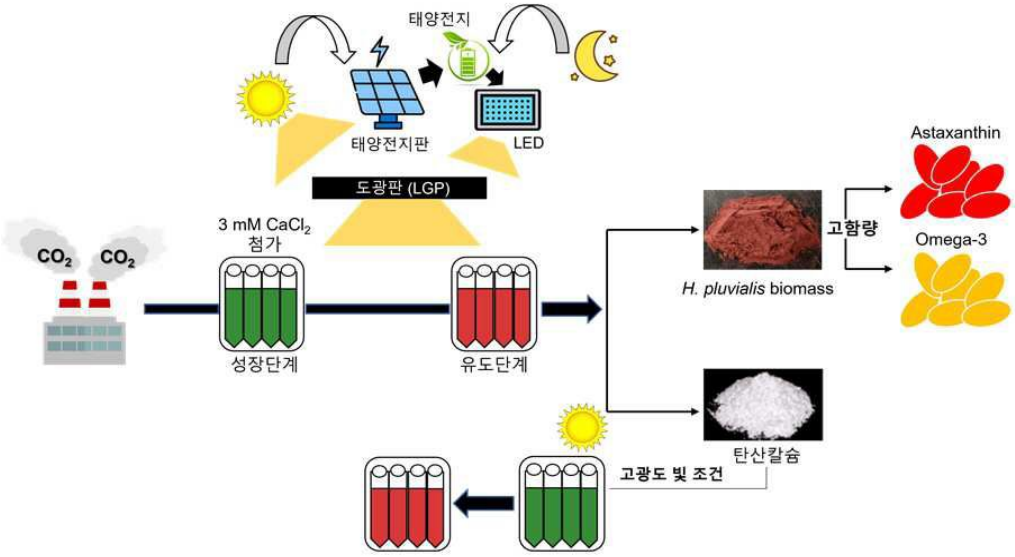
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **태양전지 및 도광판을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법**

(57) 요 약

본 발명은 태양전지 및 도광판을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 관한 것으로, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은, 제1 반응기 내의 제1 배양액에 이산화탄소(CO_2)를 공급하여, 탄산수소 이온(HCO_3^-)을 생성하는 단계, 이산화탄소가 공급되는 제1 배양액에, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 접종하는 단계, 및 헤마토코쿠스 플루비알리스가 접종된 제1 배양액에, 칼슘 이온(Ca^{2+})을 첨가하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 생성하면서, 태양전지로부터 생산된 전력에 의해 작동되는 광원을 이용해 광배양하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 23/00 (2013.01)
C12P 7/6427 (2022.01)
(72) 발명자
이주연
서울특별시 송파구 풍성로20길 34, A동 202호

시로히 란지나
서울특별시 성북구 고려대로27길 40-4, 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711128194
과제번호 2020M3H7A1098295
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 유용물질생산을위한CarbontoX기술개발(R&D)
연구과제명 연소가스 내 CO2 직접 광생물전환을 위한 고효율 공정 원천 기술
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.27 ~ 2022.01.26
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711141613
과제번호 2021B300
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 (재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명 공공연구성과활용촉진(R&D)
연구과제명 광 조건하 미세조류 기반 아스타잔틴 고생산 및 제품화 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 제1 반응기 내의 제1 배양액에 이산화탄소(CO_2)를 공급하여, 탄산수소 이온(HCO_3^-)을 생성하는 단계;

(b) 상기 이산화탄소가 공급되는 상기 제1 배양액에, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 접종하는 단계; 및

(c) 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스가 접종된 상기 제1 배양액에, 칼슘 이온(Ca^{2+})을 첨가하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 생성하면서, 태양전지로부터 생산된 전력에 의해 작동되는 광원을 이용해 광배양하는 단계;를 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스의 접종량은 0.2g/L 이상인 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 (c) 단계에서 첨가되는 상기 칼슘 이온의 농도는 0.5 ~ 3.5 mM인 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 광원은,

상기 태양전지로부터 생산된 전력을 이용해 빛을 생성하는 LED; 및

상기 LED에서 생성된 상기 빛을 확산시키는 도광판(light guide panel);을 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 제1 반응기는 다수 개로, 서로 이격 배열되고,

서로 근접 배치된 어느 하나의 상기 제1 반응기와 다른 하나의 상기 제1 반응기 사이마다 상기 광원이 배치되는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 (c) 단계는,

상기 칼슘 이온을 첨가하고, 20 ~ 60 μE/㎡/s의 광도로 제1 광배양하는 단계; 및

상기 제1 광배양 단계 후에, 100 ~ 150 μE/㎡/s의 광도로 제2 광배양하는 단계;를 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 제1 광배양으로 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 밀도가 1.0 g/L 이상에 다다를 때에, 상기 제2 광배양 단계를 수행하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 (c) 단계의 상기 칼슘 이온은, 상기 제1 배양액에 염화칼슘($CaCl_2$)이 공급되어 첨가되는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

(d) 상기 (c) 단계에서 생성된 상기 탄산칼슘을 회수하는 단계; 및

(e) 제2 반응기 내의 제2 배양액에, 회수된 상기 탄산칼슘을 첨가하고, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스를 광배양하는 단계;를 더 포함하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 (e) 단계는, 100 μE/㎡/s 이상의 광도에서 광배양하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 태양전지 및 도광판을 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 관한 것으로, 칼슘매개 바이오광물화를 통해 이산화탄소(CO_2) 고정과 오메가-3 지방산(ω-3 FA) 및 아스타잔틴의 생산성을 동시에 향상시키는 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 화석 연료의 사용에 따라 배출된 대규모 온실가스는 지구 온난화 현상을 야기하고 있다. 이에 이산화탄소 감축을 위한 이산화탄소 포집 및 저장 기술(CCS, Carbon Capture & Sequestration) 개발이 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. CCS 기술은 화력발전소를 비롯한 다양한 탄소 배출원에서 방출되는 다량의 이산화탄소를 고농도로 포집한 후 지중이나 해저에 주입하여 대기로부터 격리시키는 방법이다. 이러한 CCS 기술은 단기간에 대량의 이산화탄소를 저감하는 효과가 있으나, 안정적인 저장 문제, 위치 선정 및 높은 설치비용 등으로 인해 실질적인

CCS의 현실화가 어려운 상황이다. 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 저감 기술로 주목받고 있다. 식물성 플랑크톤이라 불리는 미세조류는 광합성을 하는 수중 단세포 생물로 에너지 및 산업 소재 생산과 동시에 온실가스 저감이 가능하기 때문에 그 잠재력이 매우 큰 바이오매스 자원으로 관심을 받고 있으며 에너지·화학·환경 분야를 중심으로 미래에 그 이용가치가 확대될 전망이다.

[0004] 에너지 분야에서 미세조류는 모든 바이오디젤 생산 작물 중 오일 생산성이 가장 우수하다. 대두, 유채, 해바라기, 오일팜 등은 재배 주기가 4 ~ 8개월인 반면, 미세조류는 매일 수 배로 증식하여 1일 단위로 재배가 가능하며 단위 무게 당 지방 함량도 높아 연간 오일 생산량이 대두의 100배 이상이다. 또한, 식량자원의 에너지화라는 비판에서 자유로운 생명자원으로, 석유계 디젤과 유사한 물성을 가진 바이오 연료를 생산할 수 있다.

[0005] 화학 분야에서 미세조류는 다양한 유용물질을 생산할 수 있는 장점이 있으며, 현재 식품 분야를 중심으로 산업화되어 있고, 향후 바이오케미컬 및 바이오플라스틱 분야로 산업화가 확대될 전망이다.

[0006] 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 효율 수치에 해당한다. 또한, 미세조류는 특정한 토양이나 수질을 가리지 않고 배양이 가능하다. 이에 관련 기업들은 이산화탄소 저감 및 공장폐수 정화 사업에 미세조류를 활용하려는 시도를 확대하고 있다.

[0007] 다양한 미세조류 중에서도 고부가가치 산물인 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)가 최근 각광을 받고 있다. 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 추출 가능한 카로테노이드인 아스타잔틴은 항산화 효과가 매우 우수하고, 생체 활성이 있는 3S, 3S' form이므로 인체에 사용 가능하며 그 경제적 효과도 매우 우수하다. 이에 하기 선행기술문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이, 아스타잔틴 생산량을 극대화하기 위해 헤마토코쿠스 플루비알리스의 생물학적 특성 및 배양 공정, 아스타잔틴 생산을 위한 하부 공정에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

[0008] 다만, 헤마토코쿠스의 전체적인 광배양 공정은 성장단계(growth stage, green stage)와 스트레스를 (염, 빛, 온도 등) 가하여 고부가가치 물질을 축적시키는 유도단계(induction stage, red stage)로 나누어지는데, 유도단계에 최소 1.5달 정도의 시간이 소요되므로 전체적으로 아스타잔틴 생산성이 낮다. 또한, 상업적 스케일의 바이오매스를 생산하기 위해 옥외 대량배양 장치 배양을 하다 보면 빛 공급이 원활한 낮에도 구조적 한계로 인해 반응기마다 조사되는 광량에 차이가 있고 이로 인해 반응기별 성장성에 차이가 발생하게 된다. 헤마토코쿠스는 일반적으로 최적의 광량 (성장단계 : 50 ~ 100 μ E/㎡/s, 유도단계 : 150 ~ 300 μ E/㎡/s)으로 지속해서 빛을 받으며 배양되어야 하는데 옥외 시스템의 특징상 밤에는 빛을 활용하지 못하는 문제가 있다.

[0009] 이에 종래 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 기술의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0120876 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 칼슘 매개 바이오광물화와, 도광판(light guide panel)과 융합된 태양전지 시스템을 도입하여 고함량의 아스타잔틴 및 오메가-3을 함유한 바이오매스를 생산하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 측면은 바이오광물화를 통해 생산되는 탄산칼슘을 성장단계부터 고광도의 헤마토코쿠스 배양조건에 활용하여 바이오매스와 아스타잔틴 생산성을 최대화하는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은 (a) 제1 반응기 내의 제1 배양액에 이산화탄소(CO_2)를 공급하여, 탄산수소 이온(HCO_3^-)을 생성하는 단계; (b) 상기 이산화탄소가 공급되는 상기 제1 배양액에, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 접종하는 단계; 및 (c) 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스가 접종된 상기 제1 배양액에, 칼슘 이온(Ca^{2+})을 첨가하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 생성하면서, 태양전지로부터 생산된 전력에 의해 작동되는 광원을 이용해 광배양하는 단계;를 포함한다.

[0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스의 접종량은 0.2 g/L 이상일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 (c) 단계에서 첨가되는 상기 칼슘 이온의 농도는 0.5 ~ 3.5 mM일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 광원은, 상기 태양전지로부터 생산된 전력을 이용해 빛을 생성하는 LED; 및 상기 LED에서 생성된 상기 빛을 확산시키는 도광판(light guide panel);을 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 제1 반응기는 다수 개로, 서로 이격 배열되고, 서로 근접 배치된 어느 하나의 상기 제1 반응기와 다른 하나의 상기 제1 반응기 사이마다 상기 광원이 배치될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 (c) 단계는, 상기 칼슘 이온을 첨가하고, 20 ~ 60 μE/㎡/s의 광도로 제1 광배양하는 단계; 및 상기 제1 광배양 단계 후에, 100 ~ 150 μE/㎡/s의 광도로 제2 광배양하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 제1 광배양으로 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 밀도가 1.0 g/L 이상에 다다를 때에, 상기 제2 광배양 단계를 수행할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 상기 칼슘 이온은, 상기 제1 배양액에 염화칼슘($CaCl_2$)이 공급되어 첨가될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, (d) 상기 (c) 단계에서 생성된 상기 탄산칼슘을 회수하는 단계; 및 (e) 제2 반응기 내의 제2 배양액에, 회수된 상기 탄산칼슘을 첨가하고, 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스를 광배양하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서, 상기 (e) 단계는, 100 μE/㎡/s 이상의 광도에서 광배양할 수 있다.

[0026] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0027] 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.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따르면, 칼슘 매개 바이오광물화 기술을 통하여 미세조류로부터 고부가가치 유용물질인 아스타잔틴과 오메가-3을 동시에 생산할 수 있으며, 태양전지에 의해 생산된 전기에너지를 활용하여 빛이 없는 조건하의 옥외

배양시스템에서도 그 생산성을 극대화할 수 있다.

[0030] 또한, 도광판을 활용하여, LED에서 방출되는 빛을 평면 광으로 변환하고 균일하게 높은 밝기로 확산시킬 수 있으므로, 단위면적당 배양규모를 확대할 때에 태양의 위치 변화에 따른 반응기들끼리의 가림 현상을 극복하여 반응기별 생산성 차이를 해소할 수 있고, 많은 양의 태양전지판을 설치할 필요가 없어서 경제성 측면에서 유리하다.

[0031] 결국, 바이오광물화와 함께 도광판을 활용한 태양전지가 융합된 시스템은 고부가가치물질인 아스타잔틴과 오메가-3를 동시에 생산할 수 있다는 측면에서 기존과 비교할 수 없는 경제적 효과를 기대할 수 있으며 동일한 면적에서 종래 광배양을 통해 저감하였던 이산화탄소량보다 더 많은 양을 저감할 수 있는 부수적인 효과도 달성할 수 있다.

[0032] 한편, 바이오매스뿐만 아니라 탄산칼슘을 동시에 생성하고, 이를 헤마토코쿠스의 고광도 배양에 사용하여 빛이 강한 여름철에 헤마토코쿠스의 효율적인 배양 전략으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1 내지 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 도시한 모식도이다.

도 3a는 성장단계에서 주입한 $CaCl_2$ 농도별 바이오매스 농도(g/L)를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 성장단계에서 주입한 $CaCl_2$ 농도별 아스타잔틴 함량(%)를 나타내는 그래프이다.

도 4는 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 바이오광물화를 통해 생성된 탄산칼슘의 농도(mg L^{-1})를 나타내는 그래프이다.

도 5는 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 배양 시작일과 최종일의 배양액에 존재하는 칼슘 농도(mM)의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 6은 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 세포외 탄산탈수소(carbonic anhydrase) 효소의 활성도(unit 10^6 $cells^{-1}$)를 나타내는 그래프이다.

도 7은 바이오광물화를 융합한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에서 저감되는 이산화탄소의 양(g L^{-1} day^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 8a는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법으로 4번의 반연속 배양을 60일 동안 진행하였을 때 사이클마다 축적되는 탄산칼슘이 바이오매스 생산(g L^{-1})에 미치는 영향을 분석한 실험 결과이다.

도 8b는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법으로 4번의 반연속 배양을 60일 동안 진행하였을 때 사이클마다 축적되는 탄산칼슘이 아스타잔틴 함량(%)에 미치는 영향을 분석한 실험 결과이다.

도 9는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 공정에 태양전지와 도광판을 추가로 활용한 배양방법을 도시한 모식도이다.

도 10a는 태양전지를 이용해 낮 동안 태양에너지를 전기에너지로 변환하여 축전지에 충전한 후 LED를 24시간 사용하는 동안의 전력량을 나타내는 그래프이다.

도 10b는 LED를 24시간 사용하는 동안의 태양에너지의 전류를 나타내는 그래프이다.

도 10c는 LED를 24시간 사용하는 동안의 태양전지 전압, 충전 전압, 및 부하 전압을 나타내는 그래프이다.

도 10d는 LED를 24시간 사용하는 동안의 축전지 용량을 나타내는 그래프이다.

도 11a는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서 도광판을 반응기 사이마다 배치한 사진이다.

도 11b는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 11c는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 아스타잔틴 함량(%)을 나타내는 그래프이다.

도 11d는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 오메가-3 함량(%)을 나타내는 그래프이다.

도 12는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 탄산칼슘의 농도(mg L^{-1})를 나타내는 그래프이다.

도 13은 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 오메가-3 함량(%)를 나타내는 그래프이다.

도 14는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 지방산을 나타내는 표이다.

도 15는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 아스타잔틴 함량(%)를 나타내는 그래프이다.

도 16a는 광 공급 시간에 따른 이산화탄소 저감량, 바이오매스 생산성, 아스타잔틴 생산성을 나타내는 표이다.

도 16b는 태양광만을 사용한 경우, 낮에는 태양광을 사용하고 저녁에는 LED를 사용한 경우, 낮에는 태양광과 도광판을 사용하고 저녁에는 LED와 도광판을 함께 사용한 경우에 각각 소모되는 전기에너지, 이산화탄소 방출량 및 이산화탄소 저감량을 나타내는 표이다.

도 17a는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 중간 광도의 빛(40 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 17b는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 강한 광도의 빛(100 ~ 150 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 17c는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 강한 광도의 빛(100 ~ 150 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 아스타잔틴 농도(mg L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 18a는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템으로 각각 28일 동안 옥외배양한 경우의 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

도 18b는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템의 옥외배양 0일차, 10일차, 28일차의 아스타잔틴 함량(%)과 광합성 효율을 나타내는 그래프이다.

도 18c는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템으로 각각 28일 동안 옥외배양한 경우의 총 오메가-3 및 지방산의 생산량(mg L^{-1}), 및 총 오메가-3 및 지방산의 생산성(mg L^{-1} day^{-1})을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 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.

[0036] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[0038] 도 1 내지 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법을 도시한 모식도이다.

[0039] 도 1 내지 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은, 제1 반응기 내의 제1 배양액에 이산화탄소(CO_2)를 공급하여, 탄산수소 이온(HCO_3^-)을 생성하는 단계, 이산화탄소가 공

급되는 제1 배양액에, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 접종하는 단계, 및 헤마토코쿠스 플루비알리스가 접종된 제1 배양액에, 칼슘 이온(Ca^{2+})을 첨가하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 생성하면서, 태양전지로부터 생산된 전력에 의해 작동되는 광원을 이용해 광배양하는 단계를 포함한다.

[0041] 본 발명은 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 배양하여 오메가-3 지방산 및 아스타잔틴을 동시에 생산하고 그 생산성을 향상시키는 기술에 관한 것이다. 종래에는 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 아스타잔틴과 오메가-3를 생산하는 방법이 달랐고, 그 생산성도 매우 낮았는바, 이에 대한 문제 해결방안으로서 본 발명이 안출되었다.

[0042] 구체적으로, 본 발명의 실시예에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법은, 이산화탄소 공급 단계, 헤마토코쿠스 플루비알리스 접종 단계, 및 칼슘 이온 첨가 및 광배양 단계를 포함한다.

[0044] 이산화탄소 공급 단계는 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스를 광배양하기 위해서 제1 배양액에 이산화탄소를 공급하는 공정이다. 여기서, 제1 배양액은 소정의 반응기에 채워질 수 있다. 또한, 제1 배양액은 헤마토코쿠스 플루비알리스의 생장을 가능하게 하는 한 특별한 제한은 없고, 일례로 탄소 결핍 자가영양 배지(autotrophic medium)를 사용할 수 있다. 이산화탄소 공급은 4 ~ 6 %(v/v) 이산화탄소가 포함된 공기(air)를 공급하거나, CO_2 인큐베이터를 이용할 수 있다. 또한, 발전소 등의 산업시설로부터 배출되는 이산화탄소 함유 배기가스를 배양액에 공급할 수도 있다. 이렇게 이산화탄소가 배양액에 공급되면, 물과 이산화탄소가 반응하므로 수소 이온과 탄산수소 이온(HCO_3^-)이 생성된다. 이산화탄소의 공급은 일시적, 또는 지속적으로 이루어질 수 있다. 따라서, 후술하는 칼슘 이온 첨가 및 광배양 단계(S400)에까지 이산화탄소가 계속적으로 공급될 수 있다.

[0046] 헤마토코쿠스 플루비알리스 접종 단계에서는 이산화탄소가 공급된 제1 배양액에 헤마토코쿠스 플루비알리스를 접종한다. 헤마토코쿠스 플루비알리스는 항산화 효과가 우수하고 생체 활성이 있는 산물로서 아스타잔틴을 생성하는 미세조류이다. 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포는 영양분이 풍부하고 낮은 광 조건에서는 세포 분열이 주로 일어나며, 영양분이 고갈되고 높은 광 스트레스를 받을 때에 세포 내부에 항산화성이 높은 카로테노이드인 아스타잔틴이 2차 대사산물로서 축적된다. 카로테노이드는 보통 성장단계(growth stage)에서는 낮은 수준이지만, 유도단계(induction stage)에서 그 함량이 점차 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0047] 여기서, 헤마토코쿠스 플루비알리스의 접종량은 0.2g/L 이상이 적절하다. 왜냐하면, 접종량이 0.2 g/L 미만일 때에는 후술하는 바이오광물화를 위한 칼슘 이온 주입 시 성장성이 저해될 수 있기 때문이다.

[0049] 칼슘 이온 첨가 및 광배양 단계에서는 칼슘 이온(Ca^{2+})의 첨가를 통해 바이오광물화를 유도하면서, 광배양한다. 헤마토코쿠스 플루비알리스는 탄산탈수소 효소(Carbon Anhydrase, CA)를 가지는데, CA는 물과 이산화탄소가 반응하여 수소 이온과 탄산수소 이온을 생성하는 반응의 촉매제로 작용한다. 여기서, 이산화탄소 공급 단계에서 생성된 탄산수소 이온과 제1 배양액에 첨가된 칼슘 이온이 반응하여 탄산칼슘($CaCO_3$)을 생성하게 된다.

[0050] 바이오광물화를 유도하기 위한 칼슘 이온은 염화칼슘($CaCl_2$)을 공급함으로써 주입될 수 있다. 다만, 칼슘 이온을 주입하기 위해서 반드시 염화칼슘을 공급해야 하는 것은 아니고, $Ca(OH)_2$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 등과 같이 배양액에 용해되어 칼슘 이온을 공급할 수 있는 공지의 모든 칼슘염을 사용할 수 있다. 이때, 첨가되는 칼슘 이온의 농도는 바이오매스, 아스타잔틴 및 오메가-3의 생산성에 영향을 미치므로, 그 농도는 0.5 ~ 3.5 mM, 바람직하게는 2.5 ~ 3.5 mM이 적절하다.

[0051] 한편, 광배양 공정은 성장단계, 및 유도단계에 따라 서로 다른 광도 조건에서 이루어질 수 있다. 세포분열이 주로 일어나는 성장단계에서는 20 ~ 60 μE/㎡/s의 광도로 제1 광배양하고, 아스타잔틴이 축적되는 유도단계에서는 100 ~ 150 μE/㎡/s의 광도로 제2 광배양할 수 있다. 여기서, 칼슘 이온은 성장단계(제1 광배양 단계)에서 주입될 수 있다. 성장단계에서 유도단계로의 진입은 헤마토코쿠스 플루비알리스의 형태적 변화 내지 배양액 내 질소원 고갈 여부로서 판단할 수 있다. 또한, 배양액 내 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 밀도가 1.0 g/L 이

상일 때에 유도단계를 진행할 수 있으므로, 칼슘 이온을 첨가하고 제1 광배양으로 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 밀도가 1.0 g/L 이상에 다다를 때에, 상기 광도로 제2 광배양 단계를 수행할 수 있다.

[0052] 칼슘 이온을 첨가하는 경우에 탄산칼슘과 물이 생성되므로 배양액의 pH가 감소하게 되고, 이산화탄소가 용해되어 탄산수소 이온과 수소 이온이 지속적으로 생성되므로, pH가 3 ~ 4.5 정도로 감소하게 된다. 바이오광물화는 pH 7.5 ~ 8.5, 바람직하게는 pH 7.7 ~ 8.0에서 진행되므로, 배양액에 염기성 용액을 첨가하여 배양액의 pH를 7.5 ~ 8.5로 유지할 수 있다. 여기서, 염기성 용액으로는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아(NH_4OH), 수산화칼슘($Ca(OH)_2$), 및 수산화마그네슘($Mg(OH)_2$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이 용해된 용액일 수 있다.

[0053] 한편, 광배양은 태양전지로부터 생산된 전력에 의해 작동되는 광원을 이용하여 수행된다. 태양전지는 태양에너지를 전기에너지로 변환하는 장치로서, 태양전지판을 구성하여 태양광 발전에 활용된다. 특히, 옥외배양의 경우, 밤에는 태양광을 사용하지 못하므로, 태양전지에서 생산된 전기에너지를 활용하여 광배양을 할 수 있다. 본 발명에 따른 광원은 태양전지로부터 생산된 전력으로 이용해 빛을 생성하는 LED를 사용할 수 있다. 이때, 태양전지로부터 생산된 전기에너지는 축전기에 저장되고, LED는 축전기에 저장된 전기에너지를 전원으로 사용할 수 있다. 다만, 태양전지로부터 전기에너지를 생산하기 위해서는 초기 시스템을 구축에 고비용이 소요되고, 옥외배양 전체를 운용하는데 한계가 있으므로, 본 발명에 따른 광원은 LED에 추가적으로 도광판(light guide panel, LGP)을 사용할 수 있다. 도광판은 LED에서 생성된 빛을 확산시키는 부재로서, 내부에 특수 가공을 통해 형성된 미세 패턴을 구비함으로써, 빛의 산란을 유도한다. 다수의 제1 반응기가 배열된 대규모 옥외배양 시, 그 반응기마다 LED를 이용해 빛을 조사하기 위해서는 대규모의 전기에너지를 생산할 수 있는 태양광 발전 시스템이 구축되어야 하지만, 도광판을 통해 LED에서 생성된 빛을 균일하게 반응기에 조사할 수 있으므로, 태양광 발전 시스템 구축에 필요한 비용을 줄일 수 있고, 태양의 위치 변화에 따라 반응기들끼리의 가림 현상으로 인해 반응기별로 생산성에 차이가 발생하는 것을 방지 내지 최소화할 수 있다.

[0054] 도 2를 참고로, 다수의 반응기(PBR)가 서로 배열되는 대규모 옥외배양 시, 반응기 어레이에서 어느 하나의 반응기가 다른 반응기를 가리는 가림 현상(shading effect)이 발생하는바, 이를 해결하기 위하여 본 발명의 다른 실시예(PLPA 시스템)로서, 다수 개의 제1 반응기가 서로 이격 배열되고, 서로 근접 배치된 어느 하나의 제1 반응기와 다른 하나의 제1 반응기 사이마다 LED 및 도광판으로 구성된 광원을 배치할 수 있다. 여기서, 서로 근접 배치된 하나의 제1 반응기와 다른 하나의 제1 반응기 사이는, 서로 근접 배치된 어느 하나의 제1 반응기의 열과 다른 하나의 제2 반응기의 열 사이를 포함한다.

[0056] 한편, 칼슘 이온 첨가 및 광배양 단계를 통해 고함량의 아스타잔틴 및 오메가-3가 헤마토코쿠스 플루비알리스 세포에 축적되면, 헤마토코쿠스 플루비알리스를 탄산칼슘과 분리하여 회수할 수 있다. 여기서, 헤마토코쿠스 플루비알리스와 탄산칼슘은 밀도차이에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 원심분리기를 이용하여 헤마토코쿠스 플루비알리스와 탄산칼슘을 분리할 수 있다. 이때, 탄산칼슘은 결정화된 상태로 존재하기 때문에 추가적인 화학물질의 주입 없이도 쉽게 분리가 가능하다.

[0057] 탄산칼슘이 회수되면, 제2 반응기 내의 제2 배양액에, 회수된 탄산칼슘을 첨가하여 헤마토코쿠스 플루비알리스를 광배양할 수 있다. 여기서, 탄산칼슘은 성장단계에서 첨가될 수 있고, 100 μE/㎡/s 이상의 고광도에서 광배양될 수 있다. 탄산칼슘은 이방성 특성을 가지므로, 강한 빛을 산란시켜 특정 영역에만 가해지던 강한 빛을 모든 영역의 세포에 골고루 조사될 수 있게 한다. 이러한 탄산칼슘을 이용한 고광도 배양은 특히 빛이 강한 여름철 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 전략으로 활용할 수 있다.

[0059] 이하에서는 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0061] 실험예 1. 광합성 생물 반응과 광물화 공정을 위한 구성 요소들의 제작 과정

[0062] 이산화탄소가 용해될 수 있는 양을 최대화하고 바이오광물화를 위해 5% 이산화탄소를 함유한 가스를 직접 배양액 내에 공급해야 하므로 500mL(가로: 5cm, 높이: 60cm) 매스실린더 8개를 준비하였다.

[0064] 실험예 2. 구성 요소들의 세부 제작 과정

[0065] 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 내고 2개의 테플론 튜브를 매스실린더 높이에 맞게 절단하여 만들어진 구멍 안으로 넣어주었다. 가스가 공급되는 테플론 튜브의 하단에는 stone 스파저를 연결하여 이산화탄소가 5% 포함된 에어(air)를 공급하였다.

[0067] 실험예 3. 미세조류 광배양 과정

[0068] 배지는 NIES-C를 사용하였으며 450ml 씩 매스실린더에 주입한 후 에어레이션(aeration)을 진행하였다. 이후 10mM의 KOH를 주입한 후 pH를 7.5 ~ 8 사이로 설정하였다. 이는 KOH의 완충 효과로 이산화탄소가 지속적으로 공급되어도 pH가 7.5에서 8 사이로 유지되게 하기 위한 것이다. 미세조류는 *Haematococcus pluvialis*를 사용하였으며 초기 접종량은 바이오매스 기준 0.2 g L^{-1}으로 하였으며 매스실린더에서 각각 6 ~ 8일간의 성장단계에서는 40 μ E m^{-2} s^{-1}으로, 10 ~ 12일간의 유도단계에서는 100 ~ 150 μ E m^{-2} s^{-1}으로 빛을 조사하였다. 매스실린더의 최종 배양 부피는 500mL로 하였다.

[0070] 실험예 4. 성장단계(Growth stage)에서의 바이오매스 공정

[0071] 조건마다 2개의 매스실린더를 사용하였으며, 우선 셀을 접종함과 동시에 빠른 시간 안에 바이오광물화를 유도하기 위해 최적의 $CaCl_2$ 농도를 찾기 위한 실험을 진행하였다. 최적의 $CaCl_2$ 농도를 찾기 위해 매스실린더에서 1mM부터 4mM까지 넣어주면서 바이오광물화를 진행하고, 16일 동안 배양하였고, 그 결과를 도 3a 내지 도 3b에 나타냈다. 도 3a는 성장단계에서 주입한 $CaCl_2$ 농도별 바이오매스 농도(g/L)를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 성장단계에서 주입한 $CaCl_2$ 농도별 아스타잔틴 함량(%)를 나타내는 그래프이다.

[0072] 실험 결과, 3mM에서 가장 높은 바이오매스 농도(biomass concentration, g L^{-1})을 가진다는 것을 확인하였고, 그 이상 주입할 경우 오히려 성장에 저해가 된다는 것 역시 확인할 수 있었다(도 3a 참고). 또한, 아스타잔틴 함량 또한 3 mM $CaCl_2$를 주입하여 바이오광물화를 진행하였을 때 가장 높았다(도 3b 참조). 성장단계(growth stage)에서의 광물화를 진행하기 위해 $CaCl_2$를 주입해본 결과 초기 농도가 낮으면 1mM에서조차 성장성이 저해된다는 것을 통해 초기 헤마토코쿠스 농도는 최소 0.2 g L^{-1} 이상이어야 한다는 걸 알 수 있었다.

[0074] 또한, 탄산칼슘이 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 생산되는지를 확인하기 위하여, $CaCl_2$를 주입하지 않고 헤마코토쿠스 플루비알리스를 배양한 경우 및 헤마토코쿠스 플루비알리스를 접종하지 않은 배양액과 접종한 배양액에 각각 3mM $CaCl_2$를 주입한 경우의 탄산칼슘 농도 및 그 변화를 측정하고, 그 결과를 도 4 및 5에 나타냈다. 도 4는 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 바이오광물화를 통해 생성된 탄산칼슘의 농도(mg L^{-1})를 나타내는 그래프이고, 도 5는 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 배양 시작일과 최종일의 배양액에 존재하는 칼슘 농도(mM)의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0075] 3mM의 $CaCl_2$ 주입하고 헤마토코쿠스를 배양한 경우에 생산된 탄산칼슘 농도는 20.85mg L^{-1}이었다. 바이오광물화를 시키지 않고 헤마토코쿠스 배양을 진행하였을 때의 탄산칼슘의 농도를 측정해본 결과 3.4mg L^{-1}으로 거의 존재하지 않았다. 또한, 헤마토코쿠스 접종을 하지 않은 배양액을 가지고 3mM $CaCl_2$를 주입하여 바이오광물화를 유도하였을 때 탄산칼슘의 농도는 1.0mg L^{-1}으로 나타났다. 그 결과를 종합하면, 헤마토코쿠스로부터 바이오광물화가 부분적으로 발생하여 탄산칼슘이 생성되는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 칼슘 농도의 변화가 없는 헤마토코쿠스 배양액과 다르게 바이오광물화된 헤마토코쿠스의 칼슘 농도를 측정하였을 때도 3.64 mM에서 3.39 mM로 생산되는 탄산칼슘의 농도만큼 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0077] 도 6은 3mM의 $CaCl_2$ 주입에 따른 세포외 탄산탈수소(carbonic anhydrase) 효소의 활성도(unit 10^6 $cells^{-1}$)를 나타내는 그래프이고, 도 7은 바이오광물화를 융합한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에서 저감되는 이산화탄소의 양(g L^{-1} day^{-1})을 나타내는 그래프이다.

[0078] 도 6을 참고로, 바이오광물화는 세포외 탄산탈수소(carbonic anhydrase) 효소에 의해 이산화탄소가 탄산수소 이온으로 빠르게 전환되어 유도되는데 바이오광물화가 실제로 $CaCl_2$를 주입하였을 때 높은지를 확인해본 결과 $CaCl_2$를 주입하지 않았을 때보다 137배 높았으며, 이산화탄소 고정 효율도 46.3% 우수하다는 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0080] 실험예 5. 헤마토코쿠스 플루비알리스의 바이오광물화 반연속 공정

[0081] 도 8a는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법으로 4번의 반연속 배양을 60일 동안 진행하였을 때 사이클마다 축적되는 탄산칼슘이 바이오매스 생산(g L^{-1})에 미치는 영향을 분석한 실험 결과이고, 도 8b는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법으로 4번의 반연속 배양을 60일 동안 진행하였을 때 사이클마다 축적되는 탄산칼슘이 아스타잔틴 함량(%)에 미치는 영향을 분석한 실험 결과이다.

[0082] 배양에 공급되는 대부분의 이산화탄소는 배양액 내에 탄산수소 이온으로 존재하므로 이산화탄소 저감을 위해서는 특히 스케일업 측면에서 배양액의 재사용이 필수적이다. 이를 위해 바이오광물화 공정을 4배치 진행을 하였을 때, 2번째 배양부터 헤마토코쿠스의 바이오매스 손실이 발생하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 4번째 배양 후 손실이 30.1%까지 발생하는 걸 알 수 있었다(도 8a 참조). 아스타잔틴 함량 역시 탄산칼슘을 제거하였을 때 24% 이상 증가하는 것을 확인하였다(도 8b 참조). 생산된 탄산칼슘은 배양 후 분리하여 고광도 조건에서의 헤마토코쿠스 배양(실험예 8)에 활용하였다.

[0084] 실험예 6. 태양전지와 도광판이 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스의 바이오광물화 공정

[0085] 헤마토코쿠스를 대량배양하기 위해 옥외에서 비닐 소재 광생물반응기를 활용하여 배양할 경우 일정한 빛을 공급하는 데 한계가 발생한다. 시간에 따른 빛의 세기가 바뀌며 저녁에는 빛의 공급이 중단되기 때문에, 배양 기간이 길어지며 일정한 아스타잔틴을 함유한 바이오매스를 지속해서 생산하는 것이 어려웠다. 또한, 대량배양 시스템상 반응기들끼리 가림 현상이 발생하여 모든 반응기에 같은 광량이 빛을 조사하는 것 또한 어려워 동일 배치 생산을 진행하기도 곤란했다. 따라서, 태양광이 안정적으로 공급되는 시간(09시 ~ 16시)에 태양전지를 활용하여 전기를 저장하여 24시간 LED를 활용하여 소모되는 전기 비용 없이 빛을 공급할 수 있는 시스템을 도 9와 같이 구축하였다. 도 9는 바이오광물화가 융합된 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 공정에 태양전지와 도광판을 추가로 활용한 배양방법을 도시한 모식도이고, 도 10a는 태양전지를 이용해 낮 동안 태양에너지를 전기에너지로 변환하여 축전지에 충전한 후 LED를 24시간 사용하는 동안의 전력량을 나타내는 그래프, 도 10b는 LED를 24시간 사용하는 동안의 태양에너지의 전류를 나타내는 그래프, 도 10c는 LED를 24시간 사용하는 동안의 태양전지 전압, 충전 전압, 및 부하 전압을 나타내는 그래프, 도 10d는 LED를 24시간 사용하는 동안의 축전지 용량을 나타내는 그래프이다.

[0086] 도 10a 내지 도 10d과 같이 저녁 동안 태양에너지가 없어 충전 전력, 충전 전류는 '0' 에 다다르고 축전지 용량은 낮 동안 저장한 에너지가 충분하여 24시간 사용하기에 적합하며 낮 동안 태양에너지를 끌어오므로 최대에 도달했다. 또한, 부하 전력, 부하 전류, 태양전지 전압, 충전 전압 그리고 부하 전압은 계속 작동되고 있으므로 떨어지지 않고 일정했다. 그리고 낮 동안 태양전지를 통해 태양에너지를 전기에너지로 변환하여 축전지에 에너지를 저장하면서 24시간 LED의 전원을 켜면 에너지가 LED에 사용되므로 저녁 동안 용량은 많이 떨어졌다. 이때 LED는 0에 다다르지 않고 약 10 ~ 15 mAh까지 다다르는 것을 볼 수 있는데 이것은 축전지에 저장된 전기에너지가 충분하다는 것을 보여준다. 그리고 낮 동안은 저장할 수 있는 태양에너지가 많기 때문에 다시 축전지에 전기에너지가 저장되어 용량은 최대 (100 mAh)에 다다랐다.

[0088] 태양전지를 구축하기 위한 초기 비용이 상당하므로 배양의 규모가 증가함에 따라 모든 반응기를 태양전지를 활

용하여 배양하는 것은 한계가 존재하기 때문에 공급되는 빛을 효과적으로 분산시킬 수 있는 우수한 도광판을 활용한 LED 공급 기술을 개발하여 배양에 최적인 빛을 일정하게 공급하여 고농도의 아스타잔틴을 함유한 바이오매스를 고속으로 생산하는 경제적인 공정시스템을 개발하였다. 도 11a는 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양방법에 있어서 도광판을 반응기 사이마다 배치한 사진이고, 도 11b는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프, 도 11c는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 아스타잔틴 함량(%)을 나타내는 그래프, 도 11d는 바이오광물화, LED 작동 및 도광판 설치 여부에 따른 오메가-3 함량(%)을 나타내는 그래프이다.

[0089] 도 11a와 같이, 서로 근접 배치되어 마주보는 반응기(매스실린더) 사이마다 도광판(LGP)을 설치하여, 한 번에 마주보는 반응기에 빛을 조사할 수 있도록 최적화된 하이브리드 (바이오광물화, LED, LGP) 공정시스템을 구축하고, 우선 매스실린더에서 헤마토코쿠스 배양을 진행하였다. 여기서 태양전지는 옥외에서 충전해 사용하였으며 태양전지에서 생성된 전기에너지로 LED를 작동시켰다. 배양을 진행하였을 때 LED와 LGP를 활용하여 24시간 빛을 공급하는 하이브리드 시스템에서 바이오매스 양과 아스타잔틴 함량이 모두 우수하였다. 바이오매스는 대조군(control) 대비 52.5% 증가하였으며(도 11b 참조), 아스타잔틴 함량은 74.34% 증가하였다(도 11c 참조). 여기서 가장 중요한 부분은 오메가-3 함량이 24.26% 증가하였으며 그 중에서도 EPA 함량이 증가했을 뿐만 아니라 일반 배양시스템에서는 축적되지 않았던 DHA가 1% 함유되어 고부가 유용물질 중에서도 가장 좋은 물질을 생산해냈다는 점이다(도 11c 참조). EPA, DHA 고함유 오메가-3는 최근 $12,540,000/ton으로 아스타잔틴($7,000,000/ton) 보다도 시장 가격이 우수하다.

[0091] 실험예 7. 광합성생물반응기를 활용한 옥외배양에서의 하이브리드 공정

[0092] 판교 한국지역난방공사 옥외배양시설에서 하이브리드 시스템을 구축하여 배양을 진행하였다. 100리터 반응기에서 배양이 진행되었으며 반응기 내로 한국지역난방공사에서 공급되는 3 ~ 5% 이산화탄소가 포함된 배가스를 주입하였다. 도 12는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 탄산칼슘의 농도(mg L^{-1})를 나타내는 그래프, 도 13은 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 오메가-3 함량(%)를 나타내는 그래프, 도 14는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 지방산을 나타내는 표, 도 15는 바이오광물화, LED 및 도광판이 결합한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 옥외배양에서 생산되는 아스타잔틴 함량(%)를 나타내는 그래프, 도 16a는 광 공급 시간에 따른 이산화탄소 저감량, 바이오매스 생산성, 아스타잔틴 생산성을 나타내는 표, 도 16b는 태양광만을 사용한 경우, 낮에는 태양광을 사용하고 저녁에는 LED를 사용한 경우, 낮에는 태양광과 도광판을 사용하고 저녁에는 LED와 도광판을 함께 사용한 경우에 각각 소모되는 전기에너지, 이산화탄소 방출량 및 이산화탄소 저감량을 나타내는 표이다.

[0093] 배양 결과 탄산칼슘 농도는 5.6배 정도 높았으며(도 12 참조) 오메가-3 함량도 2.67배 높은 것을(도 13 참조) 확인할 수 있었다. 오메가-3 중에서도 역시 EPA 함량이 일반 배양조건보다 2.7배 높았으며 축적되지 않았던 DHA 또한 1.14%로 축적되었다(도 14 참조). 아스타잔틴 함량은 대조군(control) 대비 54.7%로 증가하였다(도 15 참조). 결론적으로 헤마토코쿠스는 24시간 빛을 일정하게 조사했을 때가 태양광만 활용할 때보다 이산화탄소 저감량이 105.4%로 증가하였으며 바이오매스와 아스타잔틴 생산성은 각각 130.4%, 82.3%씩 증가한다는 것을 확인할 수 있었다(도 16a 참조). 또한, 태양광과 함께 LED를 사용하면 전기에너지와 이산화탄소 배출량이 증가하기 때문에 스케일이 커짐에 따라 한계가 존재한다. 따라서, 이를 도광판과 함께 사용하였을 때 전기에너지와 이산화탄소 배출량을 6.51 배씩 감축시킬 수 있었으며 태양전지로인해 도광판에 사용되는 전기에너지까지 태양에너지로 사용할 수 있었다(도 16b 참조).

[0095] 실험예 8. 성장단계에서 탄산칼슘를 주입한 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양공정

[0096] 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시, 광도를 달리하고, 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였다. 탄산칼슘은 실험예 5의 바이오광물화를 통해 생성된 탄산칼슘을 활용하였다. 도 17a는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 중간 광도의 빛(40 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프, 도 17b는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 강한 광도의 빛(100 ~ 150 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 바이오매스

생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프, 도 17c는 성장단계에서의 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양 시 강한 광도의 빛(100 ~ 150 μE m^{-2} s^{-1})을 조사하면서 다양한 농도의 탄산칼슘을 주입하였을 때의 아스타잔틴 농도(mg L^{-1})을 나타내는 그래프이다.

[0097] 탄산칼슘은 이중산란 현상을 유발하기 때문에 강한 광도의 빛이 가해졌을 때 강한 빛을 여러 개의 중간 광도 빛으로 분산시킬 수 있다는 것을 배양 결과 확인하였다. 실제로 일반적인 배양조건의 빛을 조사하였을 때는 탄산칼슘의 양에 따른 바이오매스의 변화는 거의 없었다(도 17a 참조). 하지만 성장단계에서부터 강한 빛이 조사하게 되면 일반적인 헤마토코쿠스 세포들은 2일 만에 사멸하였지만 2mM의 탄산칼슘을 세포 접종과 함께 주입하였을 때에는 바이오매스 생산량과 아스타잔틴 함량이 가장 우수했다(도 17b, 17c 참조).

[0099] 실시예 9. 옥외배양에서의 PLPA 하이브리드 시스템

[0100] 도 2를 참고로, 면적당 배양규모를 증가시키기 위해, 다수의 광생물반응기(PBR)를 고밀도로 배열(PPPA 시스템)한 결과, 중간에 낀 광생물반응기는 가림 효과로 인해 빛을 거의 공급 받지 못한다. 따라서 광생물반응기 사이마다 도광판을 배치하고, LED로 빛을 공급하며 바이오광물화를 유도하는 PLPA 하이브리드 시스템을 구축하였다. 또한 LED의 전기 에너지는 낮 동안 모은 태양전지로부터 공급되어 추가적인 전기 에너지를 사용하지 않았다. 도 18a는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템으로 각각 28일 동안 옥외배양한 경우의 바이오매스 생산량(g L^{-1})을 나타내는 그래프, 도 18b는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템의 옥외배양 0일차, 10일차, 28일차의 아스타잔틴 함량(%)과 광합성 효율을 나타내는 그래프, 도 18c는 PPPA 시스템과 PLPA 하이브리드 시스템으로 각각 28일 동안 옥외배양한 경우의 총 오메가-3 및 지방산의 생산량(mg L^{-1}), 및 총 오메가-3 및 지방산의 생산성(mg L^{-1} day^{-1})을 나타내는 그래프이다.

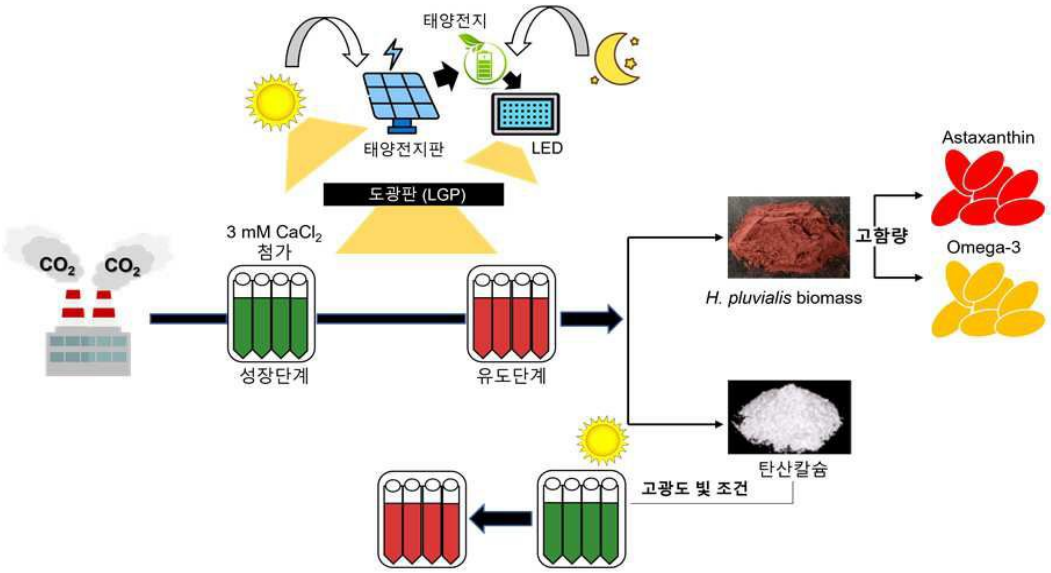
[0101] 밀도 있는 광생물반응기 배치에서 PLPA 하이브리드 시스템의 바이오매스 생산량(g/L), 아스타잔틴 함량(%), 10일차 광합성 효율(μmol/mg/Chl/min), 총 오메가-3 생산성(mg/L/day) 그리고 총 지방산 생산성(mg/L/day)을 PPPA 시스템과 비교한 결과 각각 3.34 배, 3.30 배, 2.17 배, 4.12배, 3.43배 증가하여 효율적인 시스템인 것을 확인하였다.

[0103] 이상 본 발명을 구체적인 실시예 및 실험예를 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.

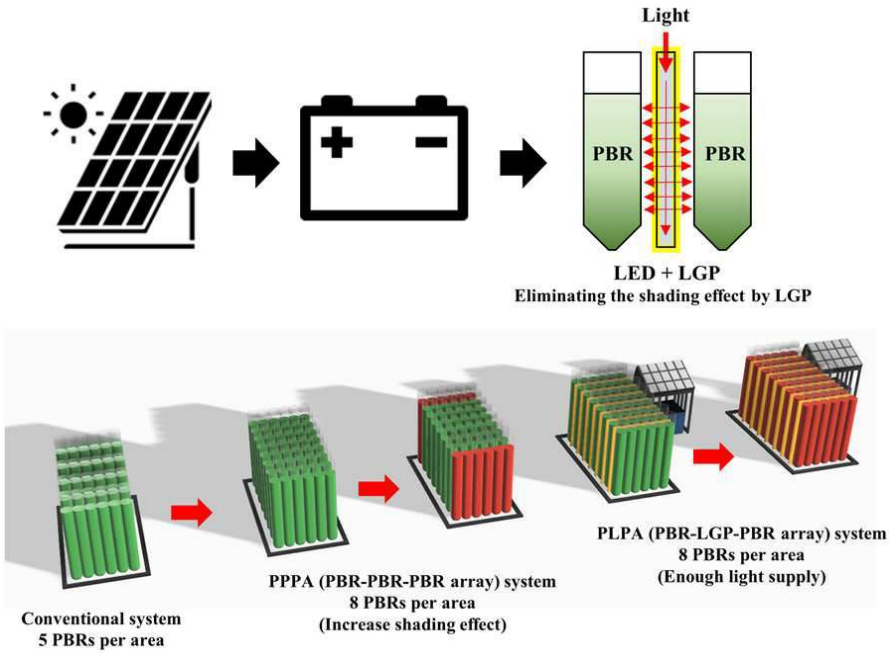
[0104] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

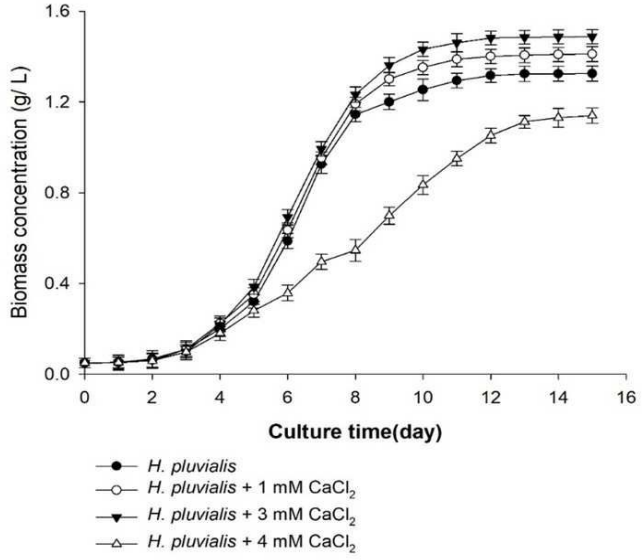
도면1


태양전지
태양전지판
LED
도광판 (LGP)
3 mM $CaCl_2$
첨가
CO_2 CO_2
성장단계
유도단계
H. pluvialis biomass
고함량
Astaxanthin
Omega-3
탄산칼슘
고광도 빛 조건

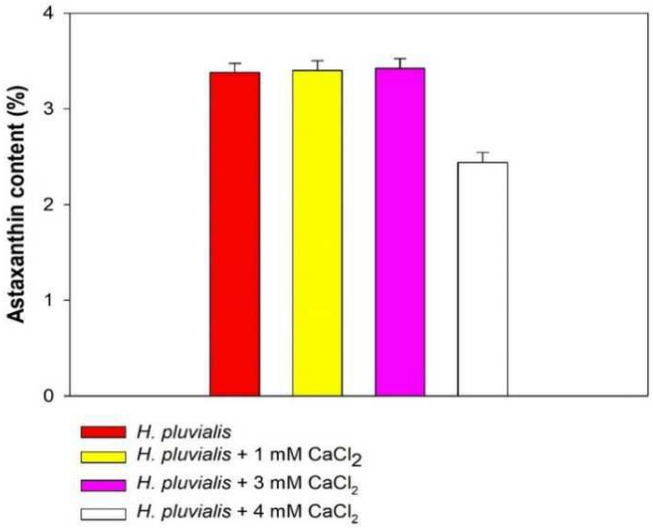
도면2


Light
PBR
PBR
LED + LGP
Eliminating the shading effect by LGP
Conventional system
5 PBRs per area
PPPA (PBR-PBR-PBR array) system
8 PBRs per area
(Increase shading effect)
PLPA (PBR-LGP-PBR array) system
8 PBRs per area
(Enough light supply)

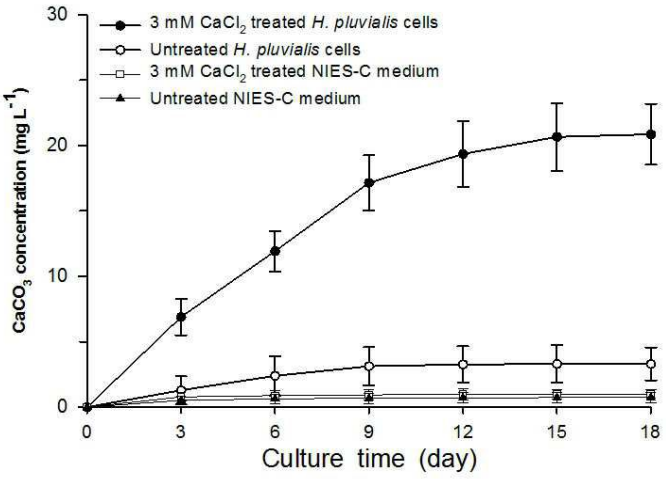
도면3a



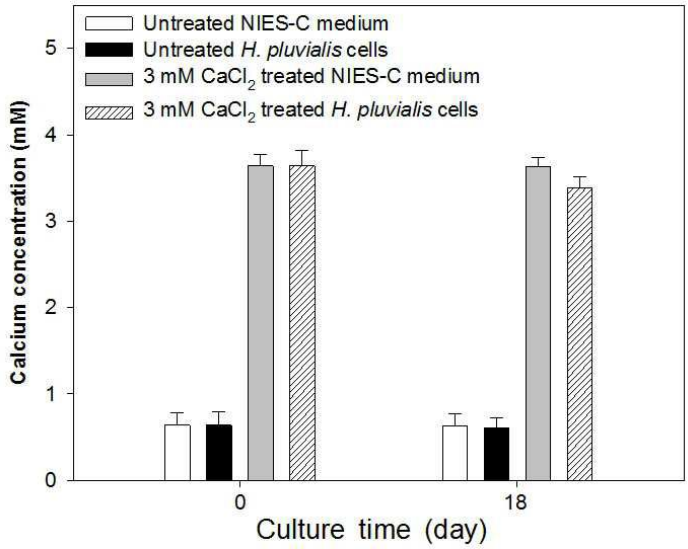
도면3b



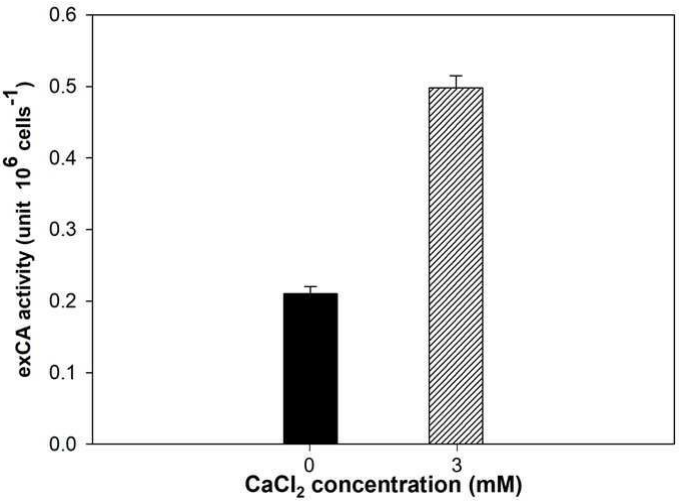
도면4



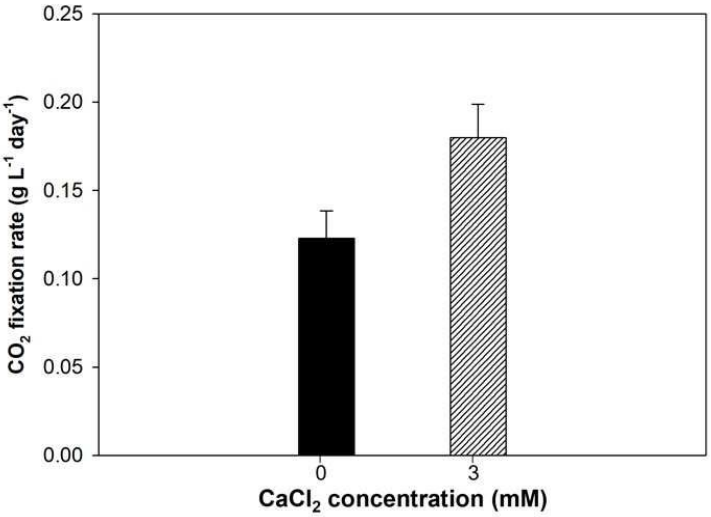
도면5


Untreated NIES-C medium
Untreated H. pluvialis cells
3 mM CaCl2 treated NIES-C medium
3 mM CaCl2 treated H. pluvialis cells
Calcium concentration (mM)
0
1
2
3
4
5
0
18
Culture time (day)

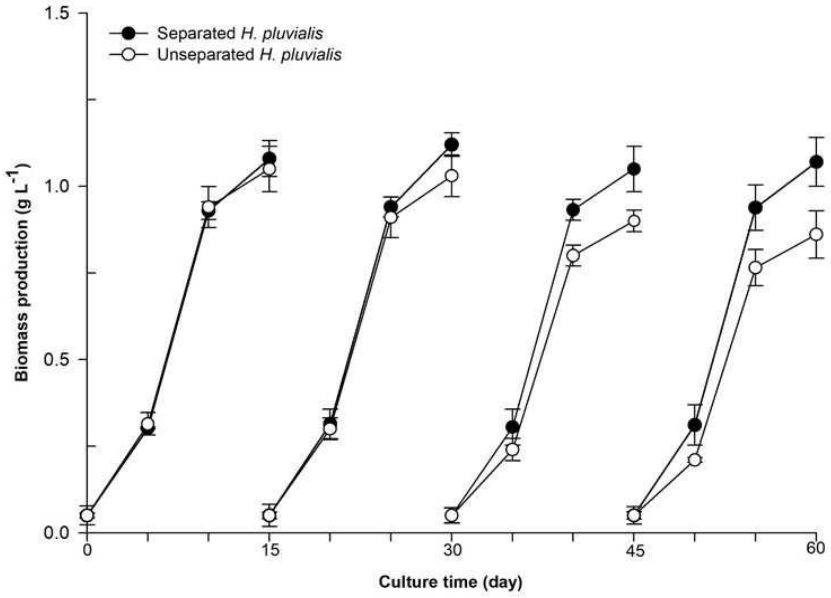
도면6


exCA activity (unit 10^6 cells^-1)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0
3
CaCl2 concentration (mM)

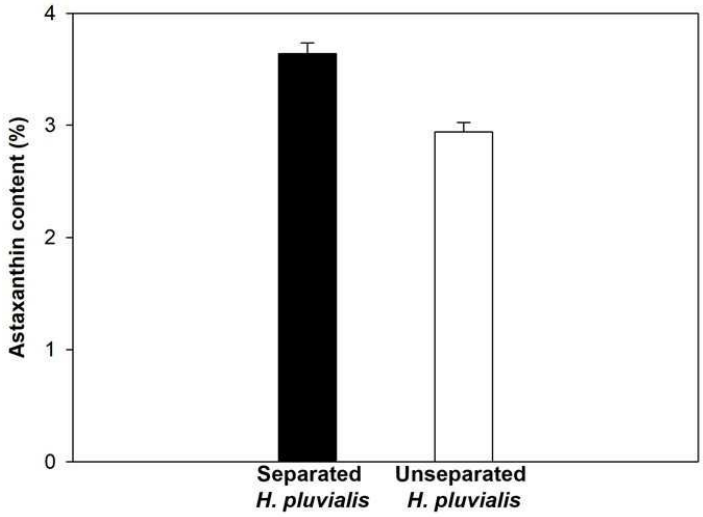
도면7


CO2 fixation rate (g L^-1 day^-1)
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0
3
CaCl2 concentration (mM)

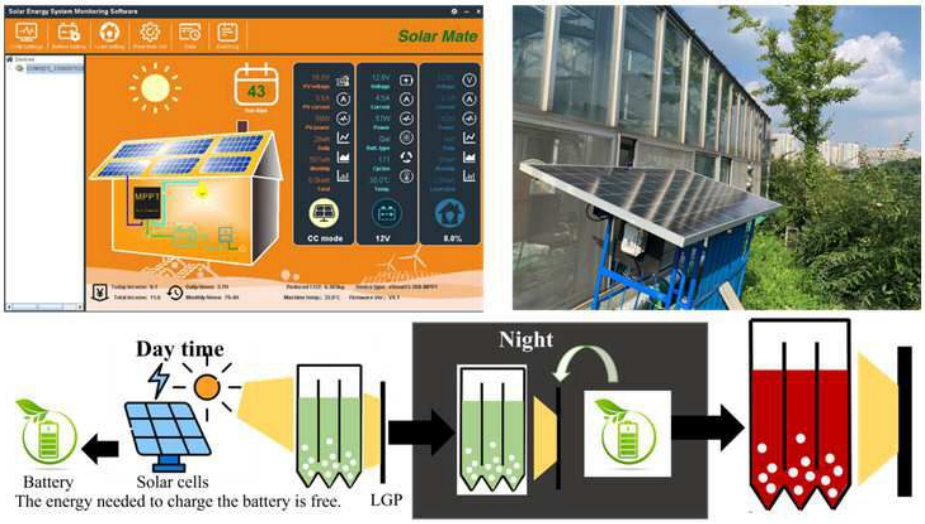
도면8a


Separated H. pluvialis
Unseparated H. pluvialis
Biomass production (g L-1)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
15
30
45
60
Culture time (day)

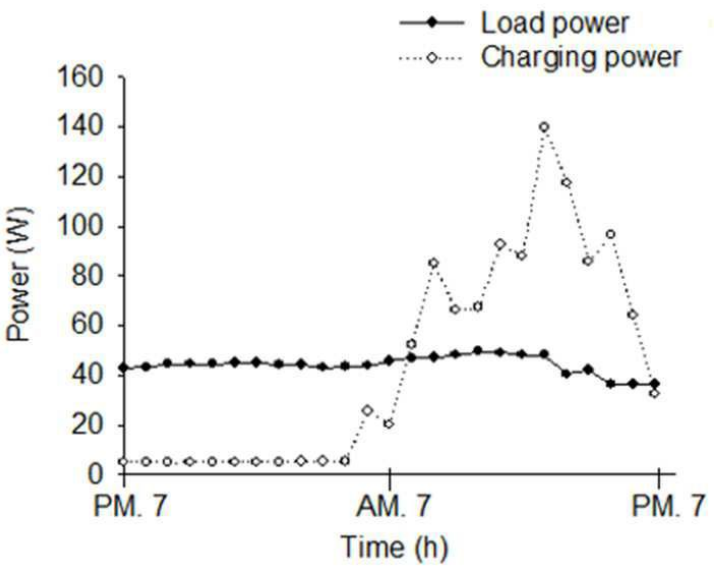
도면8b


Astaxanthin content (%)
4
3
2
1
0
Separated
H. pluvialis
Unseparated
H. pluvialis

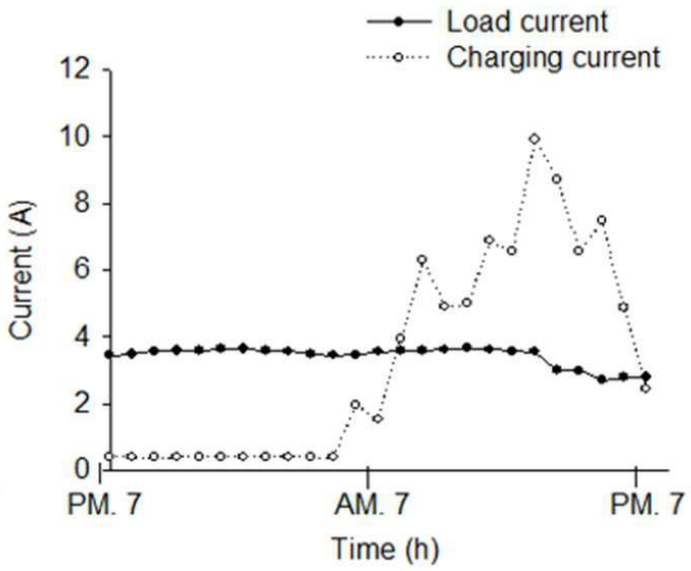
도면9


Solar Mate
Day time
Night
Battery
Solar cells
The energy needed to charge the battery is free.
LGP

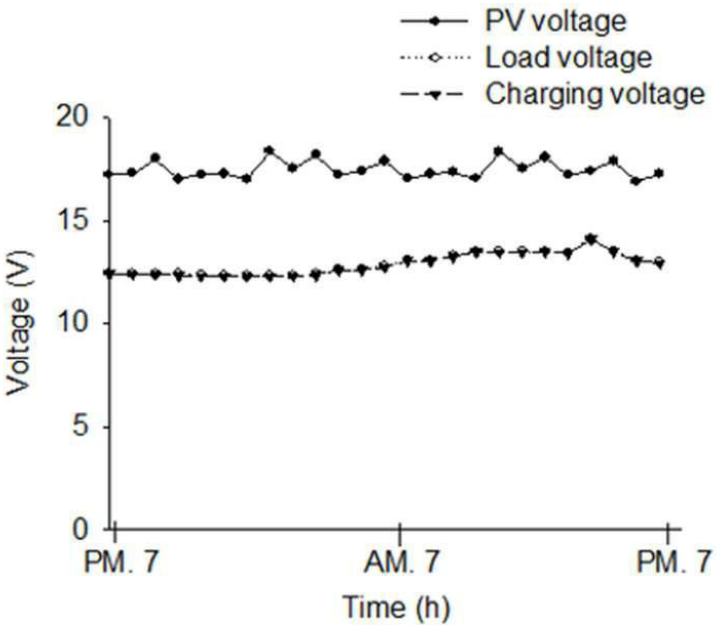
도면10a


Load power
Charging power
Power (W)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
PM. 7
AM. 7
PM. 7
Time (h)

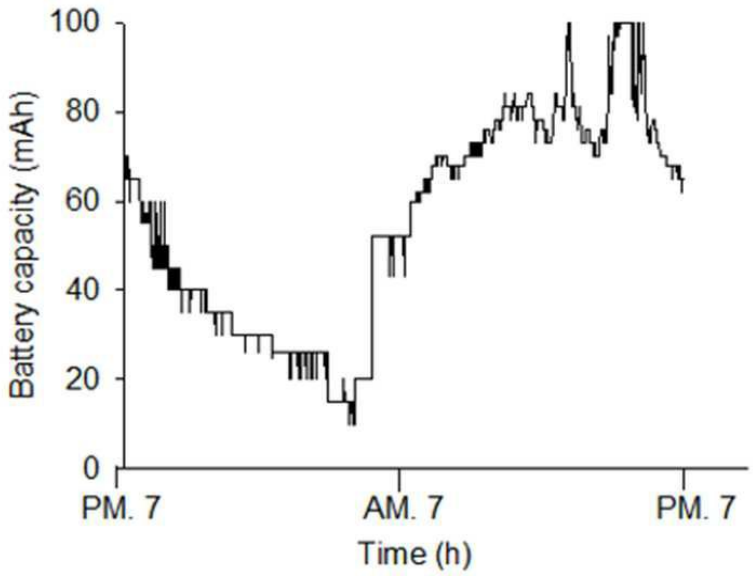
도면10b


Load current
Charging current
12
10
8
6
4
2
0
Current (A)
PM. 7
AM. 7
PM. 7
Time (h)

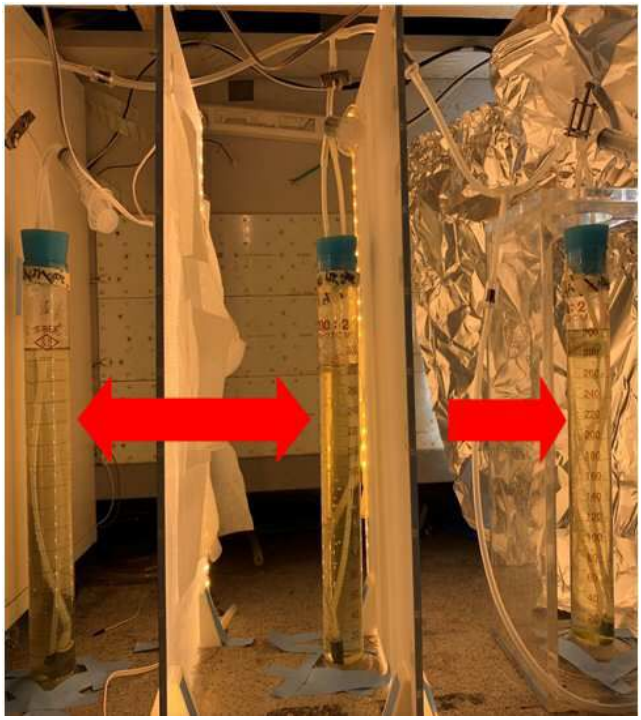
도면10c


PV voltage
Load voltage
Charging voltage
20
15
10
5
0
Voltage (V)
PM. 7
AM. 7
PM. 7
Time (h)

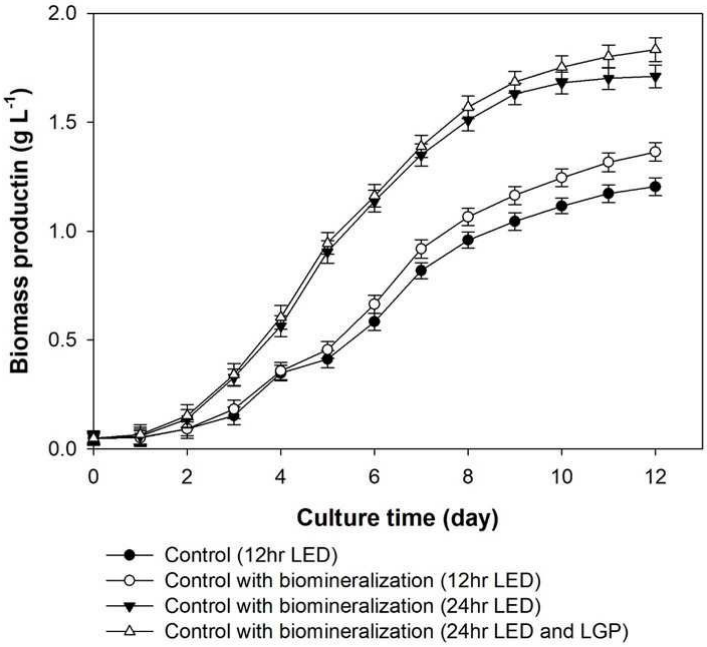
도면10d



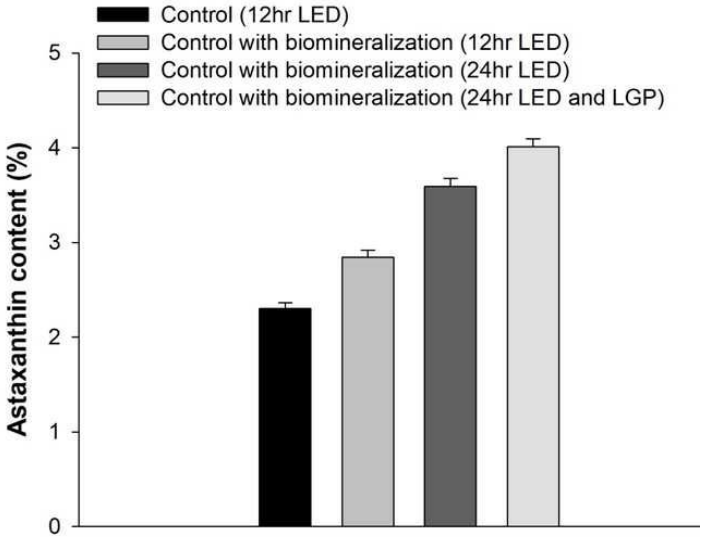
도면11a



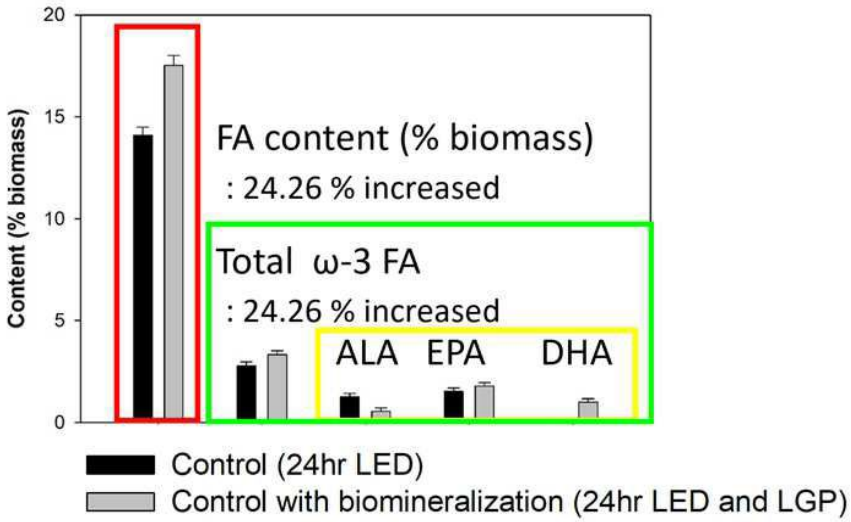
도면11b


Biomass productin (g L-1)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
10
12
Culture time (day)
Control (12hr LED)
Control with biomineralization (12hr LED)
Control with biomineralization (24hr LED)
Control with biomineralization (24hr LED and LGP)

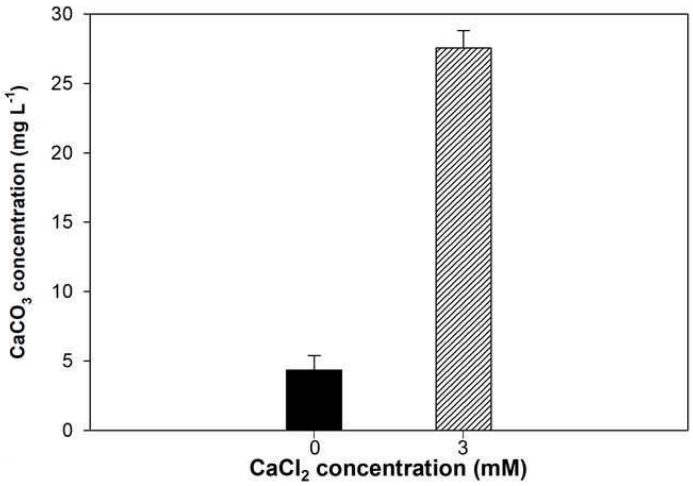
도면11c


Control (12hr LED)
Control with biomineralization (12hr LED)
Control with biomineralization (24hr LED)
Control with biomineralization (24hr LED and LGP)
Astaxanthin content (%)
5
4
3
2
1
0

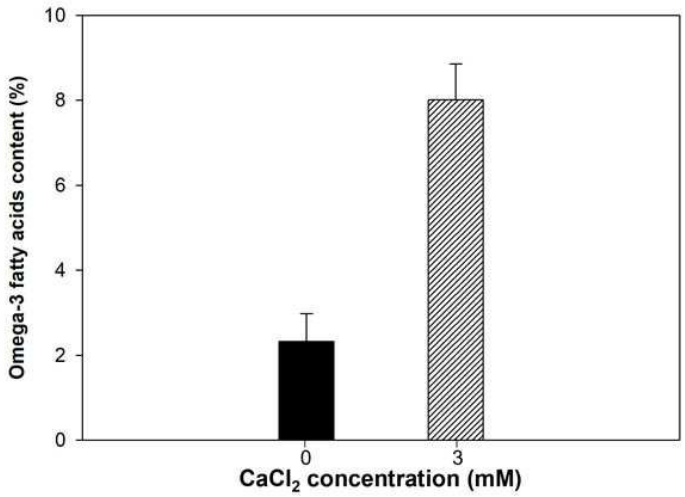
도면11d



도면12



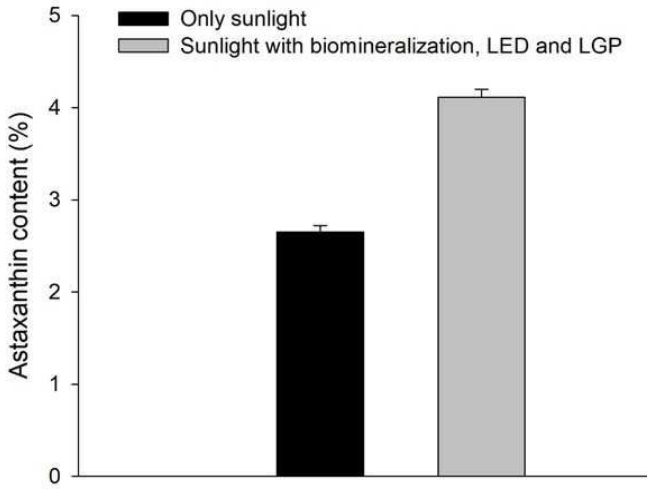
도면13



도면14

Fatty acid concentration (mg L^{-1})	Autotrophic condition	
	$CaCl_2$ (0 mM)	$CaCl_2$ (3 mM)
SFA		
C16:0	141.03 ± 15.5	349.44 ± 28.6
C18:0	9.11 ± 1.5	21.61 ± 3.2
UFA		
C16:1	12.50 ± 1.8	17.52 ± 2.1
C18:1	14.24 ± 1.3	23.14 ± 2.4
C18:2	2.85 ± 0.2	48.05 ± 4.9
C18:3n3	21.65 ± 4.6	48.58 ± 5.4
C18:3n6	9.83 ± 1.5	20.87 ± 2.1
C18:4n6	6.01 ± 1.1	12.17 ± 1.9
C20:5n3	26.29 ± 2.7	96.24 ± 8.5
C22:5n3	-	26.24 ± 4.8
Total SFA	150.14 ± 17.0	371.06 ± 31.8
Total MUFA	26.74 ± 3.1	40.66 ± 4.5
Total PUFA	66.62 ± 10.1	252.14 ± 27.6
Total ω-3 FA	47.94 ± 7.3	171.05 ± 18.7
Total FA	243.5 ± 30.2	663.86 ± 63.9
FA content (% biomass)	14.1 ± 0.4	28.5 ± 0.6
Fraction of total FA (% lipid)		
SFA	61.7 ± 3.2	55.9 ± 2.8
UFA	38.3 ± 1.0	44.1 ± 1.4
Total ω-3 FA	19.7 ± 0.2	25.8 ± 0.3
C18:3n3	8.9 ± 0.3	7.3 ± 0.2
C20:5n3	10.8 ± 0.2	14.5 ± 0.4
C22:5n3	-	4.0 ± 0.1

도면15



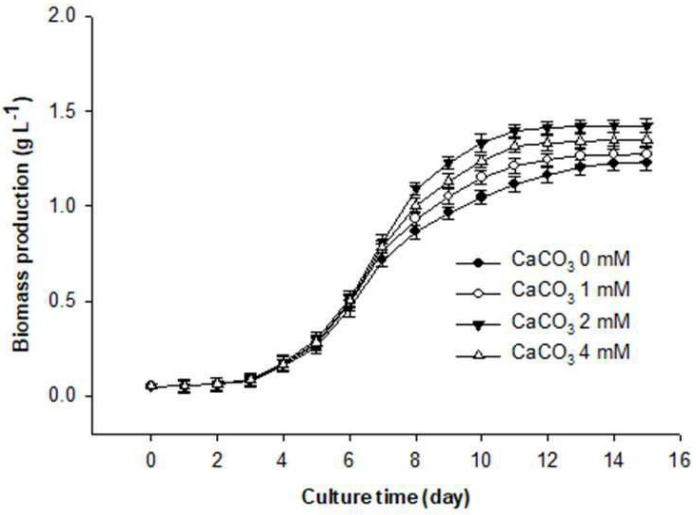
도면16a

	Light 24 h	Light 12 h	Light 0 h
CO_2 removal rate (g/L/day)	0.33957	0.16533	0.04752
Biomass productivity (g/L/day)	0.19056	0.08271	0.01667
Astaxanthin productivity (g/L/day)	7.38189	4.04821	0

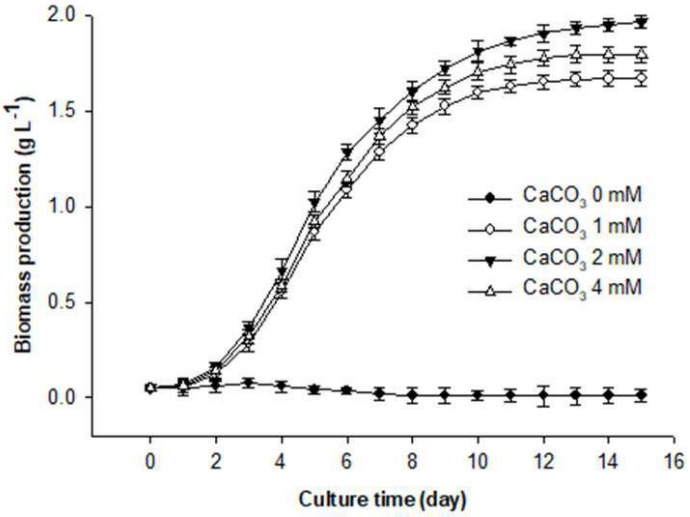
도면16b

	Electricity energy consumption (MWh/year; 10 ton)	CO_2 emission (MWh/year*0.4594 ton CO_2 MWh; 10 ton)	CO_2 removal rate by biomass (g/L/day)
Sun light and LED	50.13	23.03	0.1551
Sun light, LED, LGP and Solar cells	7.70 (saved)	3.54 (prevent)	
Sun light	-	-	0.07425

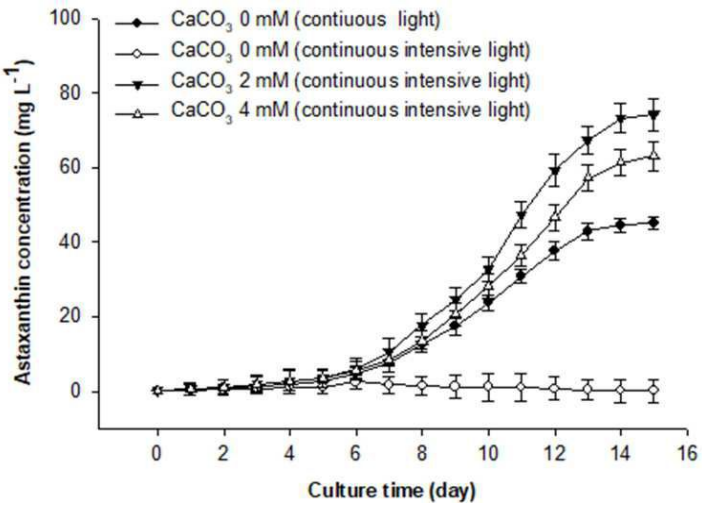
도면17a



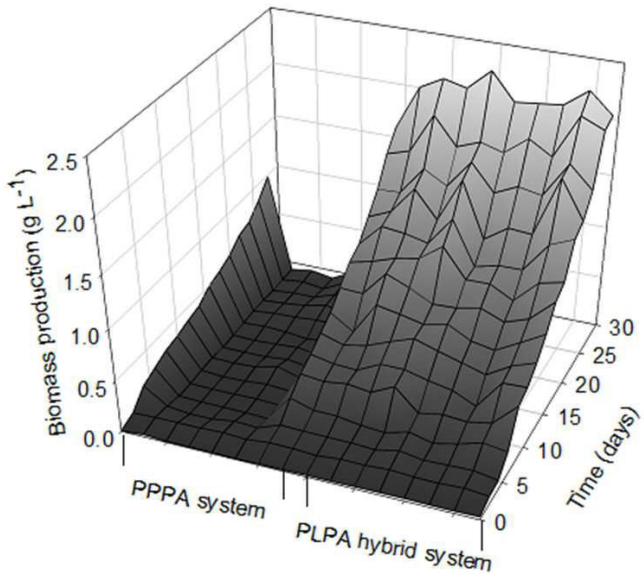
도면17b



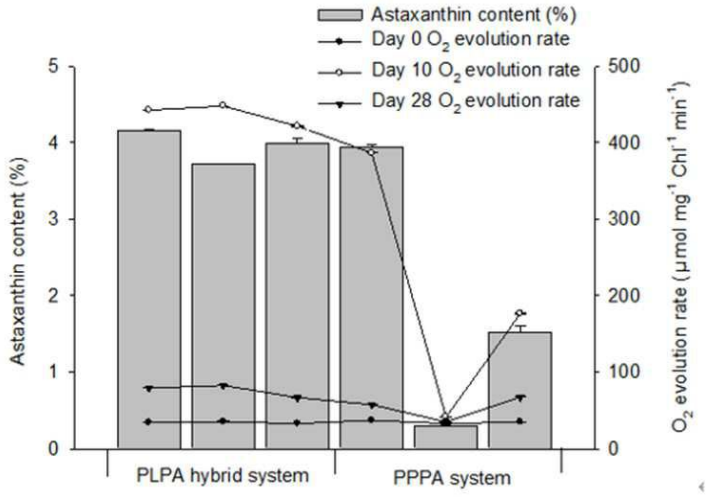
도면17c



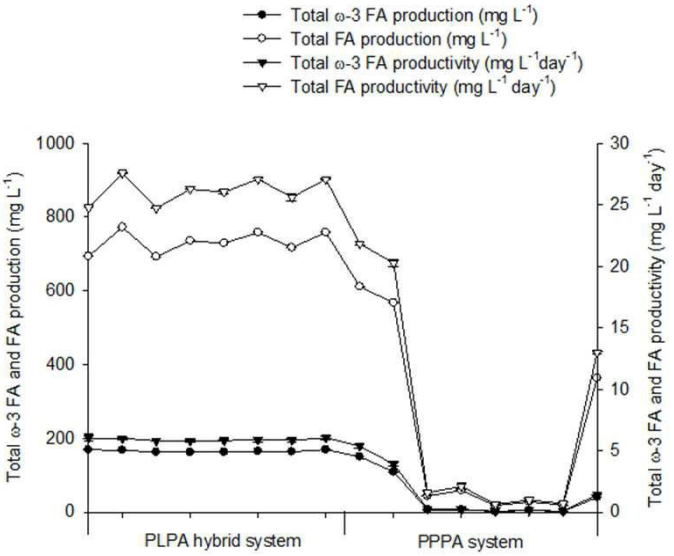
도면18a



도면18b


Astaxanthin content (%)
Day 0 O_2 evolution rate
Day 10 O_2 evolution rate
Day 28 O_2 evolution rate
Astaxanthin content (%)
O_2 evolution rate (μmol mg^{-1} Chl^{-1} min^{-1})
PLPA hybrid system
PPPA system

도면18c


Total ω-3 FA production (mg L^{-1})
Total FA production (mg L^{-1})
Total ω-3 FA productivity (mg $L^{-1}$$day^{-1}$)
Total FA productivity (mg L^{-1} day^{-1})
Total ω-3 FA and FA production (mg L^{-1})
Total ω-3 FA and FA productivity (mg L^{-1} day^{-1})
PLPA hybrid system
PPPA system