



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년03월27일  
 (11) 등록번호 10-1125668  
 (24) 등록일자 2012년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0106662  
 (22) 출원일자 2011년10월18일  
 심사청구일자 2011년10월18일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020040073693 A  
 JP11243943 A  
 JP2003325165 A

(73) 특허권자  
 한국해양연구원  
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)  
 (72) 발명자  
 강도형  
 경기도 안산시 상록구 사동 1345-1 요진아파트  
 206-101  
**아부 아판**  
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 특허법인 대아

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김윤경

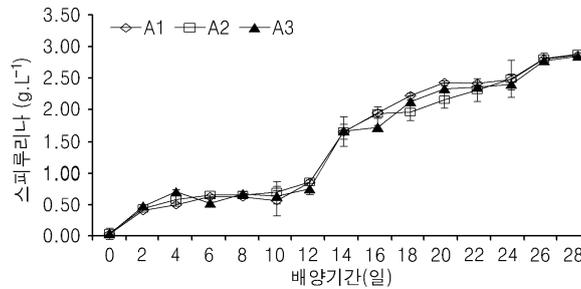
(54) 발명의 명칭 **전처리 해수를 이용한 스피롤리나 배양액 제조 방법**

**(57) 요약**

전처리 해수를 이용하여 스피롤리나((Spirulina sp.) 배양액의 제조 비용을 감소시킬 수 있는 스피롤리나 배양액 제조 방법에 대하여 개시한다.

본 발명에 따른 스피롤리나 배양액 제조 방법은 천연 해수에 석탄 및 NaOH를 첨가하여, 우유빛 탁도 생성 물질이 제거된 전처리 해수를 제조하는 단계; 및 염분 농도 13~18 psu가 되도록 상기 전처리 해수를 담수(Freshwater)로 희석하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**허수진**

경기도 안산시 상록구 장화1안길 7, 하이츠빌라 202호 (사동)

**오철홍**

경기도 안산시 상록구 사3동 푸르지오 6차아파트 622동 903호

**이대원**

경기도 안산시 상록구 사2동 대우 6차 620-2202

**박홍식**

서울특별시 동대문구 답십리1동 대우아파트 102동 1502호

**전선미**

부산광역시 동래구 온천2동 화신아파트 2-1107

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PM56130

부처명 국토해양부

연구사업명 미래해양기술개발사업

연구과제명 해산스피롤리나의 생산기술개발 및 고부가가치 사업 연구개발

주관기관 한국해양연구원

연구기간 2008.11.11 ~ 2011.11.10

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PE98592

부처명 한국해양연구원

연구사업명 조류를 이용한 바이오에너지 자원화 기술개발

연구과제명 조류를 이용한 바이오에너지 자원화 기술개발

주관기관 한국해양연구원

연구기간 2009.01.01 ~ 2013.12.31

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

천연 해수에 석탄 및 NaOH를 첨가하여, 우유빛 탁도 생성 물질이 제거된 전처리 해수를 제조하는 단계; 및 염분 농도 13~18 psu가 되도록 상기 전처리 해수를 담수(Freshwater)로 희석하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 스피롤리나(Spirulina sp.) 배양액 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 석탄은

역청탄, 갈탄, 무연탄, 분탄 및 목탄 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 석탄은

상기 천연해수의 염분 농도 31psu를 기준으로, 26.3~30.2 g/L의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 석탄은

상기 천연해수의 염분 농도(psu)에 따라 하기 식 1에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

[식 1]

$$RA_c \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_c$$

(식 1에서,  $RA_c$ 는 요구되는 석탄의 농도,  $\mu_c$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 석탄을 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 석탄의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 NaOH는

상기 천연해수의 염분 농도 31psu를 기준으로, 7.75~8.25 g/L의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 NaOH는

상기 천연해수의 염분 농도(psu)에 따라 하기 식 2에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

[식 2]

$$R_{NaOH} \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_{NaOH}$$

(식 2에서,  $R_{NaOH}$ 는 요구되는 NaOH의 농도,  $\mu_{NaOH}$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 NaOH를 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 NaOH의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 희석된 용액에 0.9~1.1 g/L의  $K_2HPO_4$ 를 더 첨가하는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 희석된 용액에

$NaHCO_3$ ,  $NaNO_3$ ,  $K_2SO_4$ ,  $K_2HPO_4$  및  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 더 첨가되고,

$H_3BO_3$ ,  $Na_2\text{-EDTA} \cdot 2H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $GeO_2$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  및  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  중 1종 이상이 더 첨가되는 것을 특징으로 하는 스피롤리나 배양액 제조 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 스피롤리나(spirulina sp.) 배양액 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 전처리 해수를 이용하여 스피롤리나 배양액의 제조 비용을 감소시킬 수 있는 스피롤리나 배양액 제조 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 인간의 음식물, 바이오 연료, 의약품 및 화장품 용도와 관련하여 미세조류 연구가 점점 더 각광을 받고 있다.

[0003] 미세조류 중 스피롤리나(Spirulina sp.)는 두날리엘라(Dunaliella sp.)와 함께 건강 식품 시장 용도, 의약품 및 바이오연료 공급원료를 주로 공급하기 위해서 배양되는 가장 가치 높은 해양 미세조류로 알려져 있다.

[0004] 그러나, 스피롤리나 배양을 위한 배양액으로, 천연해수를 이용하지 못하고, SOT(Spirulina Ogawa Terui)와 같은 고가의 인공 배양액이 이용되고 있다. 스피롤리나 배양액으로 천연해수를 이용하는 경우, 우유빛 탁도 생성, 영양분의 검출, 미세조류의 클럼핑(clumping),  $HPO_4^{2-}$  용해도의 감소, 배양액 내 백색 침전물 형성 등 다양한 문제점이 있다.

[0005] 이 중에서 우유빛 탁도 생성은 주로 마그네슘 이온( $Mg^{2+}$ )이나 칼슘 이온( $Ca^{2+}$ )에 의하여 생성되는데, 미세조류의 배양을 위하여 인산염 및 탄산염을 천연해수에 첨가하면, 배양액이 탁해지는 현상이 발생한다. 이러한 우유빛 탁도 생성은 스피롤리나 배양시 단백질의 함량이 저하되고, 애쉬(ash) 함량이 증가하는 원인이 된다.

- [0006] 또한, 배양액 내 백색 침전물 생성 역시 애쉬 함량이 증가하는 원인이 된다.
- [0007] 한편, 다른 화합물질과 함께 탄소의 이용성은 스피롤리나 성장에 있어서 가장 중요한 인자가 된다. 일반적으로, 탄소는 모든 보고된 스피롤리나 배양 매체 내에서 탄산산염( $\text{NaHCO}_3$  및  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )으로서 공급되나, 전술한 문제점들은 탄산염을 천연해수로 첨가한 후에 발생된다.
- [0008] 본 발명과 관련하여, 대한민국 특허공개 제10-2004-0073693호에는 SOT 배양액에서 NaOH 대신에 숯을 부가하여 pH를 조절하는 동시에 탄소원으로 활용하여 스피롤리나를 배양하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 상기 문헌에 제시된 기술의 경우, 숯이 배양액에 침전되어 pH 조절효과가 크지 못하고, 침전된 숯에 스피롤리나 조류가 흡착되는 문제점이 있다.
- [0009] 또한, 대한민국 특허공개 제10-2006-17033호에는 스피롤리나 조류의 성장 최적화 및 최대 수확을 위하여, 질소 및 탄소의 농도를 조절한 SOT 배양액이 개시되어 있으나, 고가의 비용이 소요되는 문제점이 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0010] 본 발명의 목적은 전처리 해수를 이용하여 스피롤리나 배양액의 제조 비용을 감소시킬 수 있으며, 스피롤리나 배양시 단백질 함량을 높이면서 애쉬 함량을 낮출 수 있는 스피롤리나 배양액 제조 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 상기 하나의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 실시예에 따른 전처리 해수를 이용한 스피롤리나(Spirulina sp.) 배양액 제조 방법은 천연 해수에 석탄 및 NaOH를 첨가하여, 우유빛 탁도 생성 물질이 제거된 전처리 해수를 제조하는 단계; 및 염분 농도 13~18 psu가 되도록 상기 전처리 해수를 담수(Freshwater)로 희석하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 한다.
- [0012] 이때, 상기 석탄은 역청탄을 이용할 수 있다. 이외 갈탄, 무연탄, 분탄 및 숯과 같은 목탄 및 가스 형태의 탄소원들도 사용 가능하나, 환경적 및 지속가능성의 특성을 고려하여 특성별 시스템으로 적용할 수 있다.
- [0013] 또한, 상기 석탄은 상기 천연해수의 염분 농도(psu)에 따라 하기 식 1에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0014] [식 1]
- [0015]  $RA_c \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_c$
- [0016] (식 1에서,  $RA_c$ 는 요구되는 석탄의 농도,  $\mu_c$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 석탄을 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 석탄의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)
- [0017] 또한, 상기 NaOH는 상기 천연해수의 염분 농도(psu)에 따라 하기 식 2에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.

- [0018] [식 2]
- [0019]  $RA_{\text{NaOH}} \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_{\text{NaOH}}$
- [0020] (식 2에서,  $RA_{\text{NaOH}}$ 는 요구되는 NaOH의 농도,  $\mu_{\text{NaOH}}$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 NaOH를 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 NaOH의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)

**발명의 효과**

- [0021] 본 발명에 따른 전처리 해수를 이용한 스피롤리나 배양액 제조 방법은 석탄과 NaOH를 이용한 전처리 해수를 이용함으로써, 마그네슘 이온( $Mg^{2+}$ )이나 칼슘 이온( $Ca^{2+}$ )과 같이 우유빛 탁도 생성 물질을 제거할 수 있으며, 배양액 내 백색 침전물 생성을 감소시킬 수 있다. 이를 통하여, 스피롤리나 배양시 단백질의 함량을 높이고, 애쉬(ash) 함량을 낮출 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 전처리 해수를 이용한 스피롤리나 배양액 제조 방법은 SOT 배양액에 비하여 2배 이상 저비용으로 스피롤리나 배양액을 제조할 수 있는 장점이 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1 내지 도 3은 다양한 염분 농도의 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마(spirulina maxima) 4주간 배양시 배양기간에 따른 스피롤리나 맥시마의 농도(바이오매스)를 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 및 비교예에 따른 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마 배양시, 16일동안 스피롤리나 맥시마의 농도 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 및 비교예에 따른 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마 배양시, 16일동안 스피롤리나 맥시마의 클로로필 a(chlorophyll a) 및 피코시아닌 (phycocyanin)의 농도 변화를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들 및 도면을 참조하면 명확해질 것이다.
- [0025] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0026] 이하, 본 발명에 따른 전처리 해수를 이용한 스피롤리나 배양액 제조 방법에 대하여 상세히 설명하기로 한다.
- [0027] 본 발명에 따른 스피롤리나(Spirulina sp.) 배양액 제조 방법은 전처리 해수 제조 단계 및 전처리 해수 회석 단계를 포함한다.
- [0028] 전처리 해수 제조
- [0029] 전처리 해수 제조 단계에서는 천연 해수를 전처리하여 우유빛 탁도 생성 물질이 제거된 전처리 해수를 제조한다. 천연 해수의 전처리를 위하여, 본 발명에서는 석탄 및 NaOH를 천연 해수에 첨가한다. 그 결과 마그네슘 이온과 칼슘 이온과 같은 우유빛 탁도 생성 물질이 침전되었다.
- [0030] 석탄은 목탄, 역청탄 등을 이용할 수 있으나, 목탄의 경우 산림 자원을 고갈시키는 요인이 될 수 있으므로, 역청탄을 이용하는 것이 더 바람직하다.
- [0031] 전처리 해수의 성분 평가를 위하여, pH 8.20 및 염분 농도가 31.00 psu인 천연해수에 27.60 g/L 역청탄 및 7.75g/L NaOH를 첨가한 후, 29℃의 온도에서 일주일간 유지하였다.
- [0032] 전처리 해수의 경우, 대략 92% 정도가 상등액(Supernatant)이었고, 나머지는 침전물이었다. 또한, 천연해수로부터 전처리된 해수까지, pH가 8.20로부터 13.14으로 증가하였으며, 염분 농도가 31.00 psu 로부터 45.00 psu로 증대되었다.
- [0033] 표 1은 천연해수와 전처리 해수의 상등액(Supernatant)에 포함된 유기 탄소(Organic Carbon) 및 각종 성분들의 함량을 나타낸 것이다.
- [0034] 표 1에서, 유기탄소 분석기(TOC-5000A, Shimadzu사 제조)를 이용하여, 천연해수 및 전처리 해수 내의 총 유기

탄소(organic carbon; OC)를 평가하였다. 또한, 천연해수 및 전처리 해수 내의 Ca, Mg, Na, As, Cd, Cr, Pb, Mg, K, Sr 및 Hg의 농도, 그리고 또한 침전물 내의 Ca 및 Mg의 농도를 한국고분자시험연구소에서 측정하였다.

[0035] [표 1]

물질	천연 해수	상등액(전처리 해수)
	mg-L <sup>-1</sup>	mg-L <sup>-1</sup>
OC	1.57 ± 0.10	10.94 ± 0.44
Na	10120.00	16040.00
K	1305.00	1446.00
Mg	874.40	0.80
Ca	500.70	337.90
Sr	6.90	9.10
P	0.00	0.00
Hg	0.00	0.00
As	0.00	0.00
Cd	0.00	0.00
Cr	0.00	0.00
Pb	0.00	0.00
	천연 해수	침전물
	mg-L <sup>-1</sup>	mg-L <sup>-1</sup>
Mg	874.40	22822.70
Ca	500.70	4090.07

[0036]

[0037]

표 1을 참조하면, 유기 탄소는 통상적인 천연해수의 유기 탄소 보다 전처리된 해수에서 7배 더 높아 졌다. Na, K 및 Sr이 천연해수로부터 전처리된 해수로 각각 증대되었다. 한편, Hg, As, Cd, Cr 및 Pb와 같은 중금속은 전처리된 해수에서 탐지되지 않았다.

[0038]

특히, 천연해수 내의 Mg 및 Ca 는 874.40 및 500.70 mg/L 인데 반하여, 전처리된 해수에서 0.80 및 337.90 mg/L로 감소되었다. 천연해수 내의 Mg 및 Ca 는 침전물 내에서 각각 99.45% 및 32.52% 검출되었다(표 1 참조). 검출물 내의 Mg 함량은 22.28 g/L 이었다.

[0039]

석탄에 함유된 CO<sub>2</sub> 또는 CO가 NaOH와 반응하여 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 또는 NaHCO<sub>3</sub> 를 형성할 수 있고, 그리고 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>는 높은 pH 에서 해수로부터 Ca 및 Mg를 검출한다. 높은 pH 는 또한 전처리된 해수 내에 존재하는 유기체를 사멸시켜 다른 종에 의한 오염을 방지할 수 있다.

[0040]

한편, 천연 해수의 염분 농도에 따라 석탄 및 NaOH 첨가량을 최적화할 필요성이 있다.

[0041]

표 2는 염분 농도가 31 psu인 천연해수에 대하여, 석탄 및 NaOH 첨가량에 따라서 제조되는 전처리 해수의 투명도와 전처리 해수가 희석되어 염분 농도가 15.00 psu인 배양액 내의 백색 침전물 형성 양을 나타낸 것이다. 관찰은 육안으로 하였다.

[0042]

[표 2]

NaOH 농도 (g/L)	염분 농도 (psu)	역청탄 농도 (g/L)	투명도	희석액 내 백색 침전물
7.50	31	25.00	Transparent	More
	31	26.30	Transparent	More
	31	27.60	Transparent	Less
	31	28.90	Transparent	Less
	31	30.20	Transparent	Less
7.75	31	25.00	Transparent	More
	31	26.30	Transparent	Less
	31	27.60	Transparent	No more
	31	28.90	Transparent	No more
	31	30.20	Transparent	No more
8.00	31	25.00	Transparent	More
	31	26.30	Transparent	Less
	31	27.60	Transparent	No more
	31	28.90	Transparent	No more
	31	30.20	Transparent	No more
8.25	31	25.00	Transparent	Less
	31	26.30	Transparent	No more
	31	27.60	Transparent	No more
	31	28.90	Transparent	No more
	31	30.20	Transparent	No more

[0043]

[0044]

표 2를 참조하면, 천연해수의 일반적 염분 농도에 해당하는 31 psu의 염분 농도를 갖는 천연해수에 역청탄과 NaOH를 첨가하는 경우, 역청탄의 농도가 25g/L 이상이고 NaOH 농도가 7.50 이상일 경우, 투명성이 유지되었다. 또한, 역청탄의 농도가 27.60 g/L 이상이고, NaOH의 농도가 7.75g/L 이상인 경우에는 배양액 내 백색 침전물이 형성되지 않았다.

[0045]

상기 표 2에서 NaOH가 농도가 8.25g/L일 경우, 역청탄의 농도가 26.3g/L인 경우에도 배양액 내 백색 침전물이 형성되지 않았다. 따라서, 상기 표 2에 의할 때, 석탄은 천연해수의 염분 농도 31 psu를 기준으로, 26.3~30.2 g/L의 농도로 첨가되는 것이 바람직하고, 이 경우 NaOH 사용이 증가하여 중화를 위하여 HCl이 사용되어야 하므로, 석탄의 사용은 27.60g/L로 첨가되는 것이 가장 바람직하다.

[0046]

또한, 상기 표 2를 참조하면, 상기 NaOH는 천연해수의 염분 농도 31psu를 기준으로, 배양액 내에서 백색 침전물이 형성되지 않도록 7.75~8.25 g/L의 농도로 첨가되는 것이 바람직하고, 7.75 g/L이 가장 바람직하다.

[0047]

한편, 석탄 및 NaOH의 사용량은 천연해수의 염분 농도(psu)에 따라 달라진다.

[0048]

우선, 석탄의 사용량은 하기 식 1에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0049]

[식 1]

[0050]

$$RA_c \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_c$$

[0051]

(식 1에서,  $RA_c$ 는 요구되는 석탄의 농도,  $\mu_c$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 석탄을 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 석탄의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)

[0052]

예를 들어, 염분 농도 31 psu에서 27.60g/L의 석탄을 필요로 하는 것을 알고 있다면,  $\mu_c$ 는 27.6 / 31로서, 대략 0.89가 된다. 따라서, 이를 기초로, 염분 농도 20psu의 천연 해수에서는 전처리를 위하여 대략 17.8g/L의 석

탄이 요구된다.

[0053] 다음으로, NaOH는 하기 식 2에 의해 정해지는 농도로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0054] [식 2]

[0055]  $RA_{NaOH} \text{ (g/L)} = \text{천연해수염분 농도} \times \mu_{NaOH}$

[0056] (식 2에서,  $RA_{NaOH}$ 는 요구되는 NaOH의 농도,  $\mu_{NaOH}$ 는 특정한 염분 농도를 갖는 천연해수 1L에 NaOH를 첨가하였을 때 투명하고, 담수로 희석하여 염분 농도 15.0psu로 하였을 때 백색 침전물이 존재하지 않는 NaOH의 농도를 상기 특정한 염분 농도로 나눈 값)

[0057] 예를 들어, 염분 농도 31 psu에서 7.75g/L의 NaOH를 필요로 하는 것을 알고 있다면,  $\mu_{NaOH}$ 는 7.75 / 31로서, 대략 0.25가 된다. 따라서, 이를 기초로, 염분 농도 20psu의 천연 해수에서는 전처리를 위하여 대략 5g/L의 석탄이 요구된다.

[0058] 실제, 상기 식 1 및 식 2에 따른 역청탄 및 NaOH 농도를 10.00~50.00 psu인 천연해수에 적용한 결과, 모든 경우에서 전처리된 해수의 투명도, 스피롤리나 맥시마 배양 매체의 투명도 그리고 백색 침전물 형성 문제가 발생하지 않았다.

[0059] 전처리 해수 희석

[0060] 다음으로, 전처리 해수 희석 단계에서는 스피롤리나 배양에 적합한 염분 농도인 13~18 psu가 되도록 전처리 해수를 담수(Freshwater; FW)로 희석하여 스피롤리나 배양액을 제조한다.

[0061] 담수는 염분 농도 7.5 psu 정도인 것을 이용할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 전처리 해수와 담수의 염분 농도에 따라서, 최종 염분 농도 13~18 psu를 갖는 스피롤리나 배양액을 제조하기 위한 전처리 해수 및 담수의 사용량이 결정될 수 있다. 예를 들어, 전처리 해수의 염분 농도가 45 psu이고, 담수의 염분 농도가 7.5인 경우, 전처리 해수 1L(20vol%)와 담수 4L(80vol%)를 사용하여 염분 농도 15 psu인 스피롤리나 배양액을 제조할 수 있다.

[0063] 스피롤리나 배양액에는 유기 탄소 함량 증가, 영양분 제공 등을 위해서, 대략 8.5g/L 정도의  $NaHCO_3$ , 대략 2.5 g/L 정도의  $NaNO_3$ , 대략 1g/L 정도의  $K_2SO_4$ , 0.9~1.1 g/L의  $K_2HPO_4$ 가 첨가될 수 있으며, 또한, 천연해수의 전처리 과정에서 Mg 농도가 0.020 mg/L로 감소됨에 따라,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 대략 0.12g/L 정도의 농도로 첨가될 수 있다. 이외에도 미량의  $H_3BO_3$ ,  $Na_2-EDTA \cdot 2H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $GeO_2$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  등이 더 첨가될 수 있다.

[0064] 한편, 전처리 해수 희석을 통하여 제조되는 스피롤리나 배양액은 염분 농도가 13~18 psu인 것이 바람직하다.

[0065] 스피롤리나 배양액의 염분 농도가 18 psu를 초과하면, 스피롤리나 배양 시 단백질 함량 비율이 상대적으로 낮아지고 애쉬 함량이 높아지는 문제점이 있다. 반대로, 해산 스피롤리나 배양액의 염분 농도가 13 psu 미만일 경우, 스피롤리나 배양이 잘 이루어지지 않는 문제점이 있다.

[0066] 표 3은 다양한 염분 농도의 스피롤리나 배양액의 조성을 나타낸 것이다.

[0067] 표 3에 나타난 바와 같이, 스피롤리나 배양액의 염분 농도를 각각 15.00 psu, 20.00 psu 및 25.00 psu로 구분하였으며,  $K_2HPO_4$ 를 제외하고 다른 첨가물질의 농도는 일정하게 하였다.

[0068] [표 3]

염분 농도	A = 15.00 psu	B = 20.00 psu	C = 25.00 psu
첨가물질	g. L <sup>-1</sup>	g. L <sup>-1</sup>	g. L <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	8.50	8.50	8.50
NaNO <sub>3</sub>	2.50	2.50	2.50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00	1.00	1.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	A1 = 0.75; A2 = 1.00 and A3 = 1.25	B1= 0.75, B2 = 1.00 and B3 = 1.25	C1 = 0.75 C2 = 1.00 and C3 = 1.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.120	0.120	0.120
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00200	0.00200	0.00200
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.05000	0.05000	0.05000
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00025	0.00025	0.00025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00550	0.00550	0.00550
GeO <sub>2</sub>	0.00150	0.00150	0.00150
Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00010	0.00010	0.00010
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.00015	0.00015	0.00015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00010	0.00010	0.00010
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00001	0.00001	0.00001

[0069]

[0070]

표 4, 그리고 도 1 내지 도 3은 다양한 염분 농도의 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마(*spirulina maxima*) 4주간 배양 시 배양기간에 따른 스피롤리나의 농도(바이오매스)를 나타낸 것이다.

[0071]

[표 4]

1 <sup>st</sup> Step	(psu)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g. L <sup>-1</sup> )	Protein	Lipid	CHO	Ash	Moisture
A1	15.00	0.75	45.77	11.64	20.40	20.13	2.06
A2		1.00	46.67	11.62	19.86	19.76	2.09
A3		1.25	38.73	9.36	20.13	28.99	2.79
B1	20.00	0.75	41.02	10.04	21.39	24.61	2.94
B2		1.00	42.72	8.94	21.49	25.02	1.83
B3		1.25	31.77	8.99	22.40	34.08	2.76
C1	25.00	0.75	41.22	9.87	20.61	25.37	2.93
C2		1.00	39.58	8.30	23.76	26.81	1.55
C3		1.25	27.85	9.56	24.90	35.85	1.84

[0072]

[0073]

표 4를 참조하면, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 일정한 경우, 배양액의 염분 농도가 낮을수록 단백질의 함량이 더 높으며, 애쉬의 함량이 더 낮아지는 것을 볼 수 있다. 따라서, 표 4에서 배양액의 염분 농도는 15.00psu인 것이 가장 바람직하다.

[0074]

또한, 표 4를 참조하면, 배양액의 15.00 psu 염분 농도에 대하여, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 1.00 g/L일 경우, 단백질의 함량이 가장 높았고, 애쉬의 함량이 가장 낮았다.

[0075]

한편, 배양액의 염분 농도가 15.00 psu인 A1, A2 및 A3의 경우, 4주 배양 후 스피롤리나 농도(g/L)는 각각 2.75, 2.80 및 2.58 이었다. 또한, 염분 농도가 20.00 psu인 B1, B2 및 B3의 경우, 4주 배양 후 스피롤리나 농도(g/L)는 2.87, 2.88 및 2.85 이었다. 또한, 염분 농도가 25.00 psu인 C1, C2 및 C3의 경우, 4주 배양 후 스피롤리나 농도(g/L)는 2.65, 3.00 및 2.90 이었다.

[0076]

즉, 표 4 및 도 1 내지 도 3을 참조하면, 동일한 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도에서, 배양액의 염분 농도가 증가할수록 대체로 스피롤리나 생산량은 증가하였으나, 스피롤리나 품질 즉, 단백질의 함량은 더 낮아지고, 애쉬의 농도는 더 높아진다고 볼 수 있다. 또한, 동일한 염분 농도에서, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 1.00일 경우 가장 스피롤리나 생산량이 높았다.

[0077] 이를 토대로, 가장 적합한 배양액의 예는 염분 농도 15.00 psu, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도 1.00 g/L라 볼 수 있다.

[0078] 표 5에 도시된 조성 및 13.45psu의 염분 농도를 갖는 SOT 배양액(비교예) 과, 표 6에 도시된 조성 및 염분 농도가 15.00 psu인 전처리 해수를 이용한 배양액(실시예)에서 스피룰리나 맥시마를 배양하였다. 배양시 온도는 30.00℃, 빛의 조명 강도는 7000 lx인 형광으로 하였으며, 염암주기(light/dark cycle)는 시간(h)비로 12:12로 하였다.

[0079] 4.5 L의 배양액을 포함하는 5L 용량 플라스크에서 배양을 하였고, 각각의 배양을 3차례 실시하였다. 약 0.21 g/L 의 스피룰리나 맥시마가 접종되고 그리고 공기주입 장치로 교반되었다. 성장 및 피그먼트 함량을 평가하기 위해서 샘플링하였다. 피그먼트 함량을 흡광분광분석기(PerkinElmer, Lamda35 uv/vis spectrometer, USA)로 분석하였다.

[0080] 스피룰리나의 성장 측정을 위해서, 미리 중량이 측정된 필터 종이를 통해서 샘플을 여과하였다. 필터 종이를 증류수 내에서 적신 후, 블랭크로서 사용하기 위해서 동시에 건조하였다. 필터 종이를 오븐 내에서 55℃에서 유지하였고, 건조하고 그리고 중량을 측정하였으며, 건조 중량을 g/L 로 계산하여 성장 곡선으로 표시하였다. 스피룰리나 맥시마의 성장율(specific growth rate)(μ)은 단위 시간당(t<sub>0</sub> → t<sub>1</sub>) 스피룰리나 맥시마의 농도 증가(X<sub>0</sub> → X<sub>1</sub>)로 규정되며, 하기 식 3을 이용하여 계산하였다.

[0081] [식 3]

$$\mu \text{ (day}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0}$$

[0082]

[0083] [표 5] (단위 : g/L)

NaHCO <sub>3</sub>	13.61
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.03
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
NaNO <sub>3</sub>	2.50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
NaCl	1.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.08
Trace metals solution	1.00 ml
Vitamins solution	1.00 ml
Trace metals solution g · L <sup>-1</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.00
Co (NO) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.00
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.005
Vitamin solution	<b>g · L<sup>-1</sup></b>
Cyanocobalamin	0.005

[0084]

[0085] [표 6] (단위 : g/L)

NaHCO <sub>3</sub>	8.500
NaNO <sub>3</sub>	2.500
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.120
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.00200
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.05000
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00550
GeO <sub>2</sub>	0.00150
Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00010
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.00015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00010
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00001

[0086]

[0087] 도 4는 실시예 및 비교예에 따른 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마 배양시, 16일동안 스피롤리나 맥시마의 농도 변화를 나타낸 것이다.

[0088] 여기에서, 도 4에서  $\mu_{max}$ 는 단위 시간(day)당 최대 스피롤리나 맥시마 생산된 것에 대한 스피롤리나 맥시마의 성장률을 나타내었다.

[0089] 도 4를 참조하면 실시예 및 비교예에 따른 배양액 각각의  $\mu_{max}$ 는 0.133 및 0.128 d<sup>-1</sup> 이었다. 16일의 배양 후에 실시예 및 비교예 각각의 스피롤리나 맥시마의 생산량은 1.47 및 1.44 g/L 였다.

[0090] 즉, 도 4를 참조하면, 실시예 및 비교예 각각에서 스피롤리나 맥시마의 생산능력에 대하여 큰 차이가 없었다. 다만, 실시예에 따른 배양액의 경우, 그 제조 비용이 비교예에 따른 배양액보다 2.5배 정도 낮았다.

[0091] 표 7은 실시예 및 비교예에 따른 배양액으로 16일간 배양 후, 각각 배양된 스피롤리나에 포함된 성분들을 나타낸 것이다.

[0092] [표 7]

	Protein	Lipid	Carbohydrate	Ash	Moisture
비교예	63.42±0.25	12.59±0.30	12.19±0.21	7.32±0.09	4.48±0.45
실시예	58.15±0.41	12.20±0.04	18.10±0.23	7.72±0.30	3.83±0.34

[0093]

[0094] 표 7을 참조하면, 비교예의 경우가 단백질의 함량이 약간 높기는 하나, 전체적으로 거의 유사한 성분들을 함유하고 있음을 볼 수 있다.

[0095] 도 4 및 표 7을 참조하면, 본 발명에 따른 전처리 해수를 이용한 스피롤리나 배양액의 경우, 기존의 SOT 배양액과 품질이 거의 유사하면서도 저비용인 것을 의미한다.

[0096] 도 5는 실시예 및 비교예에 따른 배양액을 이용하여 스피롤리나 맥시마 배양시, 16일동안 스피롤리나 맥시마의 클로로필 a(chlorophyll a) 및 피코시아닌 (phycocyanin)의 농도 변화를 나타낸 것이다.

[0097] 도 5를 참조하면, 클로로필 a의 경우, 배양 초기에는 실시예 및 비교예 모두 거의 동일한 농도로 증가하다가, 12일을 기점으로 실시예의 경우가 현저히 농도가 증가하는 것을 볼 수 있다.

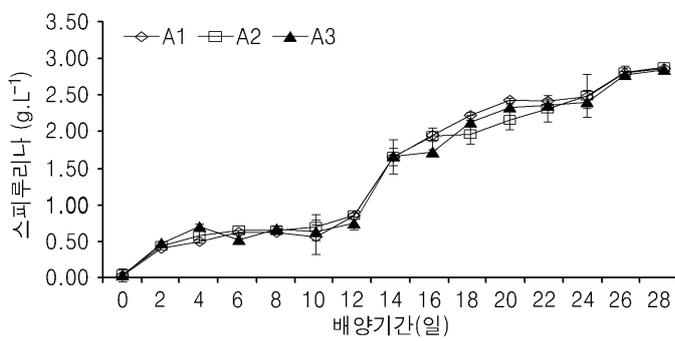
[0098] 피코시아닌의 경우, 비교예의 경우가 실시예의 경우보다 약간 높았다.

[0099] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 하여 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다.

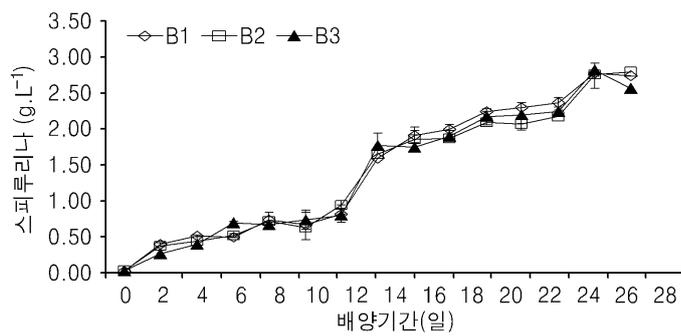
[0100] 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 아래의 특허청구범위에 의해서 정하여져야 할 것이다.

**도면**

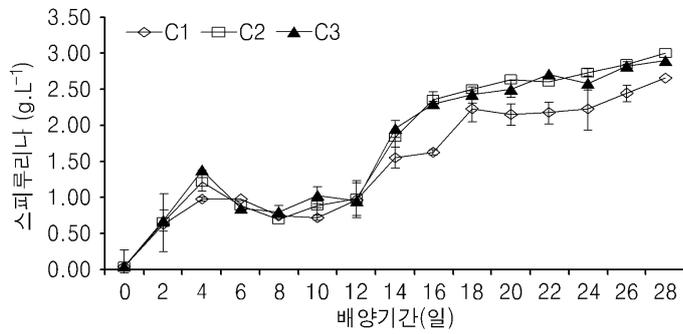
**도면1**



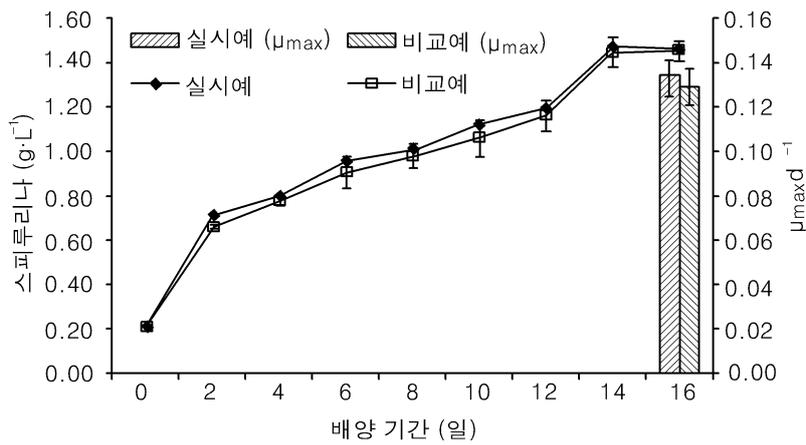
**도면2**



도면3



도면4



도면5

