

## 옥외 광배양조에서 광합성 미세조류인 *Spirulina platensis*의 대량배양에 관한 동력학적 연구

성 기 돈 · 안 주 희 · \*이 준 엽 · \*오 상 집 · †이 현 용  
강원대학교 식품공학과, \*강원대학교 사료생산공학과

### Kinetics of Cultivating Photosynthetic Microalga, *Spirulina platensis* in an Outdoor Photobioreactor

Ki-Don Sung, Ju-Hee Ann, Jun-Youp Lee\*,  
Sang-Jip Ohh\* and Hyeon-Yong Lee†

Department of Food Engineering, \*Department of Feed Science and Technology,  
Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

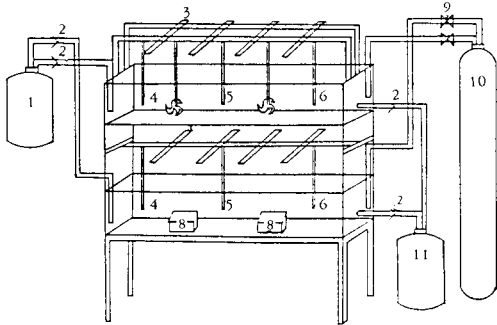
An open pond type photobioreactor for mass cultivation of *S. platensis* was designed and the growth parameters from different cultivation processes were compared. 0.30(1/day) of specific growth rate and 1.69(g/ℓ) of maximum cell density were obtained from batch cultivation. In fed-batch cultivation, specific growth rate and maximum cell density were estimated as 0.22(1/day) and 1.75(g/ℓ), respectively. Maximum biomass productivity from continuous cultivation was obtained as 0.44(g/ℓ/day). It proves that an outdoor mass cultivation of *S. platensis* considering optimal environmental condition is economically feasible. In addition, the biomass productivity was studied in two different mixing systems such as agitation and air sparging methods. The biomass productivity by an agitation method was better than that in an air sparging method.

#### 서 론

현재 전세계적으로 경작되고 있는 농작물류는 인류의 주식량공급원으로 현재까지 어느 정도의 역할을 수행하고 있지만 농지 면적당 수확량이 많지 않고 연중 2~3회만이 경작 가능하여 태양 에너지의 이용률이 극히 낮다. 이에 비해서 광합성조류는 적은 면적에서 혹은 식물의 생육이 불가능한 지역에서도 생육이 가능하며 에이커당 20배 이상의 단백질을

얻을 수 있는 것으로 알려졌다(1). 또한 다양한 종류의 유용물질과 미생물 혹은 동·식물 세포로부터 생산이 불가능한 천연의 희귀물질 생산이 가능하다(2,3). 미생물과 달리 세포의 크기가 큰 조류는 쉽게 침전되어 다양한 방법을 통한 추출이 쉬워 분리가 용이하며 수율이 높은 장점이 있다. 특히 주에너지원으로 태양 에너지를 사용함으로써 지구상에 조사되는 보존되지 않는 태양에너지의 효율적인 이용이 가능하며 탄소원으로 이산화탄소를 사용하고 부산물로 산소를 방출하는 광합성 과정을 갖고 있어 대기 오염을 낮추는 기능까지도 가지고 있다(4,5).

† Corresponding Author



1. Substrate reservoir. 2. Gear pump. 3. Cool-white fluorescent lamp. 4. Thermometer. 5. pH meter. 6. Temp. controller. 7. Plastic fan stirrer. 8. Air pump. 9. CO<sub>2</sub> flowrate meter. 10. CO<sub>2</sub> tank.

Fig. 1. Schematic diagram of a two stage open pond photobioreactor for the cultivation of *Spirulina platensis*.

그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 조류는 생육 속도가 매우 느리기 때문에 목적물질의 경제적 생산에 어려움이 따르고 있으며 정상적 생육시에는 자화적(autotrophic growth)으로 생육하나 특정 물질의 축적 혹은 분비를 위해서는 유기탄소의 존재하에서만 생육하는 heterotrophic 혹은 dark period에서만 생육하는 특징을 갖기 때문에 배양조건의 결정이 어렵다(6). 생육 속도가 느린 것으로부터 목적물질의 경제적 생산을 위해서는 옥외 배양이 필수적임에도 불구하고(7) 옥외 배양의 경우 계절에 따른 온도 및 광도 조절, 외부 오염과 무기염 농도의 균일성 유지가 어렵기 때문에 배양 공정의 scale-up에 관한 연구가 미흡한 실정이다(8,9). 그러므로 배양 공정의 효율적인 scale-up이 조류로부터 목적 물질의 경제적 생산에 가장 큰 난제로 인식되고 있다.

따라서 본 논문은 온도, 광도 등의 배양조건을 인위적으로 조절할 수 있는 대량배양조를 설계, 제작하여 옥외에서의 여러 가지 배양공정을 통해 이용가능성이 가장 높은 *Spirulina platensis*의 옥외연속 대량 배양조건에 관한 동력학적 자료를 제시하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 균체 측정

광합성 미세조류인 *Spirulina platensis*(LB 2340 UTEX, USA)를 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.042, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, urea 2.5, NaCl 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 0.42, MgSO<sub>4</sub> 0.2, FeSO<sub>4</sub>

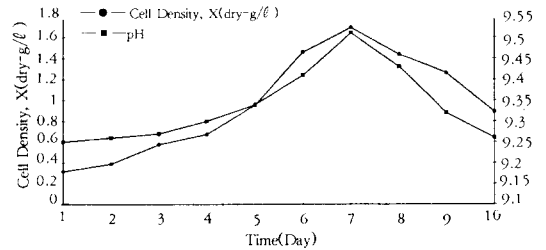


Fig. 2. The cell growth and pH change for batch cultivations of *Spirulina platensis*.

0.01, CaCl<sub>2</sub> 0.04(g/l)이 포함된 20ml(pH 9.2) 배지를 50ml Erlenmeyer flask에 10%(v/v) 접종하여 광합성배양기(Han Back Scientific Co.)에서 온도 32℃, 광도 3Klux를 유지하면서 90rpm으로 교반하며 배양하였다. 그리고 균주의 생육정도는 Spectrophotometer(U-2000 Hitachi, Japan Nisse San Cyto Co.)를 이용하여 560nm에서 O.D(optical density)값을 측정하였으며, 건조 균체량은 배양조에서 매일 20ml를 채취해 0.45m 크기의 여과지로 여과하여 105℃로 유지되는 drying oven(Sam Hwa Co.)에서 6시간 건조 후 측정하였다.

#### 대량 배양 장치 및 배양조건

500ml Erlenmeyer flask에 배지 200ml를 넣고 균주를 10%(v/v)되게 접종한 후, 약 90rpm으로 교반하면서 온도 32℃, 광도 3Klux로 일주일간 배양한 후 다음 단계로 1ℓ Erlenmeyer flask에 신선 배지 400ml를 넣고 10%(v/v)으로 균주를 접종하여 위와 동일한 조건으로 배양하고, 매회 6개의 flask에 배양하여 25ℓ 배양조에 접종하였다. 25ℓ 배양조에서 성장한 균주는 다시 Fig. 1에 나타낸 각각 125ℓ(100×50×25cm) 부피의 옥외연속 대량 배양조(총부피 250ℓ)에 접종하여 대량배양하는데 사용하였다. 광배양조는 온도를 배양조 밀면의 열판을 이용하여 32℃로 일정하게 유지하였으며 광도는 20W white cool 형광등을 이용하여 3Klux로 연속적으로 조사하였다. 배지내 pH는 조절하지 않고 배양조 위에 부착된 on-line pH meter(Radiometer Copenhagen Co. Denmark)를 이용하여 자동기록하였다. 조류의 침강과 영양소의 침전을 예방하고 배지내 온도분포를 균일하게 유지하기 위해서는 교반이 중요한데 이러한 점을 고려하여 배양조 상층부는 motor에 의한 교반기를 사용한 agitation method,

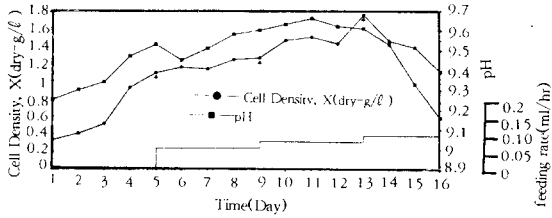


Fig. 3. Kinetics of cell growth in fed-batch cultivations of *Spirulina platensis*. Arrows indicate the point of adding fresh media.

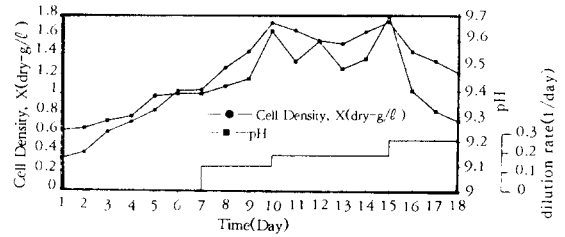


Fig. 5. The cell growth and pH change during continuous cultivations of *Spirulina platensis* using agitation method.

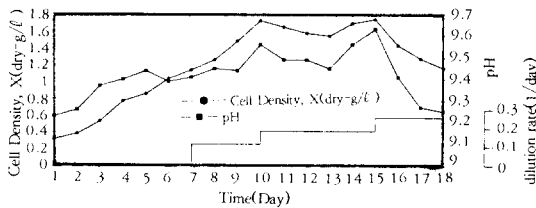


Fig. 4. The cell growth and pH change during continuous cultivations of *Spirulina platensis* using aeration method.

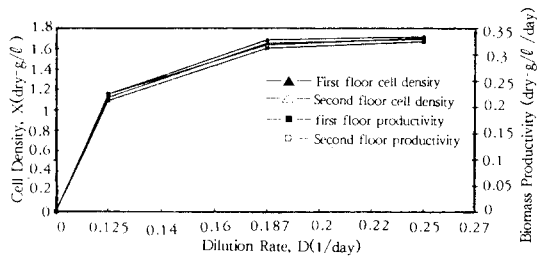


Fig. 6. The cell growth and biomass productivity for two different agitation methods in continuous cultivation.

하층부는 공기를 주입하는 air sparging method를 이용하여 교반효과에 따른 균체 생육도를 비교 조사하였다.

결과 및 고찰

Fig. 2는 pilot 규모의 광배양조(working volume 125ℓ)에 *S. platensis*를 10일간 회분배양하였을 경우 세포생육과 pH 변화를 나타낸 결과이다. 3Klux 광도로 연속 조사하면서 매일 세포생육과 pH를 조사한 결과 배양 시간이 경과함에 따라 세포생육과 pH가 일정하게 증가하는 전형적인 조류 배양형태를 보이고 있다(10). 비생육속도는 0.30(1/day)로서 배양 약 7일째 1.69(g/ℓ)의 최대 건조 균체량을 유지한 후 감소하였으며 이에 따라 pH도 최대 9.51에서 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이 현상은 배지 내 영양분의 고갈과 사세포 수의 증가 그리고 배지 중 주탄소원인 sodium bicarbonate 감소로 인한 pH의 감소에 기인하는 것이다.

고농도 배양을 위하여 *S. platensis*를 유가식 배양하였을 경우 세포생육을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 전반적으로 세포 농도가 다소 높은 값을 나타내는 5일째부터 0.125(ℓ/h)의 속도로 신선배지를 공

급하기 시작하여 9일과 13일에 공급 속도를 0.146(ℓ/h)과 0.198(ℓ/h)로 증가시켰다. 이 결과 균체 생육이 꾸준히 증가하여 최대 1.75(g/ℓ)를 나타냈으나 13일 후에는 pH 감소와 더불어 현저히 감소하였다. 유가식 배양에서 세포생육 감소는 배양액 내의 영양분의 고갈 보다는 균체의 농축에 의한 광원의 shelf-shading과 높은 feeding rate로 인한 신선 배지의 빠른 공급으로 세포 농도가 과량으로 희석되어 생육이 감소한 것으로 생각된다. 또한 생육분비물의 독성 성분과 광합성에 의한 산소분압상승도 세포사멸의 한 원인이 되었을 것이다(11).

Fig. 4와 5는 연속배양시 광도 3Klux, 온도 32℃로 일정하게 유지하면서 교반관제에 따른 균체 생산성을 비교한 결과이다. 하층 배양조는 최적 공기공급속도(air flow rate)로 보고된 6.51(ℓ of air/min/ℓ of culture)속도(12)로 공기를 sparging시켰으며 상층배양조는 top-driven stirrer를 이용하여 90rpm 속도로 교반하였다. 두 배양조 모두 배양 7일째부터 희석율을 0.125~0.250(1/day) 범위에서 변화시켰을 때 0.187-0.250(1/day) 범위에서 평균적으로 약 1.70(g/ℓ)의 균체농도를 나타냈다. 0.250(1/day)

Table 1. Comparison of growth parameters from different cultivation processes for the growth of *Spirulina platensis*.

	Specific growth rate (1/day)	Maximum cell density (dry-g/ℓ)	Max. biomass productivity (g/ℓ/day)
Batch	0.30	1.69	0.51
Fed-batch	0.22	1.75	0.39
Continuous(first floor)*	0.25	1.72	0.43
Continuous(second floor)**	0.25	1.74	0.44

\* First floor was mixed by air sparging system.

\*\* Second floor was mixed by stirring system.

이상의 회석물에서는 세포 생육과 pH 모두 감소하였는데 이는 회석물 증가에 의한 washout과 배양이 오랫동안 진행됨에 따라서 교반이 미치지 않는 배양조 구석에 축적되는 사세포의 덩어리가 증가하여 생세포의 사멸을 유도했기 때문이다. pH는 두 배양조에서 9.0-10.0범위에서 유지되었다. 또한 두 가지 배양방법으로 배양한 결과 top-driven stirrer를 이용한 배양조는 평균 균체농도가 1.70(g/ℓ)으로서 air sparging 배양조의 1.65(g/ℓ)보다 약간 높은 것으로 나타났다. 따라서 top-driven stirrer에 의한 교반이 보다 효과적인 것으로 판단되었다.

Fig. 6은 서로 다른 교반형태인 agitation 배양조와 air sparging 배양조에서 연속배양 동안 회석물에 따른 세포농도와 균체 생산성의 변화를 나타낸 결과로서 회석물이 증가함에 따라 두 배양조 모두 세포농도와 균체 생산성이 증가하는 것을 보여주고 있다. Agitation 배양조보다 air sparging 배양조의 세포농도가 다소 낮은 데 이는 air sparging 배양조 내에서의 균주에 의한 산소생산과 교반 장치의 산소공급으로 인한 과산소 현상에 기인하는 것으로 추측된다. 따라서 air sparging 배양조에 CO<sub>2</sub>를 공급했다면 세포 농도가 agitation 배양조와 거의 유사한 값을 나타냈을 것이다.

Table 1은 각기 다른 배양조 즉 회분, 유가식, 연속 배양 하에서 *S. platensis*를 배양하였을 경우 생육 변수를 비교한 결과이다. 회분, 유가식, 상·하층 연속배양에서 비생육 속도는 각각 0.30, 0.22, 0.25(1/day)였으며 최대 균체 농도는 유가식 배양에서 1.75(g/ℓ)로서 다른 배양조건에 비해 다소 높았다. 최대 균체 생산성은 상·하층 연속배양에서 0.44와 0.43(g/ℓ/day)의 값을 보여 이같은 연속형 광배양조에서 균체생육을 최적으로 유지하면서 상·하층을 순환(circulation)배양하였을 경우 12개월을 기준으

로 약 40Kg의 건조균체를 생산할 수 있다. 따라서 *S. platensis*를 연속적으로 배양하였을 때 경제성이 있을 것으로 예측된다.

## 요 약

*S. platensis*의 옥외연속 대량배양을 위해 125ℓ 배양조를 설계, 제작하여 배양조건에 따른 생육 변수를 검토하였다. 0.30(1/day)의 비생육 속도와 1.69(g/ℓ)의 최대 세포농도가 회분배양에서 얻어졌으며 유가식 배양에서 비생육 속도와 최대 세포농도는 각각 0.22(1/day)와 1.75(g/ℓ)였다. 연속 배양에서 얻어진 상·하층 배양조의 최대 균체생산성은 각각 0.44와 0.43(g/ℓ/day)였다. 따라서 인위적으로 온도, 광도 등의 생육조건을 고려하여 *S. platensis*를 연속 배양할 경우 경제성이 클 것으로 사려된다. 아울러 top-driven stirrer와 air sparging 장치를 이용하여 교반 효과를 비교한 결과 top-driven stirrer를 이용한 배양조의 균체 생산성이 다소 높은 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 한국과학기술처의 지원(93~94)으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

## 참고문헌

1. G. S. Venkataraman(1981), *Soil Bull.*, FAO, 46.
2. H. W. Siegelman, and J. H. Kycia(1978), *Handbook of Phycological Methods*(J. A. Hellebust and J. S. Craigie eds), p. 71, Cam

- bridge University Press, Cambridge.
3. Y. S. Park, H. K. You, S. J. Ohh and H. Y. Lee(1993), *Kor. J. Microbiol. Bioeng*, **21**, 342.
  4. J. R. Benemann, R. P. Goebel, J. C. Weissman, and D. C. Augenstein(1982), *Microalgae as a Source of Liquid Fuels*, prepared by Enbio, Inc., for the U. S. Department of Energy's Office of Energy Research, Contract DEACOS 81 ER 30014.
  5. E. A. Laws(1984), US DOE Rep., No. SERI-STR-231-2496, 59.
  6. J. A. Raven(1987), *Microalgal Biotechnology* (M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka eds), p. 331, Cambridge Press.
  7. A. Vonshak and A. Richmond(1988), *Biomass*, **15**(4), 233.
  8. A. Richmond, A. Vonshak and S. Arad (1980), *Algae Biomass, Production and Use*(G. Shelef and C. J. Soeder eds), p. 65, Elsevier/NorthHolland, Amsterdam.
  9. A. Richmond, E. Lichtenberg, B. Stahl and A. Vonshak(1990), *J. appl. Phycol.*, **2**, 195.
  10. W. R. Barclay and R. P. McIntosh(1986), *Algal Biomass Technologies*, p. 273, J. Cramer Press, Berlin.
  11. C. Santillan(1982), *Experientia*, **38**, 40.
  12. F. Jaime, F. Lucia, G. Yolanda and V. Estella (1994), *Bioresource Technology*, **48**, 107.