J. Mar. Biosci. Biotechnol. 2014, p. 118 - 122 Vol. 6, No. 2 [Research Paper]

http://dx.doi.org/10.15433/ksmb.2014.6.2.118 ISSN 2383-5400 (Online)

해양배양기 내 중탄산염 공급에 따른 *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP 증식에 관한 연구

Investigation of Microalgal Growth, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP by Supplying Bicarbonate on the Ocean Cultivation

조용희†, 신동우†, 이상민, 전효남, 류영진, 이종찬, 임상민, 이철균*

Yonghee Cho†, Dong-Woo Shin†, Sangmin Lee, Hyonam Jeon, Young-Jin Ryu, Jong-Chan Lee, Sang-Min Lim, Choul-Gyun Lee*

인하대학교 생물공학과, 인천광역시, 402-751, 대한민국

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

† Both authors contributed equally to this work

(Received 30 December 2014, Revised 14 January 2015, Accepted 14 January 2015)

Abstract The ocean provide great benefits for microalgal mass cultures with maintaining stable temperature due to high specific heat, mixing by wave energy, and providing large area for large-scale microalgae cultures. In this study, we cultivated a marine green microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP, using marine photobioreactors on the ocean for investigating the effect of $NaHCO_3$ concentration on the biomass productivities and evaluating the potential of ocean microalgae culture. The culture medium consist of three fold concentrated f/2-Si with 4 g/L of $NaHCO_3$, which is dissolved in natural seawater. After 11 days of cultivation, the cultures reached stationary phase at biomass concentration of 1.6 g/L. At that time, $NaHCO_3$ concentration of 0, 2, and 4 g/L were fed to the cultures. The daily productivities of 0.11, 0.19, 0.30 g/L/day were attained with feeding rate of 0, 2, and 4 g/L $NaHCO_3$, respectively. Biomass productivity of *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP was a function of the $NaHCO_3$ feeding rate as expected. This research shows that the microalgae can grow with $NaHCO_3$ as carbon source in marine photobioreactors on the ocean while exploiting various benefits of ocean cultivation.

Keywords : microalgae, ocean cultivation, biodiesel, sodium bicarbonate

서 론

팜이나 대두를 이용한 바이오디젤의 생산은 전 세계적인 식량 가격의 상승을 초래하였다 [11]. 팜이나 대두를 경작하기 위한 토지와 비료 및 담수의 이용으로 바이오디젤의 경제적인 생산에 어려움이

* Corresponding author
Phone: +82-32-872-7518 Fax: +82-32-873-7518
E-mail: leecg@inha.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0)

있다 [11]. 따라서 바이오디젤 생산에서 육상식물의 사용은 윤리 및 경제적인 면에서 문제가 됨이 확인이 되었다. 팜이나 대두 등의 육상식물의 대안으로서 미세조류는 바이오디젤의 제 3세대 생산용 원료로 각광을 받고 있다 [5, 16]. 미세조류는 육상식물에 비해 빠른 생장속도, 높은 이산화탄소 흡수율, 바이오디젤로 전환 가능한 지질을 다량으로 함유하기 때문에 바이오디젤의 원료로서 충분한 가능성을 가지고 있다 [5, 11, 16].

이러한 미세조류 유래 바이오디젤이 가격 경쟁력을 갖추기 위해서는 미세조류 바이오매스 생산을 경제적으로 하는 것이 가장 중요한 요인으로 고려되고 있다 [7, 8]. 특히, 미세조류 유래 바이오디젤 생산에 소요되는 전체 비용의 40%가 미세조류 바이오매스 생산에 이용되고 있다 [8]. 현재 대부분의 바이오디젤 생산을 위한 미세조류의 배양은 육상의 도수로연못 (raceway pond)에서 연구되고 있는 실정이다 [13]. 도수로연못을 이용한 미세조류 배양에서는 배양 온도 조절 및 배양액 혼합에 필요한 에너지가 현재 미세조류 유래 바이오디젤 생산에 가장 큰 문제가 되고 있다 [13]. 또한, 도수로연못 설치를 위한 토지 비용 및 배양 중 증발되는 물 등에 대한 비용이 미세조류를 경제적으로 배양하는데 걸림돌이 되고 있다 [9]. 해양을 미세조류 배양지로 이용하는 것이 이 문제를 개선가능하다. 해양은 지구 전체 면적의 72%를 차지하고 있으며, 해양 미세조류의 본 서식지이며, 넓은 미세조류 배양 면적을 제공한다. 또한, 높은 비열 (해양: 약 4000 $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$, 대륙: 약 1000 $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$)을 가지고 있어 배양 중 자연적인 온도조절이 가능하고, 풍부한 바닷물을 기본 배지로 현장에서 이용할 수 있다. 뿐만 아니라 파도를 이용한 미세조류 배양액 혼합이 가능하여 에너지 소비 없이 미세조류 배양이 가능하다. 하지만, 이러한 해양배양은 현재 다른 연구자들에 의한 보고가 적어 실제로 해양배양을 통해 위에서 기술한 다양한 해양배양의 장점들을 해양반응기의 설치로 효율적으로 이용가능한지 및 개선할 점은 없는지를 확인해야 한다.

본 연구에서는 해양의 거친 환경 상 미세조류 배양기로의 이산화탄소의 공급은 추가적인 배양기 디자인과 운영방식을 필요로 하기 때문에, 상대적으로 이용이 편리한 중탄산염을 미세조류 탄소원으로 이용하였다. 미세조류는 이산화탄소 농축 메커니즘 (CCM, Carbon Concentrating Mechanism)을 거쳐 중탄산이온을 이산화탄소로 전환하여 생장 가능하다 [2, 3]. 본 연구의 목적은 해양반응기를 이용하여 미세조류 배지 중의 중탄산염 농도에 따른 미세조류 생장을 확인하고, 미세조류 해양배양의 가능성을 확인하는 것이다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주 유지방법

본 연구센터가 대한민국, 인천광역시, 영흥도 연안에서 분리한 미세조류 *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP를 인공해수 (MBL)를 이용하여 배양하였다. 인공해수는 증류수에 NaCl 30 g/L, 0.66 g/L KCl, 8.48 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.9 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 6.318 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.18 g/L $NaHCO_3$를 첨가하여 제조하였다. 인공해수에 미세조류가 성장하기 위한 영양분으로 f/2-Si 배지를 추가적으로 공급하였다. 그 조성은 75 mg/L $NaNO_3$, 5 mg/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 3.15 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 4.36 mg/L $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$, 0.180 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.022 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ and 0.006 mg/L $Na_2MoO \cdot 2H_2O$이다. 본 배양을 위한 균주 유지는 2 L bubble colunm에서 광도 100 $\mu E/m^2/s$, 2% CO_2 0.1 vvm 폭기로 이루어졌다.

건조균체량 및 질소원 분석

바이오매스 분석을 위해 건조 중량을 측정하였다. 필터는 Whatman GF/C (0.45 μm pore size; 직경 47 mm)를 사용하였다. 먼저 필터의 무게를 측정하고 감압 조건에서 미세조류를 필터에 걸러내고 염분 제거를 위해 증류수로 세척한다. 세척된 필터는 80°C오븐에 하루 동안 건조한 후 실온의 데시케이터에서 무게가 일정하게 유지될 때까지 보관하여 최종적으로 무게를 측정한다. 질소원은 UV-Vis spectrophotometer (UV-1750, Shimadzu, Kyoto, Japan)에 의해 측정되었다. 배양액을 3,000 RPM에서 10 분 동안 원심분리법에 의해 세포와 분리하였고, 1 N 염산과 상층액을 혼합하여 표준분석법을 이용하여 분석하였다 [14].

Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) 분석

동결 건조된 바이오매스 10 mg의 건조샘플을 5% (v/v) 아세틸클로라이드/메탄올과 내부 표준물질(C19:0)을 혼합한 후에, 80°C에서 1 시간 동안 전처리 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후 노르말헥산을 넣어 FAME을 추출하였고, 가스크로마토그래피(Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용해 FAME함량과 조성을 분석하였다. Capillary column (HP-INNOWax, Agilent, Califonia, USA, 길이: 30 m, 직경 0.25 mm, 두께 0.25 μm)을 이용하였고, 유량 3 mL/min의 헬륨가스를 이동상으로 이용하였다. 오븐의 분석조건은 초기 오븐 온도 140°C에서 1분간 정치하여 240°C까지 5°C/min로 승온하여 최종온도에서 10분간 정치하였다. FAME standards mixture (F.A.M.E. MixC4-C24, SUPELCO, Bellefonte, USA)와 미세조류 유래 FAME의 정체시간을 비교하여 FAME의 정성분석을 실시하였고, 각 정체시간 동안의 면적을 내부 표준물질의 면적과 비교하여 정성분석을 실시하였다 [12].

광량 및 온도

LI-COR quantum sensor (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, USA)를 이용하여 해양배양 현장의 Photosynthetically Active Radiation (PAR, wavelength 400-700 nm) 범위의 광도를 측정되었다. 대한민국 기상청으로부터 해양기상관측 부이의 시간별 기온 및 수온 데이터를 얻었다.

해양반응기를 이용한 미세조류 배양

해양반응기를 이용하여 대한민국 인천광역시 영흥도 (37.23°N, 126.43°E)에서 미세조류 배양을 실시하였다. 배양기 크기는 가로 0.5 m, 세로 0.5 m, 높이 0.5 m 이며, 배양액 부피는 15 L이다. 2014년 6월 30일부터 2014년 7월 21일까지 21일 동안 배양이 실시되었다. 초기 4 g/L의 $NaHCO_3$를 공급 한 후, 배양기간 중 11일 차에 $NaHCO_3$를 각 0, 2, 4 g/L 씩 추가 공급하였다. 배양 중 질소원은 고갈되기 전에 추가적으로 공급되었다.

결과 및 고찰

해양배양기간 중 외부 환경 조건

미세조류의 해양배양 기간 중 해수의 온도와 대기의 온도를 비교하였다. 해수의 온도는 배양기간 중 평균 온도 17.2°C부터 20.4°C까지의 변화를 보였다 (Figure 1). 오차막대는 일교차를 의미한다. 배양 기간 중의 평균 일교차는 1.5°C이다. 이는 해양의 높은 비열로 유지되는 해수 온도가 미세조류 생장에 적절함을 보여준 것이다. 배양기간 중의 대기 온도는 18.3°C부터 22.0°C까지의 변화를 보였으며, 일교차는 평균 2.6°C이다 (Figure 1). 배양기간 중 광도는 523-1085 μE/m^2/s로 미세조류 생장에 충분하였다 (Figure 1) [1, 4, 6].

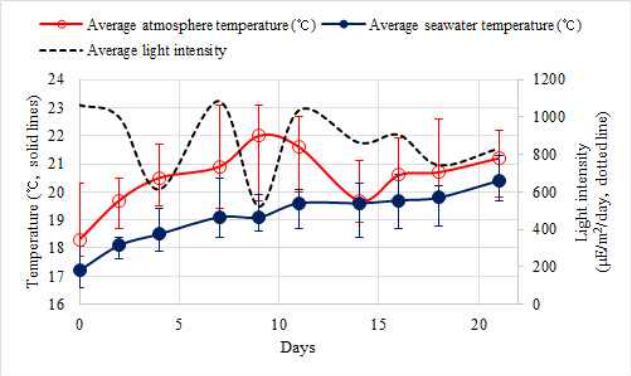

Figure 1. Outdoor environmental condition during culture periods

중탄산염 농도에 따른 *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP의 세포성장

질소원 분석을 실시하여 질소원이 고갈되기 전에, 추가적으로 f/2 배지를 공급하였다. 배지 내의 함유된 4 g/L의 중탄산나트륨을 이용하여 균주 접종 후 배양 11일 차에 1.6 g/L의 미세조류 바이오매스가 생산되었다. 배양 11일 차 이후에, 추가로 중탄산나트륨을 공급하지 않은 환경에서는 미세조류가 성장하지 못하는 것을 확인하였고, 2, 4 g/L의 중탄산나트륨을 공급한 조건에서는 연속적인 미세조류 생산이 가능하였다. 4 g/L의 중탄산나트륨 추가 공급 후 초기 3일 동안 성장저해 현상이 확인되었다 (Figure 2). 배양 기간 중 배양액 pH는 배양 9일차부터 9.5 이상으로 유지되었으며, 이는 White [15] 의 $NaHCO_3$의 탄소원 이용으로 인한 pH 증가 결과와 일치한다.

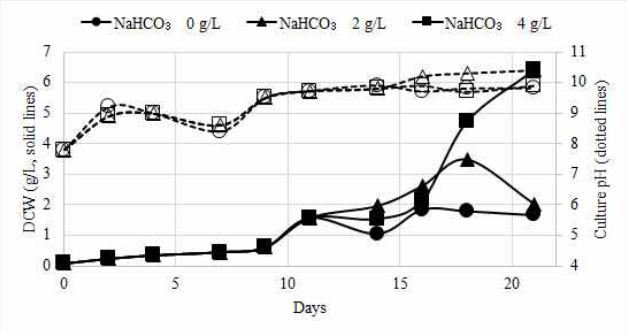

Figure 2. Growth of *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP under different sodium bicarbonate addition at day 11

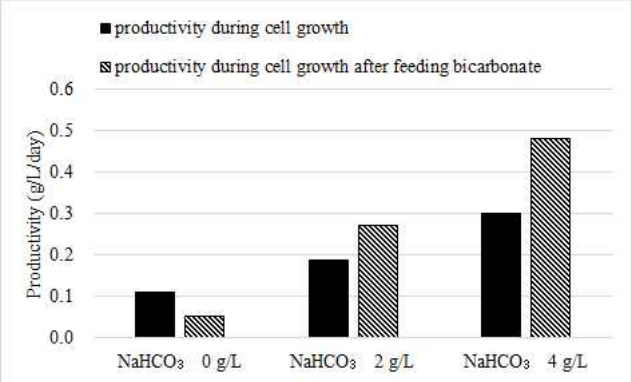

Figure 3. Biomass productivity of each experimental group

중탄산나트륨 추가 공급에 의한 최대 미세조류 농도 및 바이오매스 생산성

배양 11일 차 이후, 0, 2, 4 g/L 중탄산나트륨을 각각 추가 공급하여 *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP 건조중량 1.8, 3.5, and 6.4 g/L를 달성하였다 (Table 1). 중탄산나트륨 추가 접종 후, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP 성장 중의 바이오매스 생산성은 각각 0.05, 0.27, 0.48 g/L/day로 공급한 탄소원의 양에 비례하였고, 따라서 미세조류 성장 중 0.11, 0.19, 0.30 g/L/day의 전체 바이오매스 생산성이 달성되었다 (Figure 3). 이는 해양배양의 장점인 해수의 큰 비열을 이용한 배양 온도 유지와 파도를 이용한 세포 부유가 적절히 이루어져 중탄산나트륨 공급량에 따른 미세조류 성장이 이루어 졌음을 알 수 있다.

Table 1. Maximum biomass of each experimental group

Experimental group		Maximum biomass
Final $NaHCO_3$ concentration added at day 11	No $NaHCO_3$ addition	1.842 g/L at day 16
	2 g/L	3.48 g/L at day 18
	4 g/L	6.41 g/L at day 21

해양에서 배양된 미세조류의 지질함량

중탄산나트륨 공급량에 따라 생산된 미세조류 내 FAME 함량 변화를 확인하였다. 배양 마지막 21일 차에 FAME 분석을 실시하였다. 중탄산나트륨 추가 공급 배양에 따른 미세조류 내 FAME 함량 변화는 크지 않았다. David [10] 에 따르면, *Tetraselmis* sp.의 지질 함량은 약 2.5-10.8% 정도로 알려져 있다. 본 실험에서는 FAME 함량은 평균 약 1.24%로 유지되었다. 해양에서 생산된 FAME 생산량은 향후 배양법 기술 개발로써 개선해야 할 것이다.

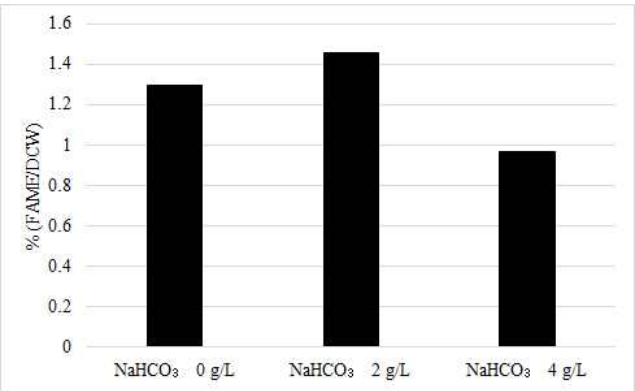

Figure 4. FAME contents of *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP of each experimental group

결 론

해양반응기를 이용하여 미세조류, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP를 해양에서 배양하였다. 배양 기간 중 수온은 기온의 비해 적은 변화폭을 보였다. 또한, 미세조류 생산성은 공급된 중탄산나트륨의 양에 비례하여 증가하였다. 전체 바이오매스 생산성은 4 g/L

의 중탄산나트륨 추가공급으로 최대 0.30 g/L/day가 달성되었다. 결론적으로, 본 실험을 통해 분리된 미세조류, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP가 해양배양에 적합하며, 다양한 해양배양의 장점을 이용하여 해양반응기의 설치만으로 미세조류 생산이 가능하였음을 의미한다. 향후 배양법 기술 개발을 통해 지질 함량을 보완함으로써 해양배양을 통한 경제적인 미세조류 유래 바이오디젤 생산에 크게 이바지할 것이다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 해양생명공학기술개발사업(PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발)과 해양에너지 융복합 인력양성 사업의 지원을 받아 수행되었습니다. 저자들 모두 연구개발비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

References

1. Al-Qasmi, M., Raut, N., Talebi, S., Al-Rajhi, S., and Al-Barwani, T. 2012. A review of effect of light on microalgae growth. *Paper presented at the Proceedings of the world congress on engineering*.

2. Badger, M.R., D. Hanson, and G.D. Price. 2002. Evolution and diversity of CO_2 concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology*, **29(2-3)**, 161-173.

3. Badger, M.R. and G.D. Price. 2003. CO_2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*. **54(383)**, 609-622.

4. Camacho, F., Molina, E., Martínez, M. E., Sánchez, S., and García, F. 1990. Continuous culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp. productivity analysis. *Aquaculture*. **90(1)**, 75-84.

5. Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. **26(3)**, 126-131.

6. da Cruz Coêlho, A. A., Barros, M. U. G., Bezerra, J. H. C., da Silva, J. W. A., Moreira, R. L., and Farias, W. R. L. 2012. Growth of the microalgae *Tetraselmis tetrathele* and nitrate depletion in culture medium Guillard f/2 and Conway. *Biological Sciences*. **35(2)**, 163-168.

7. Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A. T., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A. and Dabbagh, F. 2012. Microalgae biofuel potentials. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **48**, 126-144.

8. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, **54**, 621-639

9. Koh, L. P., and Ghazoul, J. 2008. Biofuels, biodiversity, and people: understanding the conflicts and finding opportunities. *Biological conservation*, **141(10)**, 2450-2460.

10. Lim, D. K., Garg, S., Timmins, M., Zhang, E. S., Thomas-Hall, S. R., Schuhmann, H., and Schenk, P. M. 2012. Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *PLoS One*, **7(7)**, e40751.

11. Mata, T. M., Martins, A. A., and Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(1)**, 217-232.

12. Tran, H. L., Kwon, J. S., Kim, Z. H., Oh, Y., & Lee, C. G. 2010. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of Botryococcus brauni i LB572. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15(2)**, 277-284.

13. Voleti, R. S. 2012. EXPERIMENTAL STUDIES OF VERTICAL MIXING IN AN OPEN CHANNEL RACEWAY FOR ALGAE BIOFUEL PRODUCTION. Master of Science, Utah State University, Logan, Utah.

14. Way, C. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater.

15. White, D., Pagarette, A., Rooks, P., and Ali, S. 2013. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Journal of Applied Phycology*, **25(1)**, 153-165.

16. Xiaodong, D., Y. L. and Xiaowen F. 2009. Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research*. **3(13)**, 1008-1014