

부유형 해양 광생물반응기를 이용한 자외선과 초기 미세조류 접종 농도와의 상관관계 규명

Verification of a Relationship between Ultraviolet Radiation and Initial Microalgal Cell Density Using a Floating Marine Photobioreactor

김지훈, 박한울, 정성균, 김수권, 김희윤, 박용성, 홍한마루, 이철균*

Z-Hun Kim, Hanwool Park, Seong-Gyun Jung, Su-Kwon Kim, Hee-Yun Kim, Yong Sung Park, Han Ma Roo Hong, Choul-Gyun Lee*

해양바이오에너지 생산기술개발연구센터 & 인하대학교 생물공학과, 인천, 402-751, 대한민국

National Marine Bioenergy Research Center & Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

(Received 30 December 2015, Revised 7 January 2016, Accepted 7 January 2016)

Abstract The purpose of this study was to investigate a relationship between ultraviolet radiation and initial cell density (ICD) of microalgae using a floating marine photobioreactor (PBR). To examine the effect of ultraviolet (UV) radiation in sunlight on biomass productivity as a function of ICD, 0.5-L floating PBRs covered with or without UV cut-off film were placed in an outdoor rectangular tank containing 200 L of water. At the lower ICDs, 0.01 and 0.05 g/L, biomass productivities in the PBRs without UV cut-off film decreased by $278 \pm 21\%$ and $222 \pm 3\%$ compared with those with the film, respectively. In contrast, the presence of UV cut-off film did not have a significant effect on biomass productivities at the higher ICDs, 0.25 and 1.25 g/L. When the differences in biomass productivity made by the UV cut-off film were plotted against the sum of cell projection area per light receiving area of the PBR, the results revealed that the inhibitory effect of UV on biomass productivity can be negligible when the sum of cell projection area is equal to the light receiving area of the PBR. These results show that photoinhibition caused by UV radiation could be eliminated via operating the PBR with a proper ICD.

Keywords : *Dunaliella tertiolecta*, photoinhibition, ultraviolet radiation, marine photobioreactor, initial cell density

서 론

미세조류는 최근 들어 지구 온난화의 주요인으로 인식되고 있는 이산화탄소를 효과적으로 제거하면서도 한정된 화석연료를 대체할 수 있는 바이오에너

지 생산자로서 주목 받고 있다. 미세조류의 주요 장점으로 (i)척박한 배양환경에서 성장성, (ii)빠른 성장속도, (iii)지질이나 탄수화물과 같은 다양한 형태의 바이오에너지 전구체를 생산, (iv) 종의 다양성 등을 꼽을 수 있다 [1].

* 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>)

이러한 높은 잠재성에도 불구하고 미세조류 바이오에너지 생산 단가가 다른 유래의 그것과 비교하여 여전히 높아 상용화되지 못하고 있는 실정이다. 현재 이를 극복하고자 미세조류 대량 배양, 균체 회수, 정제, 에너지 전환 등의 다양한 요소 기술 개발이 활발히 진행되고 있다 [2, 3]. 그 중에서도 미세조류의 배양은 전체의 미세조류 유래 바이오디젤 생산비용의 약 40%를 차지할 만큼 중요한 요소 기술로 평가 받고 있다 [4]. 따라서 미세조류 배양에 투입되는 에너지와 소요 비용을 획기적으로 낮추는 것이 중요하다. 이러한 측면에서 최근 들어 해양을 이용한 미세조류 배양 방식이 개발되고 있다. 해양을 활용한 미세조류 배양의 장점으로는 육상에 비해 상대적으로 넓은 배양 면적, 배양 용수로 해수의 활용, 파도의 에너지를 이용한 배양액 혼합 등이 있다 [5, 6]. 본 연구팀은 광투과도가 높은 연질의 플라스틱 필름으로 제작된 태양광 조사 면적 넓은 형태의 부유형 해양 광생물반응기(floating marine photobioreactor)를 이용하여, 해양배양을 2009년부터 지속적으로 시험 운영하고 있다.

상기 광생물반응기를 이용한 미세조류 해양배양 시 발생하는 문제 중 하나로 세포 접종 농도에 따라 세포의 생장성이 늦춰지거나 낮아지는 경향이 있는데, 주로 광인자와 관련성이 깊다. 미세조류는 높은 광도에서도 생존이 가능하다고 알려져 있으나, 일정 수준 이상의 광에너지를 지속적으로 받게 되면, 세포 내의 Photosystem II가 파괴되어 광합성 효율이 떨어진다 [7]. 또 다른 문제로는 ultraviolet radiation (UV, 200 - 400 nm)에의 노출이다. UV는 가시광선과 달리 photosynthetically active radiation (PAR)이 아닐 뿐만 아니라, 일정 수준이상의 UV의 노출은 세포의 구조적 변화뿐만 아니라, 세포 내의 단백질과 유전자의 변성을 일으켜 미세조류의 생리적 변화를 초래한다 [8]. 궁극적으로 이러한 현상들이 지속된다면, 세포 내의 대사흐름이 변화로 인해 사멸율이 높아져 생산성이 낮아지는 문제가 발생하게 된다 [9].

본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하고자, 미세조류 배양 시 접종 농도와 UV의 존재 유무에 따른 세포의 생장성을 분석하고자 하였다. 이를 위해, 저밀도 폴리에틸렌 (low-density polyethylene)으로 제작된 0.5 L 규모의 prototype 광생물반응기를 제작하고,

초기 접종 농도를 0.01에서 1.25 g/L까지 달리하여 옥외에서 운전하여 시험하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주 유지

본 연구에 사용한 *Dunaliella tertiolecta* LB 999는 University of Texas at Austin의 Culture Collection of Algae (Austin, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 배지는 인공해수에 수정된 f/2-Si 배지를 첨가하여 사용하였다. 인공해수는 증류수에 NaCl 30 g/L, 0.66 g/L KCl, 8.48 g/L MgCl₂·6H₂O, 1.9 g/L CaCl₂·2H₂O, 6.318 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.18 g/L NaHCO₃를 첨가하여 제조하였다. 수정된 f/2-Si 배지는 증류수에 225 mg/L NaNO₃, 5 mg/L NaH₂PO₄·H₂O, 3.15 g/L FeCl₃·6H₂O, 4.36 g/L Na₂EDTA·2H₂O, 180 mg/L MnCl₂·4H₂O, 22 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 10 mg/L CoCl₂·6H₂O, 9.8 mg/L CuSO₄·5H₂O, 6.3 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O NaNO₃ 0.225 g/L, NaH₂PO₄ 0.015 g/L를 첨가하여 제조하였다. 본 배양을 위한 종균은 2 L 부피의 원통형 광생물반응기에서 광도 100 μE/m²/s, 온도 25°C, 2% CO₂ 0.1 vvm 폭기 조건에서 유지되었다.

부유형 광생물반응기 제작 및 운전

부유형 광생물반응기의 재질은 두께가 1 mm이고, PAR투과도가 93.0 ± 0.2%인 폴리에틸렌 필름으로 제작하였다. 반응기의 가로와 세로의 길이는 각각 25 cm와 20 cm이었으며, 액체의 수용이 가능한 최대 부피는 2 L이다. 또한 광생물반응기 내로 가스 공급을 위해, 폭기구와 가스 배출구를 반응기의 하단과 상단에 각각 설치하였다 (Figure 1). 반응기의 광조사 면적 (light receiving area)은 0.05 m²이었다.

세포 농도에 따른 효과를 실험하기 위하여, 인하대학교 C호관 옥상 (Inha University, Incheon, Korea)에 설치된 불투명 아크릴 직사각형 수조 (230 cm (l) x 130 cm (w) x 35 cm (h))에 200 L의 물을 채우고, 광생물반응기를 수조 내에 부유 시킨 후 실험을 수행하였다. 초기 세포 농도와 UV의 상관성을 알아보기 위해, 초기 운전 농도를 생체 중량 (fresh cell weight, FCW)으로 0.01, 0.05, 0.25, 1.25 g/L를 각각 접종하였다. UV 차단군의 경우, 태양광 중 UV영역만을 선택적으로 차단하는 2.5 mm의 두께의 film (30 cm (l) x 25 cm

(w))을 이용하여, 광생물반응기 상부를 덮어 UV를 완벽히 차단하였다 (Figure 2). UV cut-off film의 광투과도는 $80.0 \pm 0.5\%$ 이며, 대조군과의 광투과도 보정을 위해 반응기 재질인 폴리에틸렌 필름을 덮어 반응기 내로 투과되는 광도가 대조군과 동일하도록 보정하였다. 다양한 세포 농도로 접종된 광생물반응기를 수면에 설치 후, 반응기 하단의 폭기구를 통해 2% CO₂를 0.1 vvm 속도로 공급하였으며, 반응기의 운전은 2011년 8월 25일부터 29일까지 5일간 실시하였다.

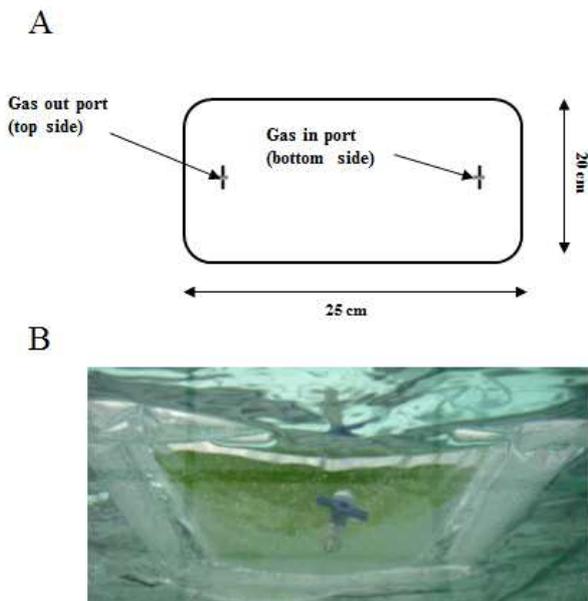


Figure 1. Schematic diagram (A) and picture (B) of a 0.5-L floating photobioreactor made of low density polyethylene film.

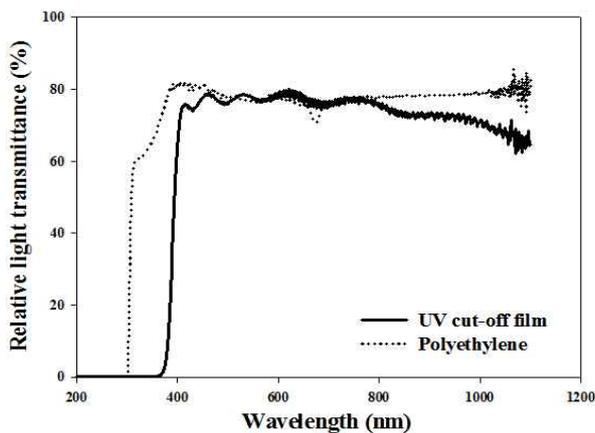


Figure 2. A comparison of relative light transmittance between polyethylene film and UV cut-off film.

세포 농도 측정 및 cell projection area 계산

세포수, 세포크기, FCW은 Coulter counter (Model Z2, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 정밀하게 측정하였다. 반응기 내의 세포의 크기가 D (m)이고, 농도가 C (cell/L)이며, 배양액의 부피가 V (L)일 때, 배양액내의 세포의 light projection area의 합은 세포가 구형이라는 가정 하에 식(1)을 이용하여 계산하였다.

$$\sum \text{cell projection area} (m^2) = \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times C \times V \quad (1)$$

광도 및 온도 측정

대기와 배양액의 온도는 temperature data logger (DT-170, Shenzhen Everbest Machinery Industry Co., Ltd., Shenzhen, China)를 이용하여 측정하였으며, 수조에 담긴 물을 주기적으로 교체하여 배양액의 온도를 일정하게 유지하였다. 이를 통해 실험 기간 동안의 광생물반응기 내 배양액의 온도는 평균 배양 조건과 유사한 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. LI-COR quantum sensor (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 이용하여 photosynthetically active radiation (PAR, wavelength 400 - 700 nm) 범위의 광도를 측정하였다.

광투과도 측정

광생물반응기 재질인 폴리에틸렌과 UV cut-off film의 광투과도를 측정은 각 샘플 (5 cm (l) x 5 cm (w))을 200 - 1200 nm 영역을 스캔이 가능한 photodiode array spectrophotometer (Model HP8453B, Hewlett Packard, Waldron, Germany)에 투과시켜 정밀하게 측정하였다.

결과 및 고찰

초기접종 농도와 UV차단 여부에 따른 미세조류의 성장성을 비교하고자, 초기접종 농도를 달리하여 실험을 실시하였다. Figure 3에 나타난 것처럼, 한여름의 일 중 광도는 최대 $1800 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에 이르러, 실내에서의 *D. tertiolecta*의 배양 광도 조건 ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)과 비교하였을 때, 상당히 높은 수치임을 알 수 있다. 특히 낮은 농도로 운전되는 광생물반응기의 경우에는 세포간의 광 간섭효과 (mutual shading)가 낮아 고광도와 UV 노출을 피하기 어렵다. Seepratomrosh

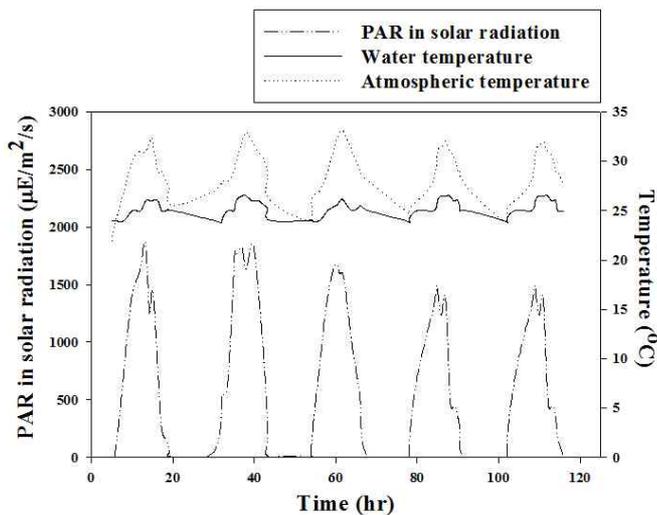


Figure 3. Time profiles of PAR in solar radiation, and water and atmospheric temperature during an experiment period.

et al.[10]의 연구에 따르면 *D. tertiolecta*를 일정 시간 동안 1000 μE/m²/s 이상의 광도 조건에 노출시켰을 때 광저해 (photoinhibition) 현상이 나타나고, 단백질 변성 및 세포내의 엽록소 함량 변화와 같은 생리적 변이를 가져온다고 보고하였다. 이는 상대적으로 저 농도로 미세조류 운전 시에 세포 성장이 지체되거나 생산성이 낮아질 가능성이 높다는 것을 의미한다. 그러나 광저해 현상은 세포의 농도와 광도의 상대적 함수관계이기 때문에, 적절히 운전하는 세포 농도의 조절 한다면, 이러한 저해 현상을 극복하는 것이 가능할 것이다. 따라서 옥외의 조건에서 태양광에 의한 저해 현상 없이 세포를 배양하기 위해 세포 운전 농도를 결정하는 것이 중요하다 [11].

본 연구에서는 세포의 초기 접종 농도를 0.01, 0.05, 0.25, 1.25 gFCW/L로 부유형 광생물반응기를 운전하였다. 또한, 같은 접종 농도 조건에서 세포 성장성에 대한 UV의 효과를 시험하고자 UV cut-off film을 부착한 실험군도 설치하여 운전하였다. 두 낮은 접종 농도 (0.01, 0.05 gFCW/L)에서는 UV cut-off film의 설치 시 균체 생산성이 비설치 군에 비해 각각 278 ± 21%와 222 ± 3% 향상되는 것으로 나타났다 (Biomass productivity in Figure 4). 이에 반해, 초기 접종 농도가 상대적으로 높은 광생물반응기 (0.25, 1.25 gFCW/L)에서는 균체 생산성이 UV cut-off film 설치와 상관없이 생산성에 유의적인 차이가 없으므로 분석되었다. 이는 세포당 받는 광에너지가 높을수록 세포 생산성 저해 효과가 확인하였으며, 특

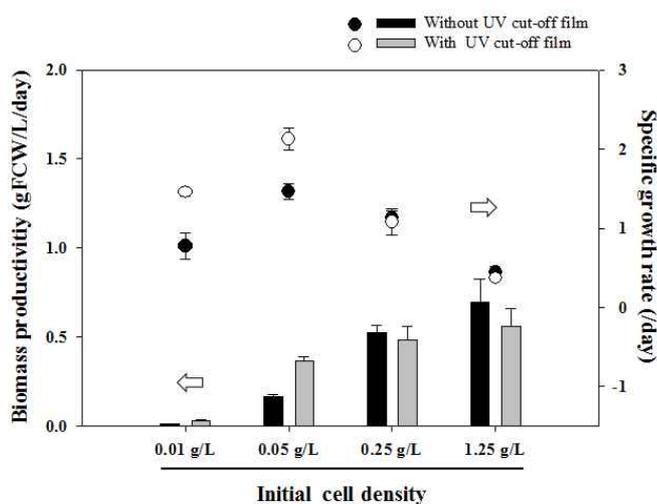


Figure 4. Effect of UV cut-off film on biomass productivity and growth rate in 0.5-L floating photobioreactors as a function of initial cell density.

히 낮은 세포 농도에서 광생물반응기를 운전할 경우 UV에 의한 저해 효과가 유의적인 균체 생산성 감소를 야기하였다.

이와는 반대로, 세포의 농도가 일정 수준으로 높아지게 되면, 성장성이 UV의 차단 유무에 관계없이 비슷한 성장성을 보였다. 이는 초기 접종 농도의 조절을 통해서 UV에 의한 광저해 현상을 배제할 수 있다는 것을 의미한다. 전술한 것처럼, 미세조류 세포가 높은 에너지 준위를 가진 UV에 지속적인 노출될 경우, 세포의 다양한 생화학적 분자들의 화학적, 구조적 변형을 일으켜 손상을 주기 때문에 성장성이 저해된다고 알려져 있다 [12]. 일정 수준의 세포 농도 이상에서는 세포당 받는 UV 광자의 수준이 낮을 뿐만 아니라, UV의 산란, 반사, 흡수가 커지게 됨으로 배양액 내로 깊게 침투하기 어렵기 때문으로 판단된다. 그러나 UV에 의한 세포 성장 저해를 막고자 높은 세포 농도로 운전하는 것은 바람직하지 않다. Figure 4에서 알 수 있듯이, 균체 생산성의 향상은 초기 세포 농도의 증가와 함께 높아지나, 상승의 폭은 점점 낮아졌다. 또한 높은 균체 농도로 인해 광합성 효율은 낮아져 세포의 비성장속도(specific growth rate)는 오히려 감소하게 되는 현상을 관찰하였다 (Specific growth rate in Figure 4).

세포의 농도에 따른 UV저해성을 보다 정확하게 분석하기 위하여, 배양액 내의 세포의 projection area의 합과 광생물반응기의 light receiving area의 비와

UV 차단 유무에 따른 균체 생산성 차를 그래프로 도시하였다 (Figure 5). 세포의 projection area는 배양액 내의 세포가 광에너지를 받는 표면적의 합을 나타낸다. 따라서 상기 면적의 값과 광생물반응기의 light receiving area가 같을 때, 이론적으로 반응기 내부로 광자가 더 이상 투과하지 못하는 값을 의미한다 [11]. Figure 5에서 보는 것처럼, 두 면적의 비율이 1보다 작을 때에는 UV cut-off film의 유무에 따라 균체 생산성에 현저한 차이가 있었으나, 비율이 1보다 큰 경우 UV 차단여부와 관계없이 균체 생산성이 유사하게 나타났다. 이를 구체적으로 본 실험에 사용한 0.5-L 반응기 수준에서 계산하고자 projection area와 light receiving area의 합이 같아지는 접종 농도를 계산하였다. 배양기간의 *D. tertiolecta*의 평균 세포 크기는 $8.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 이고, 반응기의 light receiving area는 0.05 m^2 임으로 이를 활용하여 계산할 경우 0.5 L 반응기에 세포의 농도가 $0.28 \pm 0.04 \text{ gFCW/L}$ 로 접종한다면 UV에 의한 성장 저해 현상을 피할 수 있다. 따라서 본 결과에 의하면 해양 광생물반응기를 옥외에서 설치 운전 시, 세포 접종 농도를 조절함으로써 UV에 의한 광저해 현상을 상쇄시키는 것이 가능할 것으로 사료된다.

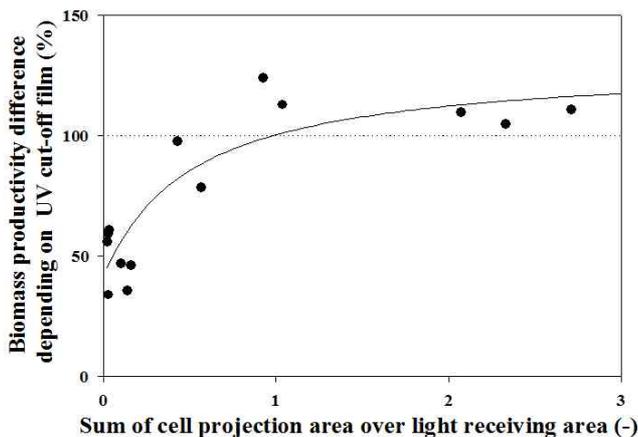


Figure 5. Biomass productivity difference depending on UV cut-off film as a function of sum of cell projection area over light receiving area.

결론

본 연구에서는 옥외에서 미세조류 배양시 발생하는 UV에 의한 세포 성장 저해현상을 규명하고자,

세포 농도와 UV 차단에 따른 미세조류 균체 생산성을 비교 분석하고자 하였다. 연구 결과로부터 미세조류의 초기 접종 농도를 조절함으로써 UV에 의한 균체 생산의 저해를 억제할 수 있었다. 본 연구결과를 통해 미세조류를 해양 광생물반응기로 배양 시 태양광도가 높은 시기에 세포 농도를 조절하여 운전함으로써 향상된 생산성을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 재원으로 해양생명공학 기술개발사업 (PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발) 연구개발비 지원과 해양에너지 융복합 인력양성 사업에 의해 수행되었습니다.

References

1. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25(3)**, 294-306.
2. Kumar, K., Mishra, S. K., Shrivastav, A., Park, M. S. and Yang, J. W. 2015. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **51**, 875-885.
3. Quinn, J. C. and Davis, R. 2015. The potentials and challenges of algae based biofuels: A review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. *Bio resour. Technol.* **184**, 444-452.
4. Cho, Y., Shin, D., Lee, S., Jeon, H., Ryu, Y., Lee, J., Lim, S. and Lee, C. 2014. Investigation of microalgal growth, *Tetraselmis* sp. KCTC12432BP by supplying bicarbonate on the ocean cultivation. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **6(2)**, 188-122.
5. Kim, Z., Park, H., Ryu, Y., Shin, D., Hong, S., Tran, H., Lim, S. and Lee, C. 2015. Algal biomass and biodiesel production by utilizing the nutrients dissolved in seawater using semi-permeable membrane photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **27(5)**, 1763-1773.
6. McConnell, B. and Farag, I. H. 2012. Offshore microalgae growth in wastewater. *Int. Rev. Chem. Eng.* **4(4)**, 423-429.
7. Neale, P. J., Cullen, J. J., Lesser, M. P. and Melis, A. 1992. Physiological bases for detecting and predicting

- photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV Radiation, In: Yamamoto H. Y. and Smith C. M. (eds), Photosynthetic Responses to the Environment, Current Topics in Plant Physiology: An American Society of Plant Physiologists Series, **8**, 61-77.
8. Holzinger, A. and Lütz, C., 2006. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* **37(3)**, 190-207.
 9. Zhang, P, Yu, J. and Tang, X. 2005. UV-B radiation suppresses the growth and antioxidant systems of two marine microalgae, *Platymonas subcordiformis* (Wille) Hazen and *Nitzschia closterium* (Ehrenb.) W. Sm. *J. Integr. Plant Biol.* **47(6)**, 683-691.
 10. Seepratomrosh, J., Pokethitiyook, P., Meetam, M., Yokthongwattana, K., Yuan, W., Pugkaew, W. and Kangvansaichol, K. 2015. The effect of light stress and other culture conditions on photoinhibition and growth of *Dunaliella tertiolecta*. *Appl Biochem. Biotechnol.* 1-12.
 11. Park, K. and Lee, C. 2001. Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of microalgal cultures over a critical cell density. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 189-193.
 12. Larkum, A. W. D. and Wood, W. F. 1993. The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynth. Res.* **36(1)**, 17-23.