

축산 폐수의 효율적 처리를 위한 광합성 미세조류인 *Spirulina platensis* 배양 공정의 최적화

안주희 · 김성수 · 김태호 · 이준엽¹ · 오상집¹ · 이진하 · 이현용*
강원대학교 식품생명공학부, ¹강원대학교 사료생산공학과

Optimizing the Process of Cultivating Photosynthetic Microalga, *Spirulina platensis* for Efficiently Treating Swine Wastes. Ju-Hee Ahn, Seong-Su Kim, Tae-Ho Kim, Jun-Yeup Lee¹, Sang-Jip Ohh¹, Jin-Ha Lee and Hyeon-Yong Lee*. Division of Food and Biotechnology, ¹Department of Feed Science and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea – The kinetics of growing microalga, *Spirulina platensis* was investigated to treat swine wastes with optimum growth conditions. Temperature was varied from 15 to 40°C at three different light intensities, 6 W/m², 12 W/m² and 24 W/m². The specific growth rate was increased as temperature increased up to 30°C. The activation energy was estimated as 13.5 kcal/mol by an Arrhenius relationship. 0.24 (1/day) of specific growth rate was obtained from batch cultivation with 30% swine wastes, compared to 0.31 (1/day) from clean culture. It was found that *Spirulina platensis* was able to reduce 70~93% of PO₄³⁻-P, 67~93% of inorganic nitrogen, 80~90% of COD and 37~56% organic nitrogen by adding various concentrations of swine wastes for 12 days of batch cultivation. Rate constants for removing nitrates and phosphates in treating swine wastes were estimated as 0.17 (1/day) and 0.14 (1/day) in the first order reaction, respectively. 1.52 (g/L) of maximum cell density was maintained at 0.20 (1/day) of dilution rate in continuous culture, adding 20% swine wastes for 30 days. The chemical composition of the biomass obtained from the process showed 58.7% of protein, 11.0% of lipid and 15.6% of ash.

산업화가 진행되면서 고도성장과 생활양식의 변화는 생활수준을 향상시켰지만 이에 따른 환경오염 문제로 많은 부작용을 유발하였다. 그래서 이러한 환경문제의 심각성이 사회문제로 제기되고 있는 실정이다. 동물 자원 생산시 부수적으로 발생하는 분뇨 폐기물이 수질 및 환경오염의 주 요인의 하나로 대두됨에 따라 축산 폐기물의 경제적이고 효과적인 처리 방법의 개발이 필요하게 되었다(4, 8).

일반적으로 폐수내의 유기물 및 무기영양염류의 제거로 수질오염의 주원인인 부영양화를 막을 수 있다(12). 특히 축산 폐수 처리 시설의 경우 부영양화의 원인이 되는 질소나 인의 규제 농도는 각각 120 및 16 (mg/L) 이하이나(환경처, 1990) 앞으로 이에 대한 규제가 더욱 강화될 것으로 예상된다. 폐수 처리의 방법에는 물리·화학적인 처리 방법과 생물학적 처리 방법이 있다(13). 최근 들어 생물학적 처리 방법의 한 분야로서 조류를 이용한 축산 폐기물의 처리에 관해 많은 연구가 진행되고 있다(13). 일부 조류는 폐기물내에 존재하는 nitrate, phosphorus, ammonium ion 등의 무기물을 흡수하는 능력이 있음이 확인되고 있다(9). 특히 돈사 폐수의 경우는 고농도의 유기물과 질소, 인을 함유하고 있어 이의 생물학적 처리 공정이 필요하게 되었다. 이에 *Spirulina platensis*는 돈분 폐수를 영양원으로 하여

생육할 수 있으므로 이를 이용하여 오염원의 처리와 더불어 사료 자원을 생산할 수 있는 방법을 개발하는 것은 매우 바람직할 것으로 판단되고 있다(3, 14). 이같이 조류를 이용한 폐수 처리는 태양 에너지를 이용함에 따른 공정상의 장점이 있는 반면 폐기물에서 효과적인 배양을 위해서는 최적의 생육 조건의 규명과 오염원 처리 능력의 최적화 등이 해결해야 할 문제점으로 제시되고 있다(10, 15, 16). 따라서 본 논문에서는 광합성 미세 조류인 *Spirulina platensis*가 돈분내에서 무기영양염류의 효과적인 제거를 위한 배양의 기초 조건의 규명과 폐수내 오염원 처리 능력에 대한 연구를 수행할 때 폐수 처리 공정의 경제성 향상을 위해 생성되는 biomass를 고단백 사료원으로서의 이용에 대한 가치를 평가하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 실험을 위하여 사용된 균주는 *Spirulina platensis* (LB 1926, UTEX, USA)를 사용하였다. 배지 조성은 A solution(Na₂CO₃, 0.042; NaHCO₃, 0.042; MgSO₄·7H₂O, 24.4; KCl, 6.0; NaNO₃, 10.0; CaCl₂·2H₂O, 3.0; KH₂PO₄, 5.0; Tris buffer, 10.0 in g/100 mL) 10 mL; Vitamin B₁₂, 1.0 µg/L; PI solution(H₃BO₃, 3.4 g/L; CoCl₂·6H₂O, 1.21 mg/L; MnCl₂·4H₂O, 0.43 mg/L; ZnCl₂, 31.5 mg/L; H₂SO₄, 1 mg/l; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·

*Corresponding author.

Key words: *Spirulina platensis*, light intensity, activation energy, organic and inorganic chemicals, swine wastes

4H₂O, 31.2 mg/L) 10 mL ; chelate iron solution(증류수 500 mL에 Na₂·EDTA, 10.0 g ; FeCl₃·6H₂O, 500 mL 0.1 N HCl에 0.81 g) 3 mL ; NaCl, 36.0 g/L ; 증류수, 926 mL로 구성되었으며(2), pH는 10% HCl로 8.08로 조정하였다. 조제된 배지는 고압 멸균기(Kuk Je Co. Korea)에서 121°C, 15분 동안 가압살균하여 접종하였다. *Spirulina platensis*의 최적 생육 조건을 결정하기 위한 회분식배양은 500 mL Erlenmeyer flask에 배지 200 mL를 넣고 균주를 10%(v/v)되게 접종하였다. 빛은 20W White cool fluorescence lamp를 이용하여 조사하였다. 조도는 Quantum sensor(LICOR, Co. USA)를 이용하여 6, 12, 24 W/m² 그리고 온도는 15, 25, 30, 40°C로 각각 조건을 달리하여 배양하였다. 돈분첨가 배양은 순수 인공배지에 5%, 10%, 20%, 30% 그리고 60%(v/v)로 첨가하여 균주를 배양하였다. 연속배양은 14L-fermentor에서 working volume 12L로 하고 dilution rate를 0.10(1/day)에서 0.25(1/day)의 범위에서 배양하였다.

균체량, 배지내 유기물 및 COD의 측정

배양액은 Spectrophotometer를 이용하여 wavelength, 560 nm에서 cell density를 측정하였다. 건조균체량은 Whatman filterpaper(No.2)로 여과하여 105°C로 고정된 Drying Oven에서 3시간 건조하여 정량하였다. Chlorophyll a는 80% acetone으로 추출하여 663 nm에서 흡광도를 측정하였다(1). TKN(total kjeldahl nitrogen)은 Tecator kjeltic Auto 1030 Analyzer로 측정(Kjeldahl Nitro Method)하였고 Ammonium 농도는 indophenol-blue method(5)를 이용하였다. T-P(total phosphorus)(7)와 COD(chemical oxygen demand)(6)는 colorimetric method에 의해 측정하였다. 그리고 얻어진 균체에 대한 성분검사로써 단백질(Lowry method)(11), 탄수화물(phenol-sulphuric acid method)(5), 지방(soxhlet) 그리고 수분함량을 측정하였다.

또한 *Spirulina platensis*의 배수내 유기물의 제거속도를 평가하기 위해서 아래와 같은 1차반응속도식을 이용하였다.

$$\ln(C_t/C_0) = -kt$$

여기서, C_t는 t 시간 배양후의 농도

C₀는 초기농도

k는 반응속도상수(1/day)

t는 배양시간(day)

아래 식과 같은 Arrhenius식을 적용해 균체생육과 온도와의 관계를 규명하였다.

$$\ln\mu = A - (E_a/R) \times (1/T)$$

여기서, A는 Arrhenius 상수

T는 절대온도 K

R은 기체 상수

E_a는 활성화 에너지

μ는 비생육속도이다.

결과 및 고찰

*Spirulina platensis*의 최적조건을 결정하기 위하여 온도와 조도를 각각 변화시켜 실험하였다. 그림에서 보여지는 않지만 15°C와 40°C에서 실험한 결과에서는 거의 생육하지 않음을 볼 수 있었고 30°C의 온도와 12 W/m²의 조도에서 0.40(1/day)의 최대 비생육속도를 갖는다(Fig. 1). Fig. 2는 30°C일 때 17 W/m²의 조도에서 최대값을 보인다. Fig. 3은 각각의 조도에서 온도의 변화에 따른 비생육속도의 변화를 나타내고 있다. 12 W/m²과 24 W/m²의 조도에서는 30°C가 최적이고 6 W/m²에서는 33°C가 최적임을 보인다. 그리고 균체 생육에 있어서 온도의 영향을 알아보기 위해서 Arrhenius식에 의해 온도에 따른 비생육속도의 변화를 보았다. 이식으로 얻은 활성화 에너지 값은 13.5 kcal/mol이다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 *Spirulina platensis*의 최적 생육 조건은 30°C, 17 W/m²임을 알 수 있다. 배지의 온도는 *Spirulina platensis*의 생육에 큰 영향을 미치며 적정 온도보다 낮거나 높을 경우에는 생육 지연 현상이 두드러지게 나타나는 것을 알 수 있다. 그리고 빛의 세기 또한 *Spirulina platensis*의 생육에 중요한 요소임을 알 수 있다. 따라서 온도와 조도의 적절한 조절은 생육저해나 균체손상의 문제점을 해결할 수 있을 것이다.

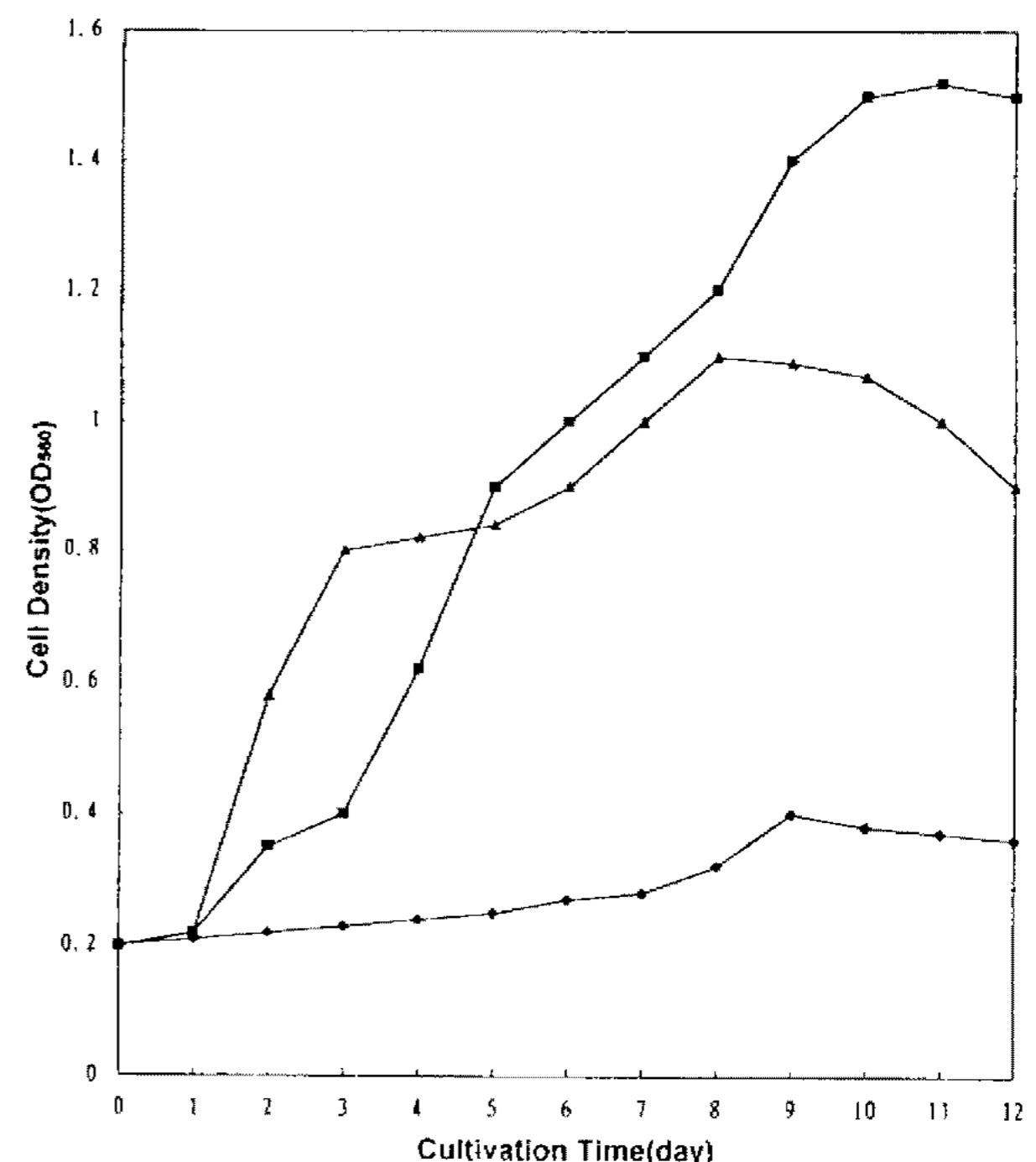


Fig. 1. The cell growth kinetics with the light intensity of 6, 12 and 24 W/m² in batch cultivation at 30°C.

—◆— 6 (W/m²) —■— 12 (W/m²) —▲— 24 (W/m²)

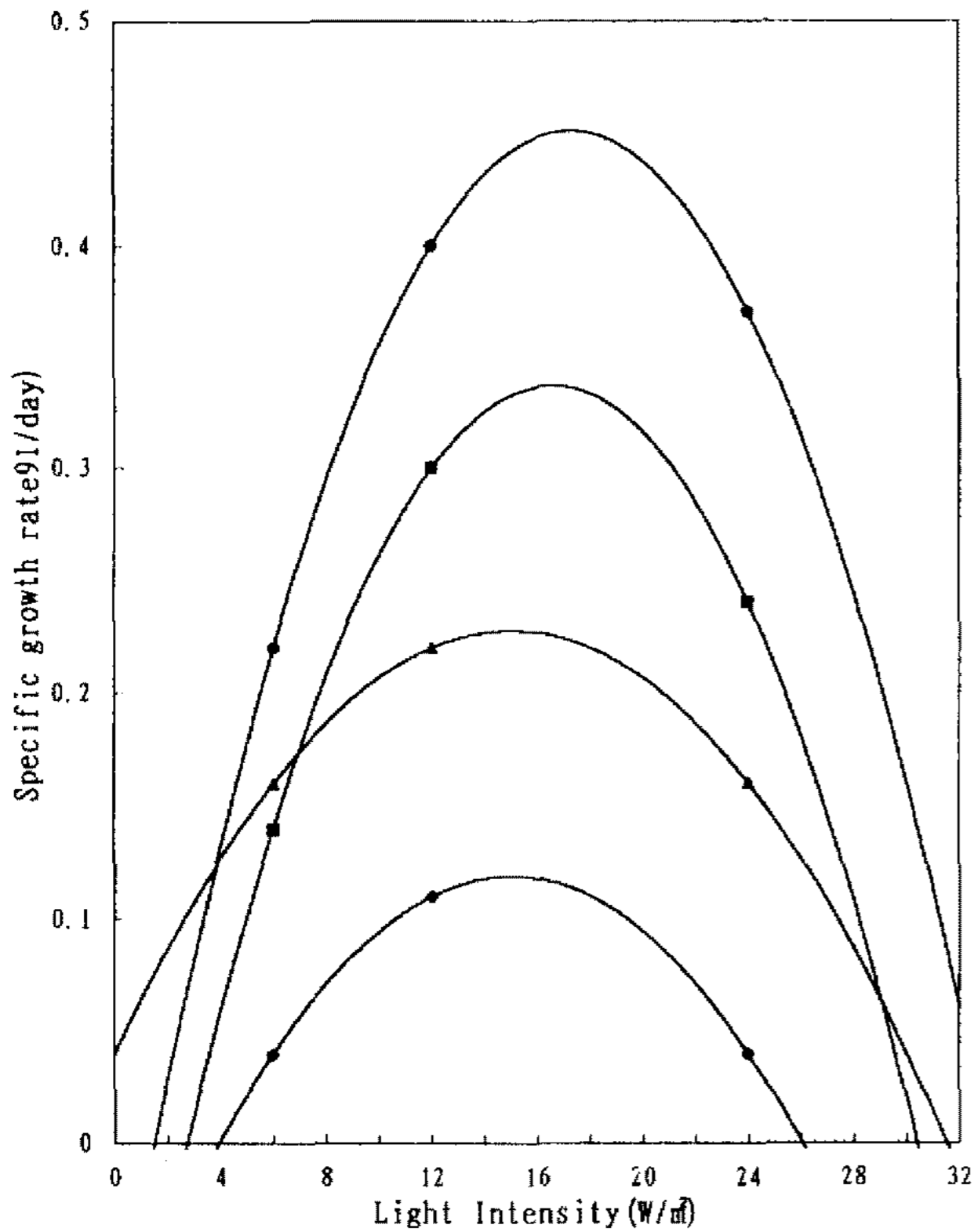


Fig. 2. The effect of light intensity on the growth of *Spirulina platensis* in batch cultivation.
 ◆ 15°C ■ 25°C ● 30°C ▲ 40°C

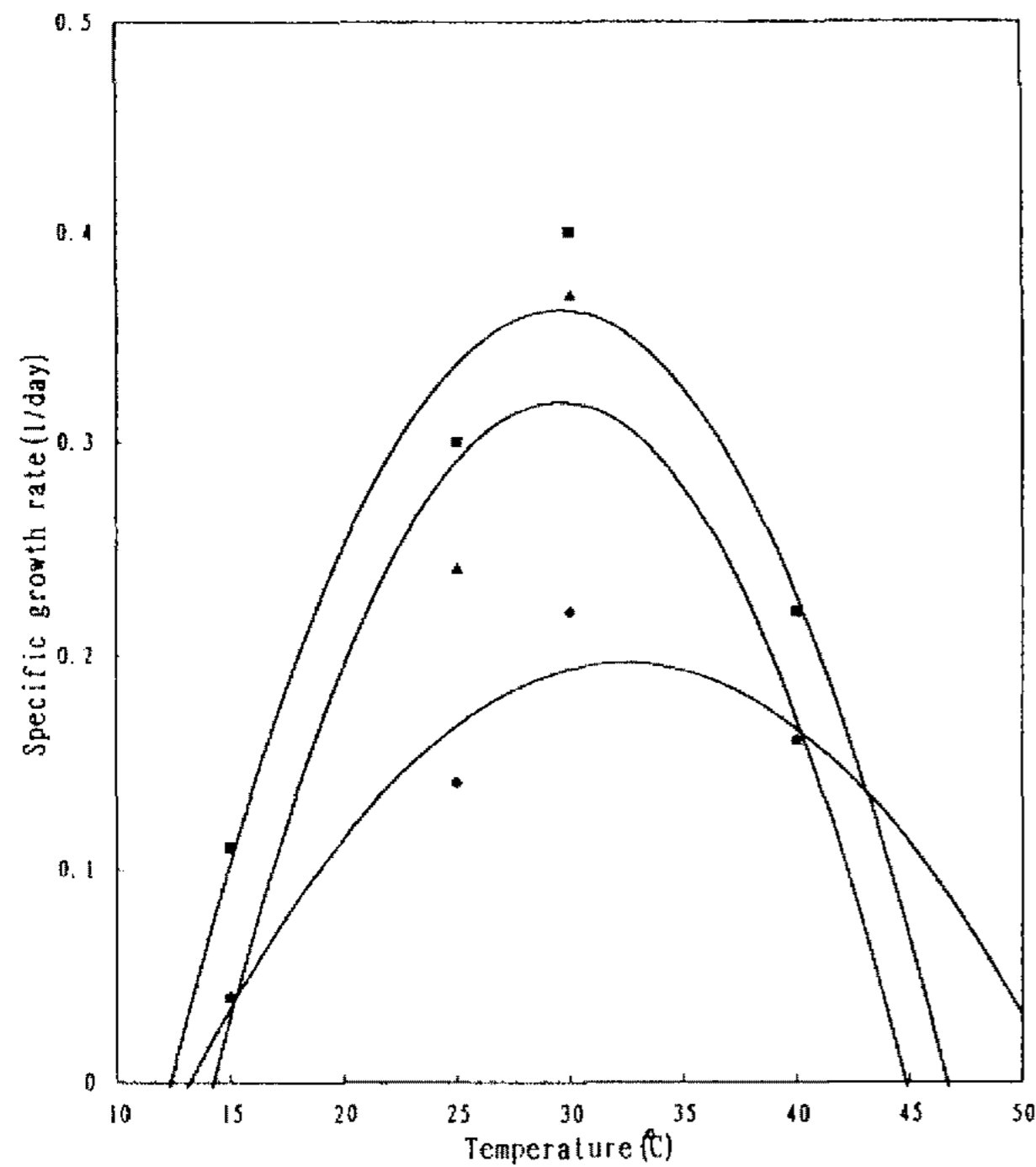


Fig. 3. The effect of temperature on the growth of *Spirulina platensis*.
 ◆ 6 (W/m²) ■ 12 (W/m²) ▲ 24 (W/m²)

돈분 첨가 정도에 따른 *Spirulina platensis*의 생육은 Fig. 4와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 돈분의 첨가농도가 증가함에 따라 생육 속도가 저하됨을 볼 수 있다.

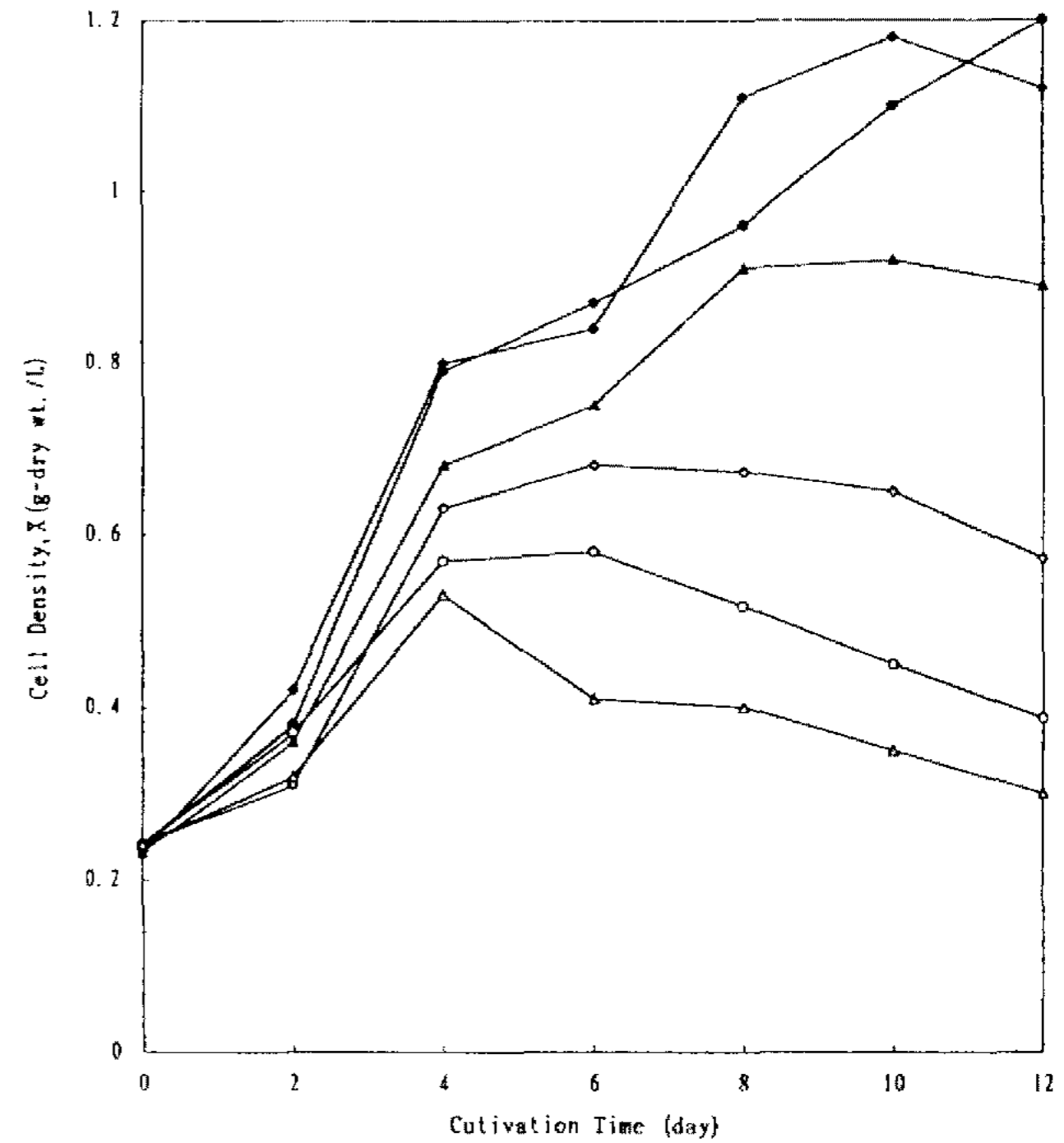


Fig. 4. Comparison of cell growth with different concentration of swine wastes in batch cultivations of *Spirulina platensis*.

◆ 0% ● 5% ▲ 10% ■ 20% ○ 30%
 △ 60%

Table 1. The estimated growth parameters from the batch cultivation of *Spirulina platensis* in adding various concentrations of swine wastes.

Dilution ratio (%)	비생육 속도 (1/day)	Max. cell density, X (g-dry wt./L)	Max. biomass productivity, P (g-dry wt./L/day)
0*	0.31	1.18	0.37
5	0.30	1.20	0.36
10	0.27	0.91	0.25
20	0.24	0.68	0.16
30	0.22	0.58	0.13
60	0.20	0.53	0.11

*Clean culture no adding swine wastes.

5% 돈분 첨가시에는 최종적으로 1.2 g/L의 cell density로 순수 배지에서 보다 더 잘 생육함을 볼 수 있다. Table 1에서 0.20(1/day)의 최대 비생육속도와 0.53(g/L)의 균체농도를 나타내는 것으로 60%의 돈분 첨가시에는 두드러진 생육저하를 볼 수 있다. 이것은 돈분내 고농도의 독성물질과 pH 저하가 생육저해의 주원인으로 작용한 것으로 판단된다. 돈분 첨가의 수준이 30%까지는 어느 정도 생육함을 볼 수 있으나 첨가되는 돈분의 상태에 따라서도 많은 변이를 보일 것이다. 본 실험에서 사용된 돈분의 조성은 Table 2에서 보여지는 것처럼 고농도의 nitrate와 phosphorus를 함유하고 있

Table 2. The chemical composition of the swine wastes.

Component	Concentration (mg/L)
NH ₄ ⁺ -N	1200~4100
NO ₃ ⁻ -N	50~150
Kjeldahl-N	1500~4400
Orthophosphate	80~270
Total phosphate	220~340
COD	15200~29900

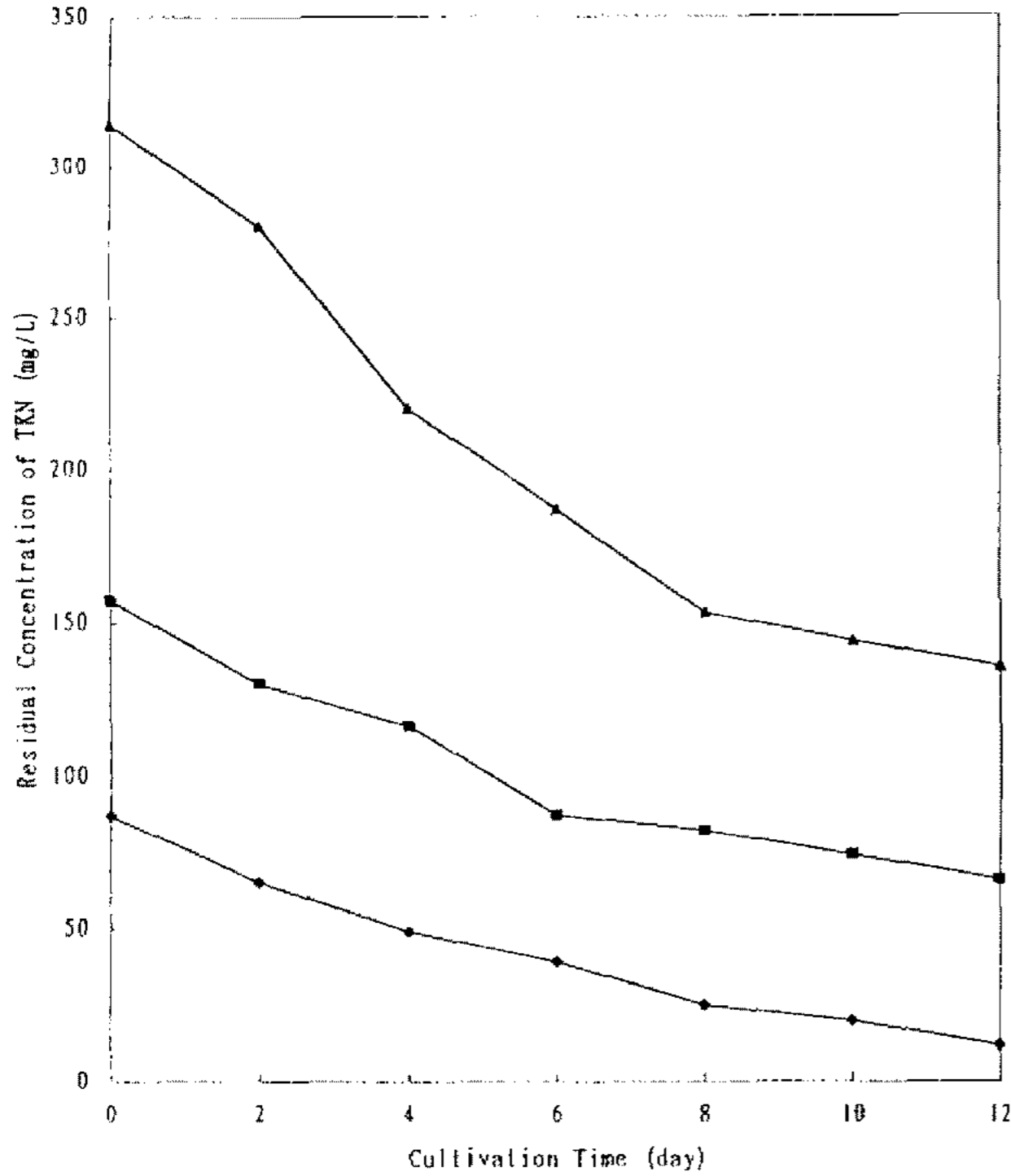


Fig. 5. Kinetics of removing total nitrogen with different concentrations of the swine in batch growth of *Spirulina platensis*.

—◆— 5% —■— 10% —▲— 20%

음을 알 수 있다.

배양액 내의 수질오염의 주원인 물질인 nitrate와 phosphate가 *Spirulina platensis*를 배양하는 과정에서 얼마만큼 이용하는가를 실험하였다. Fig. 5는 TKN의 변화를 나타내고 있으며 5% 돈분첨가에서는 86.2%의 제거율을 보여준다. 5%, 10% 그리고 20%의 돈분 첨가 배양시 COD의 제거율은 80% 이상을 보여주는 효율적인 공정임을 알 수 있다(Fig. 6). Table 3은 *Spirulina platensis*의 배양시 배지내 유기물의 감소 속도를 1차 반응속도식에 의해 얻은 결과로서 NH₄⁺-N과 PO₄³⁻-P가 TKN과 T-P보다 각각 더 빠른 감소 속도를 보임을 알 수 있다. TKN은 암모니아성 질소와 유기성 질소를 포함하는 양이다. 위의 결과로 *Spirulina platensis*의 생육시 우선적으로 암모니아성 질소를 이용하고 이의 고갈 후 nitrate나 요소와 같은 질소화합물을 이용함을

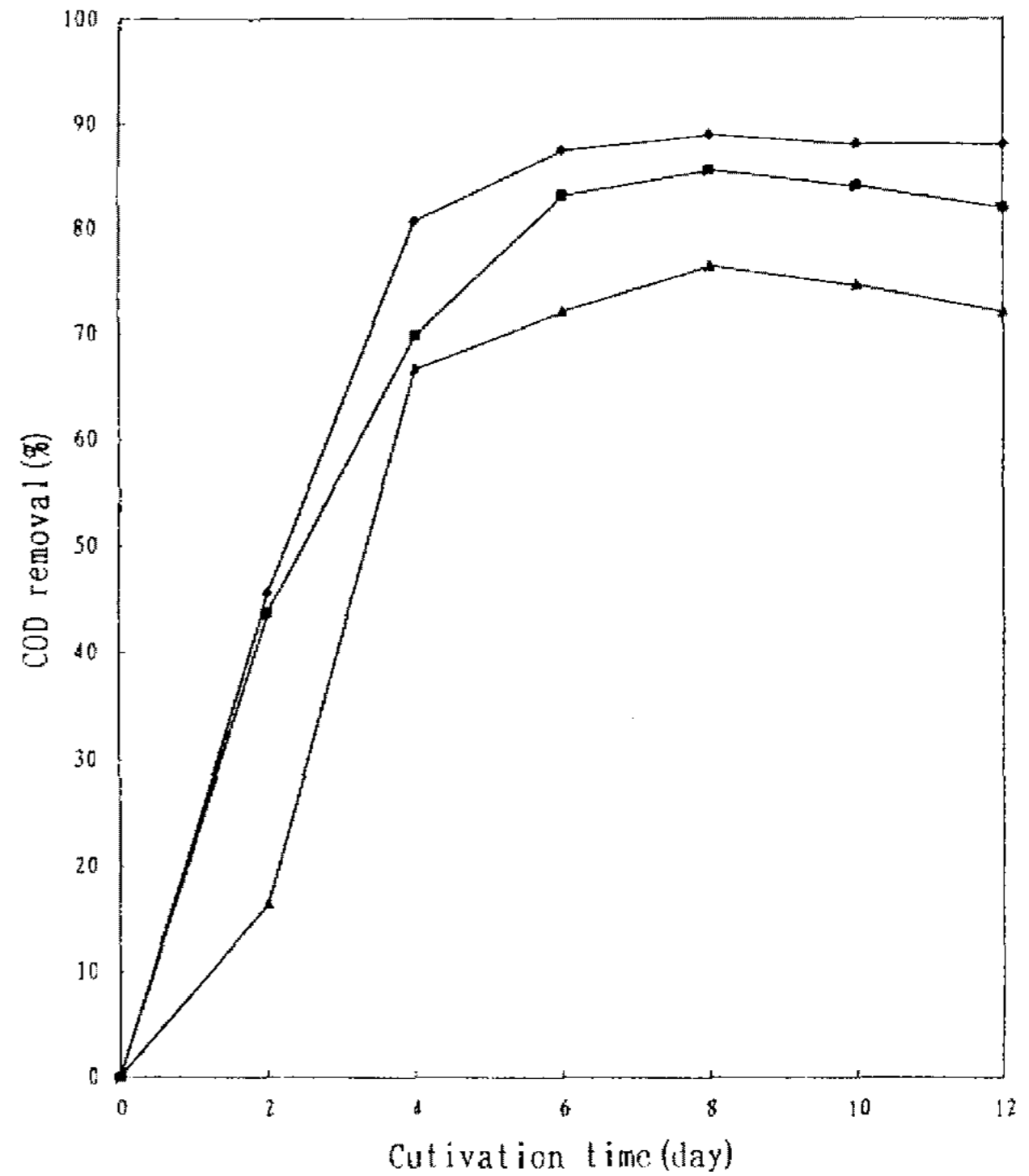


Fig. 6. The reduction of chemical oxygen demand (COD) by *S. platensis*.

—◆— 5% —■— 10% —▲— 20%

Table 3. The estimated first order rate constants* for removing TKN, NH₄⁺-N, T-P and PO₄³⁻-P by cultivating *Spirulina platensis*.

Dilution ratio (%)	TKN (1/day)	NH ₄ ⁺ -N (1/day)	T-P (1/day)	PO ₄ ³⁻ -P (1/day)
5	0.17	0.23	0.14	0.22
10	0.10	0.12	0.11	0.14
20	0.09	0.11	0.06	0.09

*First order removal rate constant, (1/day).

알 수 있다. Fig. 7은 20% 돈분을 첨가하는 연속배양에서 배양시간에 따른 cell density, chlorophyll a 그리고 용존산소량(DO)의 변화를 나타내고 있다. *Spirulina platensis*의 생육에 따른 dry weight와 chlorophyll a가 비슷한 곡선의 형태로 증가하고 있는데 이는 *Spirulina platensis*가 계속하여 생육하고 있음을 알 수 있는 것이다. 그리고 *Spirulina platensis*의 생육으로 배지내 용존산소량의 농도는 계속하여 증가하게 된다.

Fig. 8은 연속배양시 *Spirulina platensis*의 TKN과 T-P의 흡수능력을 나타내고 있다. 연속배양시 희석률이 0.20(1/day)일 때 최대 균체농도인 1.52(g/L)를 유지하였다. 생육함에 따라 TKN과 T-P를 이용하고 있고 배양 말기에는 TKN과 T-P의 농도가 급격히 증가함을 볼 수 있다. 이는 연속적인 돈분 첨가에 따른 pH의 저하와 독성물질의 축적으로 균체의 사멸이 일어났기 때문으로 판단된다.

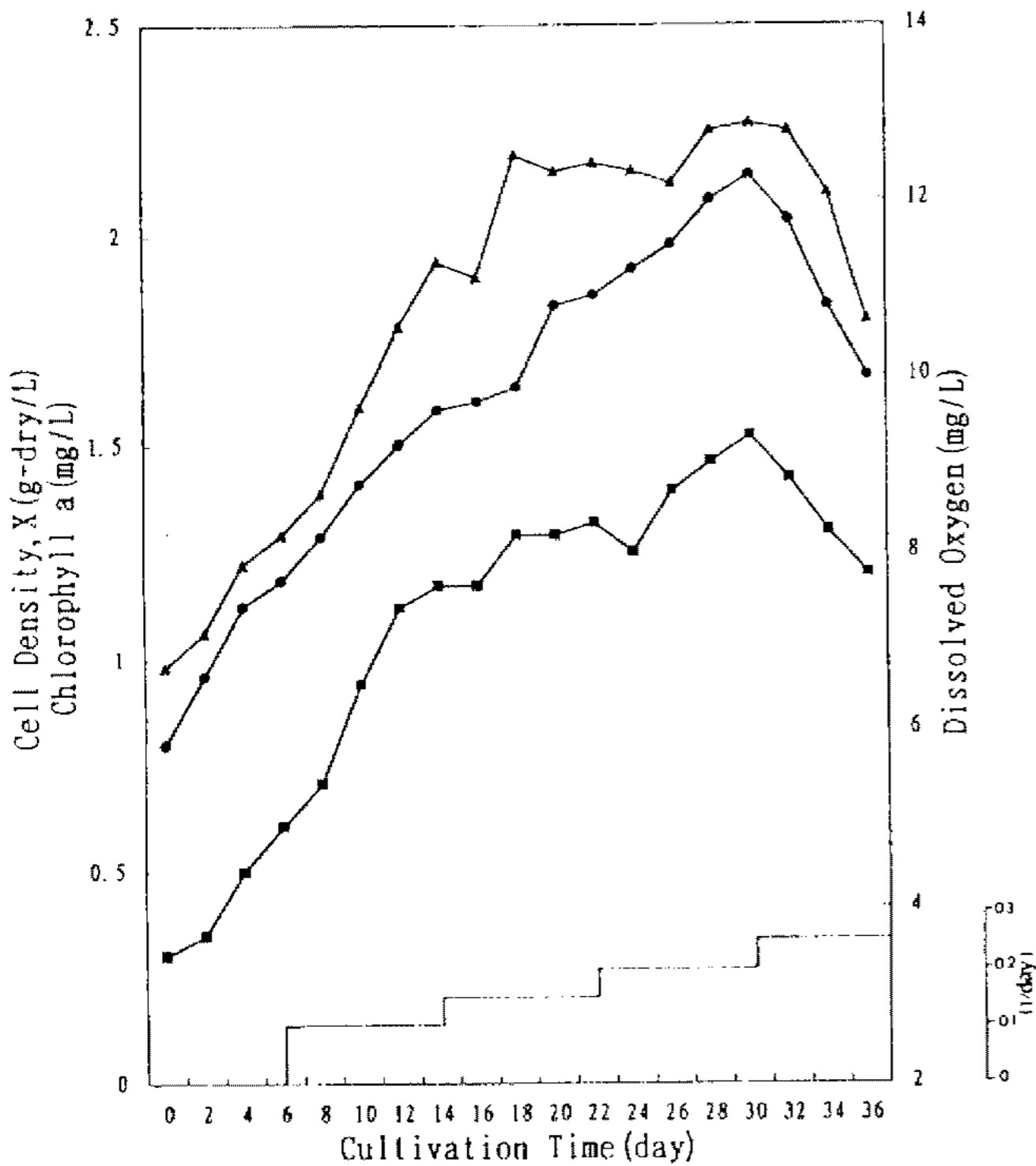


Fig. 7. The change of cell density, chlorophyll a and dissolved oxygen with 20% swine wastes in continuous cultivation of *S. platensis*.
 -■- Dry Weight -▲- Chlorophyll a -○- DO

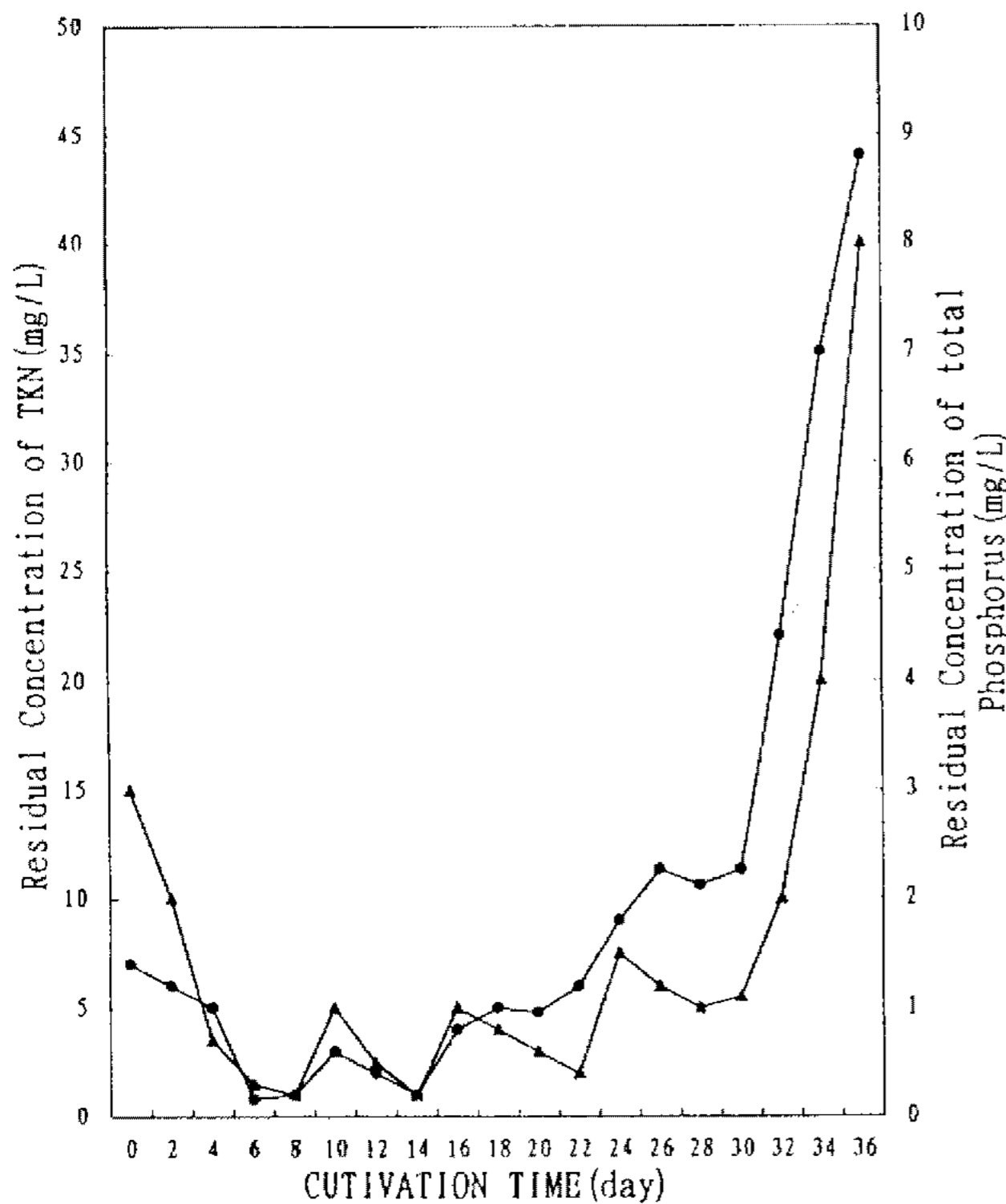


Fig. 8. Kinetics of removing TKN and T-P in continuous cultivations of *S. platensis*.
 -●- TKN -▲- T-P

Table 4. The comparison of chemical compositions of *Spirulina platensis* grown in swine wastes and a commercial health food.

Component (wt.%)	<i>Spirulina platensis</i> grown in swine wastes	SPIRULINA for commercial health food
protein	58.7	68.5
lipid	13.5	15.2
carbohydrate	10.2	4.9
ash	17.6	11.4

58.7%로 높은 것으로 나타났다. 이는 본 실험과 같이 폐기물에서 배양된 *Spirulina platensis*가 사료의 단백질 공급원으로서의 이용가치가 높음을 보여 주는 것이다. 이같은 균체의 사료적 가치의 연구와 대량연속배양에 관한 연구가 병행되면 축산 폐수의 효율적 처리와 고단백 사료원의 경제적 생산이 가능할 것이다.

요 약

돈분 폐수의 효율적인 처리를 위해 6 W/m², 12 W/m² 와 24 W/m²의 조도 하에서 온도를 15℃에서 40℃까지 각각 변화시켜, 광합성 미세 조류인 *Spirulina platensis*의 생육에 관한 최적 생육 조건 결정에 관한 실험을 하였다. 균체의 비생육속도는 30℃까지는 온도 증가에 따라 증가하였다. 균체의 생육에 있어서 온도의 영향을 설명하기 위해서 Arrhenius 식을 이용하여서 얻은 활성화 에너지 값은 13.5 kcal/mol이었다. 순수 배지에서 배양된 균체의 비생육속도가 0.31(1/day)인 반면 30% 돈분 첨가 배양에서 얻은 균체의 비생육속도는 0.24(1/day)였다. 폐수내의 총 질소량과 인의 제거속도로 균체의 폐수 처리 능력을 평가할 수 있었다. 돈분 농도를 달리 첨가한 회분배양에 있어서 70~93%(PO₄³⁻-P), 67~93%(inorganic nitrogen), 80~90%(COD) 그리고 37~56%(organic nitrogen)의 감소율을 보였다. 총-질소와 총-인의 1차반응 감소 속도 상수는 각각 0.17(1/day)와 0.14(1/day)로 계산되었다. 20% 돈분을 첨가하는 연속배양에 있어서 회석률이 0.20(1/day)일 때 최대 균체농도가 1.52(g/L)를 유지했다. 돈분처리 후 얻은 균체의 성분은 단백질이 58.7%, 지방 11.0% 그리고 회분이 15.6%였다.

감사의 말

본 연구는 한국 농수산부의 현장애로사업(1996~1997)으로 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Becker, E.W. 1939. Microalgae: biotechnology and

본 실험에서 배양된 *Spirulina platensis*의 일반성분 분석은 Table 4에 나타낸 바와 같다. 단백질 함량은

- microbiology. Cambridge studies in biotechnology. 58-59.
2. Beneman, J.R., D.M. Tillet, and J.C. Weissman. 1987. Microalgae Biotechnology. *Trends in Biotechnology* **5**: 47-53.
 3. Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzk. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 477.
 4. Chow, V.T., R. Eliassen, and R.K. Linsley. 1979. Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse. 2nd ed., McGraw-Hill Co., New York.
 5. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
 6. Germirli, F., D. Orhon, and N. Artan. 1991. Assessment of the initial inert soluble COD in industrial wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* **23**: 1077-1086.
 7. Henze, M. 1992. Determination of organic matter and nitrogen in wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **25**(6): 1-15.
 8. Ifiguez, C.G. 1983. Utilization and management of piggy exerts. National Congress AMVEC-83. Puerto Vallarta, Mexico.
 9. Lavoie, A. and J. de la Noue. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus abliquus*: A new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Res.* **19**(11): 1437-42.
 10. Louis Van Liere, J. Loogman and L.R. Mur. 1978. Measuring light-irradiance in cultures of phototrophic micro-organisms. *FEMS Microbiology Letters* **3**: 161-164.
 11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biological Chemistry* **193**: 265-275.
 12. Mokady, S., S. Yannai, P. Einov, and Z. Berk. 1978. Nutritional evaluation of the protein of several algal species for broilers. *Arch. Hydrobiol./Beih. Ergebn Limnol.* **11**: 89-97.
 13. Namsu, K. and P. Moon-young. 1993. Removal of inorganic nitrogen and phosphorus from cow's liquid manure by batch algal culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 214-216.
 14. Schmidt, E.L. and L.W. Belser. 1982. Nitrifying bacteria. In Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison. Pp. 1027-1042.
 15. S. Contreras, A. and J.C. Toha. 1980. Effects of illumination intensity on algal production. *Biotechnol. and Bioeng.* **10**: 91-92.
 16. Sigmund, J. and K. Gjert. 1993. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *J. Applied Phycology* **5**: 495-504.

(Received 29 March 1996)