

## Microencapsulation에 의한 미세조류의 고밀도 배양

한영호 · 이정석 · 광중기 · 이응호\* · 조만기  
동서대학교 산업기술연구소, \*부경대학교 식품공학과

## High-Density Cultivation of Microalgae using Microencapsulation

Young-Ho HAN, Jung-Suck LEE, Jung-Ki KWAK, Eung-Ho LEE\* and Man-Gi CHO

Engineering Research Center, Dongseo University, Pusan 617-716, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Pukyong University, Pusan 608-737, Korea

The three species of microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* and *Porphyridium purpureum*) were immobilized in Ca-alginate capsules as a basic study for development of economic cultivation process, and then were cultivated in an air-bubble column bioreactor.

Under the batch culture of aerobic conditions, the thickness of the capsule membrane and CO<sub>2</sub> supply did not affect the growth of the immobilized microalga, *Chlorella vulgaris*. Cell concentration of immobilized microalgae in the capsule was higher than those of immobilized microalgae in beads and free cells. The cell concentration of microencapsulated *Dunaliella salina* was greater about 5 times than that of free cells.

Based on these results, it is concluded that the application of microencapsulation technology to the culture of microalgae was an effective method for high-density cultivation.

**Key words:** microalgae, Ca-alginate capsule, microencapsulation, batch culture, high-density cultivation

### 서 론

미세조류는 그 자체가 여러 가지 기능성 물질을 함유하고 있는 것으로 밝혀짐에 따라 식품 및 의약품 산업, 화장품 공업 및 어패류 양식분야에 이용되는 등 그 응용 분야가 날로 확대되고 있는 생물자원이다. 예를 들면, *Chlorella*는 건강식품 및 rotifer의 먹이 생물로 상품화되어 있고,  $\gamma$ -linolenic acid 및 phycocyanin 등 약리작용을 나타내는 물질이 함유되어 있는 *Spirulina platensis*도 식품 첨가물, 건강식품 및 어류 사료 소재로서 많이 배양되고 있다. 또한  $\beta$ -carotene을 함유하고 있는 *Dunaliella salina*는 식품첨가물 및 화장품 원료로서 이용되고 있으며, *Porphyridium purpureum*은 세포의 다당류를 다량 함유하는 것으로 알려져 있어 유용한 산업적 자원으로 이용이 기대된다 (Michael and Lesley, 1988).

미세조류의 산업적 이용에 가장 근간이 될 수 있는 경제적인 대량생산과 관련한 공정에서 해결해야 할 중요한 과제가 분리 및 농축기술의 개발이다. 대부분의 미세조류는 배양액 중의 농도가 낮고, 크기가 대개 30  $\mu$ m 이하일 뿐만 아니라 물의 밀도 보다 약간 크기 때문에 배지로부터 분리하기가 용이하지 않다 (오 등, 1998). 또한 조류의 대량배양시 미생물에 의한 오염도 큰 문제가 되기 때문에 이러한 문제점을 해결할 수 있는 하나의 방안으로 고정화 방법의 도입을 고려할 수 있다.

생물 촉매의 고정화 방법으로는 포괄법 (entrapment), 가교법 (cross-linking) 및 담체 결합법 (carrier-binding) 등이 알려져 있으며, 이 중에서 bead 내부에 포괄하는 방법이 가장 널리 이용되고 있다 (Rehm and Reed, 1987). 그러나 bead 형태로 고정화하는 방법은 bead를 구성하는 고분자 물질의 기계적 강도 때문에 생물 촉매를 부피비로 25% 이상 고정화시킬 수 없을 뿐만 아니라 bead 표면에서의 생물촉매의 유실이 심하고, bead 내부로의 물질 및 산소 전달에 문제가 있다. 이와 반대로 capsule 고정화는 물질

전달의 저항이 적으며, capsule의 내부공간이 넓고, 생물 촉매를 capsule 내부에 고농도로 축적시킬 수 있다는 장점이 있어, 동물 세포 및 미생물 등의 고정화에 많이 적용되고 있다 (Lee and Park, 1996).

한편 미세조류 분야에서의 고정화에 관한 연구는 alginate로 고정화한 미세조류의 생리학적 연구 (Jeanfils and Collard, 1983; Robinson et al., 1985)를 비롯하여 폐수로부터 인이나 질소의 제거 (Oswald, 1988; Trivicso et al., 1996), 아미노산이나 비타민 등의 유용물질 생산 (Lem and Glick, 1985; Reed et al., 1986)을 위하여 bead 형태의 고정화가 응용되었으나, 아직까지 microencapsulation에 의한 미세조류의 고정화에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

본 논문에서는 미세조류의 배양시 경제적인 배양 공정을 개발하기 위한 기초연구로써, 대표적인 미세조류 3종을 선택하여 Ca-alginate로 microencapsulation한 후 고밀도 배양을 시도하였고, 아울러 bead형으로 고정화한 미세조류 및 free cell과 생산성을 비교·검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 미세조류 및 배지

본 실험에 사용한 미세조류는 *Chlorella vulgaris* 211-11b, *Dunaliella salina* B42-88, *Porphyridium purpureum* B112.79 3종으로써 독일의 Göttingen 대학 조류종자 보관소에서 분양 받았다. 한편 *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* 및 *Porphyridium purpureum*의 배양을 위하여 사용된 배지는 각각 Trebon medium의 조성은 Table. 1에, *Dunaliella* medium 및 *Porphyridium* medium은 Table. 2 및 3에 나타내었다. 그리고, 이들 배지들은 121.1°C, 2 bar에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

**Table 1. Composition of the Trebon medium for the growth of *Chlorella vulgaris* 211-11b**

	Component	(g/l)
Medium 1 (1 l)	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	0.300
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.400
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.500
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.014
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.435
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.640
Medium 2 (1 l)	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	74
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.7
	CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	23.8
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	23.6
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	410
Medium 3 (1 l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9.2
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	2.5

\* Trebon medium was prepared by adding medium 2 (10 μl) and medium 3 (10 μl) in medium 1 (1 l).

**Table 2. Composition of the Dunaliella medium for the growth of *Dunaliella salina* B42-88**

Component	(g/l)
KNO <sub>3</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02
Soil extract	30 ml
Artificial seawater	970 ml

\* Artificial seawater : Dissolve in 1000 ml of distilled water 60.0 g NaCl, 10.0 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KCl, and 2.0 g CaSO<sub>4</sub>

**Table 3. Composition of the Porphyridium medium for the growth of *Porphyridium purpureum* B112.79**

Component	(g/l)
KNO <sub>3</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
Soil extract	30 ml
Micronutrient solution	5 ml
Distilled water	480 ml
Filtered seawater	485 ml

\* Porphyridium medium was prepared by adding vitamin B<sub>12</sub> (5 × 10<sup>-6</sup>g) in sterile solution after cooling.

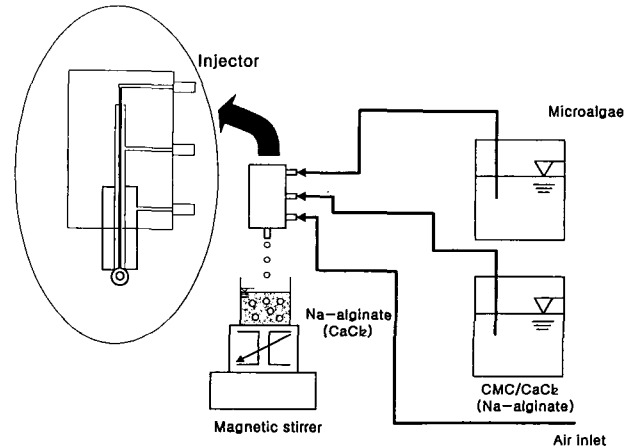
**고정화**

고정화 장치는 single immobilizing apparatus를 이용하였으며, 그 장치의 모식도는 Fig. 1과 같다.

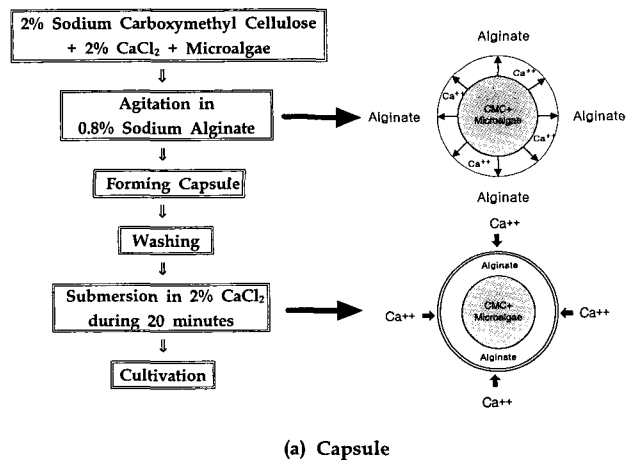
Capsule은 Cho (1994)와 Kim et al. (1997)의 결과를 참조하여 다음과 같이 제조하였다. 즉 일정농도의 미세조류와 2% carboxymethyl cellulose (CMC) 및 2% CaCl<sub>2</sub>의 혼합액을 고정화 장치를 통해 0.8% sodium alginate 용액으로 떨어뜨려서 제조하였고, capsule 막의 안정화를 위하여 2% CaCl<sub>2</sub> 용액에 20분간 교반시킨 후 실험에 사용하였다.

한편 bead는 Klein et al.의 방법 (1983)에 따라 미세조류와 0.8% sodium alginate 용액의 혼합액을 고정화 장치를 통해 2% CaCl<sub>2</sub> 용액에 떨어뜨려서 제조하였고, capsule 제조와 동일하게

20분간 2% CaCl<sub>2</sub> 용액에서 교반시킨후 배양에 사용하였다. 이상의 microencapsulation 및 bead 제조공정은 Fig. 2에 상세하게 나타내었다.



**Fig. 1. Schematic illustration of single immobilizing apparatus for the preparation of Ca-alginate capsule and bead. Chemicals in the parenthesis were used to produce immobilized microalgae in bead.**



**Fig. 2. Flowchart for the preparation of Ca-alginate capsule and bead.**

### 배양조 및 배양방법

미세조류는 air-bubble column형 배양조로 상온 ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ )에서 배양하였으며, 그 장치의 모식도는 Fig. 3에 나타내었다. 배양시 조도는 10,000 lux로 하였고, 공기를 이용한 폭기(aeration)에 의하여 배양액에 필요한 탄소원을 충분히 공급되도록 하였으며, 이때 공기 공급속도는 0.20 vvm이었다. 또한 배양액의 pH를 조절할 수 있도록 pH meter을 설치하였다.

### 미세조류의 농도 측정

초기 동일 농도에서 동일 조건으로 배양한 고정화 미세조류 및 free cell을 일정시간에 일정량을 취하여 UV-VIS spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)로 750 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다. 이 때 free cell은 배양액내 중심부에서 5차례 채취하여 흡광도를 측정 후 평균값으로 나타내었다. 한편, capsule 및 bead로 고정화된 미세조류는 free cell과 동일하게 5차례 걸쳐 각각 10개씩 채취하여 capsule 및 bead를 파쇄한 다음 흡광도를 측정 후 평균값으로 나타내었고, 흡광도 측정 후 capsule과 bead내의 농도를 free cell의 배양조내 농도와 동일하도록 희석배율을 곱하여 최종 흡광도를 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### Capsule 및 bead의 성상

Fig. 4는 Video presenter (SVP-410S, Samsung Co., Korea) 및 광학현미경 (ML7000, Meiji Co., Japan)을 사용하여 20배 및 500

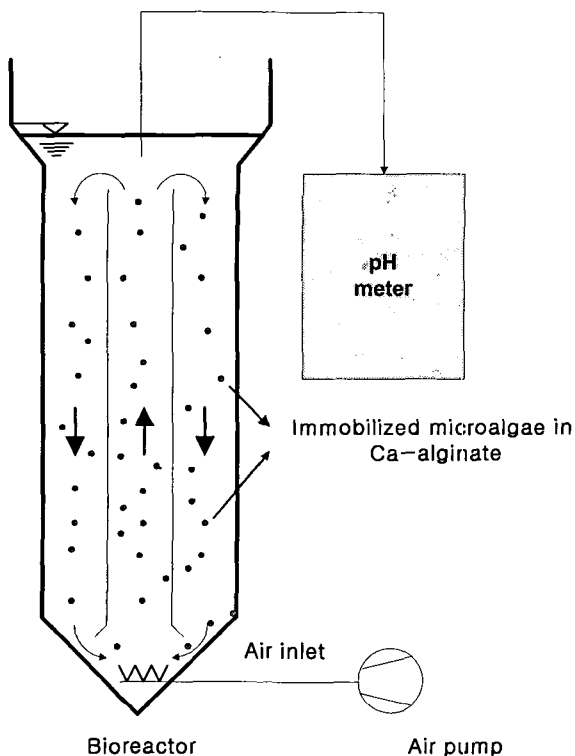


Fig. 3. Schematic illustration of air-bubble column bioreactor.

배로 확대한 capsule 및 bead의 성상을 나타낸 것으로서, capsule의 경우 bead와 달리 막을 형성하여 미세조류를 둘러싸고 있는 것을 알 수 있다. 또한, air-bubble column형 배양조는 packed-bed 배양조와는 달리 배양조내에서 capsule을 순환시킴에 따라 capsule내에 미세조류를 골고루 충전시킬 수 있었다. Capsule 및 bead의 평균 직경은 각각 3.51 mm 및 2.11 mm로 bead에 비하여 capsule이 컸으며, capsule 막의 평균 두께는  $385 \mu\text{m}$ 로 Kim et al. (1997)이 동일조건에서 제조한 capsule의 평균 직경 (4 mm) 및 막의 두께 ( $400 \mu\text{m}$ )와 거의 비슷하였다. 한편 capsule의 안정성을 알아보기 위하여 CMC 농도를 2%로 고정화 후  $\text{CaCl}_2$  농도를 각 1%, 2% 및 3%로 하여 capsule을 만든 다음  $\text{CaCl}_2$ 에 안정화 시키지 않고 캡슐이 파괴되는데 걸리는 시간을 알아본 결과, 2%  $\text{CaCl}_2$  농도에서 제조한 capsule이 가장 안정하였다 (not shown data).

### Capsule 막 두께 및 $\text{CO}_2$ 공급 유무에 따른 미세조류의 성장 특성

Microencapsulation으로 고정화 된 미세조류의 배양조내 배양시 성장에 영향을 미치는 중요한 인자가 capsule 막의 두께 및  $\text{CO}_2$ 라 할 수 있다. Capsule 막의 두께는 배양액 중의 물질 및 산소전달에 관여하며,  $\text{CaCl}_2$ 의 농도 증가에 따라 capsule 막의 두께가 커진다고 보고되어 있다 (Cho, 1994). Table 4는 CMC를 2%로 고정화한 후  $\text{CaCl}_2$  농도에 따른 capsule 막의 두께를 나타낸 것으로 1%, 2% 및 3%  $\text{CaCl}_2$  농도에서 제조한 capsule 막의 두께는 각각  $232 \mu\text{m}$ ,  $385 \mu\text{m}$  및  $679 \mu\text{m}$ 였다. Fig. 5는 본 실험에 사용된 3종의 미세조류 중 rotifer의 먹이사료로 국내에서 가장 많이 이용되고 있는 *Chlorella vulgaris*를 대상으로 capsule 막의 두께에 따른 성장 곡선을 나타낸 결과로 막의 두께에 따른 cell 농도차는 거의 없었다. 따라서 capsule 막의 안정성과 미세조류의 성장을 고려할

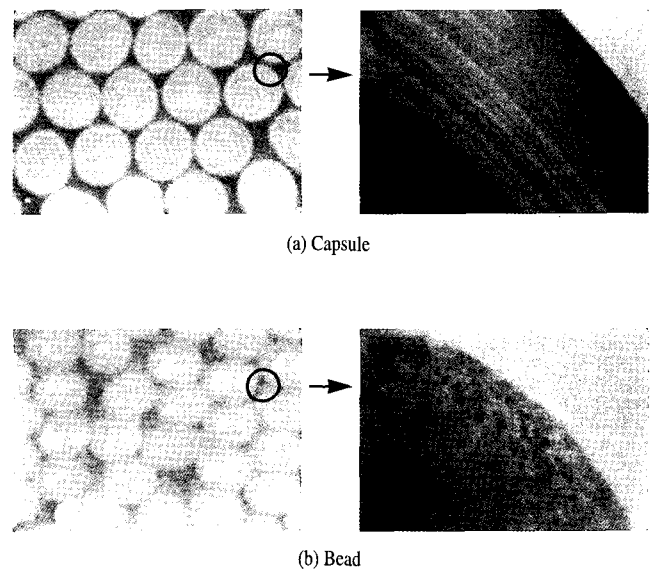
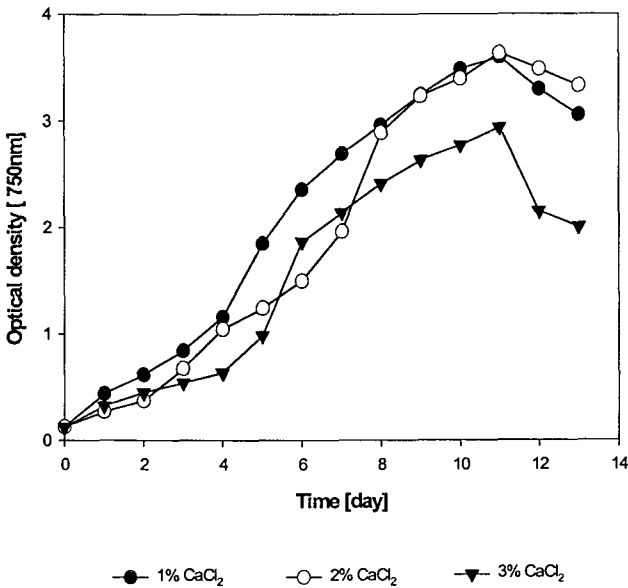


Fig. 4. Photographs of immobilized microalgae (*Chlorella vulgaris* 211-11b) in Ca-alginate capsules and beads.

**Table 4.** Membrane thickness of Ca-alginate capsules formed at different CaCl<sub>2</sub> concentrations in the encapsulation

Concentration of CaCl <sub>2</sub> (%)	Thickness of membrane (μm)
1	232
2	385
3	679

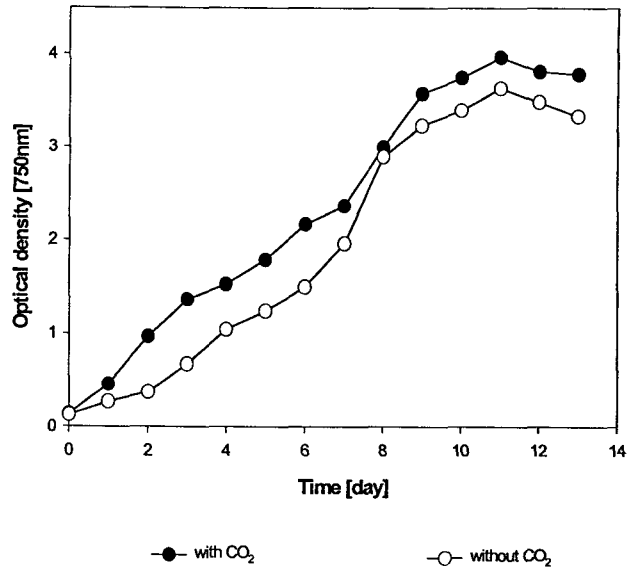


**Fig. 5.** Effect of the thickness of capsule membrane on the growth of immobilized *Chlorella vulgaris* 211-11b in Ca-alginate under batch culture in aerobic conditions.

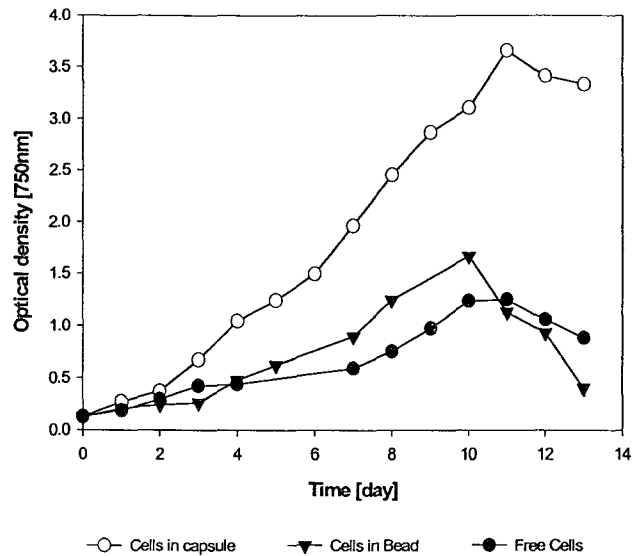
때, 2% CaCl<sub>2</sub> 농도가 적당한 것으로 생각되었다. 한편 CO<sub>2</sub>는 미세조류의 증식에 큰 영향을 미치기 때문에 CO<sub>2</sub> 공급 유무에 따른 미세조류의 성장을 알아보기 위하여 공기만 0.20 vvm 속도로 공급한 실험구와 공기 뿐만 아니라 별도로 CO<sub>2</sub>를 0.05 vvm 속도로 공급한 실험구에 있어 *Chlorella vulgaris*의 cell 농도는 거의 차이가 없어 (Fig. 6), 미세조류를 microencapsulation으로 고정화 하여 배양할 때 공기만 공급하여도 무방하다는 결론을 얻었다.

미세조류의 고밀도 배양

Fig. 7, 8 및 9는 capsule 및 bead로 고정화시킨 *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* 및 *Porphyridium purpureum*을 각각 air-bubble column형 배양조에서 미생물에 대한 오염을 최소화하기 위하여 완전 밀폐된 batch식으로 배양한 후 cell 농도의 변화를 나타낸 것이다. 또한, 배양중 capsule 및 bead의 파괴로 인한 미세조류의 손실을 막기 위해서 배양액에 CaCl<sub>2</sub>를 2% 농도로 매일 공급하였다. 그 결과 3종의 미세조류 모두 capsule로 고정화 시킨 것이 bead로 고정화 한 미세조류나 free cell 보다 농도가 높았다. 또한 bead로 고정화 한 미세조류의 경우, *Dunaliella salina* 및 *Porphyridium purpureum*에서는 free cell의 농도 보다 높은 값을 나타내었으나, *Chlorella vulgaris*는 free cell의 농도와 비슷한 것으로 미루어 보아 미세조류의 종에 따라 고정화에 의한 생장이



**Fig. 6.** Effect of CO<sub>2</sub> supply on the growth of immobilized *Chlorella vulgaris* 211-11b in Ca-alginate under batch culture in aerobic conditions.



**Fig. 7.** Growth curve of immobilized *Chlorella vulgaris* 211-11b in Ca-alginate under the batch culture in aerobic conditions.

다를 것으로 추정되었다. Lau et al. (1998) 및 Jeanfils et al. (1993)은 carrageenan 또는 alginate bead로 고정화 한 *Chlorella vulgaris*의 비증식속도 ( $\mu$ )는 free cell의 비증식속도와 유사하다고 보고한 바 있다. 한편 microencapsulation으로 고정화 한 미세조류의 생산성이 bead에 비하여 우수한 것은 배양액 중에서 물질 및 산소 전달이 capsule 내에서 보다 원활하게 일어난 것이 주된 요인으로 생각된다. 3종의 미세조류 중에서는 *Dunaliella salina*가 microencapsulation에 의한 고밀도 배양 효과가 가장 뛰어나 free cell 보다 약 5배 정도의 생산성을 나타내었다.

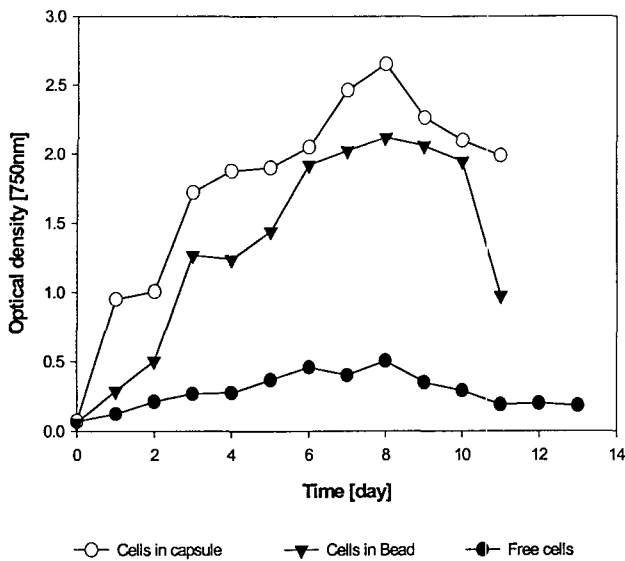


Fig. 8. Growth curve of immobilized *Dunaliella salina* B42-88 in Ca-alginate under the batch culture in aerobic conditions.

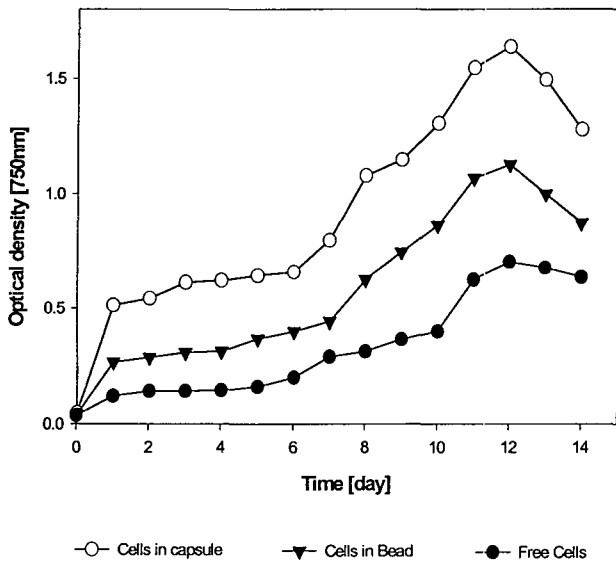


Fig. 9. Growth curve of immobilized *Porphyridium purpureum* B112.79 in Ca-alginate under the batch culture in aerobic conditions.

이상의 결과로부터 미세조류를 microencapsulation로 고정화 시킨 후 배양하면, free cell에 비하여 고밀도 배양이 가능하다는 것을 알 수 있었고, 아울러 이 방법은 배양 중에 발생할 수 있는 오염을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배양 후 미세조류의 회수에 별도의 분리나 농축이 필요하지 않아 향후 경제적인 배양공정으로 이용이 기대된다.

요 약

본 연구에서는 미세조류의 고밀도 배양을 위한 경제적인 공정을 개발하는 차원에서 3종의 미세조류 즉, *Chlorella vulgaris*, *Dun-*

*aliella salina* 및 *Porphyridium purpureum*를 Ca-alginate 로 microencapsulation 한 후 air-bubble column형 배양조에서 고밀도 배양을 시도하였다. 2% CaCl<sub>2</sub> 농도로 capsule을 제조할 때 capsule의 안정성이 가장 좋았으며, capsule 막의 두께 및 CO<sub>2</sub> 공급 유무에 따른 미세조류 (*Chlorella vulgaris*)의 생산성은 거의 차이가 없었다. 한편, 3종의 미세조류 모두 capsule로 고정화 시킨 것이 bead로 고정화한 미세조류나 free cell 보다 농도가 높았으며, 특히 *Dunaliella salina*가 microencapsulation에 의한 고밀도 배양 효과가 가장 뛰어나 free cell 보다 약 5배 정도의 생산성을 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 지방대육성과제 연구비에 의해 수행된 연구의 일부분으로 연구비를 지원해 준 한국학술진흥재단에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Borowitzka, M.A. and Lesley, B. 1988. Micro-Algal Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge.

Cho, M.G. 1994. Verfahrenstechnische Auslegung einer Apparatur zur Herstellung Mikroverkapselter Biokatalysatoren mit getrennter Zuführung von Katalysatorlösung und Kapselgrundsubstanz. Fortschritt-berichte VDI. Vol. 108. 1~140.

Jeanfils, J., M.F. Canisius and N. Burlion. 1993. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. J. Appl. Phycol., 5, 369~374.

Jeanfils, J. and F. Collard. 1983. Effect of immobilized *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 254~257.

Kim, S.H., J.Y. Park., G.T. Kim., Y.S. Chung., M.G. Cho. and B.H. Han. 1997. Fish meat hydrolysis using commercial protease immobilized with alginate in capsule and bead type. Korea. J. Biotechnol. Bioeng 12 (5), 501~508.

Klein, J., J. Stock and K.D. Vorlop. 1983. Pore size properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 86~91.

Lau, P.S., N.F.Y. Tam. and Y.S. Wong. 1997. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology., 63, 115~121.

Lee, B.H. and J.K. Park. 1996. Encapsulation of whole cell  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli*. Korea. J. Biotechnol. Bioeng 11 (4), 398~404.

Lem, N.W. and B.R. 1985. Biotechnological uses of cyanobacterials. Biotechnol. Adv., 3, 195~209.

Oh, H.M, S.J. Lee and J.S. Kim. 1998. Present conditions and preview of bioengineering industry using microalgae. Present conditions and preview of Korea Marine Microalgae Culture Center. 49~65.

Oswald, W.J. 1988. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation, In Algae and Human Affairs, eds C.A. Lembi and J.R. Waaland. Cambridge University Press, Cambridge. 255~281.

- Reed, R.D., S.R. Warr, N.W. Kerby and W.D. Sewart. 1986. Osmotic shock induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 8, 101~104.
- Rehm, H.J. and G. Reed. 1987. *Biotechnology*. Vol 7a, VCH Publishers, New York. 369.
- Robinson, P.K., A.L. Dainty, K.H. Goulding, I. Simpkins and M.D. Trevan. 1985. Physiology of alginate-immobilized *Chlorella*. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 7, 212~216.
- Travisco, L., F. Benitez, P. Weiland, E. Sanchez, R. Dupeyron. and A. R. Dominguez. 1995. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatment. *Bioresource Technology* 33, 181~186.

---

1999년 1월 11일 접수

1999년 3월 3일 수리