

## 광합성세균의 파이롯트 단위 생산을 위한 고순도 배양

조경숙<sup>1</sup> · 임태빈<sup>2</sup> · 정해윤<sup>2</sup> · 조정섭<sup>2</sup> · 김중균<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품생명공학부

<sup>2</sup>두산 에코비즈넷

Highly Pure Culture of Photosynthetic Bacteria for Pilot-scale Production. Kyoung Sook Cho<sup>1</sup>, Tae Bin Yim<sup>2</sup>, Hae Yoon Jeong<sup>2</sup>, Jeong Sub Cho<sup>2</sup> and Joong Kyun Kim<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, <sup>2</sup>Doosan Ecobiznet, Yongin, Gyeonggi-do 449-795, Korea

**Abstract** Lab-scale and pilot-scale productions of photosynthetic bacteria, that were able to efficiently treat wastewater from aquacultural farm, were experimented for their highly-pure culture. The results of experiments in a gas pack reactor, an anaerobic flask and a flask using N<sub>2</sub> gas as N-source showed that only photosynthetic bacteria formed red colonies on agar plate and their purity was over 90% in a colony, observed under a microscope. It was found that the basal medium could most promote the growth of photosynthetic bacteria, confirmed by experiments of serial cultures on various media. Under the culture conditions, the specific growth rate was found to be 0.18h<sup>-1</sup> from the culture in 5L bioreactor and the same value could be obtained in pilot-scale production.

**Key words :** Photosynthetic bacteria, optimal medium, pure culture, pilot-scale

### 서 론

새우는 전 세계적으로 선호되는 식용 수산 생물로서 다른 양식 어종에 비해 사육기간이 매우 짧아 단기간에 소득을 올릴 수 있음으로 인해, 새우 양식은 어민들에게 부가가치가 매우 높은 산업으로 인정받고 있다. 예로부터 인천 근해에서는 양식업이 크게 발달하여 인천 지역의 경제에 기여해 오고 있다. 그러나 최근 인천 지역 새우 양식 해수의 수질은 공업용수나 선박 정박용 등으로 사용하는 수질의 기준치에 비슷한 수치를 보임으로써 식용 새우를 사육하기 위해서는 해수의 수질 개선이 요구된다. 현재 우리나라 대부분의 새우 양식장에서 방출되는 사육수는 제대로 된 정화 과정 없이 연안 해역에 방출되고 있는 실정이다. 사육수의 방출은 해양 오염을 일으킬 뿐만 아니라 적조나 녹조 현상 등 2차적인 오염을 유발시켜 해양 생태계 및 수산업 그리고 나아가 인류의 건

강 복지에 심각한 피해를 끼칠 수 있다. 또한, 바이러스 감염으로 인한 새우의 대량 치사 현상이 일어나면 양식업에 큰 타격을 주는데 이는 양식 해수의 수질과 밀접한 관계를 지니고 있으며, 고농도의 유기물 및 무기물을 함유한 양식장 해수로 인하여 새우의 저항성이 낮아져서 감염 발생율이 증가되는 것으로 사료된다 [6]. 따라서, 새우 양식장 사육 해수 처리에 대한 연구는 인천을 비롯한 서해안 지역 새우 생산량의 향상 뿐 아니라 해양 오염의 사전 방제 및 수질 정화라는 측면에서 반드시 이루어져야겠다.

양식 해수 오염의 주원인이 되고 있는 질소 성분은 수중에서 암모니아 [9], 질산염 [10] 및 아질산염 [1,11] 형태로 존재하여 독성을 가지게 되므로 이 물질들의 제거를 위한 수질정화 미생물의 개발이 중요해지고 있다 [2,3]. 그 중 광합성세균은 단백질이 풍부하여 치어패류의 초기먹이 사료의 첨가제로서 사용되고 있을 뿐만 아니라 수질악화의 원인이 되고 있는 유독질소성분 처리능

\* Corresponding author

Phone: +82-51-620-6186, Fax: +82-51-620-6180

E-mail: junekim@pknu.ac.kr

력이 뛰어난 것으로 알려져 있다 [7,8]. 본 연구에서는 타 미생물과의 친화성이 높은 광합성세균의 대량배양 시 고순도를 유지하기 위하여, 먼저 flask culture 및 5L bioreactor에서 광합성세균의 반응특성을 알아보았고, 이 lab-scale 실험 결과를 토대로 하여 500L bioreactor를 운전하면서 대량생산 반응조건을 알아보았다.

**재료 및 방법**

**광합성세균의 배양**

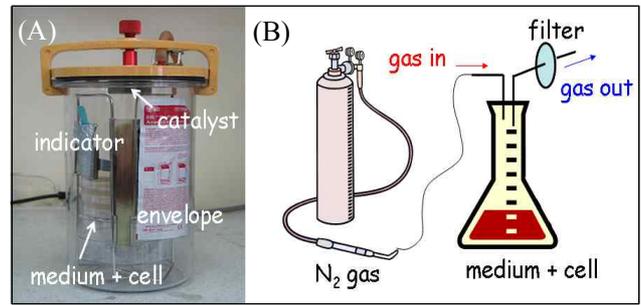
광합성세균의 배양은 기초배지 (Table 1)를 사용하였고, 국내 광합성세균 생산회사인 D사 (수원)에서 얻은 원액상태의 광합성세균 (*Rhodospirillum rubrum*)을 loop으로 떠서 액체배지에 접종하거나 고체배지에 streaking 및 stabbing 하였다. 접종된 배지는 30°C, 180rpm shaking incubator에서 50lux의 빛을 주어 1주일간 배양하였다.

**Gas pack 반응기와 flask 반응기를 이용한 고순도 유지**

광합성세균의 혐기적 배양을 통한 고순도 유지를 위하여 gas pack (Fig. 1(A))과 anaerobic flask (Fig. 1(B))에서 반응을 시켰다. Gas pack에 광합성세균을 접종한 agar plate를 넣고 반응기 내부를 혐기적인 상태로 만들어주는 촉매와 envelope를 투입한 후 뚜껑을 닫고 indicator를 넣어 실제 내부가 혐기적인 상태를 확인하였고, flask 반응기는 균 접종 후 질소가스를 15분간 지속적으로 넣어주었다가 질소가스를 차단하였다. Gas pack과 flask는 growth chamber에서 50lux의 빛을 주어 1주일간 배양하였다. 실험에 사용된 배지는 Table 1과 같다.

**N-source로서 질소 가스를 사용한 고순도 유지**

실험에 사용된 배지는 기초배지로, 배지내 N 성분인 ammonium phosphate와 MSG를 뺀 액체배지에 광



**Fig. 1.** Diagram of photosynthetic bacteria (PSB) culture in a gas pack reactor (A) and an anaerobic flask (B).

합성세균을 접종하고 N<sub>2</sub> 가스를 충분히 넣어준 anaerobic flask 반응기를 이용하여 실험하였다.

**배지의 교차에 의한 배양**

광합성세균의 배양에 사용되는 기초배지를 비롯한 4가지 배지 중 광합성세균의 성장에 있어 보다 효과적인 배지를 찾아보았다. 배지의 교차에 의한 광합성세균의 성장 및 활성을 측정하기 위하여 기초배지를 비롯하여 LB배지, TSB배지간의 교차배양을 시도하였다. 1L flask를 사용하여 먼저 기초배지 600ml에 광합성세균을 5%로 접종하여 배양하면서 현미경으로 미생물을 관찰하고 cell의 성장은 660nm에서 optical density (O.D.)를 측정하여 관찰하였다. 기초배지에서 자란 광합성세균을 다시 LB배지 또는 TSB배지로 옮겨 배양하였고, 균의 순도 및 균의 성장을 알아보기 위해 현미경 관찰 및 O.D.를 측정하였다.

**5L bioreactor에서의 배양**

최적 배지조성하에서 5L fermenter (Korea Fermentor Co., Ltd, Korea)를 이용하여 광합성세균의 고순도 배양을 실시하면서 pH, air flow rate, agitation speed 등의 반응조건을 알아보았다. 실험에 사용된 배지는 기초배지이고, 30°C에서 실험하였다.

**Table 1.** The compositions of various media used in this study

Medium	Composition
Basal (pH=6.8)	0.5g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0.5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2.7g DL-malic acid; 0.8g ammonium phosphate; 3.76g MSG; 1g tryptone; 2g yeast extract; and 2.1ml trace element
LB (pH=6.8)	10g tryptone; 10g NaCl; and 5g yeast extract
TSB (pH=6.8)	17g tryptone; 3g soytone; 2.5g dextrose; 5g NaCl; and 2.5g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
MYC (pH=6.8)	1g DL-malic acid; 3g yeast extract; and 2g casamino acid

## Pilot-scale에서의 배양

5L fermenter 실험을 통해 얻은 최적 pH, air flow rate, agitation speed 조건을 바탕으로 500L fermenter (Korea Fermenter Co., Ltd, Korea)를 이용하여 pilot-scale 배양을 실시하면서 대량생산 반응조건을 알아보았다. 실험에 사용된 배지는 기초배지이고, 30°C에서 실험하였다.

## 분석

광합성세균의 성장에 따른 흡광도 변화를 UV-VIS spectrophotometer (Hanson Technology Co., Ltd, Korea)를 이용하여 측정하였고, 광합성세균의 순도는 agar plate 위에 형성된 colony의 색깔과 수를 counting하여 측정하였다. pH의 변화는 pH meter (Humas Co., Ltd, Korea)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 광합성세균의 고순도 유지

기초배지를 이용한 광합성세균의 배양결과, agar plate 위에 독립된 colony들을 얻을 수 있었다. 독립된 colony로부터 현미경 관찰을 통해 광합성세균이 약 90%이상의 순도를 유지함을 알았고, agar plate 상에 형성된 colony를 관찰한 결과 red pigment를 띄는 광합성세균 colony만을 관찰할 수 있었다. 광합성세균의 현미경상의 특징은 폭 0.5~1.2 $\mu\text{m}$ , 길이 2~2.5 $\mu\text{m}$ 의 막대 형태이고, motility가 뛰어났다. 광합성세균의 순도는 액체배양보다는 고체배양 시, 그리고 빛의 양이 50lux이상 많을수록 높게 유지되는 것으로 보고되고 있다 [4].

광합성세균의 gas pack reactor 실험결과, 고체배지에 streaking한 광합성세균이 4일만에 colony를 이루었는데, Fig. 2에 나타난 것과 같이 모두 진한 붉은색을 띄고 있었다. 광합성세균은 순도가 높을수록 colony가 더욱 붉은색을 띄게 되는데, 이는 현미경 관찰 결과에서 뿐만 아니라 agar plate 결과에서도 확인할 수 있었다. 현미경 관찰 결과 기초배지에서 순수 광합성세균의 우점도가 가장 높았고 (90% 이상), motility 또한 가장 뛰어났다. 반면에 액체배지에 접종하여 배양시킨 flask 반응기의 실험결과, 배양 1주일 후에 배지가 갈색으로 바뀌었는데, 현미경 관찰 결과, 액체배지에는 광합성세균 외 타 미생물이 보였고 motility가

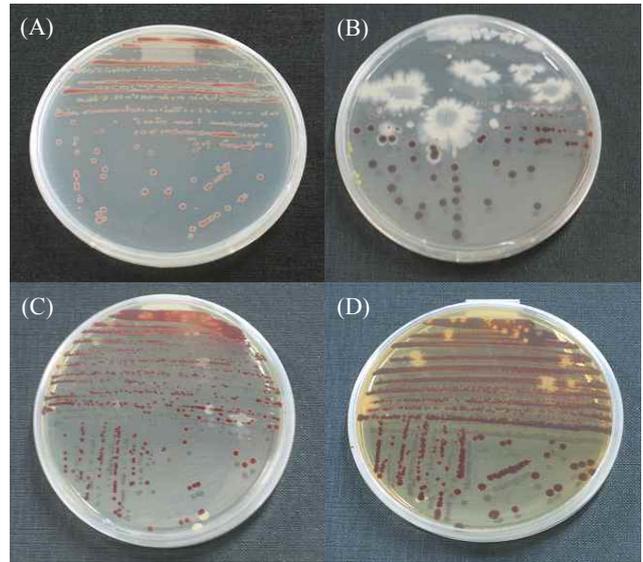


Fig. 2. Results of PSB cultures on basal (A), MYC (B), LB (C) and TSB (D) media in a gas pack reactor.

고체배지 배양에 비해 상대적으로 떨어지는 것으로 나타났다. 배지가 붉은색이 아닌 갈색으로 바뀐 것은 광합성세균의 순도가 떨어졌기 때문이다.

일부 광합성세균은 N-source로서 질소 가스를 이용할 수 있는 질소고정균일 수도 있다는 보고 [5]에 따라, 배지내 N 성분을 제거하고 질소 가스를 주입하는 실험을 실행한 결과, 배양 4일만에 배지가 붉은색을 띄었고, 배양 1주일 뒤 현미경 관찰 및 agar plate counting 결과, 약 90%이상 대부분의 미생물이 광합성세균인 것으로 나타났다. 따라서 실험에 사용된 광합성세균은 질소 가스를 이용할 수 있는 미생물로 보인다.

### 배지의 교차에 의한 배양

배양 안정화를 위한 1L flask 광합성세균 배양결과, 기초배지에서 광합성세균은 현미경 관찰과 colony counting을 통해 거의 90% 이상의 순도가 유지되고 cell motility도 매우 뛰어난 것을 관찰하였고, agar plate 상에 형성된 모든 colony가 붉은색을 띄고 있어 광합성세균임을 확인할 수 있었다. 그러나 LB배지, TSB배지로의 교차에 의한 배양에서는 광합성세균의 수가 줄어들었을 뿐 아니라 cell motility도 많이 떨어졌다. Colony counting 결과 역시 실험이 진행될수록 붉은색 colony를 형성하는 광합성세균 수가 감소하면서 갈색 또는 아이보리색을 띄는 colony를 형성하는 미생물들의 검출빈도가 높아졌다. Fig. 3은 각각의 영

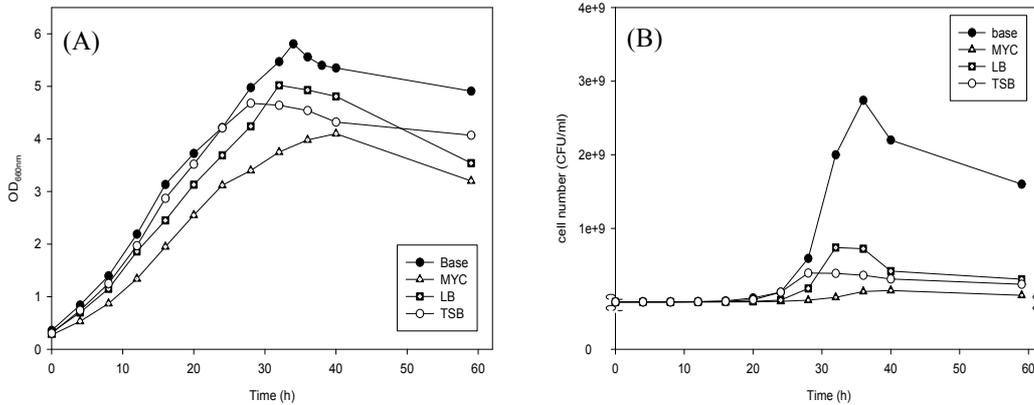


Fig. 3. Results of O.D. (A) and cell number (B) of PSB cultured on various media.

양배지에서 배양시간에 따른 광합성세균의 비증식속도와 CFU 변화를 나타낸 것인데 그림에서 볼 수 있듯이 광합성세균은 기초배지에서 비증식속도가 0.21h<sup>-1</sup>로 가장 높았고, CFU 측정 결과에서도 35시간 이후 2.7\*10<sup>9</sup>CFU/ml로 타 배지에 비해 가장 높은 값을 나타내었다.

Fig. 4는 각 배지에 광합성세균을 순차적으로 배양시켰을 때의 비증식속도를 나타낸 것으로, 실험결과 기초배지에서 LB배지로 순차적인 배양을 하였을 경우, 기초배지에서 비증식속도가 0.22h<sup>-1</sup>이었고 LB배지로 옮겼을 때 0.24h<sup>-1</sup>로 비슷한 균의 성장이 나타났다. 이에 비해 LB배지에서 TSB배지로, 또는 TSB배지에서 LB배지로 순차적인 배양을 하였을 경우 비증식속도는 0.15h<sup>-1</sup>에서 0.17h<sup>-1</sup>로 나타나 균의 성장속도에는 변화가 거의 없었다. 가장 높은 균체량은(O.D. 5.9) 기초배지에서 배양했을 경우 얻어졌다. 따라서 이러한 결과로 볼 때, 실험에서 고려해 본 LB배지, TSB배지보다는 기초배지를 이용한 배양이 광합성세균의

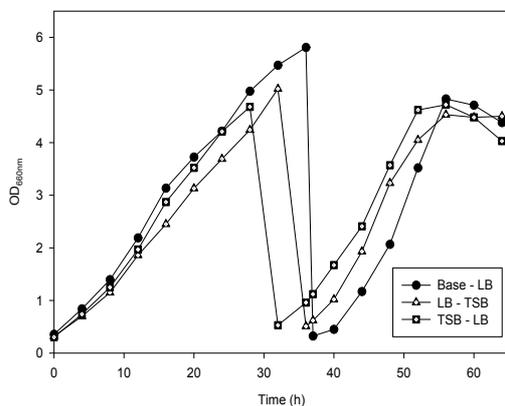


Fig. 4. Serial cultures of PSB on various combined media.

성장에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

### 5L bioreactor에서의 배양

5L bioreactor를 이용한 광합성세균의 배양결과, Fig. 5(A)에서 볼 수 있듯이 접종 후 광합성세균은 빠르게 성장하다가 약 40시간 이후 stationary phase에 도달하였고, 최대 비증식속도는 0.18h<sup>-1</sup>이었다. Fig. 5(B)에서 보듯이, 처음 18시간에 반응이 격렬히 일어나 pH가 처음 6.8에서 8.3으로 크게 상승하였다. 이 이후는 균의 최적 성장을 위해 pH를 7로 유지시켜 주어 반응을 시켰다. 이때, 충분한 산소공급을 통한 광합성세균의 호기적 반응을 위해 air flow rate를 초기 0.6L/min에서 균이 빨리 성장하는 log-phase에서는 0.9L/min로 높여 주었고, agitation speed는 shear stress를 고려하여400rpm에서 580rpm 정도까지만 올려 주었다.

### Pilot-scale에서의 배양

500L bioreactor를 이용한 광합성세균의 pilot-scale 배양결과, Fig. 6(A)에서 볼 수 있듯이, 접종 후 광합성세균은 빠르게 성장하다가 약 80시간 이후 stationary phase에 도달하였다. 이는 5L bioreactor에서 광합성세균이 40시간만에 stationary phase에 도달한 것에 비해 2배정도 속도가 느려진 것으로 scale-up 시, lab-scale에서 얻어진 parameter가 pilot-scale에 그대로 적용될 수 없음을 의미한다. Fig. 6(B)에서 보면, 반응 시작 18시간만에 DO가 모두 소모되었다. 따라서, 충분한 산소를 공급하기 위하여 DO가 모두 소모되는 시간마다 air flow rate와 agitation speed를 조절하여 DO를 높여주었는데, 균이 빨리 성장하는

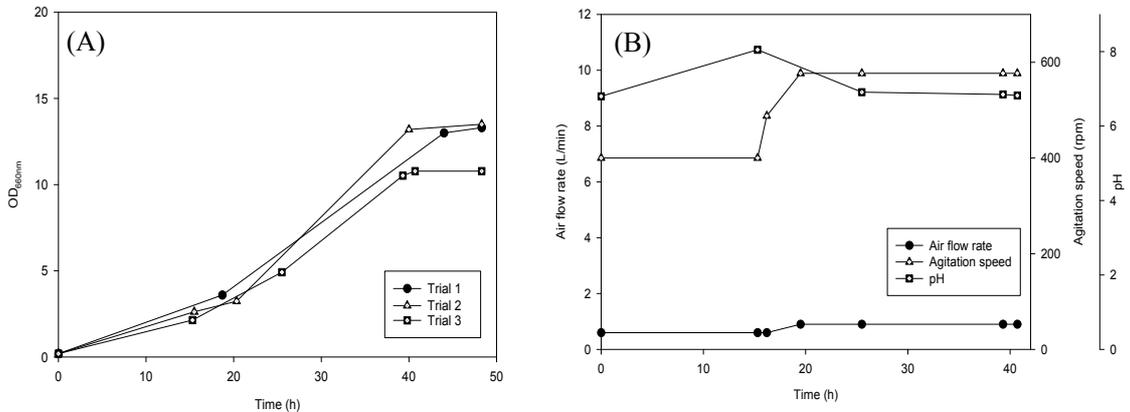


Fig. 5. Batch cultures of PSB in a 5L bioreactor: cell growth (A) and culture conditions (B).

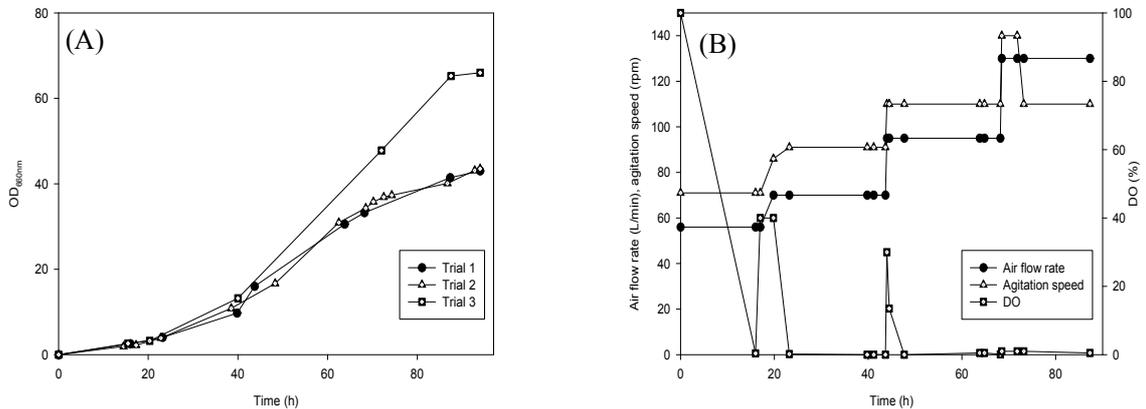


Fig. 6. Mass cultures of PSB in a 500L bioreactor: cell growth (A) and culture conditions (B).

log-phase에서의 반응시간인 24, 48, 72시간에 air flow rate는 처음 56L/min에서 70, 95, 130L/min으로 높여 주었고, agitation speed는 처음 71rpm에서 86, 91, 110rpm으로 단계적으로 올려 주었다. 그 결과, 모두 소모되었던 DO가 반응 24, 48 시간에 40, 30%로 증가하였다. 이때, pH는 앞선 5L bioreactor의 실험결과에 따라 7로 control 하여 반응시켰다. 이러한 조건에서 세 차례에 걸친 배양 결과, air flow rate와 agitation speed의 증가로 DO가 증가하였고, 최대 비증식속도는 5L bioreactor에서의 배양과 동일한 0.18h<sup>-1</sup>로 계산되었다.

**요 약**

오염된 양식 해수의 수질정화능력이 뛰어난 광합성세균의 고순도 대량배양을 위한 실험을 실험실 단위 및 파이롯트 단위에서 수행했다. Gas pack 반응기, flask 반응기 및 N-source로서 질소 가스를 사용한 실험

결과, 광합성세균은 현미경상 약 90%이상의 순도를 나타내었고, CFU 측정 결과에서도 붉은색을 띄는 광합성세균 colony만을 관찰 할 수 있었다. 배지의 교차에 의한 배양실험에서 기초배지를 이용한 배양이 광합성세균의 성장에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 이러한 배양조건하에서의 5L bioreactor 배양에서 비증식속도가 0.18h<sup>-1</sup>로 나타났고, 실험실 단위의 결과를 이용한 pilot 단위에서의 배양결과, 실험실 단위의 비증식속도와 동일한 값을 얻을 수 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 2006년도 중소기업기술혁신개발사업 연구 (S1012329) 지원에 의한 연구결과입니다.

**참 고 문 헌**

1. Alcaraz, G. and Espina, S. 1995. Acute toxicity of nitrite in juvenile grass carp modified by weight and

- temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 473-478.
2. Cho, K. S., Park, K. J., Jeong, H. D., Nam, S. W., Lee, S. J., Park, T. J. and Kim, J. K. 2006. Characteristics of immobilized PVA beads in nitrate removal. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 414-422.
  3. Dahab, M. F. 1978. Treatment alternatives for nitrate contaminated groundwater supplies. *J. Environ. Syst.* **17**, 65-69.
  4. Drews, G. 1986. Adaptation of the bacterial photosynthetic apparatus to different light intensities. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 255-257.
  5. Gest, H., Favinger, J. L. and Madigan, M. T. 1985. Exploitation of N<sub>2</sub>-fixation capacity for enrichment of anoxygenic photosynthetic bacteria in ecological studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **31**, 317-322.
  6. Grossa, A., Nemirovskya, A., Zilbergb, D., Khaimova, A., Brennerc, A., Snird, E., Ronena, Z. and Nejidata, A. 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture* **223**, 51-62.
  7. Kim, J. K., Lee, B. K., Kim, S. H., and Moon, J. H. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.* **19**, 179-193.
  8. Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S. Y. and Kim, Y. H. 2005. Characteristics of a water-purification system using immobilized photosynthetic bacteria beads. *Environ. Eng. Res.* **10**, 227-238.
  9. Meade, J. W. 1985. Allowable ammonia for fish culture. *Prog. Fish. Cult.* **47**, 135-145.
  10. Mirvish, S. S. 1977. N-nitroso compounds, nitrate and nitrite: Possible implications for the causation of human cancer. *Prog. Water Technol.* **8**, 195-201.
  11. Smith, C. E. and Williams, W. G. 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **103**, 389-390.