

# Polyaluminium Chloride를 이용한 미세조류 *Spirogyra*의 응집 최적화

백재원, 최종일\*

## Optimization of *Spirogyra* Flocculation Using Polyaluminium Chloride

Jaewon Baek and Jong-il Choi\*

접수: 2014년 3월 17일 / 게재승인: 2014년 6월 13일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Flocculation is known one of the effective methods for harvesting microalgae. This study was aimed to optimize the flocculation condition for decreasing the amounts of flocculant and obtaining the highest yield of algal biomass. To achieve this goal, it was optimized the flocculant concentration, reaction pH and the concentration of cell density for harvest using response surface methodology (RSM). The flocculation of microalgae, *Spirogyra varians*, was carried out using inorganic flocculant polyaluminium chloride. By the RSM result, the optimal flocculation condition was calculated 5 ppm of polyaluminium chloride, pH 7.5 and 0.33 of optical cell density at OD<sub>640</sub>. The obtained recovery yield of *S. varians* was 97.6% at the optimal condition.

**Keywords:** Microalgae, Flocculation, Response surface methodology

### 1. INTRODUCTION

전 세계적으로 화석연료 연소 시 발생하는 이산화탄소로 인해 지구 온난화를 비롯한 각종 환경문제가 발생 되어왔다. 이에 대한 해결책으로 수력, 풍력, 태양광 등 신재생 에너지 개발로 환경문제에 대처해 왔지만 이러한 신재생 에너지로는 상업 및 수송용 화석 에너지원을 대체하기엔 미흡한 실정이다 [1].

상업 및 수송용 에너지를 대체하기 위하여 바이오 매스를 이용한 바이오 에탄올, 바이오 디젤 그리고 바이오 가스 등 바이오 에너지가 연구 되어왔고, 현재에는 바이오 에너지의 상용화가 이루어지고 있다 [2-4].

바이오 디젤의 경우 palm, corn 또는 jatropha 와 같은 육상 식물을 이용하여 생산이 되어 왔는데 미세조류 또한 바이오 디젤 생산을 위한 바이오 매스로 사용될 수 있다. 대표적인 균주로는 *Spirogyra varians*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella* sp. 등이 있다 [5]. 이들 미세조류는 육상 식물에 비하여 배양시 필요 면적이 적고, 면적당 바이오 매스 생산 수율이 높다. 또한 대기중 CO<sub>2</sub>를 고정시키며 태양광과 미량의 무기영양소만으로도 생장을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [6-9]. 특히 *S. varians*의 경우 우리나라에서는 겨울철에도 휴경지에서 생장이 가능하고 43% 이상 바이오매스를 생산 및 저장하는 균주로 특히 starch 생산에 있어 우수한 능력이 밝혀져 있다 [10]. 세포내 저장된 starch와 cellulose와 같은 물질은 바이오 에탄올 생산에 사용될 수 있다.

미세조류를 이용한 바이오 매스 또는 바이오 디젤 생산과정에는 미세조류의 대량 배양, 배양액으로부터 미세조류 수확, 전분 또는 지질 추출 그리고 발효 또는 추출한 지질로부터 바이오 디젤로의 전환 단계를 거쳐야 한다. 이러한 공정 중 미세조류를 수확하는 단계에서 원심분리, 응집, 여과 등 여러 방법을 적용할 수 있지만 비교적 경제적이고 효율적인 방법으로는 응집법이 있다 [11]. 응집제를 이용한 미세조류의 응집방법은 species 특이성이 적으며 대용량으로 수확할 경우에도 적용이 쉽다는 장점이 있다 [12]. 이전 연구에 의하면 aluminium 계열, ferric계열의 무기 응집제 사용 시 미세조류의 높은 응집 효율을 얻을 수 있었다. 하지만 무기 응집제가 해수에 용해되면 산도를 증가시키기 때문에 사용되는 무

전남대학교 생물공학과  
Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, South Korea  
Tel: +82-62-530-1846, Fax: +82-62-530-1949  
e-mail: choiji01@chonnam.ac.kr

기 응집제의 사용량을 최소화 함으로써 응집제 사용시 발생되는 pH감소를 최소화할 필요가 있다 [13].

따라서 본 연구에서는 최소한의 무기 응집제의 사용으로 최대의 응집 효율을 얻기 위해 response surface methodology (RSM)를 이용한 미세조류의 최적 응집조건을 구축하는 연구개발을 수행하였다.

연구를 수행하는데 있어서 사용된 RSM은 인자가 두 개 이상일 때 인자 간 상호영향을 확인할 수 있고 실험 시행 횟수를 최소화하고 통계적으로 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있다. 이를 바탕으로 미세조류의 응집반응 시 응집제의 농도, 반응 시 pH, 세포의 농도가 응집 효율에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 통하여 통계적으로 응집제를 이용한 미세조류 수확 시 최적의 반응 조건을 찾을 수 있었다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 균주 및 시료

응집에 사용된 조류 *Spirogyra varians*는 공주대학교 (Kongju National University, Kongju, South Korea)에서 분양을 받아 [10], Bold's Basal Medium (BBM)을 이용하여 20°C에서 배양하였다 [14]. 응집제는 17% 액상 polyaluminium chloride 17% (PAC 17%) (Mijoo Envichem, Seoul, South Korea)를 사용하였으며, 또한 pH 조절에 사용된 완충용액은 2% NaOH, 2% HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 각각 사용하였다.

### 2.2. 응집 실험

균주는 BBM 배지에서 OD<sub>640</sub> 1.0까지 배양하였으며 배양된 균주는 BBM 배지로 희석하면서 OD값을 조절하였다. 응집 실험은 각 인자별로 조건을 맞춘 배양액 150 mL에 응집제를 첨가하여 100 rpm으로 10분간 교반하여 실시하였다. 응집효율을 확인하기 위해 응집반응 후 상층액 내에 남아있는 균주의 OD는 분광광도계 (UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 640 nm에서 측정하였다.

### 2.3. 중요요소 선별 및 응집효율 측정

pH 7.0, cell mass OD<sub>640</sub> 0.25로 조건을 고정시키고 응집제의 농도변화 (3, 5, 7, 9, 11 ppm)에 따른 실험을 하고, 응집제 농도 5 ppm, cell mass OD<sub>640</sub> 0.25로 조건을 고정시키고 반응 pH의 변화 (3, 5, 7, 9)에 따른 실험, 그리고 응집제 농도 5 ppm, 반응 pH 7.0으로 고정시키고 cell mass의 변화 (OD<sub>640</sub> 0.5, 0.25, 0.125, 0.625)에 따른 응집효율을 측정하였다.

### 2.4. 반응표면분석 (response surface methodology; RSM)의 실험계획

본 실험에서 최적의 응집효율 조건을 알기 위하여 반응표면분석법 (RSM)의 Box-Behnken design (BBD)방법을 선택하여 이용하였다. 최적화된 조건을 얻기 위한 많은 변수들 중 가장 큰 영향을 주는 변수라고 판단된 응집제의 농도와 반응시

**Table 1.** Independent variables and their levels used BBD

Real variable	Spaced levels		
	-1	0	1
PAC concentration (X <sub>1</sub> ) (ppm)	3	5	7
pH (X <sub>2</sub> )	5.0	7.5	9.0
cell mass (X <sub>3</sub> ) (OD <sub>640</sub> )	0.125	0.25	0.5

pH, 세포의 농도 (cell mass)를 독립변수로 선택하였다. 이 세 가지 인자를 응집반응에 영향을 미치는 독립변수 (X<sub>i</sub>)로 고려되는 인자 즉, 응집제의 농도 (X<sub>1</sub>), 반응 pH (X<sub>2</sub>), cell mass (X<sub>3</sub>)에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 low level (-1), medium level (0) 및 high level (1)로 값을 부호화하여 (Table 1) BBD 방법에 따라 15가지의 실험구간을 설정하여 응집 실험을 실시하였다. 15개의 실험군은 각각 3반복하여 실험하였다.

### 2.5. 통계 분석

반응표면분석을 위하여 Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하였다. 실험결과를 분산분석, 모수추정, 능선분석과 정준분석 등을 이용하여 독립변수에 대한 종속변수를 등고선 또는 삼차원표면도로 나타내어 함수관계를 추정하고, 예측하여 최적화하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. 모델 구축 및 중요 요소 결정

세 가지 요인 (응집제의 농도, pH, 세포의 농도)과 3단계 (-1, 0, 1)를 가진 15-run 방법은 세 번의 중심점 (level 0, 0, 0)을 포함하여 총 15번의 실험을 필요로 한다. 이 방법은 최적화된 응집 조건을 얻기 위해 이차 반응 표면을 사용하였다. 세 개의 중심점 (level 0, 0, 0)은 실행공정의 안정성과 내재된 다양성 및 응집효율을 측정하기 위해 설정하였다. 코드 단위로 설계된 변수에 따른 반응의 예측 값과 실험값을 Table 2에 나타내었다. 각 조건에 따른 실험은 3회 수행하였으며 Table 2에 나타난 실제 응집효율은 안정된 실험값의 평균값을 나타낸다. 반면 RSM 예측 값은 Minitab을 이용해 이차 모델에 적합한 기술로 얻었다. (식 1)의 예측 방정식은 BBD 모델로 실험 데이터에 맞추어 얻은 것이며, 응집반응 사이의 경험적 관계를 나타낸다.

$$Y = 95.307 - 10.320X_1 + 10.217X_2 + 13.643X_3 - 13.276X_1^2 - 6.831X_2^2 - 10.511X_3^2 + 14.9X_1X_2 + 20.16X_1X_3 - 18.105X_2X_3 \quad (\text{식 1})$$

모델의 적합성은 자료분석의 구성요소 중 필수적인 부분이다. 전체 모델의 적합성을 파악하기 위해서 분산분석을 수행하여 Table 3에 나타내었다.

P value는 각 계수의 중요성을 확인하는 도구로 사용되며, P value 값이 0.05보다 작으면 모델이 유의미하다는 것을 의미한다. Table 3에서 보듯이 P value가 0으로 나타났으므로 모

**Table 2.** Experimental design of Box-Behnken design

Experimental Runs	Code levels			Yield of flocculation (%)	
	X1	X2	X3	Actual values	Predicted values
1	0	1	1	85.64	83.72
2	-1	-1	0	91.6	90.2025
3	0	0	0	92.16	95.30667
4	0	-1	1	98.22	99.495
5	-1	1	0	79.04	80.8375
6	1	-1	0	41.56	39.7625
7	1	0	-1	27.52	27.3975
8	-1	0	-1	88.88	88.3575
9	1	1	0	88.6	89.9975
10	-1	0	1	75.2	75.3225
11	0	0	0	96.72	95.30667
12	0	-1	-1	34.08	36
13	0	1	-1	93.92	92.645
14	1	0	1	94.48	95.0025
15	0	0	0	97.04	95.30667

**Table 3.** Analysis of variance of the experimental results of the BBD

	DF	Seq Sum of squares	Adj Sum of squares	Adj Mean square	F value	P value
Regression	9	8084.61	8084.61	898.29	123.15	0.000
Linear	3	3176.14	3176.14	1058.71	145.14	0.000
X <sub>1</sub>	1	852.02	852.02	852.02	116.81	0.000
X <sub>2</sub>	1	835.18	835.18	835.18	114.50	0.000
X <sub>3</sub>	1	1488.94	1488.94	1488.94	204.12	0.000
Square	3	1083.56	1083.56	361.19	49.52	0.000
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	1	540.93	650.76	650.76	89.21	0.000
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	1	134.71	172.28	172.28	23.62	0.005
X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>	1	407.92	407.92	407.92	55.92	0.001
Interaction	3	3824.91	3824.91	1274.97	174.79	0.000
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	1	888.04	888.04	888.04	121.74	0.000
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	1	1625.70	1625.70	1625.70	222.87	0.000
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	1	1311.16	1311.16	1311.16	179.75	0.000
Residual error	5	36.47	36.47	7.29		
Lack-of-fit	3	21.57	21.57	7.19	0.96	0.545
Pure error	2	14.90	14.90	7.45		
Total	14	8121.08				

**Table 4.** Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model of flocculation

Item	S	Press	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	R <sup>2</sup> <sub>Pred</sub>
Value	2.70080	378.622	99.55	98.74	95.34

델의 F-value에 noise가 생길 확률이 거의 없다는 의미이고, 이 모델은 높은 유의성을 가진다는 것을 나타낸다. 적합성 결여의 P value가 0.05보다 작은 값을 보이면 예측한 모델에 문제가 있다는 것이며, 0.05보다 큰 값을 가지면 모델이 적절하다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 구한 적합성 결여의 P value는 0.545로 나타났고 이는 얻어진 모델이 적절하다는 것을 의미한다. 독립 변수들 또한 모델에 있어 매우 큰 영향력을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

결정계수 ( $R^2=99.55$ ), 결정계수조정 ( $R^2_{Adj}=98.74$ )는 Table 4에 나타내었다. 이 값들은 다항식 모델의 일반적인 유효성 및 정확성을 암시하고 모델의 적합성을 판단하는데 기여한다.

### 3.2. RSM을 이용한 응집반응의 최적화

이 반응표면곡선은 최적응답을 위한 각각의 변수의 최적 양을 결정하고 각 변수의 상호작용을 조사하여 그린다. 각 변수의 최적 값은 회귀방정식을 통해 얻어지게 되고, 회귀방정식은 Minitab 소프트웨어를 사용하여 풀었다. 3차원 반응 표면과 2차원 등고선 평면도는 Fig. 1~3처럼 회귀방정식의 그래픽 표현으로 제공되고 각각의 등고선 곡선은 세 가지의 독립 변수 중 한 가지는 0에 고정시키고 나머지 두 변수 조합의 무한 값을 나타낸다. Fig. 1(a)와 (b)는 cell mass를 코드화된 레벨 0으로 고정시킨 상황에서 응집체의 농도와 반응 pH 이 둘의 상호작용에 관한 효과를 볼 수 있다. 반응 시 첨가된 응집

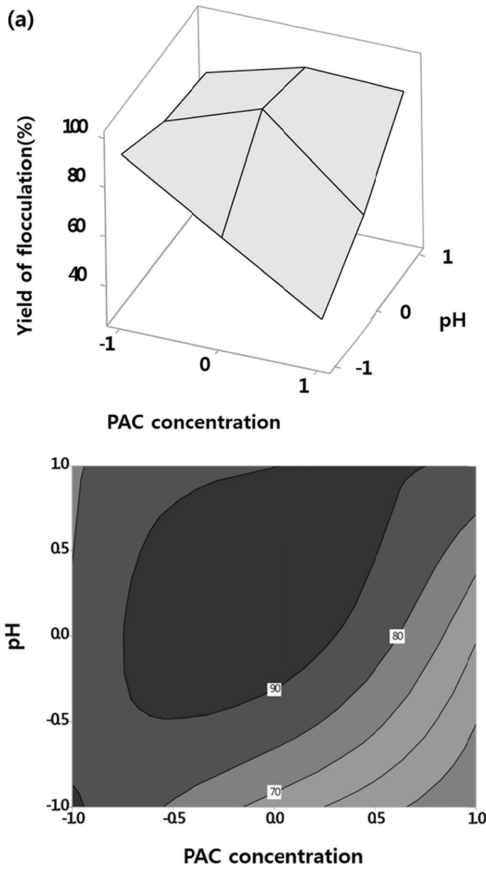


Fig. 1. Effect of PAC concentration, pH and their reciprocal interaction on yield of flocculation (a. 3D response surface; b. 2D contour plots).

제의 농도가 낮아질수록, 반응 pH가 높아질수록 응집효율이 증가하였다. Fig. 2(a)와 (b)는 반응 pH가 코드화된 레벨 0으로 고정시킨 상황에서 응집제의 농도와 cell mass 이 둘의 상호작용에 관해 그래프로 나타내었다. 응집제의 농도가 0.5 레벨에서 cell mass가 증가함에 따라 응집효율이 증가하였다. Fig. 3(a)와 (b)는 응집제의 농도를 코드화된 레벨 0으로 고정시킨 상황에서 반응 pH와 cell mass의 상호관계를 나타낸다. 반응 pH와 cell mass가 둘 다 증가함에 따라 응집효율이 증가함을 나타내었다.

RSM분석을 통해 찾아낸 응집반응 최적 조건은  $X_1$ 이 0 레벨 즉 5 ppm,  $X_2$ 는 0 레벨 즉 pH 7.5,  $X_3$ 은 0.345 레벨 즉 cell mass 0.33 OD<sub>640</sub>이고 이때 예측되는 응집효율은 99%이다.

### 3.3. RSM 모델의 유효성 검사

위 RSM 모델에서 예측을 확인하기 위해 세 독립 변수가 적용된 최적 응집반응 조건으로 반복하여 실험하였다. 그 결과 응집효율은 97.6%가 나왔고 이는 RSM 모델식 에서 예측한 응집효율이 실제 응집효율의 오차범위 내에 포함되므로 이 모델이 응집효율의 최적화를 결정하는데 적절한 방법임을 나타내었다.

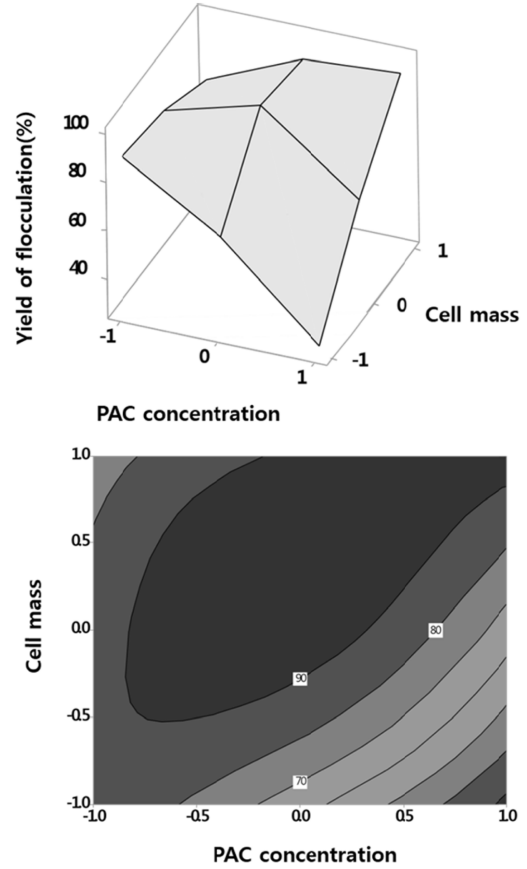


Fig. 2. Effect of PAC concentration, cell mass and their reciprocal interaction on yield of flocculation (a. 3D response surface; b. 2D contour plots).

## 4. CONCLUSION

RSM의 BBD방법을 이용하여 조류의 최적 응집효율을 찾는 것은 유용한 실험계획법이다. 그 이유로 결정계수 즉 R<sup>2</sup>값이 99.55%이고 0의 확률 값 Pvalue는 본 회귀모델이 높은 중요성을 가지고 있다는 것을 보이고 있다. 본 모델 식을 이용하여 고분자 응집제인 polyaluminum chloride를 이용한 조류의 최적 응집조건은 응집제의 농도는 5 ppm, 반응 pH는 7.5 그리고 세포의 농도는 0.33 OD<sub>640</sub>이었다. 이 조건에서 예측된 99% 응집효율과 유사한 수치인 97.6%의 결과를 얻어냈다. 따라서 본 연구에서는 최적화된 조류의 응집효율을 예측하기 위하여 RSM을 이용한 실험방법이 적합함을 알 수 있다.

### Acknowledgements

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트와 2013년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

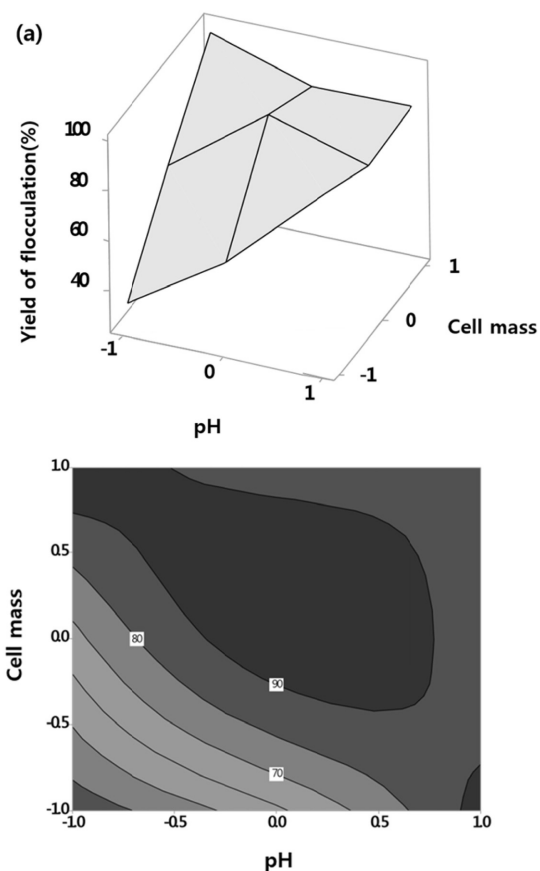


Fig. 3. Effect of cell mass, pH and their reciprocal interaction on yield of flocculation (a. 3D response surface; b. 2D contour plots).

## REFERENCES

- Lund, H. (2007). Renewable energy strategies for sustainable development. *Energy* 32: 912-919.
- Harun, R., M. Davidson, M. Doyle, R. Gopiraj, M. Danquah, and G. Forde (2011). Technoeconomic analysis of an integrated microalgal photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy* 35: 741-747.
- Junginger, M., T. Bolkesj , D. Bradley, P. Dolzan, A. Faaij, J. Heinimo, and M. D. Wit (2008). Developments in international bioenergy trade. *Biomass and Bioenergy* 32: 717-729.
- Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and N. Dubois-Calero (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24: 815-820.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Dismukes, G. C., D. Carrieri, N. Bennette, G. M. Ananyev, and M. C. Posewitz (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235-240.
- Lee, A. K., D. M. Lewis, and P. J. Ashman (2009). Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Psychol.* 21: 559-567.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, N. A. Kumar, S. Sridhar, and R. Rengasamy (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34: 77-88.
- Radakovits, R., R. E. Jinkerson, A. Darzins, and M. C. Posewitz (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell* 9: 486-501.
- Yoon, M., J. I. Choi, G. H. Kim, D. H. Kim, and D. H. Park (2013). Proteomic analysis of *Spirogyra varians* mutant with high starch content and growth rate induced by gamma irradiation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36: 765-774.
- Sukenik, A., D. Bilanovic, and G. Shelef (1988). Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. *Biomass* 15: 187-199.
- Uduman, N., Y. Qi, M. K. Danquah, G. M. Forde, and A. Hoadley (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 2: 012701.
- Kwon, D. Y., C. K. Jung, K. B. Park, C. G. Lee, and J. W. Lee (2011). Flocculation characteristics of microalgae using chemical flocculants. *KSBB J.* 26: 143-150.
- Brennan, L. and P. Owende (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 14: 557-577.
- Hossain, A. S., A. Salleh, A. N. Boyce, and M. Naquiuddin (2008). Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4: 250.
- Szklou, A. and R. Schaeffer (2006). Alternative energy sources or integrated alternative energy systems? Oil as a modern lance of Peleus for the energy transition. *Energy* 31: 2513-2522.
- Somasundaran, P. (2006). *Encyclopedia of surface and colloid science*. 2nd ed., pp. 2588-2591. CRC Press, Taylor & Francis Group, NY, USA.
- Yoon, M., M. K. Kim, and G. H. Kim (2009) Conjugation process in *Spirogyra varians* monitored with FITC-lectins (Zygnemataceae, Chlorophyta). *Algae* 24: 39-45.
- Zheng, H., Z. Gao, J. Yin, X. Tang, X. Ji, and H. Huang (2012). Harvesting of microalgae by flocculation with poly ( $\gamma$ -glutamic acid). *Bioresour. Technol.* 112: 212-220.
- Shen, Y., Y. Cui, and W. Yuan (2013). Flocculation optimization of microalga *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 2049-2063.
- Sanyano, N., P. Chetpattananondh, and S. Chongkhong (2013). Coagulation-flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 147: 471-476.
- Kiran, B., A. Kaushik, and C. P. Kaushik (2007). Response surface methodological approach for optimizing removal of Cr (VI) from aqueous solution using immobilized cyanobacterium. *Chem. Eng. J.* 126: 147-153.
- Huang, J., Z. H. Yang, G. M. Zeng, M. Ruan, H. Y. Xu, W. C. Gao, and H. M. Xie (2012). Influence of composite flocculant of PAC and MBFGA1 on residual aluminum species distribution. *Chem. Eng. J.* 191: 269-277.
- Bradley, R. L. (1998). Renewable energy: Not cheap, not green? *Strategic Planning for Energy and the Environment* 17: 15-21.