

폴리비닐클로라이드 해양광생물반응기와 고밀도 폴리에틸렌 해양광생물반응기에서 미세조류, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP의 생산성 비교

Comparison of Biomass Productivity of the Microalgae, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, in Polyvinyl Chloride Marine Photobioreactor and High Density Polyethylene Marine Photobioreactor

정성균[†], 김수권[†], 변문섭, 조용희, 신동우, 김지훈, 임상민, 이철균*

Seung-Gyun Jung[†], Su-Kwon Kim[†], Moon-Sup Bun, Yonghee Cho, Dong-Woo Shin, Z-Hun Kim, Sang-Min Lim, Choul-Gyun Lee*

인하대학교 생물공학과, 인천광역시 남구 인화로 100, 22212, 대한민국

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon-si 22212, Republic of Korea

[†] Both authors contributed equally to this work

(Received 11 May 2016, Revised 17 June 2016, Accepted 17 June 2016)

Abstract It is important to design photobioreactor by cheap material for economical microalgal biomass production. In this study, two types of marine photobioreactors (MPBR), made by either polyvinyl chloride (MPBR-PVC) or high density poly ethylene (MPBR-HDPE), are used and performance of these were compared. *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP is a green marine alga that isolated from Ganghwa Island, Korea, and the strain was used for marine cultivations using MPBR-PVC and MPBR-HDPE. The cultivations were performed three times in the spring season of 2012 using MPBR-PVC and of 2013 using MPBR-HDPE in the coastal area of Young Heung Island. As the results, MPBR-PVC shows higher biomass productivities than MPBR-HDPE, due to its high light transmittance. In the cultivations using MPBR-PVC, the average sea water temperature was 11.5°C during the first experiment and 16.5°C during the second and third experiments. Average light intensities during three times for experiments were 407.5, 268.1 and 273.0 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively. The maximum fresh cell weight and average biomass productivity were 1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0.12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. These results showed that *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP were adapted well with the environmental conditions from ocean, and grow in the MPBR-PVC and MPBR-HDPE.

Keywords : biomass, microalgae, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, photobioreactor, marine cultivation

서 론

화석연료의 고갈로 인해 대체할 수 있는 신재생

에너지원이 필요한 실정이다. 이 중 바이오디젤은 기존 경유 유래의 인프라를 그대로 이용하면서 경유를 대체할 수 있다 [1]. 미세조류는 성장속도가 빠르

* 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/by-nc/4.0/>)

며, 높은 지질함량을 지녀 바이오디젤 생산을 위한 바이오매스로 최근 각광을 받고 있다 [8, 11]. 현재, 미세조류는 다양한 방법으로 대량배양이 되고 있으나 대부분이 육상의 레이스웨이 폰드를 이용하여 이루어져 오고 있다 [9]. 수송용 연료의 대체를 위한 바이오매스 생산을 위해서는 상당히 넓은 배양 면적이 필요하며, 비례적으로 설치 및 운영비는 기하급수적으로 증가하게 된다 [2, 3]. 이는 경제적인 연료의 공급에 있어서 제한조건으로 자리매김하고 있어, 화석연료 대체 수송용 연료 생산을 위한 바이오매스의 생산은 이러한 단점들을 해결하기 위한 노력이 필요하다 [10]. 한국은 산지가 국토의 약 80%를 차지하고 있어 경제적인 가용면적이 제한적이지만, 삼면이 바다로 둘러 싸여 있어서 바이오연료 생산용 미세조류의 배양을 위해 충분한 면적을 해양으로부터 확보가 가능하다 [5]. 본 연구에서는 해양에서의 미세조류 바이오매스 생산을 위해 경제성 있는 플라스틱 광생물반응기를 해수에 부유시켜 미세조류를 배양하여 해양배양의 가능성을 확인하고자 한다 [12, 13].

재료 및 방법

사용균주 및 균주 유지방법

본 연구센터가 대한민국, 강화도 연안에서 분리한 미세조류 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP를 인공해수 (MBL)를 이용하여 배양하였다. 이 균주는 차가운 바닷가에서 생육이 우수하며, 지질 생산성이 우수한 균주이다 [6]. 인공해수는 증류수에 NaCl (99.5%, S7653, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) 30 g/L, 0.66 g/L KCl (99%, P9333, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 8.48 g/L MgCl₂·6H₂O (99%, M2670, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 1.9 g/L CaCl₂·2H₂O (99%, C5080, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 6.318 g/L MgSO₄·7H₂O (99.5%, 63138, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 0.18 g/L NaHCO₃ (99.5%, S6297, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)를 첨가하여 제조하였다. 인공해수에 미세조류가 성장하기 위한 영양분으로 f/2-Si 배지를 추가적으로 공급하였다. 그 조성은 75 mg/L NaNO₃ (99%, S5022, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 5 mg/L NaH₂PO₄·H₂O (99%, 71505, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 3.15 mg/L FeCl₃·6H₂O (98%, F2877, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A),

4.36 mg/L Na₂EDTA·2H₂O (98.5%, E1644, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 0.180 mg/L MnCl₂·4H₂O (99%, M3634, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 0.022 mg/L ZnSO₄·7H₂O (99%, Z4750, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 0.01 mg/L CoCl₂·6H₂O (98%, 255599, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A), 0.01 mg/L CuSO₄·5H₂O (98%, C3036, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A) and 0.006 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O (99.5%, M1651, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A)이다. 본 배양을 위한 균주 유지는 100 L flat-plate photobioreactor를 이용하여 광도 100 μE/m²/s, 2% CO₂ 0.1 vvm 폭기로 이루어졌다.

젖은세포 중량 및 질소원 분석

바이오매스 분석을 위해 젖은세포 중량을 세포 사이즈와 세포 농도를 확인하여 간접적으로 측정하였다. 세포 사이즈와 농도는 미세조류 배양액 샘플을 electrolyte solution, Isoton[®] II에 희석하여 Coulter Counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A)를 통해 확인하였다. 질소원은 UV-Vis spectrophotometer (UV-1750, Shimadzu, Kyoto, Japan)에 의해 측정되었다. 배양액을 3,000 RPM에서 10 분 동안 원심분리법에 의해 세포와 분리하였고, 1 N 염산과 상층액을 혼합하여 표준분석법을 이용하여 분석하였다 [5].

광량 및 온도

LI-COR Quantum Sensor (LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 이용하여 해양배양 현장(Young Heung Island, Incheon, Korea)의 Photosynthetically Active Radiation (PAR, wavelength 400-700 nm) 범위의 광도를 측정되었다. 대한민국 기상청으로부터 해양기상관측 부이(Duck Juk Island, Incheon, Korea)의 시간별 기온 및 수온 데이터를 얻었다.

자연해수의 미세조류 배양가능성 확인

자연해수의 미세조류 배양의 가능성을 확인하기 위해 기존의 배지 (MBL, 인공해수)와 자연해수를 이용하여 미세조류 성장을 확인하였다. 250 mL Erlenmeyer flask에 100 mL의 배지를 이용하였고, 미세조류농도 0.1 g/L를 접종하였다. 배양 시 온도 18°C, 광도 100 μE/m²/s, 150 rpm의 혼합조건을 구성하였다.

공기순환과 L/D cycle의 미세조류 성장에 대한 영향 확인

공기순환이 가능한 스펀지 마개와 공기순환이 불가능한 유리 테이프를 이용하여 플라스크를 통해 미세조류배양을 실시하였다. 미세조류 성장을 위해 탄소원 1.72 g/L NaHCO₃, 3 배의 f/2 배지를 접종하였다. 미세조류 접종농도는 0.1 g/L이며, 온도 18°C, 광도 100 µE/m²/s, 150 rpm의 혼합조건을 구성하였고, L/D cycle의 비율은 12:12였다 [7].

해양배양용 광생물반응기의 제작

두 가지 재질(PVC, HDPE)을 이용하여 두 종류의 해양배양용 광생물 반응기(MPBR-PVC, MPBR-HDPE)가 제작되었다. MPBR-PVC는 가로 50 cm, 세로 150 cm 크기로 제작되었고, 안쪽에 16 cm마다 구획을 나누어 혼합이 원활하게 하였다. 접종 및 회수를 위해 4개의 구멍이 있으며, 고무 마개를 통해 닫을 수 있도록 제작되어, 공기의 순환이 없는 구조이다. MPBR-HDPE는 50 cm의 정육각 구조로 제작되었다. 시료 채취를 위한 polycarbonate cap을 통해 공기순환이 가능하도록 하였다. 광 투과율은 HDPE와 PVC에서 각각 50%와 75%이다.

해양광생물반응기를 이용한 미세조류 배양

해양반응기를 이용하여 대한민국 인천광역시 영흥도 (37.23°N, 126.43°E)에서 미세조류 배양을 실시하였다. 미세조류 배양을 위해 기본배지로 해수를 이용하였고, 영양분으로 4 g/L NaHCO₃와 3 배의 f/2 배지를 접종하였다. 이용된 미세조류 접종농도는 0.1 g/L 이다.

결 과

자연해수의 미세조류 배지활용 평가

Figure 1은 각각의 자연해수 및 인공해수를 이용하여 미세조류를 배양할 때의 미세조류 성장을 보여준다. 배양 기간 동안 미세조류의 성장 및 질소 소비는 비슷한 경향을 보여주었으며, 최대 미세조류 젖은세포농도는 인공해수를 이용하였을 경우 1.15 g/L, 자연해수를 이용하였을 경우 1.10 g/L로, 자연해수를 이용하여 인공해수를 이용할 때 대비 95.7%의 효율을 보여주었다. 이 결과를 통해, 영흥도 현지의 해수

가 해양미세조류 *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP의 배양에 적절함을 알 수 있었다.

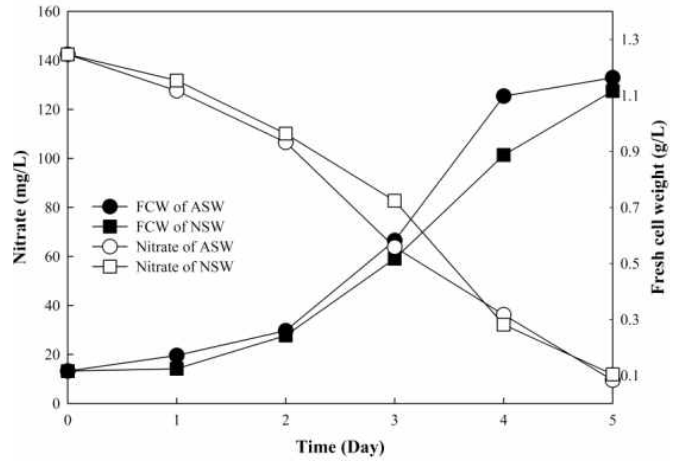


Figure 1. Microalgal growth and nitrate consumption of *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP in natural sea water (NSW) and artificial sea water (ASW) media.

L/D cycle 상에서 공기 순환에 따른 미세조류 성장

Figure 2는 flask 배양기에서 공기순환이 막힌 상태와 공기가 통하는 상태의 미세조류 성장을 보여준다. 공기순환이 있는 상황에서는 L/D cycle (12:12) 조건에서 최대 젖은세포농도 1.35 g/L, 공기순환이 막힌 상태에서는 최대 젖은세포농도 0.78 g/L가 달성되었다. 공기순환이 막힌 상태에서는 공기순환이 있는 상태에서보다 57.8%의 바이오매스 달성이 가능하였다. 결과를 통해 공기순환이 막혀있었던 미세조류 해양배양용 광

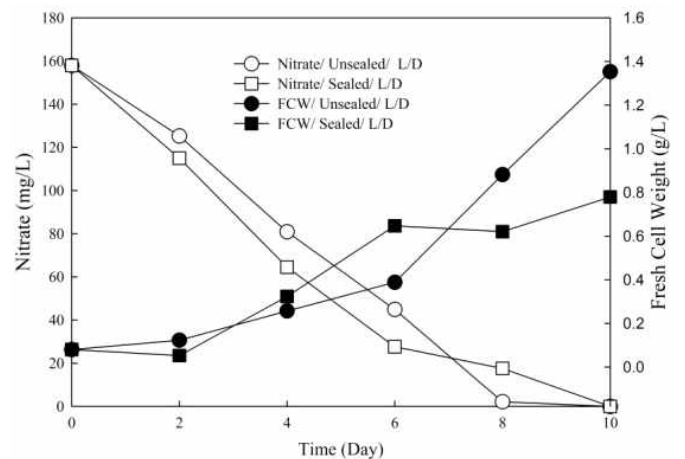


Figure 2. The growth of *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP under closed culture system and open culture system with L/D cycle (12:12) condition, simultaneously.

생물반응기 (MPBR-PVC, Figure 3)를 공기순환이 가능한 광생물반응기 (MPBR- HDPE, Figure 4)로 개선하였다.

해양광생물반응기를 이용한 미세조류의 배양

제작된 미세조류 해양배양용 광생물 반응기 (MPBR-PVC와 MPBR-HDPE)는 다음과 같다 (Figure 3, 4).

Table 1은 미세조류 성장에 영향이 있는 요인들에 대한 주변 환경 조건이다. 배양 기간 동안의 온도와 광도는 MPBR-PVC batch 1번과 MPBR-HDPE batch 2번이 비슷하였

다. 하지만, MPBR-HDPE에서 최대 바이오매스 농도 및 성장 속도는 MPBR-PVC에서 보다 낮음을 볼 수 있다 (Figure 5). MPBR-HDPE에서 낮은 성장속도는 재질에 따른 빛 투과성이 다르기 때문인데, HDPE는 약 50%의 낮은 빛 투과성을 지녀, 미세조류가 성장하기에 충분한 광 조건이 형성되지 않았다. Table 2에서 MPBR-PVC의 최대 바이오매스 농도가 1.2 g/L임을 알 수 있다. 이 수치는 공기순환이 막혀있는 플라스크에서의 미세조류 성장이 0.8 g/L인 것에 비해 약간 높은 값이다. MPBR-HDPE에서는 공기순환이 있는 플라스크에서의 미세조류 최대 바이오매스 농도의 85%가 달성되었다.

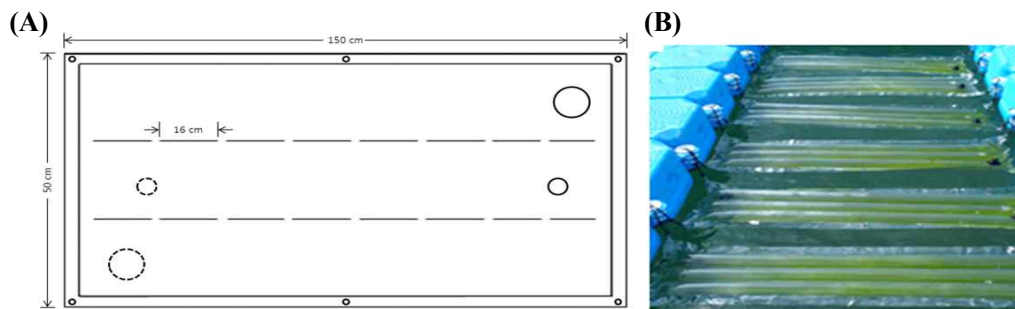


Figure 3. Shape of MPBR-PVC. (A) schematic diagram; (B) MPBR-PVC in local marine culture.



Figure 4. Shape of MPBR-HDPE. (A) schematic diagram; (B) MPBR-HDPE in local marine culture.

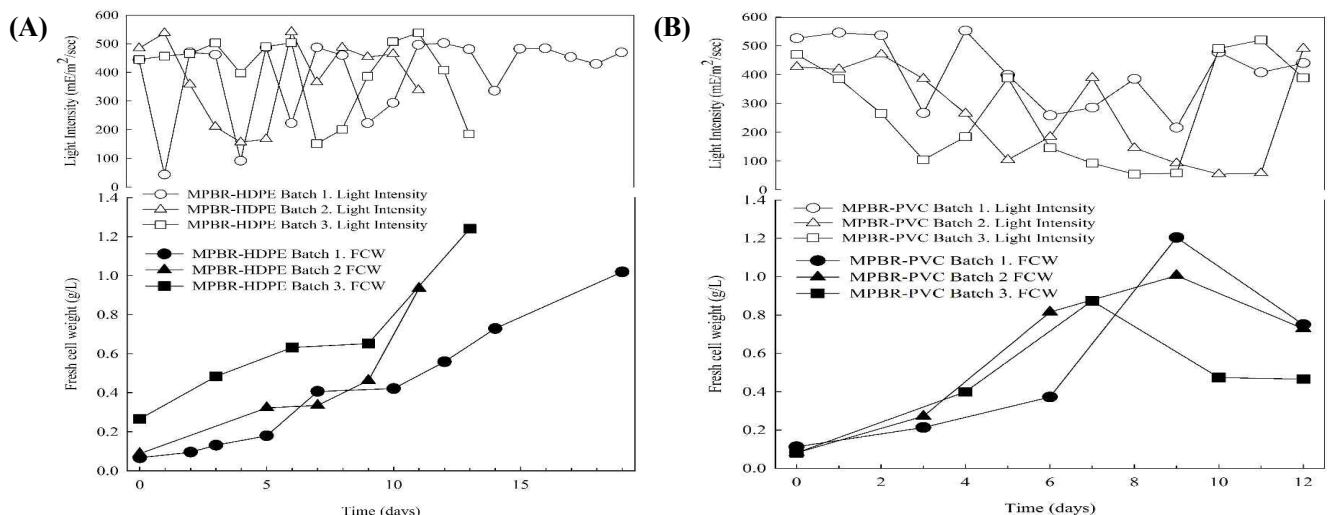


Figure 5. Local natural environmental conditions and growth rate of *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP in Young Heung Island. (A) MPBR-PVC (B) MPBR-HDPE.

Table 1. Summary of local marine culture of *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP using MPBR-PVC and MPBR-HDPE

Photobioreactor Batch No.	MPBR-PVC			MPBR-HDPE		
	1	2	3	1	2	3
Maximum cell concentration (10 ⁶ cells/ml)	2.49	1.45	1.43	1.51	1.41	2.81
Maximum fresh cell weight (g/L)	1.2	1.0	0.9	1.0	0.9	1.2
Average growth rate to maximum fresh cell weight (g/L/day)	0.12	0.10	0.11	0.06	0.08	0.08
Mean sea water temperature (°C)	11.5	16.3	16.5	7.1	10.3	13.2
Mean sunlight intensity (μE/m ² /s)	408	268	273	782	380	805
Time to reach maximum biomass concentration (day)	9	9	7	19	11	13

Table 2. Comparison of biomass production yield between in laboratory and on the ocean

PBR	Flask						MPBR	
	Unclosed			Closed			PVC	HDPE
	None	L/D	L/D	None	L/D	L/D	Closed	Unclosed
Maximum Biomass concentration (g/L)	1.8		1.4	1.2		0.8	1.2	1.2
Biomass productivity (g/L/day)	0.17		0.13	0.11		0.07	0.12	0.11

고찰

이번 실험에서, 2가지 미세조류 해양배양용 광생물반응기(MPBR-PVC, MPBR-HDPE)를 설계하여, 해양배양에 적합한지를 알아보았다. 해양배양을 시작하기에 앞서, 실험실 내에서 플라스크를 이용하여 해양배양과 비슷한 환경을 조성하여 미세조류 성장을 알아보았다. 자연해수를 기본으로 이용하여 MPBR-PVC, MPBR-HDPE에서 플라스크와 인공해수(MBL)를 이용한 실험에 비해 각 100%, 85%의 최대 바이오매스 농도가 달성되었다. 이 결과를 통해, 자연해수가 미세조류 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP 배양을 위한 기본 배지로 이용되기에 적절함을 알 수 있다. 그리고 광도의 미세조류 성장에 대한 영향을 알아보려고 하였다. MPBR-PVC를 이용한 배양 시, 광도 100 μE/m²/S 이하에서 미세조류 생산성 0.1127 g/L/day, 광도 100 μE/m²/S 이상에서 0.1266 g/L/d가 달성되었다. MPBR-HDPE를 이용한 배양 시, 광도 200 μE/m²/S 이하에서 미세조류 생산성 0.0562 g/L/d, 광도 200 μE/m²/S 이상에서 미세조류 생산성 0.0495 g/L/d가 달성되었다. 하지만, MPBR-HDPE의 투과도는 50%

로, 약 100 μE/m²/S의 광도가 PBR 안쪽으로 투과되었을 것으로 예상 된다. 따라서 이 결과를 통해 미세조류 성장에 적합한 광도는 100 μE/m²/S 이상임을 알 수 있었다. MPBR-PVC에서는 공기흐름이 없지만 빛 투과율이 높았고, MPBR-HDPE에서는 공기흐름이 있으나 빛 투과율이 낮았다. PVC 재질을 이용해 통기성을 갖춘 구조를 해양에서 만들 수가 없어, 단단한 HDPE를 이용하여 통기성을 갖춘 구조의 PBR을 제작하였고, HDPE를 투명하게 만들 수 없어 빛 투과율이 낮을 수밖에 없었다. 낮은 빛 투과율로 인해 MPBR-HDPE에서 플라스크와 인공해수를 이용한 실험 대비 낮은 바이오매스 농도가 달성되었을 것이다. 또한, 해수온도의 미세조류 성장에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 평균 해수온도 11.5°C일 경우 MPBR-PVC에서 9일에 걸쳐 최대 바이오매스 농도가 달성되었으며, 평균 해수온도 16.5°C일 경우 7일에 걸쳐 최대 바이오매스 농도가 달성되었다. MPBR-HDPE를 이용한 배양에서는 평균 해수온도 7.1°C에서 최대 바이오매스 농도 도달 시까지 19일이 걸렸으며, 평균 해수온도 13.2°C에서 13일이 걸렸다. 이 결과를 통해, 해수온도가 낮을수록 최대 바이오매스 농도 도달 시간이 길어짐을 알 수 있었다.

결 론

두 종류의 해양반응기를 이용하여 미세조류, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP를 배양하였다. 미세조류의 해양배양 결과는 태양광에 의한 광원의 공급과 파도에 의한 혼합 효과, 그리고 해수의 높은 비열에 의한 배양 온도의 유지와 같은 장점에 의해 육상에서의 바이오에너지 생산을 위한 미세조류의 대량 배양 방법을 대체할 수 있는 충분한 가능성을 보여주고 있다. 이번 실험에서는 통기성을 갖춘 구조를 단단한 HDPE를 통해 제작하여 빛 투과율이 낮아져 공기 순환에 대한 미세조류 성장을 해양배양에서 정확히 비교할 수 없었다. 하지만, 본 연구결과로부터 광 투과성이 높을수록 미세조류 생산성이 높은 경향을 확인하였고, 해양에서 미세조류 바이오매스 생산을 위한 해양반응기의 재질 선택 시 광 투과성을 고려해야 함을 확인할 수 있었다. 차후 공기 순환이 가능하고 빛 투과도 또한 높은 진보된 배양기를 제작하여 공기 순환이 미세조류 성장에 미치는 영향을 확인할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 정부 (해양수산부)의 ‘해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술개발’ 연구의 지원을 받아 수행하였습니다.

References

1. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294-306.
2. Choi, B. R. and T. Y. Lee. 2012. Cultivation of *Chlorella* sp. under Different Aeration Conditions Illuminated by Light Emitting Diode. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.* **27**, 263-267.
3. Davis, R., A. Aden and P. T. Pienkos. 2011. Technoeconomic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Appl. Energy.* **88**, 3524-3531.
4. Hioki, A. and J. W. McLaren. 2008. Direct Determination Method of Nitrate Ions in Seawater by UV-Detection

- Ion-Chromatography with Hydrochloric Acid/Sodium Chloride Eluent. *Adv. Ind. Sci. Technol. Bul. Metrol.* **7**, 51-59.
5. Lee, C-G. 1999. Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**, 78-81.
6. Lee, C-G., D. H. Seong, 2014. A novel *Tetraselmis* sp. and method for preparing biodiesel with this strain. Korean Patent 10-2014-0019616.
7. Lee, K. and C-G. Lee. 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 194-199.
8. Lee, S-J., S. Go, G-T. Jeong and S-K. Kim. 2011. Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 561-566.
9. Richardson, J. W., M. D. Johnson and J. L. Outlaw. 2012. Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Res.* **1**, 93-100.
10. Rodolfi, L., G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini and M. R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100-112.
11. Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Biosci. Bioeng.* **101**, 87-96.
12. Suh, I. S. and C-G. Lee. 2003. Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**, 313-321.
13. Ugwu, C. U., H. Aoyagi and H. Uchiyama. 2008. Photobioreactor for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* **99**, 4021-4028.