



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018년 2월
석사학위논문

해양심층수기반 배지를 이용한
Spirulina platensis 성장과 경제성
분석

조선대학교 대학원

에너지자원공학과

임 대학

해양심층수기반 배지를 이용한
Spirulina platensis 성장과 경제성
분석

The growth and economic analysis of *Spirulina platensis*
using medium based on deep sea water

2018 년 2 월 23 일

조선대학교 대학원
에너지자원공학과
임 대학

해양심층수기반 배지를 이용한
Spirulina platensis 성장과 경제성
분석

지도교수 박 천 영

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함.

2017 년 10 월

조선대학교 대학원
에너지자원공학과
임 대 학

임대학의 석사학위 논문을 인준함.

위원장	조선대학교	교수	박철현	 (인)
위원	조선대학교	교수	고진석	 (인)
위원	조선대학교	교수	박천영	 (인)

2017 년 11 월

조선대학교 대학원

목 차

1. 서론	1
가. 연구배경 및 필요성	1
2. 실험재료 및 방법	6
가. 균주 및 배양조건	6
나. 해양심층수	8
다. 성장실험 및 분석방법	10
1) <i>Spirulina platensis</i> 성장실험 및 분석방법	10
가) 배양배지의 영향인자에 따른 성장특성	10
나) 해양심층수 기반 배양배지의 성장특성	12
다) 균체량 및 영양염류 분석	13
2) 생물동역학적 인자	15
가) 최대 비성장률	15
나) 배가시간	15
다) 비산출율	15
3. 결과 및 고찰	16
가. <i>S. platensis</i> 성장특성	16
1) <i>S. platensis</i> 배양	16
2) 배양배지의 영향인자	18
가) 해양심층수를 이용한 성장특성	18
나) N, P, K 혼합비율에 따른 성장특성	20

3) 배양배지의 혼합에 따른 최적 영양인자	22
가) 해양심층수기반 SP medium 혼합의 성장특성	22
나) 해양심층수기반 저비용배지 혼합의 성장특성	24
나. 생물동역학적 인자	28
1) 성장특성에 따른 최대 비성장률 및 배가시간	28
2) 성장특성에 따른 비산출율	30
다. 경제성 분석	31
4. 결론	35
5. 참고문헌	37

List of Tables

Table 1. Chemical composition of SP medium for <i>S. platensis</i>	7
Table 2. Physico-chemical characteristics of deep sea water in this study. ..	9
Table 3. Chemical compositions various type of low cost medium.	11
Table 4. Composition ratios under various medium conditions.	12
Table 5. A comparison of chemical compositions in SP medium and deep sea water.	19
Table 6. Chemical concentrations for SP medium and low cost medium.	21
Table 7. Concentrations variation for elements in the growth medium under variously mixed medium conditions of SP medium based on deep sea water.	22
Table 8. Concentrations variation for elements in the growth medium under variously mixed medium conditions of low cost medium based on deep sea water.	24
Table 9. Bio-kinetics factor for <i>S. platensis</i> under variously mixed medium conditions based on deep sea water.	29
Table 10. Yields for <i>S. platensis</i> under variously mixed medium conditions based on deep sea water.	30
Table 11. The summary of <i>S. platensis</i> production cost using various low cost medium.	31
Table 12. The summary of making cost for <i>S. platensis</i> medium (1L).	32
Table 13. The summary for <i>S. platensis</i> production cost using variously mixed medium conditions of medium based on deep sea water. ..	33

List of Figures

Fig. 1 The equipments of the <i>S. platensis</i> cultivation.	6
Fig. 2 Sampling sites of deep sea water.	8
Fig. 3 The calibration curve with correlation coefficient as a function of optical density and Dry cell weight.	13
Fig. 4 Growth curve of <i>S. platensis</i> using the SP medium.	16
Fig. 5 Distribution of production per day with dry cell weight.	17
Fig. 6 Growth curves of <i>S. platensis</i> under various deep see water.	18
Fig. 7 Growth curves of <i>S. platensis</i> under various low cost medium.	20
Fig. 8 Growth curves for <i>S. platensis</i> under variously mixed medium conditions of SP medium based on deep sea water.	23
Fig. 9 Growth curves for <i>S. platensis</i> under variously mixed medium conditions of low cost medium based on deep sea water.	25
Fig. 10 Microphotograph of <i>S. platensis</i> in the growth medium at 22 days after culture.	26
Fig. 11 SEM images(a and b) and EDS analysis of <i>S. platensis</i> in the growth medium at 22 days.	27

Abstract

The growth and economic analysis of *Spirulina platensis* using medium based on deep sea water

Lim, Dae Hack

Advisor : Prof. Park, Cheon-Young

Dept. of Energy & Resource Engineering

Graduate School, Chosun University

Deep sea water is psychrophilic and clean and has abundant marine resources containing significant nutrients as calcium and magnesium due to low temperature and density. Thanks to these advantages, deep sea water has been commercialized in various fields such as development of marine products and healthy food. However, among these advantages, deep sea water significantly retaining inorganic nutrients was successfully used to cultivate microalgae, the technical development of a culture system is insignificant.

In particular, economical efficiency of deep sea water-based preparation media is insignificant and technical skills to secure optimal growth characteristics of deep sea water-based microalgae have not been fully developed.

Accordingly, this study is to prepare a SP medium and a low-cost medium using deep sea water and cultivate *S. platensis* using these media.

Based on the results of the growth experiment of the microalgae, this study is to investigate the maximum specific growth rate, doubling time, yield and economical efficiency according to production.

When the SP medium was mixed with deep sea water in diverse compositions to grow *S. platensis*, its maximum growth rate was found in the mixing ratio of 50:50. In these conditions, its maximum specific growth rate was 0.094 1/day, its double time was 3.058 day, and the yields of N, P K was 0.160, 0.081, and 0.131, respectively.

When the low cost medium was mixed with deep sea water in diverse compositions to grow *S. platensis*, its maximum growth rate was found in the mixing ratio of 75:25. In these conditions, its maximum specific growth rate was 0.099 1/day, its double time was 3.007 day, and the yields of N, P K were 0.170, 0.029, and 0.033, respectively.

This study mixed the SP medium with the low cost medium in diverse mixing proportions to grow *S. platensis*. When deep sea water was mixed with the Sp-medium at the ratio of 50:50(W/W), the maximum dry cell weight obtained was 1.16 g/L and its production cost was 142.62 KRW/g. When deep sea water was mixed with the low cost medium at the ratio of 25:75, the maximum dry cell weight was 0.88 g/L and the production cost was 8.17 KRW/g.

When deep sea water-based low cost medium was used to grow *S. platensis*, the economical efficiency was significant because of low production cost. It is judged that the low-cost medium and the SP medium were very eco-friendly as clean deep sea water was used to grow *S. platensis*.

Therefore, it is suggested that further studies on pre-treatment technology of deep sea water and hazard evaluation of *S. platensis* grown in media with diverse mixing proportions are needed.

1. 서론

가. 연구배경 및 필요성

미세조류는 일반적으로 빛과 이산화탄소를 이용하여 광합성 대사를 통해 성장하는 단세포 생물로써, 탄수화물, 지질, 단백질, 색소 등과 같은 다양한 유기물질을 체내에 축적 할 수 있고, 대사속도가 높아 몇 시간 이내로 세포증식이 이루어지는 것으로 밝혀져 있다(Richmond, 1986). 이러한 미세조류는 신재생에너지인 바이오매스 자원으로 대량배양을 통해 하·폐수 처리, 이산화탄소 고정, 바이오 연료, 고부가 가치 산물생산 등과 같은 다양한 측면으로 이용가능하다.

미세조류 중 남조류에 속하는 0.5 mm의 나선형형태인 *Spirulina platensis*는 식품으로 단백질(50~70 %), 탄수화물(10~20 %), 지질(5~10 %), 무기질(7~13 %), 섬유질 및 비타민(8~10 %)을 함유하고 있어 체내 흡수력이 우수하며, 클로로필-a를 함유하고 있어 의약품 및 건강보조식품으로 관심을 받고 있다(Rangel-Yagui et al., 2004). 또한, 강알칼리에 내성을 가지고 있어 폐수처리 등의 환경 분야에 적용할 수 있다(Mosulishvili et al., 2002).

영양학적 가치를 기반으로 건강보조식품 및 기능성 식품연구(Khan et al., 2005; Kulshreshtha et al., 2008; Mazo et al., 2004), 당뇨병 개선 및 콜레스테롤 억제(Iwata et al., 1990), 면역조절 기능 및 항산화(Rasool and Sabina 2009; Wu et al., 2005), 항암(Akao et al., 2009; Schwartz et al., 1998), 항바이러스 효과(Ayehunie et al., 1998; Hayashi et al., 1994) 등의 의료용 연구, 필수 아미노산 및 지방산(Alonso and Maroto, 2000), 베타 카로틴 및 피코시아닌 등의 색소류, 향장품 원료 등의 다양한 천연물 연구에 활용되고 있다(Kay, 1991; Sautier and Tremolieres, 1998; Ahsan et al., 2008).

*Spirulina*의 대량생산은 1970년대 말부터 진행되었으며, 최초 옥외대량배양은 멕시코의 Sosa Texcoco Co.에서 시작(Durand-Chastel, 1980; Ciferri,

1983), 그 후 멕시코(Spirulina Mexicana SA), 태국(Siam Algae Co., Ltd.), 일본(Nippon Spirulina Co., Ltd.), 이스라엘(Koor Foods Co., Ltd.), 미국(Earthrise Farms, Cyanotech Corporation), 대만(Nan Pao Resins Chemical Co., Ltd., Blue Continent Co., Ltd., Far East Microalgae Co., Ltd., Tung Hai Chlorella Co., Ltd.), 인도(Parry Agro Industries Ltd.), 중국(Yunnan Spirin Co., Ltd., Hainan DIC Microalgae Co., Ltd.) 등과 같은 세계 여러 나라에서 성공적인 대량생산이 이루어지면서 현재 연간 약 3,000 톤을 생산하고 있다(Shimamatsu, 2004). 옥외대량배양시설은 원형(circular)이나 수로식 못(raceway pond)이 이용되어지며, 미국의 Earthrise Farms에서는 15개의 독립된 수로식 못(15,000 m³)을 설치하여 하천수를 이용한 *Spirulina*의 대량배양에 성공하였다(Vonshak, 1997).

국내에서는 실내 배양기를 이용하여 배양조건에 따른 *Spirulina*의 증식 및 지방산 조성 등의 연구가 이루어졌으나(Joo et al., 1988, 2000), 옥외대량배양에 대해 최근 활발히 이용되고 있는 *S. platensis*는 아직 국내에서는 일부 관련기업에서 생산하고는 있지만 대량생산에 있어 상용화기술의 보급이 이루어지지 못해 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다. *Spirulina* 성장의 중요한 영향을 미치는 요소는 영양물질의 활용도, 온도 및 조도 등으로 조사되고 있다(Cornet et al., 1992).

*S. platensis*는 다른 조류에 비해 상대적으로 높은 pH환경(pH 9.2~9.3)이 요구되어 배양 중 배지(medium) 내 다른 조류에 의한 오염이 일어나지 않는 장점을 지니고 있다(Belkin and Boussiba, 1991). *Spirulina*의 위와 같은 장점을 활용하여 상업적으로 *Spirulina*를 대량배양을 진행하기 위해서는 반드시 영양염류 공급에 대한 경제적인 부분을 고려하여야 한다. 그중 배지조성 비용에 대하여 선행연구자들은 *Spirulina*를 배양하기 위해 사용되었던 SOT, Zarrouk 및 SP medium을 기반으로 하여 해수(seawater), 하수(sewage water) 및 공업폐수(industrial effluents)를 이용한 경제적인 배지를 개발하는 연구를 진행해왔다(Faucher et al., 1979; Saxena et al., 1982; Tanticharoen et al., 1993). 하지만 전·후처리, 추가적인 2차 처리시설 필요 및 사용에 따른 운반비, 운전비, 장비 구축비 등의 경제적인 문제점이

발생되고 있다.

현재 대부분의 미세조류 배지는 무기 영양염류를 바탕으로 하여 미량금속류 및 비타민 등이 보강된 합성배지를 사용하고 있다(Park, 1999). 주로 f/2, conway 배지 등에 이용되고 있으며, 최근에는 미세조류 배양배지로 비용절감에서 경제성을 지닌 상용복합비료를 많이 사용하고 있다(Guillard and Ryther, 1962; Claude, 1976; Rodriguez and Maestrini, 1984).

Schreiber(1927)는 해수(1 L)기반에 질산염과 인산염(NaNO_3 150 mg/L, NaH_2PO_4 8.69 mg/L)을 기준으로 상용복합비료의 양을 환산하여 배양배지를 제조 하였고, Rodriguez and Maestrini(1984)의 연구에 따르면 12 종의 복합비료를 16 종의 미세조류에 배양한 결과, Conway 배지기준 *Chlamydomonas palla*, *Chaetoceros sp.*, *Nannochloris oculata* 및 *Isochrysis galbana*에서는 복합비료 배지에서 낮은 성장률을 보였으나, *Phaeodactylum triconutum*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis striata* 및 *Thalassiosira pseudonana*는 비료의 종류에 따라 약간의 차이는 보이지만, Conway 배지의 성장률과 유사하거나 더 높았다.

Ankita et al.(2014)의 연구에서는 N(10 %), P(26 %), K(26 %)로 이루어진 상용복합비료를 이용하여 농도별로 배양배지를 제조하여 *S. platensis*를 성장시킨 결과, Zarrouk 배지기준에 비해 더 높은 성장률을 나타내었다. 이러한 이유는 상용복합비료 내 N, P, K 및 Si 등의 영양염류만 포함하고 있어 미세조류의 성장속도가 늦지만, 성장속도를 증가시키기 위해 비료 이외 Mn, Co, Cu 및 Zn 등의 무기 영양염류를 첨가시킨다면 성장효율이 증대될 것이다(Park and Huh, 1999).

해양심층수는 수심 200 m 이하 깊은 해수를 해양 심층수라고 부르며, 표층 해수와는 달리 햇빛이 닿지 않아 플랑크톤 및 생명체가 증식하지 못하기 때문에 영양염류의 농도가 높으면서 수온에 따른 밀도차이로 표층해수와 혼합되지 않아 표층해수에 존재하는 오염물질이 없기 때문에 표층의 해수와 비교하였을 때 저온성, 안정성, 청정성, 부영양성, 미네랄밸런스 특성 및 숙성성 등의 특성을 가지고 있다.

해양심층수는 채수지역에 따라 조성 비율의 차이가 있음에도 불구하고,

비교적으로 일정한 온도, 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 질산염 및 인산염 등과 같은 영양염류가 풍부하고, 안정적인 수질의 특성을 보인다(Fukami et al., 1992; Nakasone and Akeda, 1997; Fukami et al., 1997; Hwang et al., 2009; Hataguchi et al., 2005). 국내 해양심층수의 주성분원소 비는 해양심층수 수질기준인 일정성분비 27.8(Na/K) : 3.4(Mg/K) : 1.1(Ca/K) : 1(K/K)의 오차범위 $\pm 10\%$ 를 만족하고 있으며, 청정성, 높은 미네랄 함유, 부영양성, 저온성 그리고 안정성의 5대 특성을 가지고 있기 때문에 이러한 특성을 활용한다면 해양심층수를 이용하는 다양한 산업분야에 활용성이 높아질 것이다. 우리나라는 2000년대부터 해양심층수에 관한 연구를 시작하였으며, 현재 해양심층수를 이용한 약 20 여개 품목의 상품이 생산·판매되어지고, 상품 외에도 농·수산업, 먹는 물 등 많은 분야로 적용되어지고 있다. 이러한 이유 등에 의해 향후 해양심층수는 신산업 창출에 이바지 할 것으로 기대된다.

해양심층수의 많은 장점을 이용하여 최근 국외에서는 미세조류 생산에 관련연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적인 미세조류인 *Spirulina*는 대부분 무기성 화학적 약품을 기반으로 건강식품시장의 변화를 위하여 활발히 생산되고 있다(Belay and Ota, 1994). 현재 *Spirulina* 대량생산시스템 공정 중 배양배지제조비용은 약 20%를 차지하고 있으며, 무기적 시약의 구입비용을 절감할 수 있는 해양심층수를 저비용배지 제조에 이용하게 된다면 배양배지 제조가격 면에서 경쟁에 유리할 것으로 판단된다.

해양수를 기반으로 하는 *Spirulina* 생산은 경제적이거나 기후조건에 영향을 많이 받기 때문에 대부분이 열대지역의 실외에서 진행되고 있다(Materassi et al., 1984). 해양심층수는 햇빛이 닿지 않으므로 광합성이 일어나지 않아 무기영양원을 포함하며 오랜 세월을 거쳐 숙성되어 필수미량원소와 다양한 미네랄이 풍부하게 포함되어 있고, 성장이 가능한 염도를 지니고 있으므로 *S. platensis*를 배양하기에 해양심층수 기반 배지로서 적합할 것으로 판단된다. 하지만 해수, 하수, 공업폐수 등으로 많은 연구가 진행되어지고 있지만 풍부한 영양소를 함유하고 있는 해양심층수를 이용한 미세조류 배양에 성공하였으나, 상용화 배양시스템 기술개발로 진행함에 있어 배지의

경제성, 성장특성 등과 같은 단위요소기술이 부족한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 *Spirulina* 대량생산시스템 공정 중에서 경제적인 비중을 많이 차지하는 배양배지 조성을 해양심층수로 활용하여 *S. platensis*가 최적으로 성장하는 경제적인 배양배지조성 기술개발 하고자 하는데 있다. 동시에 해양심층수기반의 SP medium과 저비용배지를 다양하게 혼합된 배지조건에서 *S. platensis*의 성장실험을 수행하여 획득한 실험 결과를 바탕으로 생물동역학 인자 산출 및 생산량에 따른 경제성 분석을 통해 친환경적이고, 경제성이 뛰어난 *S. platensis*의 해양심층수기반 최적 배양배지조건을 도출하고자 함이다.

2. 실험재료 및 방법

가. 균주 및 배양조건

미세조류인 *S. platensis*(KMMCC-56)는 한국해양미세조류은행에서 분양 받았으며, 균주 배양에 사용된 배지는 한국해양미세조류은행에서 *S. platensis*의 전용 성장배지로 사용된 알칼리성 무기배지(pH 9.37)인 SP medium을 사용하였다. SP medium(Table 1)은 solution A, solution B, PIV metal solution 및 Chu micronutrient solution으로 구성되어 있으며, medium에 사용된 시약은 모두 실험용(Duksan Chemical, Korea)으로 이용하였다. 배양조건은 500 mL 삼각플라스크에 medium 200 mL를 넣고 균주 5 % (W/W)되게 접종한 후, 온도 35 °C, 교반속도 120 rpm 및 조도 8,000 lux로 35일간 배양하였다(Fig. 1).



S. platensis(KMMCC-56)



SP medium



S. platensis cultivation



Fig. 1 The equipments of *S. platensis* cultivation.

Table 1. Chemical composition of SP medium for *S. platensis*.

<u>Solution A</u>	
NaHCO ₃	13.61 g
Na ₂ CO ₃	4.03 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
DI water	500 mL
<u>Solution B</u>	
NaNO ₃	2.50 g
K ₂ SO ₄	1.00 g
NaCl	1.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04 g
PIV metal solution*	6 mL
Chu micronutrient solution**	1 mL
Vitamin B ₁₂ ***	1 mL
DI water	500 mL
<u>*PIV metal solution</u>	
Na ₂ EDTA	0.750 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	97 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41 mg
ZnCl ₂	5 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4 mg
DI water	1,000 mL
<u>**Chu micronutrient solution</u>	
Na ₂ EDTA	50 mg
H ₃ BO ₃	618.0 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	19.6 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	44.0 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	20.0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	12.6 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	12.6 mg
DI water	1,000 mL
<u>***Vitamin B₁₂ Stock</u>	
Vitamin B ₁₂	15 µg/100 mL H ₂ O

나. 해양심층수

해양심층수의 풍부한 무기영양성분을 활용하여 *S. platensis*의 성장특성을 파악하고자 국내 동해연안에서 취수되는 해양심층수를 이용하였다. 해양심층수는 수심 200 m 이상의 깊은 곳에 존재하며 연중 안정된 저온성(2℃ 이하)을 유지하고 있으며, 세균 등의 유기물은 거의 없을 뿐만 아니라 해양식물의 성장에 필수영양분 등이 풍부한 자원으로 해양수산부(해양심층수의 개발 및 관리에 관한 법률)의 인·허가를 통해 개발 및 취수가 가능하다.

본 연구에 사용된 해양심층수 취수원은 강원도와 울릉도에 위치(Fig. 2)하고 있으며, 취수심도는 605 m(DSW-1), 510 m(DSW-2), 200 m(DSW-3) 및 418 m(DSW-4)에서 취수되고 있는 원수를 이용하였다. 각 해양심층수의 물리·화학적 조성은 Table 3과 같다.

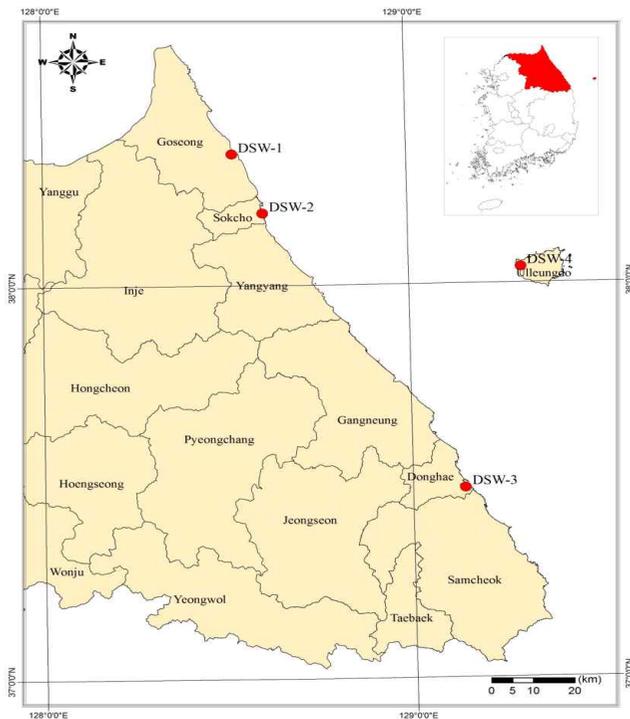


Fig. 2 Sampling sites of deep sea water.

Table 2. Physico-chemical characteristics of deep sea water in this study.

Contents	DSW-1	DSW-2	DSW-3	DSW-4
Depth(m)	605	510	200	418
Temperature(°C)	0.567	0.486	1.227	0.944
Salinity(‰)	34.069	34.070	34.006	34.044
pH	7.745	7.718	7.918	7.557
Count of coliform group(MPN/250mL)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
NO ₃ ⁻ (mg/L)	0.332	0.234	0.141	0.215
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.057	0.048	0.024	0.036
SiO ₂ (mg/L)	1.186	0.961	0.389	0.655
Na ⁺ (mg/L)	11,501	12,897	9,529	10,981
Mg ²⁺ (mg/L)	1,415	1,571	1,104	1,246
Ca ²⁺ (mg/L)	454	464	368	394
K ⁺ (mg/L)	437	466	335	380
Cd ²⁺ (µg/L)	0.042	0.034	0.013	N.D.
Pb ²⁺ (µg/L)	0.041	0.026	0.022	N.D.
Cu ²⁺ (µg/L)	0.106	0.203	0.330	N.D.
Hg ²⁺ (µg/L)	0.0015	0.0027	0.013	N.D.

N.D. : not detected

다. 성장실험 및 분석방법

1) *Spirulina platensis* 성장실험 및 분석방법

가) 배양배지의 영향인자에 따른 성장특성

*S. platensis*의 성장특성을 파악하기 위해 N, P, K비율 특성에 따른 저비용배지 5 종(Table 3)과 해양심층수 4 종(Table 2)을 이용하여 성장실험을 진행하였다.

성장실험은 배지의 저비용배지는 조류성장에 있어 기초영양분인 N, P, K가 다양한 비율로 구성되어 있어 경제성을 확보하고자 하였으며, 해양심층수는 각 해양심층수의 취수원 특성에 따른 성장특성을 파악하였다. 각 배양조건은 500 mL 삼각플라스크에 medium 200 mL를 넣고 균주 5 %(W/W)되게 접종한 후, 온도 35 °C, 교반속도 120 rpm 및 조도 8,000 lux로 35일간 배양하였다.

저비용배지 각 5종별로 DI water 1 L에 정밀저울을 이용하여 0.5 g를 정량하여 용해시킨 후 0.2 µm membrane filter paper를 이용하여 여과시켜 부유물질을 제거하였으며, 해양심층수 4 종은 저비용배지와 동일하게 0.2 µm membrane filter paper를 이용하여 여과시켜 부유물질을 제거한 후 1시간 이상 UV 조사시켜 배양을 수행하였다.

저비용배지와 해양심층수의 화학적 조성을 파악하기 위하여 원자흡광분광기(Atomic Absorption Spectrophotometer, AA-7000, Shimadzu, Japan), 이온크로마토그래피(IC, Ion Chromatography, 883 basic IC plus, Metrohm, Swiss) 및 UV/Vis spectrophotometer(Aquamate plus, Thermo, United States of America)를 이용하여 화학 분석하였다.

Table 3. Chemical compositions various type of low cost medium.

Sample	LCM-A	LCM-B	LCM-C	LCM-D	LCM-E
N(%)	5	3	12	25	19
P(%)	15	15	10	9	18
K(%)	25	43	35	18	19
Mg(%)	1	1	1	1	1
B(%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Mn(%)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Zn(%)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Fe(%)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Cu(%)	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
Mo(%)	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005

나) 해양심층수 기반 배양배지의 성장특성

본 실험에서는 해양심층수 기반 배양배지의 특성을 파악하고자 해양심층수, 저비용배지 및 SP medium을 비율별로 혼합하여 *S. platensis*의 성장 실험을 통해 최적영양인자를 도출하였다. 배지의 혼합비율은 해양심층수를 기준으로 저비용배지와 SP medium을 Table 4와 같이 혼합하였다.

배지의 배양조건은 500 mL 삼각플라스크에 medium 200 mL를 넣고 균주 5 % (W/W)되게 접종한 후, 온도 35 °C, 교반속도 120 rpm 및 조도 8,000 lux로 DSW-2과 SP medium의 비율별 혼합배지는 29일, DSW-2과 LCM-E의 비율별 혼합배지는 22일간 성장실험을 진행하였다.

Table 4. Composition ratios under various medium conditions.

DSW-2(25%) + SP medium(75%)	DSW-2(25%) + LCM-E(75%)
DSW-2(50%) + SP medium(50%)	DSW-2(50%) + LCM-E(50%)
DSW-2(75%) + SP medium(25%)	DSW-2(75%) + LCM-E(25%)

다) 균체량 및 영양염류 분석

미생물의 성장량을 측정하기 위해 흡광도와 건조 균체량 무게를 측정하였다. 건조 균체량은 항량(constant weight)된 종이필터(GF/C)를 이용하여 여과된 균체를 열풍건조기에서 105 °C로 2 시간 동안 건조시켜 그 무게를 측정하였다. 흡광도 측정은 채취한 시료를 vortex를 이용하여 미생물이 고르게 분포하도록 하였으며, 1 회용 큐벳을 사용하여 600 nm 파장에서 측정하였다. 위와 같은 방법을 이용하여 *S. platensis* 균주의 배양을 통해 회귀분석을 통한 상관분석을 실시한 결과 다음과 같은 상관관계식을 도출하였다(Fig. 3).

$$DCW(g/L) = 0.9322 \times \text{Optical density}(600nm) + 0.0255 \quad (r^2 = 0.9846) \quad (1)$$

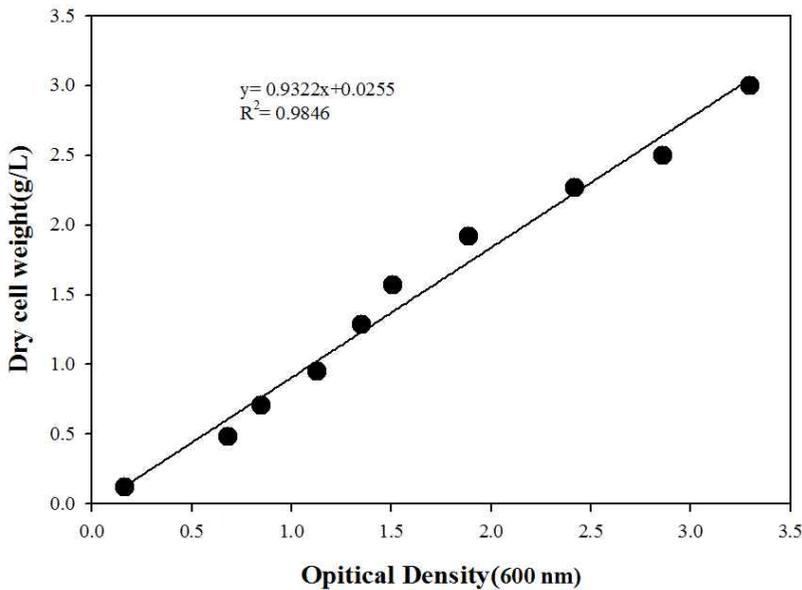


Fig. 3 The calibration curve with correlation coefficient as a function of optical density and dry cell weight.

이를 이용하여 배양배지 특성에 따른 해양심층수, 저비용배지 및 SP medium을 이용한 *S. platensis* 성장실험의 균체량 분석은 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 측정된 흡광도를 측정하여 건조 균체량을 도출하였다.

*S. platensis*의 배양종료 후 배양액의 주요영양인자인 N, P, K의 영양염류 변화량을 측정하기 위해 성장배양액은 0.2 μm membrane filter paper로 여과하여 부유물질을 제거한 후 진행하였으며, 원자흡광분광기, 이온크로마토그래피 및 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 화학 분석하였다. 배양배지의 화학분석은 3회 반복 측정하여 재현성을 확보하였다.

S. platensis 성장형태를 파악하고자 광학적 분석은 광학현미경 (Microscope, Nikon ECLIPSE LV100DOL, Japan) 및 전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 분석하였다.

2) 생물동역학적 인자

해양심층수기반 혼합배지에 대해 *S. platensis*의 성장실험 결과를 이용하여 배지조성별 생물동역학적 인자 최대비성장률(maximum specific growth rate), 영양분에 따른 비산출율(yield, Y) 및 배가시간(doubling time)을 산출하였다(Pirt, 1975; Costa et al., 2003; Leema et al., 2010).

가) 최대 비성장률

최대 비성장률을 초기 정체기를 제외하고 지수성장기 값을 이용하여 결과 값으로 나타내었다. 주어진 성장조건에서 미세조류의 성장 가능성을 파악할 수 있는 대표적인 인자로 식 (2)을 이용하여 산출하였다. (X_1/X_0)는 배양 전·후의 미세조류 농도(g/L)이며, (t_1-t_0)는 배양시간(day)이다.

$$\mu_{\max} (1/day) = \ln(X_1/X_0)/(t_1 - t_0) \quad \text{식 (2)}$$

나) 배가시간

배가시간은 미세조류가 분열 증식하여 초기 성장에 2배가 될 때까지의 시간을 말하며, 식 (3)을 이용하여 산출하였다.

$$t_d (day) = \ln 2 (\mu_{\max})^{-1} \quad \text{식 (3)}$$

다) 비산출율

배지 내 미세조류 성장에 미세조류 성장에 따른 기초영양분인 N, P 및 K에 대한 산출율은 식 (4)을 이용하여 산출하였다. 여기서, X 값은 미세조류 농도(g/L)이며, C는 N, P, K의 농도(mg/L) 값이다.

$$Y_{N,P,K} = \Delta X / \Delta (C_{N,P,K}) \quad \text{식 (4)}$$

3. 결과 및 고찰

가. *S. platensis* 성장특성

1) *S. platensis* 배양

*S. platensis*를 SP medium을 이용하여 29 일 동안 배양하였으며, 성장특성을 파악하기 위해 2일 간격으로 배양액을 채취하여 흡광도를 600 nm 파장에서 측정된 결과 초기농도 0.08에서 접종 29 일 후 1.18로 초기농도의 14 배 이상으로 성장하였다(Fig. 4). 성장실험을 통해 측정된 흡광도 값을 식 (1)을 이용하여 접종 후 균체량을 환산한 결과 1.13 g/L로 산출되었다.

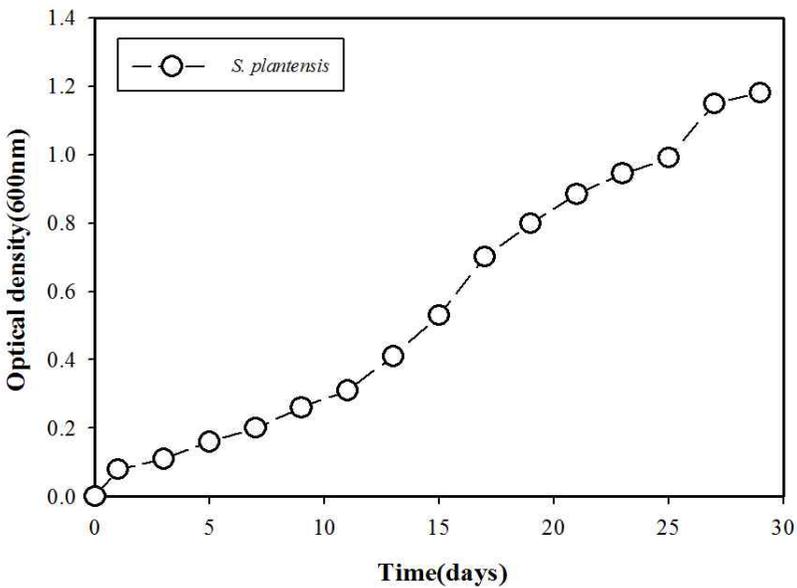


Fig. 4 Growth curve of *S. platensis* using the SP medium.

본 연구와 유사한 배양규모(100 mL)에서 진행된 Monica et al.(2014)과 Bezerra et al.(2012)가 수행한 시간당 생산량은 각각 0.0096 g/d, 0.0438 g/d로 조사되었으며, 본 연구(200 mL)에서 산출된 균체량을 이용하여 시간당 생산량을 식 (5)를 이용하여 산출한 결과 평균 0.0077 g/day로 산출되었다(Fig. 5). 선행된 연구와 본 연구의 생산량 차이는 조도 및 배지조성 등과 같은 배양환경의 차이로 사료된다.

$$\text{Production per day(g/day)} = \text{Working Volume(L)} \times \frac{\text{Dry cell weight(g/L)}}{\text{culture time(day)}} \quad \text{식 (5)}$$

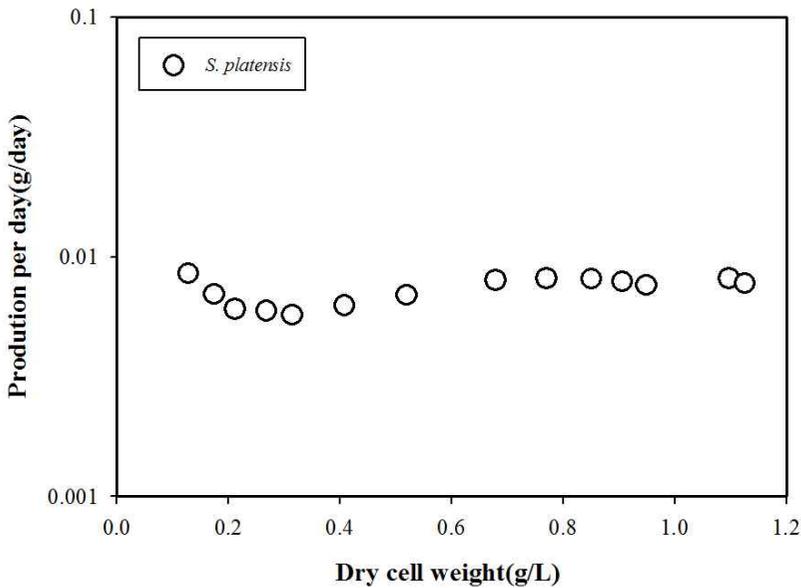


Fig. 5 Distribution of production per day with dry cell weight.

2) 배양배지의 영향인자

배양배지의 영향인자를 이용하여 *S. platensis*의 성장특성을 파악하고자 천연 무기영양분을 함유하고 있는 해양심층수 4 종과 다양한 N, P, K의 비율을 함유하고 있는 저비용배지 5 종을 이용하여 *S. platensis*의 성장실험을 진행하였다.

가) 해양심층수를 이용한 성장특성

해양심층수(DSW-1, DSW-2, DSW-3, DSW-4)를 이용하여 *S. platensis* 성장특성을 파악한 결과 Fig. 6과 같이 나타났다. 해양심층수를 이용한 성장특성은 접종 후 배양 1 일까지 *S. platensis*의 농도가 극소량 증가하였으나 14 일까지 시간에 따른 농도변화가 거의 일어나지 않았다(Fig. 6).

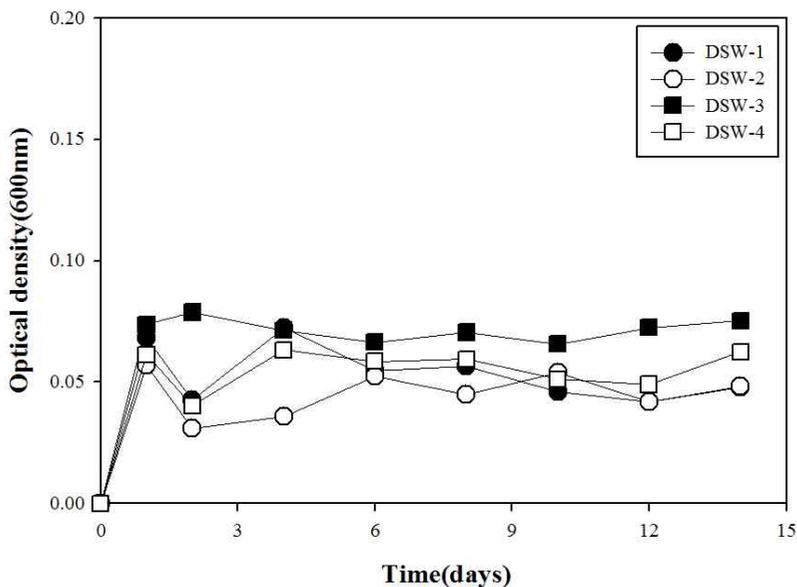


Fig. 6 Growth curves of *S. platensis* under various deep sea water.

흡광도 분석을 통해 해양심층수의 성장특성을 파악한 결과 배양 초기 1 일까지 *S. platensis*의 농도가 증가한 이유는 배양액의 영향으로 생각되며, 14 일까지 농도의 변화가 접종 후 1 일과 동일한 농도를 유지하는 것으로 보아 해양심층수에 의한 *S. platensis*의 성장은 일어나지 않았다. 성장을 하지 않은 이유는 해양심층수는 SP medium의 농도에 비해 NO_3^- , PO_4^{3-} 및 K^+ 는 각각 평균 0.0012 %, 0.0001 % 및 1.25 %로 매우 낮은 함량비율을 보이고 있다(Table 5). 해양심층수 내 함유된 염도(평균 34 ‰)에 의해 미생물 성장을 저해한 것으로 판단되며, 다량 함유된 Cl^- 와 Br^- 등이 독성으로 작용하기 때문이다(Zinicovscaia et al., 2013).

Table 5. A comparison of chemical compositions in SP medium and deep sea water.

SP medium (A)		NO_3^- (mg/L)	PO_4^{3-} (mg/L)	K^+ (mg/L)
		19,325	30,145	32,426
DSW-1	Conc. (B)	0.332	0.057	437
	% (B/A*100)	1.72E-03	1.89E-04	1.35E+00
DSW-2	Conc. (B)	0.234	0.048	466
	% (B/A*100)	1.21E-03	1.59E-04	1.44E+00
DSW-3	Conc. (B)	0.141	0.024	335
	% (B/A*100)	7.30E-04	7.96E-05	1.03E+00
DSW-4	Conc.(B)	0.215	0.036	380
	% (B/A*100)	1.11E-03	1.19E-04	1.17E+00

Chung and Lee(2008)에 따르면 세계 여러 나라의 해양 심층수는 지리적 위치, 위도, 평균기온, 해양의 수심 등과 같은 환경에 따라 해양 심층수의 성분에 차이가 있다고 보고되었다. *S. platensis*의 기초 영양물질인 NO_3^- 의 경우, 일본의 고치(Gochi)현과 미국 하와이는 우리나라 동해에 비해 약 19.5.5 %와 307.2 % 정도 높았으나, PO_4^{3-} 는 각각 약 45.5 %와 73.3 %로 낮게 나타났다. 따라서 국내 해양심층수를 기반으로 하는 *S. platensis* 성장을 기대하기는 어려울 것이다. 하지만, 해양심층수가 보유하고 있는 풍부한 무기영양분을 이용하기 위해서 N, P, K를 함유하고 있는 배양배지의 영향 인자를 도출한다면 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다.

나) N, P, K 혼합비율에 따른 성장특성

미세조류의 성장에 있어 N, P, K의 다양한 혼합비율을 가진 저비용배지를 이용하여 *S. platensis*의 성장실험을 수행한 결과, 배양 35 일 후에 저비용배지 5 중 중 Sample D와 E에서 최대 균체량은 각각 0.71, 0.72 g/L로 나타나 SP medium(Fig. 4)조건 대비 *S. platensis*의 성장이 가장 뛰어났으며, Sample A, B, C는 각각 0.25, 0.20, 0.43 g/L로 D와 E보다 상대적으로 낮은 성장을 보였다(Fig. 7). 이는 Sample A, B, C조건에서의 저비용 배지 내 미생물이나 조류 등에 살균 특성을 보이는 Cl^- 와 Br^- 이온함량이 D와 E조건보다 높기 때문이다(Table 6).

또한, Carvalho et al.(2006)에 의하면, *S. platensis*의 배양배지 중 NO_3^- 는 단백질과 클로로필의 생물학적 합성을 통한 미생물 성장과 균체량에 직접적 영향을 미치는 중요한 성분으로, 본 실험에서 사용된 N, P, K의 혼합비율에 따른 저비용 배지의 성장특성을 비교한 결과 SP medium기준으로 적정 NO_3^- 함량에 따라 *S. platensis*의 성장에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

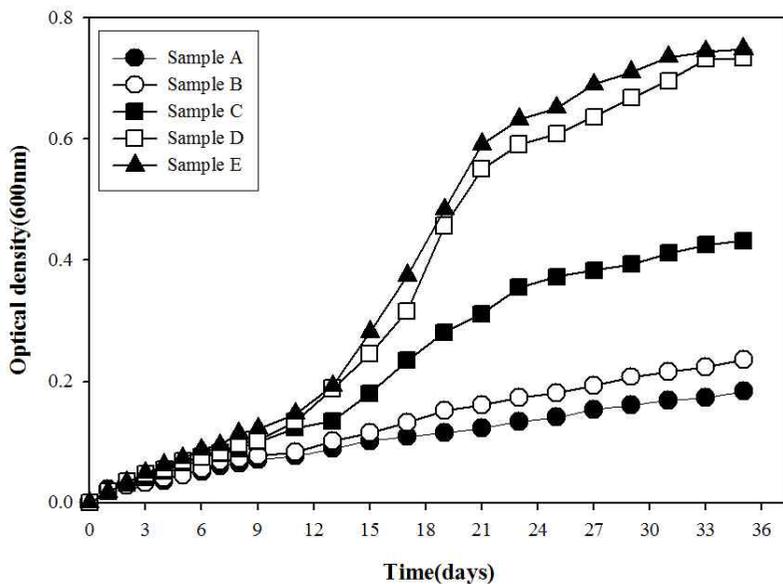


Fig. 7 Growth curves of *S. platensis* under various low cost medium.

Table 6. Chemical concentrations for SP medium and low cost medium.

Medium	NO ₃ ⁻ (mg/L)	PO ₄ ²⁻ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	Br ⁻ (mg/L)
SP medium	19,945	32,004	32,544	1,088	N.D
LCM(Sample A)	61,254	552,566	264,548	665,844	10,554
LCM(Sample B)	4,135	351,544	138,241	665,445	6,245
LCM(Sample C)	4,122	422,545	364,844	754,484	6,513
LCM(Sample D)	6,954	601,354	224,544	345,155	3,154
LCM(Sample E)	8,433	312,545	197,504	381,654	2,145

3) 배양배지의 혼합에 따른 최적 영양인자

가) 해양심층수 기반 SP medium 혼합의 성장특성

SP medium을 이용하여 해양심층수의 혼합비율에 따른 *S. platensis*의 성장특성을 파악하고자 Table 7과 같이 배지를 조성하여 성장실험을 수행하였다. 또한, 미세조류 배양 전 NO_3^- , PO_4^{3-} 및 K^+ 농도를 표시하였고, 미세조류 배양 29일 후 이들 무기성분의 감소한 농도를 함께 표시하였다(Table 7). 영양성분의 공급은 미세조류의 주요 생산성의 수준을 조절하는 중요한 요인 중 하나이다. 배지에는 미세조류를 조류가 성장하는데 필요한 주요 성분인 C, N, P 등 주요 영양분과 미량이지만 세포의 성장에 영향을 미치는 Fe, Cu, Ni 등 다른 미네랄 또한 세포의 구조와 신진 대사 생화학의 에너지지원으로 포함되어야 한다(Zhila et al., 2005). 특정성분의 과잉이나 부족은 세포의 성장을 억제할 수 있으므로 적정량의 성분이 함유되어야 한다.

Table 7. Concentrations variation for elements in the growth medium under variously mixed medium conditions of SP medium based on deep sea water.

	Mediums	Time (days)	NO_3^- (mg/L)	PO_4^{3-} (mg/L)	K^+ (mg/L)
a	SP medium(100%)	0	19,945	32,004	32,544
		29	709	3,305	5,959
b	DSW-2(25%) + SP Medium(75%)	0	14,417	25,119	25,159
		29	8,115	13,121	15,454
c	DSW-2(50%) + SP medium(50%)	0	10,115	16,551	16,998
		29	2,916	2,254	8,154
d	DSW-2(75%) + SP medium(25%)	0	5,011	8,351	8,288
		29	3,645	6,123	6,648

각 혼합비율에 따라 조성된 배지조건(a-d)에 따라 *S. platensis*의 성장에 필요한 성분인 질소, 인 및 칼륨의 농도를 측정된 결과, NO_3^- 의 함량변화는 각 배지조건별로 a(96.45 %), b(43.71 %), c(71.17 %) 및 d(27.26 %)로 나타났으며, PO_4^{3-} 와 K^+ 의 함량변화도 유사하게 나타났다(Table 7). 배지(a)조건에서 *S. platensis*의 주요영양분인 N, P, K의 소비량은 각각 NO_3^- (96.45 %), PO_4^{3-} (89.67 %), K^+ (81.69 %)로 안정적인 대사 작용을 보인반면에 해양심층수의 혼합에 따른 배지(b-d)에서는 불안정한 대사 작용으로 배지(a)와 차이를 보이는 것으로 판단된다.

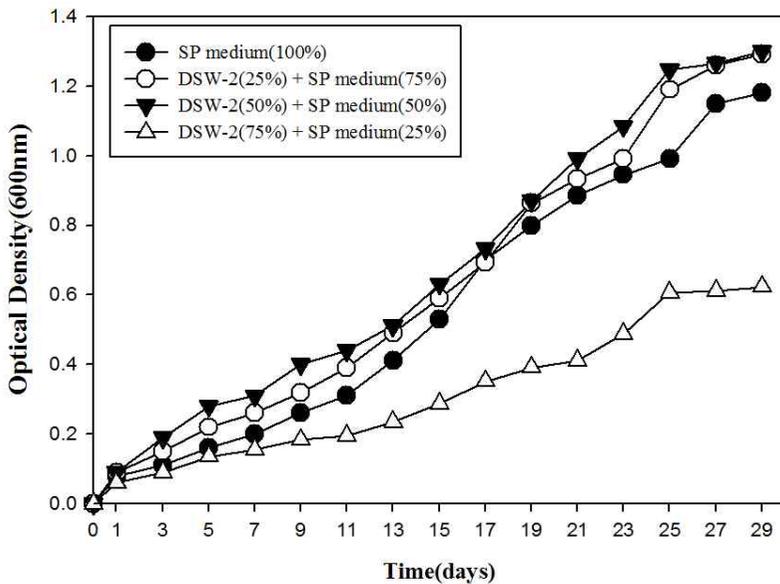


Fig. 8 Growth curves for *S. platensis* under variously mixed medium conditions of SP medium based on deep sea water.

해양심층수의 각 혼합비율에 따라 조성된 배지의 성장실험을 진행한 결과 각 배지조건별 흡광도는 배지(d)를 제외하고 유사한 성장특성을 보이고 있으며, 각 흡광도 값(식1)을 이용하여 배양 29 일 균체량을 산출한 결과 각각 a(1.13g/L), b(1.23g/L), c(1.24g/L), d(0.61g/L)로 나타났다. 배지(d)의 경우, 해양심층수의 특정성분(Cl^- , Br^- 등)의 과잉으로 인해 *S. platensis*의 성장을 저해한 것으로 예상된다.

나) 해양심층수 기반 저비용배지 혼합의 성장특성

N, P, K 조성에 따른 성장특성을 통해 확인된 저비용배지(Sample E)를 이용하여 해양심층수의 혼합비율에 따른 *S. platensis*의 성장특성을 파악하고자 Table 8과 같이 배지를 조성하여 성장실험을 수행하였다.

미세조류의 생장에 많이 소요되는 원소는 C, H, O, N, P, K 등에서 C, H, O 등은 물과 대기 중의 이산화탄소로 부터 계속적으로 공급되므로 결국 N, P, K 등의 공급에 의해 미세조류의 생장이 조절될 수 있다. 특히 N은 단백질 합성의 주요 성분으로 필수적 요소이다(Conley et al., 2009). 각 혼합비율에 따라 조성된 배지조건(A-D)에서 *S. platensis*의 성장에 따른 기초영양물질의 함량을 배양종료 후 확인한 결과 배양 전에 비하여 감소하였다(Table 8). 각 조건별 소비량을 비교한 결과 B(13.21%), C(11.41%) 및 D(7.59%)로 조사되었다. 특히 상대적으로 기초 영양물질이 적은 배지(D)의 조건의 경우, 성장실험 종료 후 NO_3^- 의 함량이 129 mg/L로 배양 전의 함량에 비하여 약 7.6% 정도밖에 남지 않았다. 배지속의 영양염류 성분 중 NO_3^- 의 질소가 결핍되어 *S. platensis*의 성장률이 감소되었다.

Table 8. Concentrations variation for elements in the growth medium under variously mixed medium conditions of low cost medium based on deep sea water.

	Mediums	Time (days)	NO_3^- (mg/L)	PO_4^{3-} (mg/L)	K^+ (mg/L)
A	LCM-E(100%)	0	6,125	302,444	223,135
		22	1,556	289,915	212,641
B	DSW-2(25%) + LCM-E(75%)	0	5,300	228,545	169,548
		22	700	201,255	145,681
C	DSW-2(50%) + LCM-E(50%)	0	3,612	150,115	116,554
		22	412	138,546	99,236
D	DSW-2(75%) + LCM-E(25%)	0	1,699	74,999	54,844
		22	129	61,545	41,255

해양심층수 혼합비율에 따른 *S. platensis*의 농도(흡광도)변화를 관찰한 결과(Fig. 9) 저비용배지 조건(A)대비 성장속도가 빠르게 진행되었으며, 이는 해양심층수가 함유하고 있는 영양염류로 인해 증식변화를 보인 것으로 판단된다. 해양심층수의 영양염류 중 규소는 조류의 성장에 영향을 미치는 것으로 조사되고 있으며, 해양심층수는 표층수에 비해 SiO₂의 함량이 최대 16.8 배 높은 것으로 조사되었다(Kim et al., 2010). 또한, 배양 12 일 기준 *S. platensis*의 농도는 저비용배지 조건(A)보다 해양심층수가 혼합된 배지(B-D)에서 높게 나타났으나, 배양 13 일 이후부터는 배지조건(D)농도의 변화가 일어나지 않았다. 농도의 변화가 접종 후 2 일과 동일한 농도를 유지하는 것으로 보아 해양심층수의 비율(75 %) 증가는 *S. platensis*의 성장을 저해 및 기초영양물질의 함량이 상대적으로 부족한 것으로 판단된다.

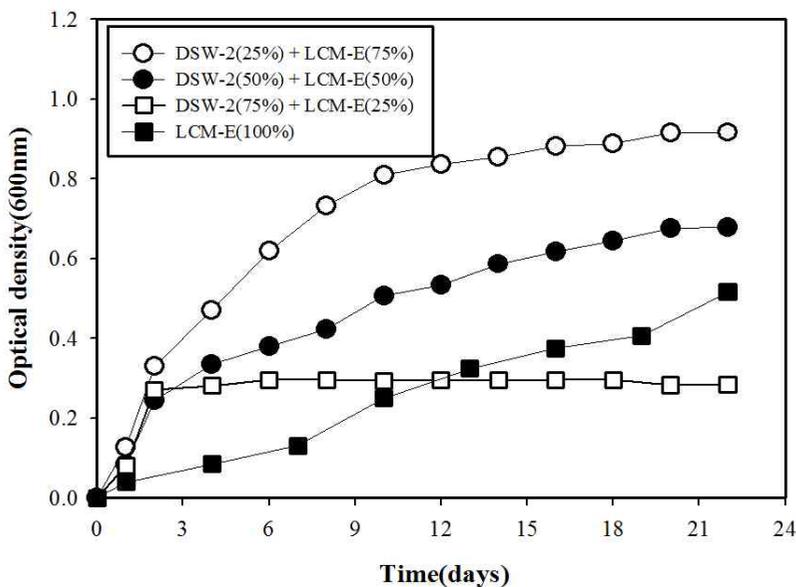


Fig. 9 Growth curves for *S. platensis* under variously mixed medium conditions of low cost medium based on deep sea water.

미세조류는 일반적으로 빛을 에너지원으로 이용하여 광합성을 통해 무기탄소를 사용하는 autotrophic대사로 알려져 있다(Kim et al., 2013). 하지만, *S. platensis*는 mixotrophic대사로 autotrophic대사와 heterotrophic대사가 동시 혹은 선택적으로 이루어지며, 에너지원(빛과 무기탄소)과 탄소원(무기·유기탄소)을 모두 사용하는 대사과정을 한다(Chen and Zhang, 1997). 해양심층수는 해양의 물질순환(biological pump)으로 인해 미생물의 중요한 영양인자인 탄소원을 저장하고 있으며, 일반적으로 이산화탄소를 흡수하여 산소를 만들어 내는 *S. platensis*는 해양심층수가 혼합된 배지(B, C)의 성장농도를 증가시켰다.

배양 22 일 후 배지(B)에서 성장된 *S. platensis*를 대상으로 현미경관찰(Fig. 10)을 실시한 결과 나선형 모양의 형상을 가지고 있으며, SEM/EDS 분석(Fig. 11)을 실시한 결과 *S. platensis*의 구성성분은 Fig. 11(a)과 같이 산소와 탄소로 이루어졌고, 생물흡착에 의해 N, K, Na, S 등이 측정되며, 육각형 침전물을 확인한 결과 해양심층수에 의해 형성된 소금결정 Fig. 11(b)이 관찰되었다.



Fig. 10 Microphotograph of *S. platensis* in the growth medium at 22 days after culture.

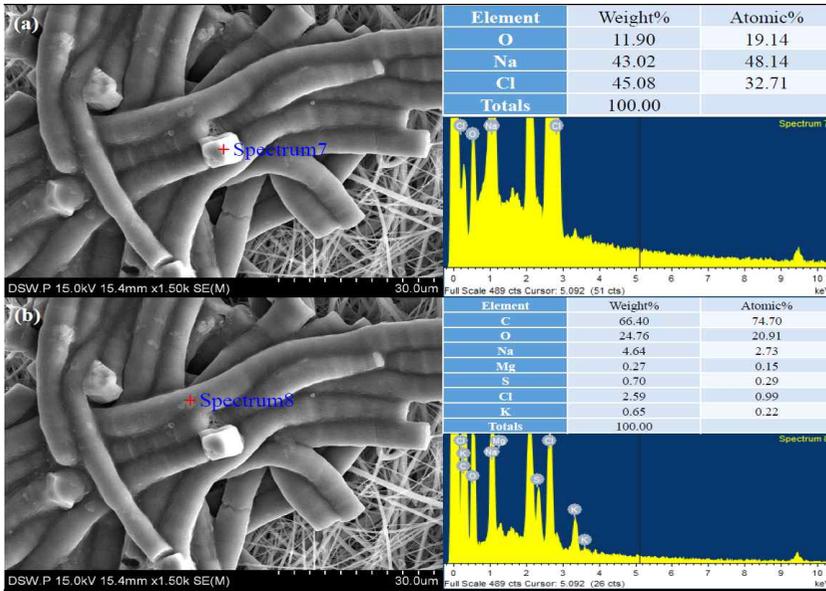


Fig. 11 SEM images(a and b) and EDS analysis of *S. platensis* in the growth medium at 22 days.

나. 생물동역학적 인자

1) 성장특성에 따른 최대 비성장률 및 배가시간

해양심층수 기반 배양배지(SP medium, 저비용배지)의 혼합에 따른 *S. platensis*의 성장결과를 활용하여 생물동역학적 인자인 최대 비성장률과 배가시간을 통해 *S. platensis*의 성장에 적합한 배양배지를 파악하고자 식 (2) 및 식 (3)을 이용하여 산출하였다(Table 9).

미생물의 최대 비성장률은 공간, 영양, 증식 저해물질 및 기타 생물의 영향에 의해 크게 변하며, 성장속도를 통해 미생물의 성장을 평가할 수 있다. 미생물의 증식은 일반적으로 균체량 측정을 통해 성장곡선(적응기, 지수성장기, 정체기 및 사멸기)을 구분할 수 있으며, 배가시간을 이용하여 성장곡선 주기를 예측할 수 있다.

기존의 선행연구자중 생물동역학 인자를 이용하여 효율적인 *S. platensis* 배지 조성을 파악하는 연구가 수행되었다. Leema et al.(2010)등은 경제적으로 대용량의 *Spirulina* 생산을 목적으로 해양수를 기반으로 서로 다른 배지조성(Zarrouk 배지)에서 성장실험을 비교분석한 결과, 조성에 따른 최대 비성장률, 배가시간, 균체량의 차이가 없으나 해양수 기반의 배지가 control(Zarrouk 배지)에 비해 루테인(lutein)함량이 증가하였다. 이때 Zarrouk 배지조건에서 최대 비성장률은 0.23 1/day, 배가시간은 3.02 day로 나타났으며, 해양수 혼합배지 조건에서 최대 비성장률은 0.26 1/day, 배가시간은 2.72 day로 변화되었다.

Costa et al.(2000)는 초기 질소의 농도에 따른 실내 광생물 반응기 조건에서 *S. platensis* 성장특성을 모델링 한 결과, Zarrouk 배지조건과 0.03 M의 질소 초기농도에서 최대 비성장률은 0.2 1/day, 배가시간은 3.53 day로 나타났으며, 0.015 M의 질소 초기농도가 증가될 때 최대 비성장률은 0.28 1/day, 배가시간은 2.50 day로 변화하였다.

Andrade and Costa(2007)는 대용량 생산을 위한 *S. platensis*의 저비용 배지를 개발하기 위하여 Zarrouk 배지를 기반으로 브라질에서 많은 양을 생산하고, 공급 가능한 당밀(molasses)등과 같은 유기물을 적용하였다. 그 결

과, $32.5 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ 의 조도 조건과 0.25 g/L 의 당밀농도 조건에서 최대 비성장률은 0.093 1/day 까지 증가시켰다.

해양심층수 기반 배양배지의 영향인자에 따라 최대성장률은 SP medium 계열은 $0.069\sim 0.087 \text{ 1/day}$ 이며, 저비용배지 계열은 $0.048\sim 0.099 \text{ 1/day}$ 로 나타났다. 각 배양배지의 영향인자별 *S. platensis*의 성장속도가 높게 나타난 배지조건(c, SP medium 50%, DSW 50%: 0.087 1/day)와 배지조건(B, 저비용배지 75%, DSW 25%: 0.099 1/day)는 주영양분인 N, P, K와 해양심층수의 Si, Fe, Zn 등 다양한 미네랄 및 탄소원의 공급으로 인해 *S. platensis*의 안정적인 대사 작용으로 인해 원활한 유용생리활성 효과가 증대된 것으로 판단된다. 또한, 배지조건(c)와 배지조건(B)의 배가시간은 각각 3.058 day , 3.007 day 로 짧게 나타났다. 비성장률과 배가시간이 선행연구에 비하여 낮게 나타난 이유는 *S. platensis*가 성장함에 따라 세포 상호간에 빛을 가리게 되는 그림자효과(shading effect)와 공간적 제한 요소 및 희분식 배양에 따른 미세조류가 벽면에 부착되어 빛 투과율을 감소시키기 때문이다(Choi et al., 2012).

Table 9. Bio-kinetics factor for *S. platensis* under variously mixed medium conditions based on deep sea water.

	Mediums	Time (days)	DCW (g/L)	u_{\max} (1/day)	t_d (day)
a	SP medium(100%)	30	1.04	0.091	3.093
b	DSW-2(25%) + SP medium(75%)		1.15	0.094	3.060
c	DSW-2(50%) + SP medium(50%)		1.16	0.094	3.058
d	DSW-2(75%) + SP medium(25%)		0.52	0.069	3.364
A	LCM-E(100%)	22	0.51	0.074	3.300
B	DSW-2(25%) + LCM-E(75%)		0.88	0.099	3.007
C	DSW-2(50%) + LCM-E(50%)		0.66	0.086	3.150
D	DSW-2(75%) + LCM-E(25%)		0.29	0.048	3.723

2) 성장특성에 따른 비산출율

해양심층수 기반 배양배지(SP medium, 저비용배지)의 혼합에 따른 *S. platensis*의 성장결과를 활용하여 생물동역학적 인자인 비산출율을 통해 *S. platensis*의 성장에 적합한 배양배지를 파악하고자 식 (4)를 이용하여 산출하였다(Table 10).

기초 영양물질 소비에 따른 *S. platensis*의 비산출율은 NO_3^- 가 가장 높게 나타났으며, PO_4^{3-} 와 K^+ 는 유사하게 나타났다. Table 10에서 성장실험 후 배지 내 NO_3^- 의 함량이 부족하였으므로, 만약 배지조건(B)에 NO_3^- 를 추가로 공급하게 되는 경우, *S. platensis*의 높은 성장률을 기대 할 수 있을 것으로 사료되어진다.

Table 10. Yields for *S. platensis* under variously mixed medium conditions based on deep sea water.

	Mediums	Y_N	Y_P	Y_K
a	SP medium(100%)	0.054	0.036	0.039
b	DSW-2(25%) + SP medium(75%)	0.182	0.096	0.118
c	DSW-2(50%) + SP meidum(50%)	0.160	0.081	0.131
d	DSW-2(75%) + SP medium(25%)	0.384	0.236	0.320
A	LCM-E(100%)	0.089	0.033	0.039
B	DSW-2(25%) + LCM-E(75%)	0.170	0.027	0.033
C	DSW-2(50%) + LCM-E(50%)	0.175	0.048	0.032
D	DSW-2(75%) + LCM-E(25%)	0.121	0.014	0.014

다. 경제성 분석

S. platensis 단위질량 생산에 따른 저비용배지제조비용을 비교 분석하고자 각 배지별 *S. platensis* 성장실험 후 식 (1)을 이용하여 균체량 값을 산출하였다. 배지제조 비용이 4 KRW/L인 저비용 배지 중 *S. platensis*의 성장이 가장 높았던 sample D와 E조건에서 *S. platensis* 단위질량 생산에 따른 저비용배지제조비용은 5.63 KRW/g과 5.56 KRW/g으로 산출되었다(Table 11). 이는 314.58 KRW/g의 SP medium에 약 1.3 %정도 밖에 차지하지 않았으며, 세계적으로 가장 많이 사용되는 Zarrouk 배지조건에 비해도 약 1.4 %밖에 차지하지 않았다(Table 12). *Spirulina* 대량생산시스템의 운영비용 중 배양배지 조제부분은 약 20 %정도 차지하며, 이러한 배양배지의 비용절감을 위한 많은 연구가 수행되었다. 본 연구에 사용된 저비용배지 sample D와 E는 *S. platensis*를 대량으로 생산함에 있어 경제적인 배지로 활용 가능하다고 판단되어 진다.

Table 11. The summary of *S. platensis* production cost using various low cost medium.

Medium	DCW, A	Cost, B	Production cost, B/A
	(g/L)	(KRW/L)	(KRW/g)
SP medium	1.04	314.58	301.18
LCM-sample A	0.25	4.00	16.00
LCM-sample B	0.20	4.00	20.00
LCM-sample C	0.43	4.00	9.30
LCM-sample D	0.71	4.00	5.63
LCM-sample E	0.72	4.00	5.56

Table 12. The summary of making cost for *S. platensis* medium (1L).

Medium element	Cost (KRW/g)	SP medium		SOT		Zarrouk	
		Consumption (g)	Cost (KRW)	Consumption (g)	Cost (KRW)	Consumption (g)	Cost (KRW)
NaHCO ₃	9	13.61	122.5	16.80	151.2	6.00	54.0
Na ₂ CO ₃	21	4.03	84.6	-	-	1.00	21.0
NaCl	10	-	-	1.00	10.0	1.50	15.0
K ₂ HPO ₄	20	0.50	10.0	0.50	10.0	0.50	10.0
K ₂ SO ₄	25	1.00	25.0	1.00	25.0	1.00	25.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	28	0.04	1.1	0.04	1.1	0.04	1.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14	0.20	2.8	0.20	2.8	0.20	2.8
FeSO ₄ · 7H ₂ O	28	0.01	0.3	0.01	0.3	0.01	0.3
Na ₂ EDTA	46	0.08	3.7	0.08	3.7	0.08	3.7
Soil	60	-	-	-	-	2.00	120.0
NaNO ₃	15	2.50	37.5	2.50	37.5	2.50	37.5
H ₃ BO ₃	16	0.62	9.9	2.86	45.8	-	-
MnSO ₄ · 7H ₂ O	50	-	-	2.50	125.0	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	14	0.04	0.6	0.22	3.1	-	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	25	0.02	0.5	0.08	2.0	-	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	110	0.01	1.1	0.02	2.2	-	-
A ₅ solution	120	-	-	0.10	12.0	-	-
Vitamin B ₁₂	10,000	0.0015	15.0	-	-	-	-
Total		314.58		431.62		290.38	

Basirath et al.(2006)은 *Spirulina*의 저비용 생산을 위하여 상업용 액체비료와 화학약품을 배합한 배지와 기존의 배양배지(Zarrouk 배지)조건에서 *Spirulina*의 성장률과 배지제조단가를 비교분석한 결과, 배양 18일 경과 시 균체량은 Zarrouk 배지조건에서 0.582 g/L, 저비용배지조건에서 0.565 g/L로 유사한 성장특성을 보였으나 배지제조단가는 배지 1 L제조 기준으로 Zarrouk 배지는 USD 79.5 \$였으나 저비용배지는 Zarrouk 배지단가의 약 20% 정도인 USD 16 \$였다.

Affan et al.(2015)은 *S. maxima*의 경제적인 생산을 위하여 배지를 천연해수 내 존재하는 Ca²⁺와 Mg²⁺ 등의 불순물을 처리 목적으로 역청탄과 수산화나트륨을 이용한 전처리를 통하여 경제적인 배지를 개발하는 연구를 수행하였다. 그 결과, 저비용 배지와 기존배지(SOT)의 *S. maxima* 성장률은 유사하였으나, 배지제조단가는 1 L 제조 기준으로 SOT 배지는 USD 170.15 \$이였으며, 저비용배지는 USD 57.6 \$로 SOT 배지보다 약 2.95 배 적었

다.

Fedekar et al.(2012)은 *S. platensis* 배지로 가장 많이 사용되는 Zarrouk 배지보다 더 경제적인 배지를 만들기 위해서 Zarrouk 배지의 질소원인 29.42 mM(2.5 g/L)의 NaNO_3 대신 2가지의 질소원으로 NH_4NO_3 와 urea ($\text{CO} \cdot (\text{NH}_2)_2$)을 10 %, 20 %, 30 %, 40 % 조건에서 *S. platensis*의 성장실험을 수행한 결과, NH_4NO_3 기반의 30 % 배지조건에서 Zarrouk 배지와 유사한 균체량을 획득하였고, 선행연구와 본 연구에서 사용된 저비용배지는 생산단가가 약 5.56 KRW/g으로 290.38 KRW/g의 배지조성단가를 보였던 Zarrouk 배지에 비하여 훨씬 경제적인 장점을 가지고 있다.

Table 13. The summary for *S. platensis* production cost using variously mixed medium conditions based on deep sea water.

	Mediums	DCW	Medium Cost	Production cost
		A (g/L)	B (KRW/L)	B/A (KRW/g)
a	SP medium(100%)	1.04	314.58	301.18
b	DSW-2(25%) + SP medium(75%)	1.15	239.69	208.79
c	DSW-2(50%) + SP medium(50%)	1.16	164.79	142.62
d	DSW-2(75%) + SP medium(25%)	0.52	89.90	171.28
A	LCM-E(100%)	0.41	3.50	8.59
B	DSW-2(25%) + LCM-E(75%)	0.78	6.38	8.17
C	DSW-2(50%) + LCM-E(50%)	0.56	9.25	64.55
D	DSW-2(75%) + LCM-E(25%)	0.19	12.13	63.92

해양심층수 기반 저비용배지 5종 중 저비용배지-sample E와 SP medium을 혼합비율별 배양배지에 *S. platensis*를 배양 후 단위질량당 생산에 따른 배양배지의 비용을 산출한 결과 (1)해양심층수 기반의 SP medium 혼합 배양배지에서는 배지조건(c)에서 142.62 KRW/g 으로 배지조건(a)기준 낮게 산출되었고, (2) 해양심층수 기반의 저비용배지를 혼합한 배양배지는 배지조건(A)기준 배지조건(B)에서 8.17 KRW/g 으로 가장 낮게 산출되었다(Table 13).

해양심층수 기반에 SP medium과 저비용배지의 혼합배지에 대한 생산단가 비교 시 배지조건(a)를 기준으로 배지조건(c)는 생산단가를 약 1.5 배 이상 감소시킬 수 있었지만, 저비용배지를 혼합할 시에는 생산단가는 약 37 % 감소될 뿐만 아니라 더불어 성장속도를 높여 *S. platensis*의 배양배지 조성비용 절감될 것으로 판단된다.

4. 결 론

해양심층수를 활용한 *S. platensis*의 성장에 배양배지를 파악하고자 한국 미세조류은행에서 분양받은 *S. platensis*를 대상으로 배양배지의 영향인자인 해양심층수, 저비용배지 및 SP medium을 이용하여 각 배양배지에 함유된 영양성분에 따른 성장특성을 비교하였다.

해양심층수는 기초영양물질인 N, P, K가 상대적으로 부족하며, 해양심층수 내 함유된 Cl^- 와 Br^- 등과 같은 무기영양분으로 인해 미생물의 성장을 저해하는 효과가 발생되어 성장을 하지 못하고 사멸한 것으로 나타났다.

N, P, K의 다양한 혼합비율을 가진 저비용배지(저비용배지 sample A~E) 5 종을 이용한 *S. platensis*의 성장특성을 관찰한 결과, 배양 35 일 후 Sample D와 E에서 최대 균체량은 각각 0.71, 0.72 g/L로 나타났으며, N, P, K의 혼합비율이 상대적으로 낮은 Sample A, B, C는 각각 0.25, 0.20, 0.43 g/L로 D와 E보다 낮은 성장률을 보였다. 배양배지 중 NO_3^- 는 단백질과 클로로필의 생물학적 합성을 통한 미생물 성장과 균체량에 직접적 영향을 미치는 중요한 성분으로, NO_3^- 함량은 *S. platensis*의 성장에 영향을 미치는 중요한 영향인자임을 확인하였다.

배양배지 해양심층수를 기반으로 저비용배지와 SP medium의 혼합비율에 따른 *S. platensis*의 성장 특성에 미치는 영양인자를 조사한 결과 해양심층수의 혼합비율이 높은 배양배지에서는 Cl^- 와 Br^- 등과 같은 무기영양분으로 인해 미생물 성장이 어려웠으며, 해양심층수의 혼합비율이 낮은 배양배지에서는 기초영양물질인 N, P, K를 기반으로 해양심층수에 함유된 Fe, Cu, Ni 등과 같은 다양한 미네랄성분은 에너지지원으로 작용하여 안정적인 대사 작용으로 높은 성장률을 보였다.

*S. platensis*의 최대 비성장률, 배가시간 및 N, P, K 산출율과 같은 생물동역학 인자와 단위질량당 생산에 따른 배양배지의 비용을 산출한 결과 해양심층수와 SP medium의 혼합비율 50:50에서 최대 비성장률은 0.094 1/day, 배가시간 3.058 day 및 생산단가 142.62 KRW/g을 산출하였고, 해양심층수와 저비용배지의 혼합비율 25:75에서 최대 비성장률은 0.099 1/day,

배가시간 3.007 day 및 생산단가는 8.17 KRW/g으로 산출하였으며, 다른 혼합비율조건에 비해 성장효율 및 경제성이 높게 나타났다.

따라서 해양심층수 기반에 SP medium과 저비용배지의 혼합배지에 대한 생산단가 비교 시 SP medium(100 %) 기준 해양심층수와 SP medium의 혼합비율 50:50에서 생산단가를 약 1.5 배 이상 감소하는 결과를 보였고, 해양심층수와 저비용배지의 혼합비율 25:75에서는 약 37 % 감소되었다. 따라서 *S. platensis*의 대량생산시스템에 있어 친환경적이고, 경제적인 *S. platensis*의 최적배양배지는 해양심층수와 저비용배지의 혼합비율 25:75로 판단되어 진다. 향후 해양심층수 전처리 기술개발과 성장배양 된 미세조류의 인체유해성 평가 등과 같은 추가적인 실험이 해양심층수 기반 연구에 확대·적용한다면 심층수 수요 증진과 안정적인 해양수자원을 확보하는데 기여할 것이라 판단되어진다.

5. 참고문헌

- Affan, M. A., Lee, D. W., Jeon, S. M., Noh, J. H., Heo, S. J., Oh, C., Park, H. S., Khomayis, S. A. and Kang, D. H., 2015, Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* growth with decreased production costs., *Aquaculture*, 436, 121-126.
- Ahsan, M. B., Mashuda, P., Tim, C. H. and Mohammad, R. H., 2008, A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish., *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 1034, 4-7.
- Akao, Y., Ebihara, T., Masuda, H., Saeki, Y., Akazawa, T., Hazeki, K., Hazeki, O., Matsumoto, M., and Seya, T., 2009, Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice., *Cancer Science*, 100, 1494-1501.
- Alonso, D. L. and Maroto, F. G., 2000, Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids., *Biotechnology Advances*, 18, 481-497.
- Andrade, M. R. and Costa J. A. V., 2007, Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate., *Aquaculture*, 264, 130-134.
- Ankita, K., Anup, K., Akhilendra, K. P. and Chandan, G., 2014, Carbon dioxide assisted *Spirulina platensis* cultivation using NPK-10:26:26 complex fertilizer in sintered disk chromatographic glass bubble column., *Journal of CO₂ Utilization*, 8, 49-59.
- Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T. W. and Ruprecht, R. M., 1998, Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*)., *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 18, 7-12.

- Basirath R., Kaushik, B. D. and Prasanna, R., 2006, Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*, *Biomass and Bioenergy*, 30, 537-542.
- Belay, A. and Ota, Y., 1994, Production of high quality *Spirulina* at Earthrise Farms., *Algal Biotechnology in the Asia Pacific Region*, Kuala Lumpur, 92, 102.
- Belkin, S. and Boussiba, S., 1991, Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values., *Plant Cell Physiology*, 32, 953-958.
- Carvalho, A. P., Pontes, I., Gaspar, H. and Malcata, F. X., 2006, Metabolic relationships between macro- and micro nutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*., *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 358-366.
- Chen, F. and Zhang, Y., 1997, High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system., *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221-224.
- Choi, B. R., Lim, J. H., Lee, J. G. and Lee, T. Y., 2012, Optimum Semi-Continuous Cultivation of *Chlorella sp.* FC-21 for Production of Biomass: Light Emitting Diodes as a Light Source and High Concentrations of Nitrogen and Phosphate in Culture Media., *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 34(8), 523-527.
- Chung, K. T. and Lee, S. H., 2008, Current Status of Domestic and Overseas Research of the Characteristics and Use of Deep Sea Water., *The Korea Journal of Food and Nutrition*, 21(4), 592-598.
- Ciferri, O., 1983, *Spirulina*, the edible microorganism., *American Society for Microbiology*, 47, 551-578.
- Claude, E. B., 1976, Nitrogen fertilizer effects on production of Tilapia in ponds fertilized with phosphorus and potassium., *Aquaculture*, 7(4), 385-390.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S.

- P., Havens, K. E., Lancelot, C. and Likens, G. E., 2009, Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus., *Science*, 324(8), 1014-1015.
- Cornet, J. F., Dussap, C. G. and Dubertret, G., 1992, A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photo-bioreactors. I. Coupling between light transfer and growth kinetics., *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 817-825.
- Costa, J. A. V., Linde, G. A., Atala, D. I. P., Mibielli, G. M. and Kruger, R. T., 2000, Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 15-18.
- Costa, J. A., Colla, L. M. and Duarte F. P., 2003, *Spirulina platensis* growth in open race way ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions., *Journal of Nursing and Care*, 58, 76-80.
- Durand-Chastel, H., 1980, Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: Shelef G. and Soeder C. J. (ed), *Algae Biomass.*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 51-64.
- Faucher, O., Coupal, B. and Leduy, A., 1979, Utilization of seawater and urea as a culture medium for *Spirulina maxima.*, *Canadian Journal of Microbiology*, 25, 752-759.
- Fedekar, F. M., Abd, E. K. and Hoda, S. N., 2012, Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media., *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38, 51-57.
- Fukami, K., Nishijima, T. and Hata, Y., 1992, Availability of deep seawater and effects of bacteria isolated from deep seawater on the mass culture of food microalga *Chaetoceros ceratosporum.*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 931-936.
- Fukami, K., Nishimura, S., Ogusa, M., Asada, M. and Nishijima, T., 1997, Continuous culture with deep seawater of a bethic food diatom

- Nitzschia sp.*, Hydrobiologia, 358, 245-249.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H., 1962, Studies of marine planktonic diatoms. I. *cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve., Canadian Journal of Microbiology, 8(2), 229-239
- Hataguchi, Y., Tai, H., Nakajima, H. and Kimata, H., 2005, Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome., European Journal of Clinical Nutrition 59, 1093-1096.
- Hayashi, O., Katoh, T. and Okuwaki, Y., 1994, Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis.*, Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo), 40, 431-441.
- Hwang, H. S., Kim, S. H., Yoo, Y. G., Chu, Y. S., Shon, Y. H., Nam, K. S. and Yun, J. W., 2009, Inhibitory effect of deep-sea water on differentiation of 3T3-L1 adipocytes., Marine Biotechnology, 11, 161-168.
- Iwata, K., Inayama, T. and Kato, T., 1990, Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose induced hyper lipidemic rats., Journal of Nutritional Science and Vitaminology(Tokyo), 36, 165-171.
- Joo, D. S., Cho, M. G., Buchholz R. and Lee, E. H., 1988, Growth and fatty acid composition with growth conditions for *Spirulina platensis.*, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 31, 409-416.
- Joo, D. S., Jung, C. K., Lee, C. H. and Cho, S. Y., 2000, Content of phycocyanins and growth of *Spirulina platensis* with culture conditions., Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 33, 475-481.
- Kay, R. A., 1991, Microalgae as food and supplement., Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 30, 555-573.
- Khan, Z., Bhadouria, P. and Bisen, P. S., 2005, Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina.*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 6, 373-379.

- Kim, A. R., Lee, S. W., Jung, D. H., Moon, D. S. and Kim, H. J., 2010, A Preliminary study comparing the Growth of Phytoplankton according to the Ratio of Deep and Surface Seawater., Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43(4), 373-379.
- Kim, S. J., Lee, Y. H. and Hwang, S. J., 2013, Effects of pH and aeration rates on removal of organic matter and nutrients using mixotrophic microalgae., Journal of Korean Society of Water and Wastewater, 27(1), 69-76.
- Kulshreshtha, A., Zacharia, A. J., Jarouliya, U., Bhadauriya, P., Prasad, G. B. and Bisen, P. S., 2008, *Spirulina* in health care management., Current Pharmaceutical Biotechnology, 9, 400-405.
- Leema, J. T., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N. V., Dheenan, P. S. and Karthikayulu, S., 2010, High value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater., Bioresource Technology, 101, 9221-9227.
- Materassi, R., Tredici, M. and Balloni, W., 1984, *Spirulina* culture in seawater., Applied Microbiology and Biotechnology, 47, 384-386.
- Mazo, V. K., Gmshinskii, I. V. and Zilova, I. S., 2004, Microalgae *Spirulina* in human nutrition., Voprosy pitaniia, 73, 45-53.
- Mosulishvili, L. M., Kirkesali, E. I., Belokobylsky, A. I., Khizanishvili, A. I., Frontasyeva, M. V., Pavlov, S. S. and Gundorina, S. F., 2002, Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 87-97.
- Nakasone, T. and Akeda, S., 1997, The application of deep sea water in Japan., Nakasone Akeda, 69-75.
- Park, H. G., 1999, Microalgal biotechnology(I), Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(4), 11-20.

- Park, H. G. and Huh, S. B., 1999, Microalgal biotechnology(V)., Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(4), 40-47.
- Pirt, S. J., 1975, Principles of microbe and cell cultivation., Blackwell Scientific Publications.
- Rangel-Yagui, C. O., Danesi E. D. G., Carvalho, J. C. M. and Sato, S., 2004, Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process., Bioresource Technology, 92, 133-141.
- Rasool, M. and Sabina, E. P., 2009, Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study., Journal of Natural Medicines, 63, 169-75.
- Richmond, A., 1986, Microalgae of economic potential. In Hand book of Microalgal Mass Culture., CRC Press, ed. A. Richmond, Florida, 199-243.
- Rodriguez, E. G. and S. Y. Maestrini., 1984, The use of some agriculture fertilizer for the mass production of marine algae., Aquaculture, 36(3), 245-256.
- Sautier, C. and Tremolieres, J., 1998, Food value in *Spirulina* algae in humans., Annales De La Nutrition Et De L' Alimentation, 136, 109-120.
- Saxena, P. N., Ahmad, M. R., Shyam, K. and Amla, D. V., 1982, Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed., Experientia, 39, 1077-1083.
- Schreiber, E., 1927, Die reinkultur von marinem phyto-plankton and deren bedeutung fur die erforschung der produktionsfahigkeit des meereswassers., Helgolander wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, 16, 1-34.
- Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. and Trickler, D., 1988, Prevention of experimental oral cancer b y extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae., Nutrition and Cancer, 11, 127-134.
- Shimamatsu, H., 2004, Mass production of *Spirulina*, an edible microalga.,

- Hydrobiologia, 512, 39-44.
- Tanticharoen, M., Bunnag, B. and Vonshak, A., 1993, Cultivation of *Spirulina* using secondary treated starch wastewater., Australasian Biotechnology, 3, 223-226.
- Vonshak, A., 1997, *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology.
- Wu, L. C., Ho, J. A., Shieh, M. C. and Lu, I. W., 2005, Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4207-4712.
- Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. and Volova, T. G., 2005, Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252., Russian Journal of Plant Physiology, 52(3), 311-319.
- Zinicovscaia, I., Duca, G., Rudic, V., Cepoi, L., Chiriac, T., Frontasyeva, M. V. and Gundorina, S. F., 2013, *Spirulina platensis* as biosorbent of zinc in water., Environmental Engineering and Management Journal, 12, 1079-1084.