[UCI]I804:24011-200000256727

2012년 2월
석사학위논문

바이오 디젤 생산을 위한 해양 미세조류(*Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis chui, Nannochloropsis oculata*)최적배양에 관한 연구

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 보 람

바이오 디젤 생산을 위한 해양 미세조류(*Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis chui, Nannochloropsis oculata*)최적배양에 관한 연구

Optimization of microalgae (*Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis chui, Nannochloropsis oculata*) culture conditions for biodiesel production

2012 년 2 월 24 일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 보 람

바이오 디젤 생산을 위한 해양 미세조류(*Dunaliella tertiolecta, Tetraselmis chui, Nannochloropsis oculata*)최적 배양에 관한 연구

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2011 년 10 월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 보 람

김보람의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 정 규 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 중 헌 (인)

위 원 조선대학교 교수 신 현 재 (인)

2011 년 11 월

조선대학교 대학원

목 차

List of Figures iv
List of Tables vi
ABSTRACT viii

제 1 장 서론 ..... א

제 2 장 이론 ..... ג

1. 미세조류 ..... ג
2. 미세조류 성장에 영향을 미치는 요소 ..... ד
2.1 광원 ..... ה
2.2 온도 ..... ז
2.3 영양분 공급 ..... ז
2.4 CO_2 공급 ..... ח
3. 바이오 디젤 ..... ט

제 3 장 실험 재료 및 방법 ..... י

1. 미세조류 종류 및 배양방법 ..... י
1.1 미세조류 종류 및 배지 ..... י
2. 배양조건 ..... יב

2.1 전 배양 ..... יב
2.2 광 생물반응기 ..... יג
2.3 광 생물반응기 운전조건 ..... טו
3. 분석방법 ..... זט
3.1 조도 측정 ..... זט
3.2 미세조류의 농도측정 ..... זט
3.3 질산원과 인산원 농도 최적화 ..... זט
3.4 FAMEs(fatty acid methyl ester) 측정 ..... יז
3.5 GC(gas chromatography) 분석 방법 ..... יז

제 4 장 실험결과 ..... יח
1. 우수종 미세조류 선별 ..... יח
1.1 성장율이 우수한 미세조류 선별 ..... יח
2. 광 조건에 따른 미세조류 성장 ..... כ
2.1 조도 ..... כ
2.2 빛 주기 ..... כב
2. CO_2 농도의 영향 ..... כד
2.1 *Tetraselmis chui* ..... כד
2.2 *Dunaliella tertionlecta* ..... כז
2.3 *Nannochloropsis oculata* ..... ל
3. 인산염 농도의 영향 ..... לג
3.1 *Tetraselmis chui* ..... לג

3.2 *Dunaliella tertiolecta* ..... לו
3.3 *Nannochloropsis oculata* ..... לט
4. 질소원 농도의 영향 ..... מב
4.1 *Tetraselmis chui* ..... מב
4.2 *Dunaliella tertiolecta* ..... מה
4.3 *Nannochloropsis oculata* ..... מח
5. 질소원과 인산원 최적농도 ..... נא
6. 반복유가식 배양공정 개발 ..... נז
6.1 *Tetraselmis chui* ..... נז
6.2 *Dunaliella tertiolecta* ..... ס
6.3 *Nannochloropsis oculata* ..... סד
7. 비닐백을 이용한 배양공정 ..... סח
7.1 *Tetraselmis chui* ..... סח
7.2 *Dunaliella tertiolecta* ..... עא

제 5 장 결론 ..... עד

참고문헌 ..... עו

List of Figures

Fig. 1. Factors influencing algae growth ..... ד

Fig. 2. Cell concentration and light transmittance [23] ..... ו

Fig. 3. Transesterification reaction of biodiesel ..... ט

Fig. 4. Three fast growing marine microalgae ..... י

Fig. 5. Seed cultures in illuminated shaking incubator ..... יב

Fig. 6. Phtobioreator design ..... יד

Fig. 7. Bubble−column photobioreactor ..... יד

Fig. 8. Schematic diagram for CO_2 concentration ..... טו

Fig. 9. Cell growth (OD) of seven microalge after 2 weeks culture ..... יט

Fig. 10. Growh curve of (a) *T. chui* , (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* on various light intensity ..... כא

Fig. 11. Growth curve of (a) *T. chui* , (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* on various L:D cycle ..... כג

Fig. 12. Effect of CO_2 concentration on *T. chui* growth ..... כה

Fig. 13. Effect of CO_2 concentration on *D. tertiolecta* growth ..... כח

Fig. 14. Effect of CO_2 concentration on *N. oculata* growth ..... לא

Fig. 15. Effect of phosphate concentration on *T. chui* growth ..... א

Fig. 16. Effect of phosphate concentration on *D. tertiolecta* growth ..... לז

Fig. 17. Effect of phosphate concentration on *N. oculata* growth ..... מ

Fig. 18. Effect of nitrate concentration on *T. chui* growth ..... מג

Fig. 19. Effect of nitrate concentration on *D. tertiolecta* growth ..... מו

Fig. 20. Effect of nitrate concentration on *N. oculata* growth ..... מט

Fig. 21. 3-D response surface of dry cell weight (a) *T. chui*, (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* according the variation of nitrate and phosphate concentration ..... נב

Fig. 22. 3-D response surface of total fatty acid (a) *T. chui*, (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* according the variation of nitrate and phosphate concentration ..... נד

Fig. 23. Repeated fed-batch culture of *T. chui* ..... נז

Fig. 24. Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *T. chui* with the repeated fed-batch culture ..... נח

Fig. 25. Repeated fed-batch culture of *Dunaliella tertiolecta* ..... סא

Fig. 26 . Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *D. tertiolecta* with the repeated fed-batch culture ..... סב

Fig. 27. Repeated fed-batch culture of *N. oculata* ..... סה

Fig. 28. Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *N. oculata* with the repeated fed-batch culture ..... סו

Fig. 29. Use of plastic bag photobioreactor for *T. chui* ..... סח

Fig. 30. *T. chui* growth curve using plastic bag photobioreactor ..... א

Fig. 31. Use of plastic bag photobioreactor for *Dunaliella tertionlecta* ..... עא

Fig. 32. *D. tertiolecta* growth curve using plastic bag photobioreactor ..... עב

List of Tables

Table 1. Composition of F/2 and F/2−si media ..... יא

Table 2. Effect of CO_2 concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... כו

Table 3. Effect of CO_2 concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... כט

Table 4. Effect of CO_2 concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty ..... לב

Table 5. Effect of phosphate concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... לה

Table 6. Effect of phosphate concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... לח

Table 7. Effect of phosphate concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... מא

Table 8. Effect of nitrate concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... מד

Table 9. Effect of nitrate concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... מז

Table 10. Effect of nitrate concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty acid and oil content ..... נ

Table 11. Estimated regression coefficients for dry cell weight (*T. chui*, *D.tertiolecta*, *N. oculata*) ..... נג

Table 12. Estimated regression coefficients for total fatty acid (*T. chui*, D.tertiolecta, *N. oculata*) ..... נו

Table 13. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *T. chui* on repeated fed−batch culture ..... נט

Table 14. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *D. tertiolecta* on repeated fed−batch culture ..... סג

Table 15. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *N. oculata* on repeated fed–batch culture ..... סז

Table 16. Biomass productivity, fatty acid weight and oil content of *T. chui* on plastic bag photobioreactor ..... ע

Table 17. Biomass productivity, fatty acid weight and oil content of *D. tertiolecta on plastic bag photobioreactor* ..... עג

ABSTRACT

Optimization of microalgae(*Tetraselmis chui, Dunaliella tertiolecta, Nannochloropsis oculata*)culture conditions for biodiesel production

Kim, Bo-ram
Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, Ph.D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

Recently, there is a growing interest in microalgae and the use of microalgae focused on the production of various high valued metabolites used for food, pharmaceuticals, and cosmetics. The rate of depletion of fossil fuels and the effect of greenhouse gas emissions on global climate change evoke much interest in biodiesel.

Microalgae have been issued much more as the factory for biodiesel production due to their several potential advantages ; high yield of neutral lipid/oil as 20-50%, high growth rate, viability in extremely arid condition, doing major roles in wastewater treatment, removers of carbon dioxide and producers of valued chemicals and much higher biomass production in a suitable vessel compared to those of terrestrial plants in the same area.

In this study, three species of marine microalga *Tetraselmis chui, Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis oculata* were cultured to investigate three

important growth factors such as CO_2 concentration, light intensity and light-cycle. The cell growth rate, biomass productivity, oil content and fatty acid composition of *T. chui*, *D. tertiolecta* and *N. oculata,* candidates for biodiesel production were measured using 1L photobioreactor. The productivity of cell mass and oilcontent increased with repeated fed-batch culture.

The optimal conditions for cell growth and oil production at 23℃, light intensity 110μmol/m^2/s, and light cycle 14:10(L:D), it was transferred to 1L photobioreactor its medium composition was F/2-Si × 3 medium. And filtered air containing 2% CO_2 was injected into the conical bottom part of the photobioreactor at a constant flow rate of 1vvm.

The repeated fed-batch system was adopted to increase the cell mass and oil content productivity for 2 weeks. The cell was harvested every other days. Biomass productivity and oil content of *T. chui* were 0.415 g/L/day and 0.170 g/L, respectively. Those of *D. tertiolecta* were 0.478 g/L/day and 0.173 g/L, respectively.

Key word: Microalgae, culture optimization, biodiesel, lipid contents, fatty acid, repeated fed-batch

제 1장 서론

최근 석유나 석탄과 같은 화석연료의 사용량이 점점 증가함에 따라 대기 중의 이산화탄소의 농도가 지속적으로 증가하고 있다. 또한, 세계는 피크오일(석유생산이 정점에 다다른 상태) 가능성 및 기후의 급격한 변화 등이 주요한 의제로 대두됨에 따라서 환경과 성장이 조화된 신재생 에너지 정책을 통한 녹색성장을 추구하고 있다[1-4]. 우리나라는 석유와 석탄 등의 화석연료 에너지의 97%를 수입에 의존하고 있으며, 화석연료의 소비비중도 83%에 이르고 있어 향후 석유화가 시급하다. 우리나라의 에너지 자급율은 4.2%에 불과해 다른 나라에 비해 현저히 낮은 수준이며 신재생에너지 개발 분야 또한 낮은 수준이다.

이러한 환경변화 속에서 우리나라는 저탄소 녹색성장에 기반을 둔 신재생에너지 사업과 에너지 효율성 재고를 통한 녹색성장 전략을 추진하고 있다. 신재생에너지 사업의 일환으로 삼면이 바다인 우리나라의 특성상 국내에서 생산이 유리한 해양 미세조류 배양을 통하여 바이오 디젤을 생산하기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다[3]. 바이오 디젤은 주로 각종 농작물, 동물성 유지 및 조류의 지질로부터 얻어지는데, 이 중에서도 미세조류는 바이오 디젤을 위한 가장 높은 수율의 공급원으로 보고되어 왔다. 또한, 미세조류를 이용한 바이오 디젤 생산이 다른 작물을 이용한 바이오 디젤 생산에 비하여 친환경적이고 경제적 지속성을 갖는 것으로 알려졌다[5-6].

미세조류는 식물과 마찬가지로 광합성에 의해 이산화탄소, 물, 태양에너지를 이용하여 유기물을 합성하지만, 식물에 비하여 증식속도가 빠르고 다양한 종류의 유용물질을 생산할 수 있다. 특히 미세조류는 식용자원이 아니기 때문에 연료로 사용하는데 있어서 규제를 피할 수 있는 에너지원으로서의 장점을 가지고 있다[2,7,8,9]. 특히, Yusuf 등(2007)은 문헌을 통하여 미세조류 바이오 디젤 생산의 우수성을 제시하였다. 바이오 디젤을 생산하는 작물의 단위면적당 지방 수율을 비교하였을 때, 미세조류는 옥수수의 300 배 이상, 팜유의 9 배 이상의 지방을 생산하여 뛰어난 생산성을 가지고 있으며, 거의 연중 내내 생산할 수 있어 지속적인 바이오 연료 공급이 가능하며 바이오 디젤의 생산과 동시에 이산화탄소를 제거할 수 있어 환경문제 해결에도 도움이 되는 장점을 가지고 있다[12].

해양 미세조류는 30-70 %까지 사용 가능한 유지성분을 함유하고 있으며, 다른 육상생물과 달리 육상식물의 생산면적의 3 %만으로도 동일한 생산성을 보이고 있어 공간적 제약이 적고, 성장률이 매우 높다. 해양 미세조류를 이용하는 경우 염의 농도가 높은 극한 환경에서도 바이오 디젤의 생산이 가능하다. 특히, 우리나라는 삼면이 바다인 해조류 생산국이며, 육상보다 재배 가능 면적이 넓어 해양 미세조류 재배가 바이오 디젤의 생산 및 이산화탄소 감축을 위한 방안으로 떠오르고 있다[13].

본 연구에 사용한 *Tetraselmis chui, Nannochloropsis oculata* 와 *Dunaliella tertiolecta* 종 모두 극한 환경조건에서도 성장할 수 있어 오염에 의한 생산성 감소 등의 문제가 없어 바이오 연료로서의 장점을 갖추고 있다[2]. 대량배양을 위해서는 조류의 성장 및 지질의 함량을 증가시키는 환경 요인으로 배양에 영향을 미칠 수 있는 인자로서 빛(light intensity, light quality), 기체의 전달(이산화탄소, 산소), 배지, 온도, 효율적인 광 생물 배양장치 등에 대한 최적화를 통한 효율적인 배양 장치 및 방법이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 바이오 디젤 생산을 위해 3 종의 해양 미세조류를 다양한 성장 조건에서 배양하여 높은 세포 성장과 양질의 바이오 디젤 지방산 (C_{16}, C_{18})을 함유한 최적 조건을 찾아 조류 대량배양의 최적화 공정을 확립하고자 한다.

제 2장 이론

1. 미세조류

미세조류는 태양 에너지를 이용하여 광합성을 하여 공기중의 이산화탄소를 유용한 바이오 매스로 전환하는 해양 생명체이다. 해양 미세조류 배양을 통하여 고부가가치 의약품, 색소, 탄수화물, 그리고 정밀화학약품 등을 생산할 수 있으며 폐수처리와 농업 분야에의 응용뿐만 아니라 이산화탄소 감축 및 바이오 연료생산에까지 그 이용범위가 점차 확대되고 있다[11,15,16].

미세조류는 광합성을 통하여 성장하고, 성장한 미세조류가 70 %이상 지방의 함유하면 기존 바이오 디젤의 원료로 쓰이는 옥수수의 300 배 이상, 팜유의 9 배 이상의 생산효율을 가지며, 다른 유지 식물처럼 식용으로 쓰이지 않아 지속적으로 사용 가능하여 고갈될 위험이 없는 장점을 가진다. 또한, 광합성을 통한 CO_2 흡수량이 육상식물의 비해 높아 대기 중 CO_2 를 저감하는 효과가 높아 지구온난화 등 환경적인 문제를 해결할 수 있다. 다른 유지 작물과는 달리 광대한 부지를 필요로 하지 않으며, 식물과 비교했을 때 상대적으로 높은 광 전환 효율을 가지고 있어 증식속도가 매우 빠르고 많은 종들이 지질 함량에 있어서 뛰어난 특성을 보이므로 석유 유래의 디젤을 완전히 대체할 수 있는 가능성을 지닌 바이오 디젤 원료로 인식되고 있다[17].

미세조류는 최적 온도, CO_2 농도, 배지 조성, 조도 등에서 건조 세포 중량의 20-70 % 이상의 지방산을 생산할 수 있기 때문에 바이오 디젤의 원료로 주목을 받고 있다[14,15,18]. 또한, 1 개의 세포 안에 지질, 단백질과 탄수화물, 비타민, 무기질, 식이섬유 등 영양소가 고루 포함하고 있어 지질을 추출하고 남은 바이오 매스를 이용하여 유용한 물질을 추출할 수 있다[14,19,20].

2. 미세조류 성장에 영향을 미치는 요소

미세조류를 상업적으로 이용하기 위해서 세포의 생장이나 생산하고자 하는 산물의 최대생산 조건을 고려해야 한다. 미세조류의 생물학적 특성인 세포의 생장주기, 생장속도, 생산하고자 하는 산물의 생산속도, 유전적 안정성, 영양분의 요구를 고려하여야 하며, 고농도의 대량배양이 가능한 광 생물반응기의 선택과 디자인이 가장 중요하다. 고농도 배양을 위한 고찰 자로서는 효율적인 광원과 광 에너지의 공급, CO_2 의 효율적인 공급, CO_2 의 제거, 배지의 공급, 혼합, 온도, pH 등이 있다[21] (Fig. 1).

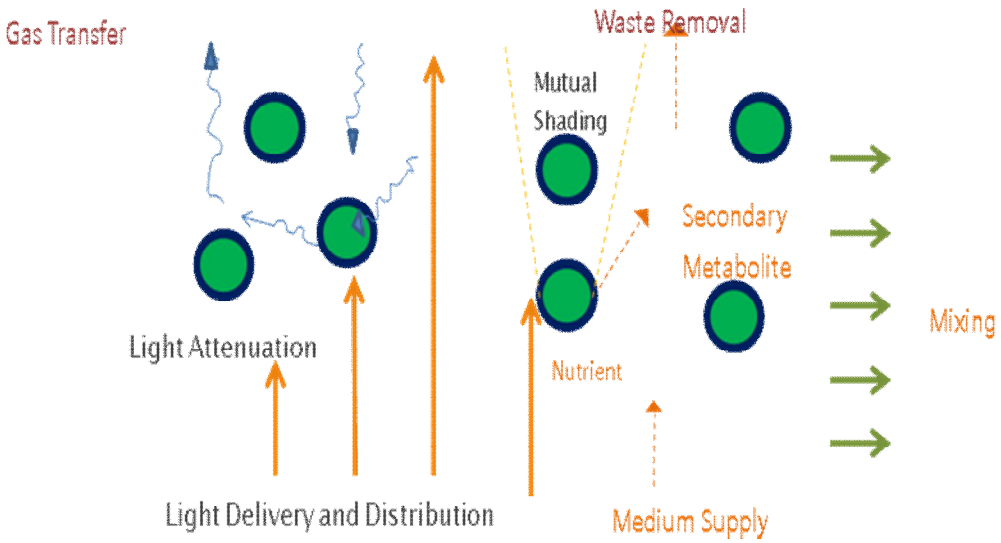


Fig. 1. Factors influencing algae growth.

2.1 광원

모든 생물은 주어진 환경에서 성장하기 위해 에너지원이 있어야 하는데 미세조류는 에너지원으로 빛을 이용한다. 에너지원인 빛의 효율적 공급을 가능하게 하는 반응기의 디자인과 제작은 미세조류 성장에 영향을 미치게 되며 미세조류의 성장속도는 상업적으로 중요 요소이다. 또한 광원의 선택 시에 광 에너지의 파장과 광도를 반드시 고려해야 한다[22-24].

광합성은 주로 400-700 nm(photo synthetically active radiation)의 파장의 광 에너지를 이용하여 가능하며, 이 중에서도 미세조류마다 선택적으로 효율적인 파장이 존재하므로 광원이 발산하는 광 에너지의 파장을 고려해야 한다. 미세조류 배양에 사용될 수 있는 광원으로서는 자연광, 텅스텐램프, 제논 램프, 형광등, 발광다이오드(Light emitting diode), 레이저 등이 사용될 수 있다[25].

광원으로부터 발산되는 광도 역시 중요한 인자이다. 광도가 높고 낮음에 따라 미세조류의 세포내의 화학적 성분, 지방의 함량과 광합성 효율이 변화한다. 미세조류는 광 에너지에 대해 특정 광도까지는 광도가 증가함에 따라 세포의 성장도 같이 증가하게 되지만, 일정광도가 넘게 되면 오히려 세포의 성장에 저해되어 세포의 농도가 감소하게 된다[21,26]. 따라서 세포의 농도에 따라 혹은 반응기 내에 공급되는 광도를 적절히 조절하여 고농도 배양을 유도해야 한다. 또한, 미세조류가 가진 광합성 안테나는 매우 효율적이고 정밀하여, 모든 광 에너지를 흡수하려는 성질이 있어, 세포의 농도가 증가함에 따라 급격히 광 투과도가 떨어져 광 에너지가 적절히 반응기 내에 분포하지 못하는 현상이 발견될 수 있다[22] (Fig. 2).

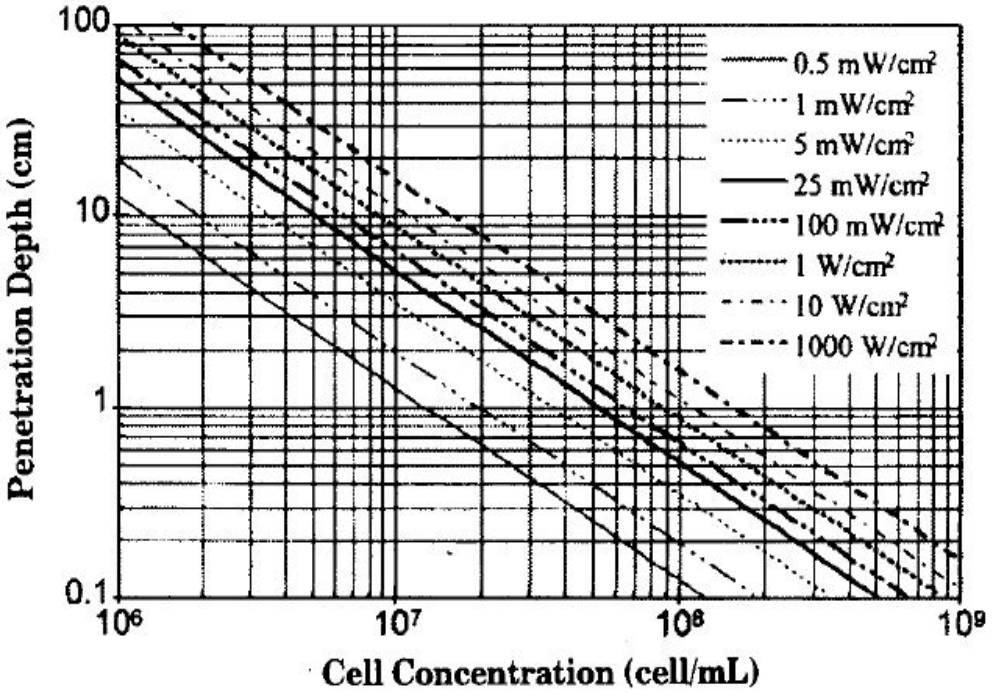


Fig. 2. Cell concentration and light transmittance [23].

2.2 온도

미세조류를 closed system 이나 open system 에서 배양할 때, 가장 중요한 제한 요소 중의 하나는 온도이다. 조류들의 최적 성장 온도는 15-26 ℃이며, 23 ℃에서 최대 세포농도를 얻을 수 있다고 보고 되었다[43,44]. 대부분의 조류는 자신이 성장할 수 있는 적정 온도보다 낮은 온도에서는 어느 정도 견딜 수 있지만, 2-4 ℃ 정도 높은 온도에서는 견딜 수 없다. 또한, closed system 에서 배양할 때, 날씨가 더워지면 over-heating 의 문제가 생길 수 있으므로 배양 system 안에 cooling system 을 갖춰 온도를 20-26 ℃로 유지하는 것이 중요하다[27,28].

2.3 영양분 공급

영양 성분의 공급은 광합성 생물의 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[33-36]. 특정 성분의 과잉이나 부족은 세포의 성장을 억제할 수 있으므로 적정양의 성분이 함유되어야 한다.

질소원의 농도는 조류의 성장에서 중요한 요소이면서 세포내 지질의 함량을 변화시킬 수 있다고 보고되었다[37-38]. *N. oculata* 와 *C. vulgaris* 은 배지의 질소원의 농도가 75 %로 감소되었을 때, 지질의 함량이 증가 하였다[9,28]. 지방의 함량은 배지의 영양성분이 고갈 되었을 때, 증가하였고 모든 세포 성분의 성장속도는 낮아졌으나, 세포가 지질 축적을 하여, 지방의 함량은 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었다[39].

미세조류의 성장에 따라 영양성분이 고갈되어 세포성장이 중단되므로 지속적으로 배양액을 주입하여 영양성분을 새로 공급하는 연속배양(continuous culture)방식으로 배양하여 세포의 성장을 촉진시켜 고농도의 세포를 얻을 수 있다.

2.4 CO_2 공급

미세조류가 광자를 에너지원(photoautotrophically)으로 사용하여 성장할 때에는 CO_2는 세포가 공급받을 수 있는 유일한 탄소원이다[17,29]. 따라서, CO_2의 효율적인 공급은 세포의 성장에 있어 중요한 영양 인자이다. 공기를 미세조류 배양에 사용하게 된다면, 대기 중에 포함된 CO_2는 대략 0.03 %이며, 이 농도로는 빠르게 성장하는 미세조류에 충분한 탄소원을 공급할 수 없다. 세포는 탄소원이 부족하게 되므로 추가적인 CO_2의 공급은 필수적이다[30]. 하지만, 특정 CO_2 이상에서는 세포는 오히려 성장에 저해를 받게 된다[23]. 일반적으로 미세조류는 종에 따라 다르지만, 2-15 %의 CO_2 농도로 배양하는 것이 일반적이다. 광 생물반응기를 이용하여 미세조류 배양 시에는 공기공급 장치를 이용하여 기체 상태로 CO_2를 공급하게 된다[31].

상업적으로 쉽게 구입 할 수 있는 CO_2를 사용하게 된다면, 상당히 경제적인 면에서 높은 비중을 차지함으로 최근에는 화석연료의 연소로부터 발생되는 연소가스를 이용하여 미세조류의 고농도 배양에 관한 연구가 활발히 진행 중이다.

공기공급 장치를 통해 공급된 CO_2는 가스 상태이며, 배양액과의 머무름 시간에 의해 용존되는 CO_2의 농도는 달라질 수 있다. 따라서 광 생물반응기에 가스 공급 시에는 기포의 크기와 기포의 공급속도, 압력 등을 고려하여 공급 해야 한다[32].

3. 바이오 디젤

바이오 디젤은 기름과 지방을 알코올과 화학적으로 반응시켜 얻어지는 지방산 알킬에스터(fatty acid alkyl ester, FAAE)를 말한다. 이와 같이 화학적 변환을 통해 얻어진 에스터는 석유계의 디젤유와 혼합해서 사용된다. 석유유래 디젤에 비해 비용은 높고 기존의 페트로 디젤과 성질이 매우 유사하여 성능은 비슷하지만, 비교적 점도가 낮고 산소함유량이 높고 유황성분과 방향족탄화수소가 전무하여 인체에 유해한 가스 배출을 절감할 수 있다. 또한 생태계에 유출되어도 자연 분해될 뿐만 아니라 발화점이 높아서 운송과 저장 시 보다 안전하고 친환경적인 청정연료이다[40].

기름과 지방은 기본적으로 물에 녹지 않으며 식물이나 동물체내에 존재하는 소수성 물질이며, 한 분자의 glycerol 에 세 분자의 지방산이 연결되어있는 형태를 갖기 때문에 triglyceride 라고 불린다[41].

식물성 기름은 90-98 %의 triglyceride 와 소량의 mono-, 그리고 diglyceride 를 포함하고 있다. 식물성 기름을 디젤엔진연료로 사용하기 위해서는 이들이 갖는 여러 가지 문제점인 높은 점도, 산화도, 유리 지방산의 농도 등의 문제를 해결해야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위한 여러 가지 공정 중에 hydrolysis 와 유사한 transesterification 은 ester 에 붙어있는 alcohol 을 다른 alcohol 로 치환하는 공정은 triglyceride 의 점도를 낮추기 위해 널리 사용된다(Fig. 3). 일반적으로 바이오 디젤 생산공정은 유지에 알코올과 촉매를 첨가한 후 진행되는 전이에스테르화 공정과 생성물을 분리하기 위한 침강, 정제 및 증발단계로 구성되며 전이에스테르화 반응 후에는 부산물로서 발생되는 글리세린은 반응 후 침강조에서 비중차이로 분리된다[42].

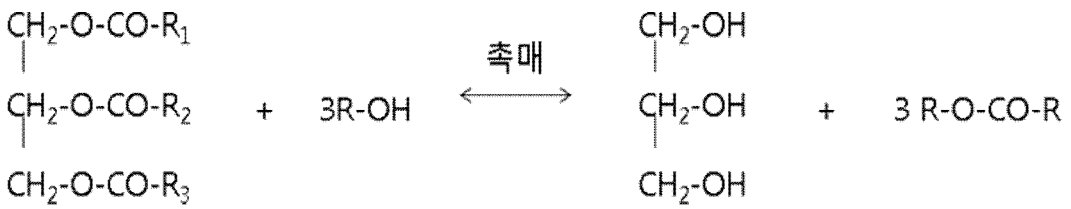


Fig. 3. Transesterification reaction of biodiesel.

제 3 장 실험 재료 및 방법

1. 미세조류 종류 및 배양방법

1.1 미세조류 종류 및 배지

본 연구에서 이용된 미세조류 *Tetraselmis chui* 와 *Dunalella teriolecta* 은 인하대학교 이철균교수님 연구실에서 분양을 받았으며, *Nannochloropsis oculata* 종은 한국해양미세조류은행에서 분양받았으며, *Phaeoductylum tricornutum, Tetraselmis suecica, Nannochloropsis oceanica* 와 *Chaetoceros gracilis* 은 에코파이텍에서 분양 받았다. 균주 사진(Fig. 4)이고 배지 조성은 Table 1 에 나타내었으며 배지는 고압멸균기에서 121 ℃, 15 분간 멸균한 후 사용하였다.

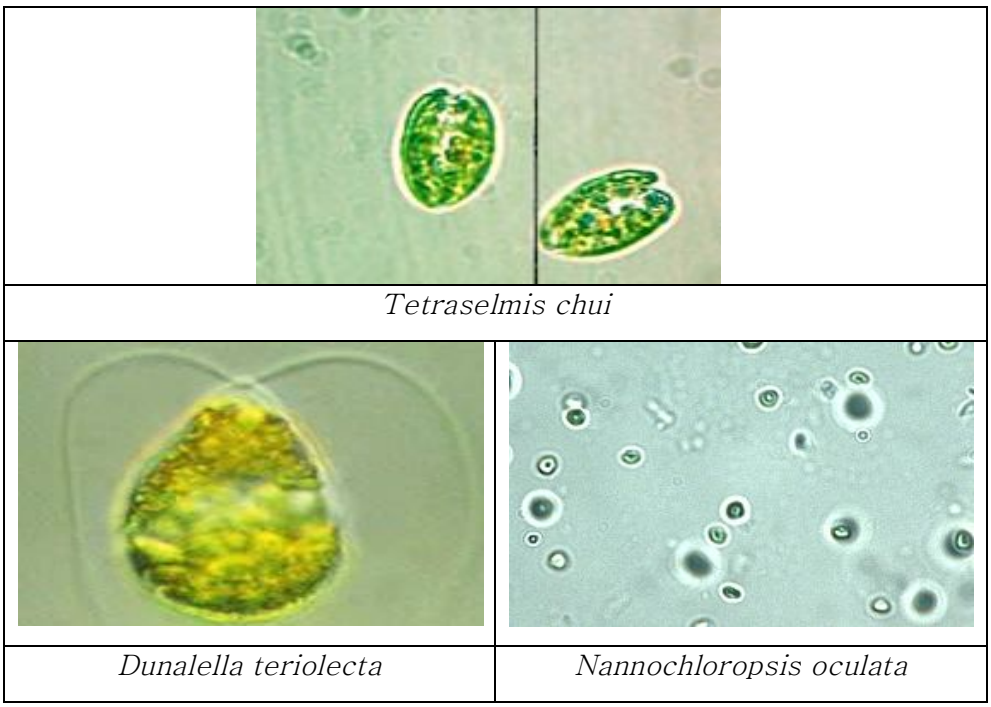


Fig. 4. Three fast growing marine microalgae
(*Tetraselmis chui, Dunalella teriolecta, Nannochloropsis oculata*).

,

Table 1. Composition of F/2 and F/2-si media

F/2 배지		
950ml filtered seawater add + stock solution		
$NaNO_3$	75g/L H_2O	1ml
NaH_2PO_4 $4H_2O$	5g/L H_2O	1ml
Na_2SiO_3 $9H_2O$	30g/L H_2O	1ml
f/2 trace metal solution		1ml
f/2 vitamin solution		0.5ml
final volume 1.0 L using seawater and autoclave.		
* F/2 trace metal solution		
950ml distilled H_2O + stock slution.		
$FeCl_3$ $6H_2O$	3.15 g	
Na_2EDTA $2H_2O$	4.36g	
$CuSO_4$ $5H_2O$	9.8g/L H_2O	1ml
Na_2MoO_4 $2H_2O$	6.3g/L H_2O	1ml
$ZnSO_4$ $7H_2O$	22g/L H_2O	1ml
$CoCl_2$ $6H_2O$	10g/l H_2O	1ml
$MnCl_2$ $4H_2O$	180g/l H_2O	1ml
* F/2 Vitamin Solution		
Vitamin B_{12}	1 g/L	1 ml
Biotin	0.1 g/L	10ml
Thiamine HCl	200 mg	
final volume 1.0L with H_2O . Filter sterilize into Plastic vials and store in refrigerator.		

.→ F/2 -si 배지는 F/2 배지에서 Na_2SiO_3 $9H_2O$ 를 뺀 배지.

2. 배양조건

2.1 전 배양

P. tricornutum 와 *C. gracilis* 균주는 100 ml 의 F/2 배지, *T. chui, T. suecica N. oceanica, N. oculata* 와 *D. tertiolecta* 균주는 100 ml 의 각각 균주에 맞는 배지인 F/2 와 F/2-si 배지가 함유된 300 ml 용량의 삼각플라스크에 각 배양액의 10 %(v/v)을 접종하였다. 접종한 균주들은 온도, 빛의 주기, 조도, 해수에 따라서 형광등을 장착한 illuminated shaking incubator 에서 110 rpm 으로 약 2 주일 동안 진탕 배양 하였다. CO_2 와 pH 는 조절하지 않았다(Fig. 5).

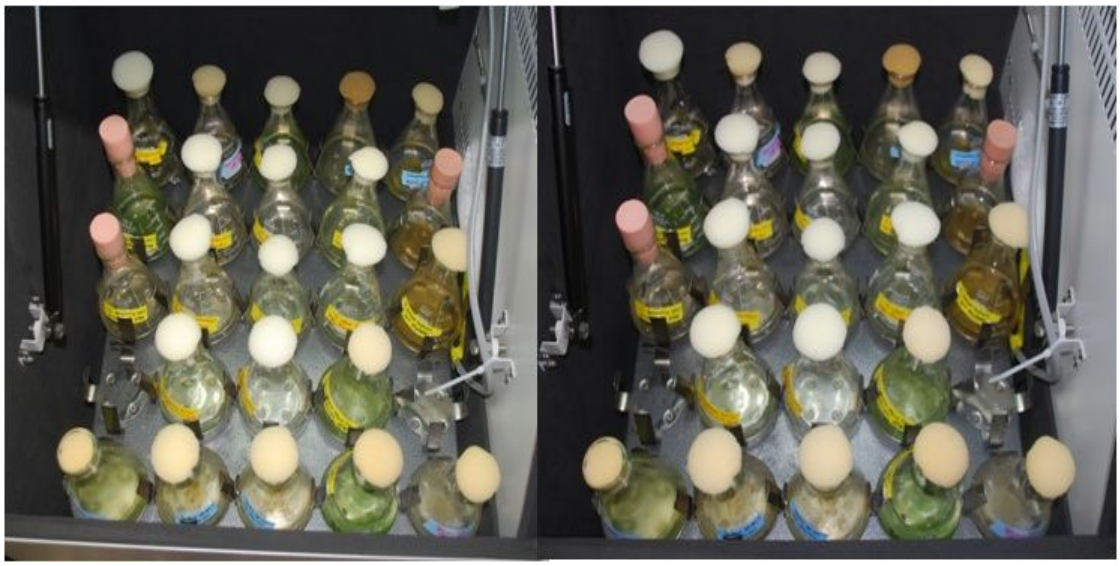


Fig. 5. Seed cultures in illuminated shaking incubator.

.

2.2 광 생물반응기

영향인자에 따른 세 종 *T. chui, N. oculata* 와 *D. tertiolecta* 의 성장 정도를 비교하기 위한 광 생물반응기 시험 시스템을 구축하였다.

미세조류의 배양장치 중 효과적인 멸균이 가능하고 고농도 배양을 할 수 있는 S/V 비를 가지고 효율적인 기체의 전달이 가능하기 때문에 미세조류 배양에 가장 흔히 쓰이는 관형(tublar) 광 생물반응기를 제작하였다. 일반적인 영향인자 실험을 위해서 반응기의 재질은 유리(pyrex-glass)로 제작하였다. 재질의 영향과 반응기 원가 절감을 위해 비닐백 반응기도 제작하여 실험을 진행하였다.

유리 광 생물반응기 구경은 75 mm, 높이는 350 mm로 제작하였으며, 반응기 위부분은 sampling port 와 온도와 pH sensor 를 꽂을 수 있게 설계하였다. 공기 주입시 박테리아 등의 오염을 막기 위해 air pump 와 반응기를 연결시켜주는 실리콘 튜브에 0.2 μm 필터를 장착하였으며 반응기 바닥부분에는 sintered-glass 를 사용하였다. 반응기 시험 시스템의 공정도(Fig. 6)와 설치된 광 생물 반응기 사진이다(Fig. 7).

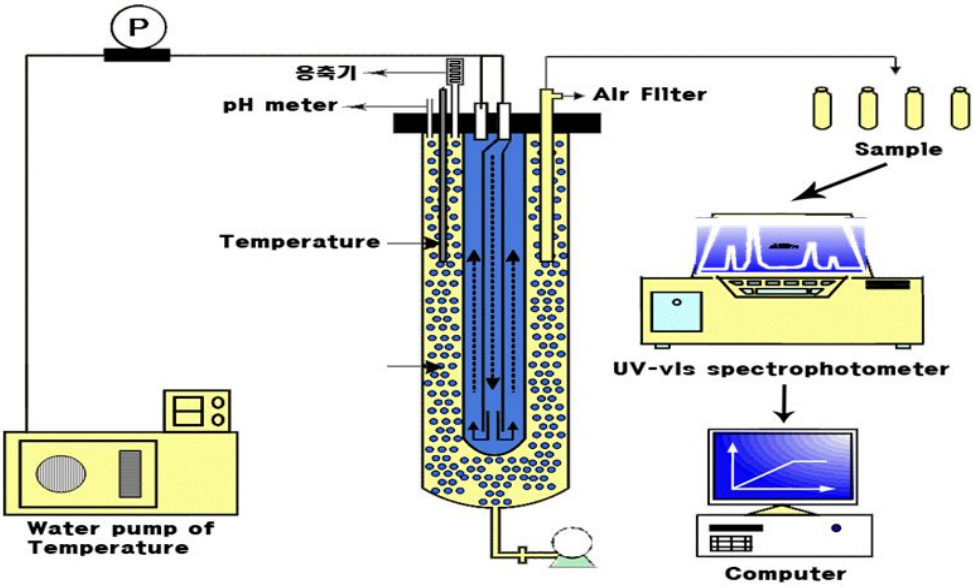


Fig. 6. Phtobioreator design.

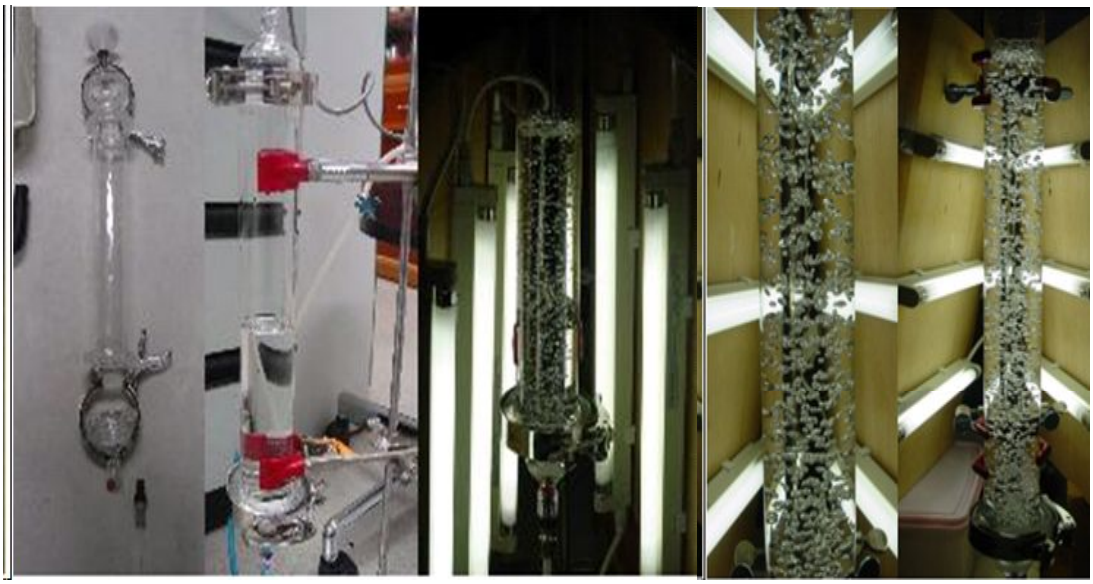


Fig. 7. Bubble-column photobioreactor.

2.3 광 생물반응기 운전조건

CO_2 농도는 air 와 CO_2 의 유량을 제어(Mass Flow Controller)로 이산화 탄소의 농도를 조절하였다. 본 연구에서는 이산화탄소 농도 1, 2, 5 %으로 유지하였으며, 1 vvm 의 유속으로 공급하였다.

직접 제작한 구경 75 mm, 높이 350 mm 인 광 반응기에 배지를 1 L 씩 넣고 *T. chui, N. oculata, D. tertiolecta* 은 배지의 10 %(v/v)를 접종하였다. 배지는 2% 해수 F/2-s5i 배지를 사용하였고 접종한 균주의 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 $\mu mol/m^2/s$ 로 유지시키고 CO_2 의 농도를 2 %로 하여 1 vvm 의 유속으로 공급하여 배양하였다(Fig. 8).

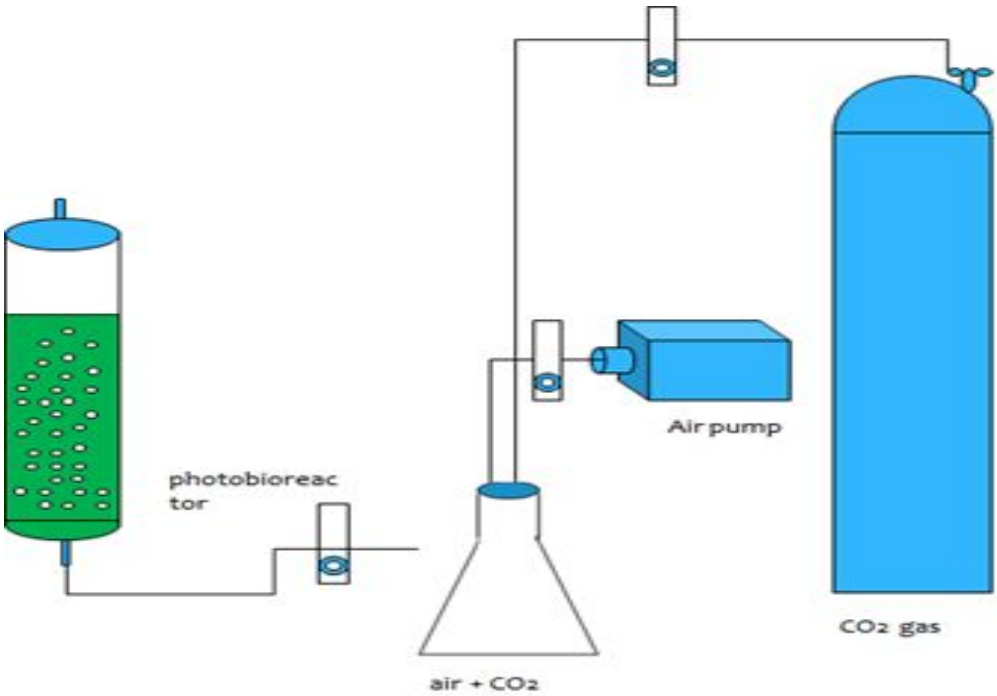


Fig. 8. Schematic diagram for CO_2 concentration.

3. 분석방법

3.1 조도 측정

반응기 표면에서 빛의 조도는 조도계(HD2102.2, DELTA OHM Inc., Italy)를 이용하여 측정하였다. 반응기 안의 평균 빛의 조도는 정확하게 측정될 수 없기 때문에 반응기 안쪽 앞, 뒤, 좌, 우 부분의 다른 위치에서 조도를 측정하였으며, 이들의 위치는 반응기의 수직 축을 따라 균등하게 위치한 수직면들의 점이었다. 평균 빛의 조도는 모든 측정값의 가중평균으로 계산하였다.

3.2 미세조류의 농도측정

미세조류의 농도는 분광광도계(Ultraspec 2100 pro, Biochrom Inc., England)를 사용하여 흡광도 680 nm 에서 측정하였다.

균체 건조량은 배양한 시료 50 ml 을 원심분리기(Mega 17R, Han-il Inc., Korea)를 이용해서 8000 rpm 에서 10 분간 원심분리하여 증류수로 3 회 세척한 후에 분리한 농축액을 건조기에서 60 ℃에서 24 시간 건조해서 측정하였다.

3.3 질산원과 인산원 농도 최적화

미세조류 성장에 주요한 요소인 질소원과 인산원의 양을 최적화하기 위해서 F/2-si 배지의 $NaNO_3$ 75 g/L 과 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 의 stock solution 의 양을 0, 1.5, 3, 6 ml 로 조절하여 세포의 성장과 생산된 지질의 함량의 변화를 측정하였다.

질산원과 인산원의 최적 농도를 추정하기 위해 질소원의 농도와 인산원의 농도를 독립 변수(X_1, X_2)로 하고, 배양 결과 생산되는 건조 균체량(dry cell weight, DCW)와 total fatty acid 를 종속변수(Y)로 하였으며, 식 3-3-1 의 반응다항 2 차 모형으로 적합하여 Y 값이 달라지는 값을 예측하였다(SigmaPlot version 10.0).

$$Y = Y_0 + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_2^2 + eXY \qquad (3-3-1)$$

실험결과는 Sigma plot 을 이용하여 통계적으로 분석하였으며(SigmaPlot version 10, Systat Software), 분석결과는 각 균주의 배지의 질산원의 농도와 인산원의 농도의 실험 결과로 부터 얻은 값으로 가상의 실험조건인 반응표면을 형성시키며, 이를 다항 이차식으로 근사하고 최적의 실험결과를 도출하여 최적의 예상 실험조건을 찾았다.

3.4 FAMEs(fatty acid methyl ester) 측정

각 조건 별로 배양한 균주를 동결건조 한 sample 10 mg 을 acetyl chloride 와 methanol 이 1:20 으로 섞인 용액을 2 ml 넣어 잘 녹인 후, internal standard 로 $C_{19:00}$ 을 0.05 ml 넣는다. 1 분간 sonication 한 후, 내부를 질소로 치환하여 테프론으로 잘 밀봉하여 1 시간 동안 oven 이나 초자건조기에서 100 ℃ 암반응 한다. 상온에서 30-40 ℃로 냉각 후, tube 에 옮기고 hexane 1 ml 을 넣어 깨끗이 옮기고 1 분간 섞는다. 다시 증류수 1 ml 넣고 30 초간 섞고 5 분간 원심분리한다. 이 후, 상부 맑은 용액에 탈수제인 Na_2SO_4 를 첨가한 후 filtering 하여 GC 분석을 하였다.

3.5 GC(gas chromatography) 분석 방법

분석용 컬럼은 DB-Wax(0.25 μm, 60.0 m, 0.25 m)을 사용하고, flame ionization detecter(FID)를 사용했다. Injector 는 250 ℃, Detector 는 260 ℃로 설정하고 injection mode 는 split mode 로 설정하였다. column 초기온도는 140 ℃로 설정하고 250 ℃ 까지 2 ℃/min 으로 실행한다. 네 종류의 fatty acid(palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid)를 표준 물질로 사용하였다.

제 4 장 실험결과

1. 우수종 미세조류 선별

1.1 성장율이 우수한 미세조류 선별

바이오 디젤 생산에 적합한 미세조류 종을 찾기 위해서 해양 미세조류 중 대표적인 7 종 중에서 300 ml 삼각플라스크에 각각의 배지를 100 ml 씩 넣고 배지의 10 %(v/v)를 접종하였다. 접종한 균주들은 온도, 빛의 주기, 조도, 해수에 따라서 형광등을 장착한 illuminated shaking incubator 에서 110 rpm 으로 약 2 주일 동안 진탕 배양 하였다(Fig. 2). CO_2 와 pH 는 조절하지 않았다. 플라스크 배양 결과 *N. oculata* 의 성장율이 가장 높았으며, 나머지 다섯 종의 종류의 미세조류 성장은 비슷하게 나타났으며, *C. gracilis* 의 경우에는 성장 속도가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 9). 위 결과에서 높은 성장 속도를 보인 *T. chui, N. oculata* 와 *D. tertiolecta* 세 종의 녹조류 균주를 위주로 성장 최적화를 위한 실험을 진행하였다.

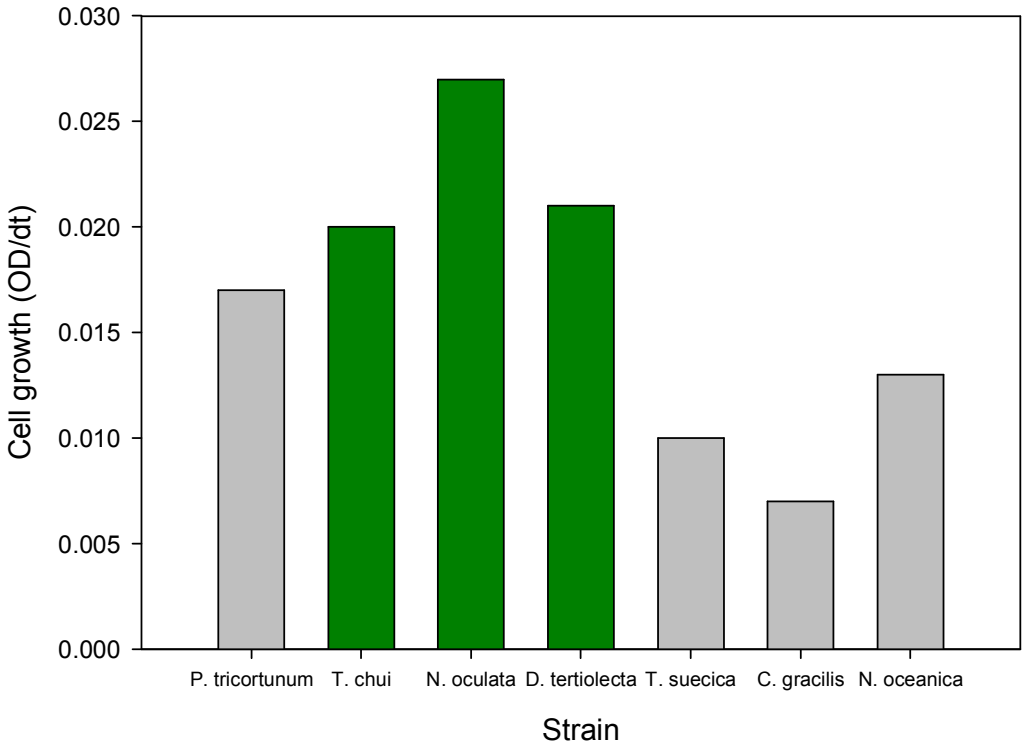


Fig. 9. Cell growth(OD) of seven microalge after 2 weeks culture.

2. 광 조건에 따른 미세조류 성장

2.1 조도

성장속도가 우수한 *T. chui, N. oculata, D. tertiolecta* 를 100 ml 의 완도해수 F/2-si 배지가 함유된 300 ml 용량의 삼각플라스크에서 seed culture 를 하였다. 배양온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (L:D cycle)로 하였다. 세 종의 조도의 영향을 관찰하기 위해서 세가지 다른 조도 값인 30, 70, 110 $\mu mol/m^2/s$ 로 실험하였다. 세포성장속도를 UV/Visible spectrophotometer 를 이용하여 OD(optical density) 680 nm 의 흡광도를 측정하였다.

세 종의 균주 중에서는 *N. oculata* 가 30, 70, 110 $\mu mol/m^2/s$ 의 세 조도에서 가장 빠른 속도로 증식 되었고 *D. tertiolecta* 는 3 종 중에 가장 느린 속도로 성장하였다. 세 종 모두 각 조도에서 배양한지 약 일주일 이내인 3-5 일에 가장 빠르게 성장하였으며 시간이 지날수록 성장속도가 점점 느려진다(Fig. 10). 이는 조류들이 광합성을 하여 개체의 성장에 필요한 CO_2 는 감소하고 광합성의 생산물인 O_2 의 증가에 의한 것으로 생각된다. 이는 CO_2 의 주기적인 공급을 통해 개선할 수 있을 것으로 보여진다.

세 종 모두 다 조도가 증가함에 따라 높은 성장률이 관찰되었으며, 실험한 조도 중에 가장 높은 조도인 110 $\mu mol/m^2/s$ 에서 가장 높은 성장률을 얻었고, 가장 낮은 조도인 30 $\mu mol/m^2/s$ 에서는 빛이 제한되어 낮은 성장률을 얻었다.

한편 본 실험에서는 광원 개수의 부족으로 인해 매우 높은 수치의 조도 실험은 수행하지 못하여 빛의 포화상태에서의 균체의 성장 정도를 비교할 수는 없었으나, 조도에 따라서 균체의 배양에 영향을 미칠 수 있음을 확인 할 수 있었다.

위 실험을 토대로 하여, 세 종류의 균주 모두 110 $\mu mol/m^2/s$ 에서 가장 높은 성장률을 보여, 광 반응기 실험에서는 최적 조도를 110 $\mu mol/m^2/s$ 로 하여 실험을 진행하였다.

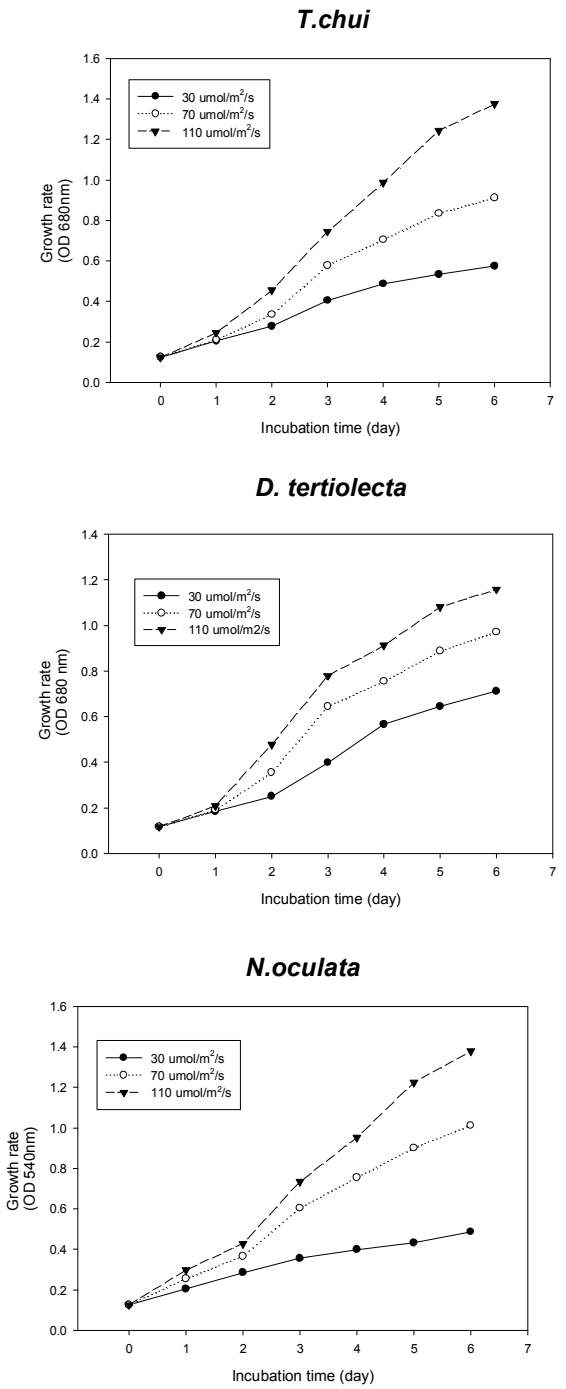


Fig. 10. Growth curve of (a) *T. chui* ,(b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* on various

light intensity.

2.2 빛 주기

빛의 주기에 따른 세포의 성장을 조사하기 위하여 빛의 주기를 다양하게 바꾸어 실험을 하였다. *T. chui, N. oculata* 와 *D. tertiolecta* 균주는 100 ml 의 완도해수 F/2-si 배지가 함유된 300 ml 용량의 삼각플라스크에 각 배양액의 10 %(v/v)을 접종하였다. 온도 23 ℃, 조도는 110 μmol/m^2/s 로 빛 주기는 암반응(0:24 hr), 8:16 hr, 14:10 hr, 16:8 hr, 명반응(24:0 hr) 5 가지로 나누어서 photobioreactor 에서 생장을 시켜 UV/Visible spectrophotometer 를 이용하여 OD(optical density) 680 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

T. chui, N. oculata 와 *D. tertiolecta* 세 종의 성장속도는 빛 에너지의 공급이 전혀 이루어지지 않은 암반응(0:24 hr)을 제외한 모든 반응에서 배양한지 약 일주일 이내인 3 일에 가장 빠르게 성장하였으며 6 일이 지나서는 성장속도가 점점 느려졌다 (Fig. 11). 세 종 모두 조도 110 μmol/m^2/에서 빛의 명반응의 주기가 길어질수록 생장속도가 빠르게 진행되었다. 이는 빛 에너지를 탄수화물로 변화시키는 과정인 광합성에 기인한 것으로 보여 진다. 즉, 빛의 흡수량이 많아질수록 명반응(24:0 hr)을 통해 비축해놓은 영양소의 양이 많아지고 조류들의 생장 영양소로 이용되어지기 때문이라고 생각된다.

위 실험을 토대로 하여 세 종류의 균주 모두 암반응(0:24 hr)과 8:16 hr 제외한 세 cycle 에서 비슷한 성장률을 보였으며, 빛이 14 시간 이상 공급되면 시간이 지날수록 세포의 호흡작용으로 인해 저장된 CO_2 가 줄어들고 O_2 는 소비하여 비슷한 성장률을 보이는 것으로 판단되며, 세 cycle 중에서 빛이 가장 적게 들어가는 14:10 hr 를 최적 반응 L:D cycle 로 광 반응기 실험을 진행하였다.

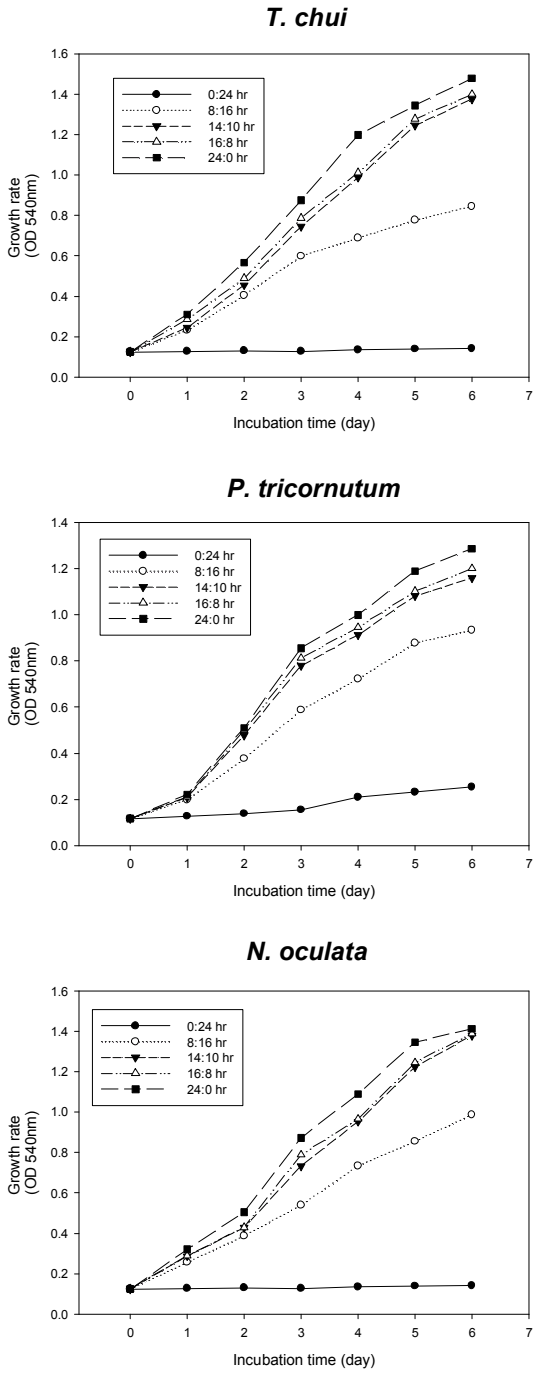


Fig. 11. Growth curve of (a) *T. chui* ,(b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* on various L:D cycle.

2. CO_2 농도의 영향

2.1 *Tetraselmis chui*

⊠

T. chui 균주를 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지하고 Air, CO_2 의 농도를 1, 2, 5 %로 변화하여 1 vvm 유속으로 공급하여 배양한 균주의 성장곡선 이다(Fig. 12). 그 결과 배양한지 6 일 후, air 만 공급했을 때 보다 CO_2 농도를 1, 2 % 공급하여 배양하였을 때 건조 균체량은 각각 0.702 g/L, 0.774 g/L, 0.858 g/L 로 CO_2 의 농도가 가장 높은 2 %로 공급되었을 때, 높은 수치를 확인할 수 있었다.

Air 만 공급하여 배양할 때와 일정 농도의 CO_2 공급하여 배양할 때, 3 일 째 까지는 건조 균체량의 값이 비슷하게 하지만 3 일이 지난 후 CO_2 를 공급하였을 때 건조 균체량이 증가하여 biomass productivity 는 또한 CO_2 의 농도가 2 % 일 때, 143 mg/L/day 로 가장 높게 나타났다. 하지만 더 높은 농도인 CO_2 를 5 % 공급하였을 때는 CO_2 의 독성 때문에 pH 가 낮아서 오히려 세포 성장을 방해하여 건조 균체량 값이 감소하는 것을 알 수 있었다[43,44] Total fatty acid 와 지질의 함량은 CO_2 의 농도가 2 %일 때, 208 mg/L 와 24.3 %로 가장 높았다. *T. chui* 은 CO_2 의 농도가 2 % 일 때, 건조 균체량과 biomass productivity, total fatty acid, 지질의 함량이 공기만 주입했을 때 보다 증가하였다(Table 2).

위의 실험을 바탕으로 적절한 농도의 CO_2 의 공급은 조류의 성장에 영향을 미치는 것을 판단하여[42], *T. chui* 종은 CO_2 의 농도가 2 %일 때, 최적 CO_2 농도로 고정하여 나머지 실험을 진행하였다.

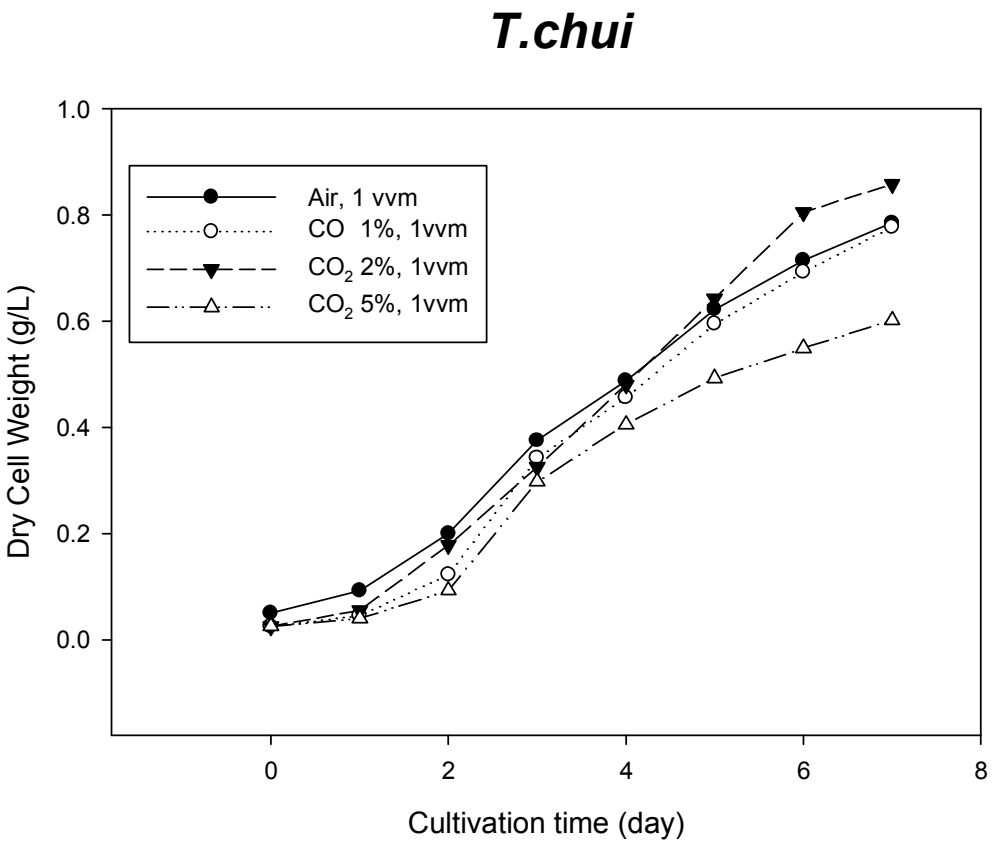


Fig. 12. Effect of CO_2 concentration on *T. chui* growth.

Table 2. Effect of CO_2 concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content

	Biomass Productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil Content (%)
Air, 1 vvm	117.0	147.0	20.6
CO_2 1%, 1 vvm	129.0	148.0	19.1
CO_2 2%, 1 vvm	143.0	208.0	24.3
CO_2 5%, 1vvm	101.0	75.0	12.3

2.2 *Dunaliella tertionlecta*

D. tertiolecta 균주를 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지하고 Air, CO_2의 농도를 1, 2, 5 % 로 변화하여 1 vvm 유속으로 공급하여 배양한 균주의 성장곡선을 보여준다(Fig. 13). 그 결과 배양한지 6 일 후, air 만 공급했을 때 보다 CO_2농도를 1, 2 % 공급하여 배양하였을 때, 건조 균체량은 각각 0.696 g/L, 0.786 g/L, 1.137 g/L 로 CO_2의 농도가 가장 높은 2 %로 공급되었을 때, 높은 수치를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 더 높은 농도인 CO_2를 5% 공급하였을 때는 CO_2의 독성 때문에 pH 가 낮아서 오히려 세포 성장을 방해하여 건조 균체량 값이 감소하는 것을 알 수 있었다[43,44].

Total fatty acid 와 지질의 함량은 CO_2 의 농도가 2 %일 때, 299 mg/L 와 26.3 %로 가장 높았으며, CO_2 5 % 일 때는 건조 균체량과 마찬가지로 가장 낮은 수치를 보였다. *D. tertiolecta* 은 CO_2 의 농도가 2 % 일 때, 건조 균체량과 biomass productivity, total fatty acid, 지질의 함량은 공기만 주입했을 때 보다 증가하였다 (Table 3).

위의 실험을 바탕으로 적절한 농도의 CO_2 의 공급은 조류의 성장에 영향을 미치는 것을 판단하여[45], *D. tertiolecta*종은 CO_2의 농도가 2 %일 때, 최적 CO_2 농도로 고정하여 나머지 실험을 진행하였다.

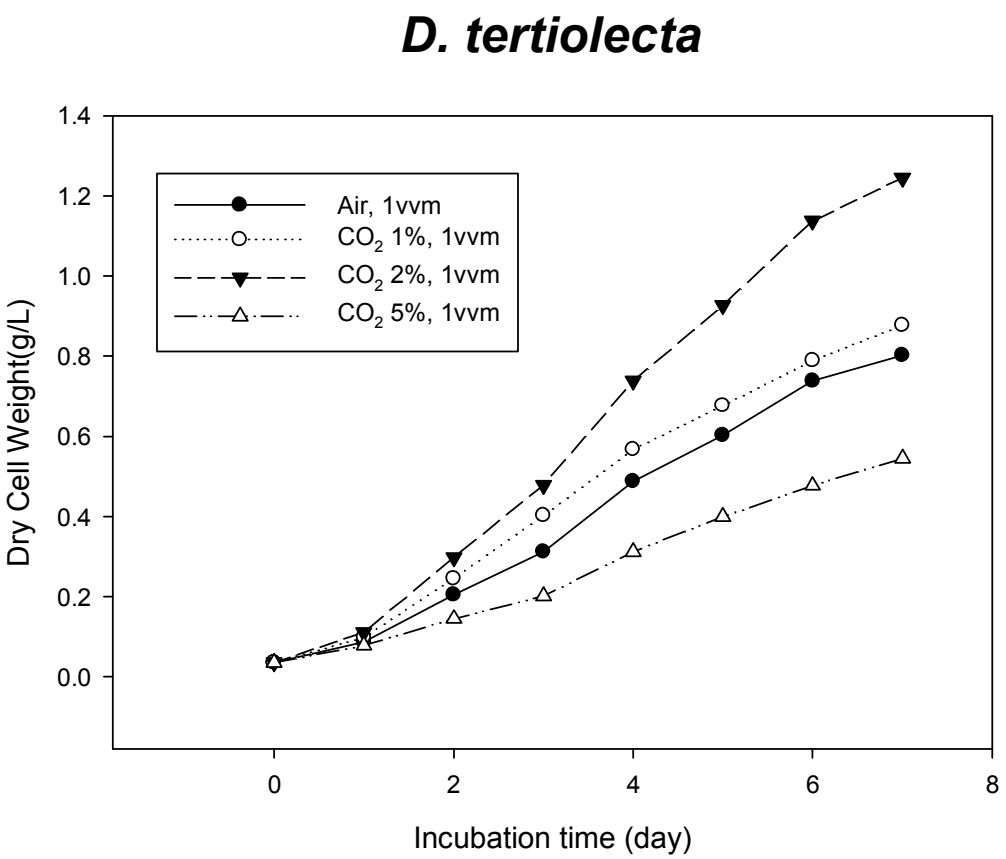


Fig. 13. Effect of CO_2 concentration on *D. tertiolecta* growth.

Table 3. Effect of CO_2 concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content

	Biomass Productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil Content (%)
Air, 1 vvm	116.0	160.0	23.0
CO_2 1%, 1 vvm	131.0	171.0	21.8
CO_2 2%, 1 vvm	189.5	299.0	26.3
CO_2 5%, 1vvm	91.0	97.2	17.8

2.3 *Nannochloropsis oculata*

N. oculata 균주를 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지하고 air, CO_2의 농도를 1, 2, 5 % 로 변화하여 1 vvm 유속으로 공급하여 배양한 균주의 성장곡선을 보여준다(Fig. 14). 그 결과 배양한지 6 일 후, air 만 공급했을 때 보다 CO_2 농도를 1%, 2% 공급하여 배양하였을 때, 건조 균체량은 각각 0.696 g/L, 0.69 g/L, 0.792 g/L 로 CO_2의 농도가 가장 높은 2 %로 공급되었을 때, 높은 수치를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 더 높은 농도인 CO_2를 5% 공급하였을 때는 CO_2의 독성 때문에 pH 가 낮아서 오히려 세포 성장을 방해하여 건조 균체량 값이 감소하는 것을 알 수 있었다[43,44].

CO_2의 농도가 2 %일 때, biomass productivity 는 162 mg/L/day 로 가장 높게 나타났으며, total fatty acid 와 지질의 함량 또한 각각 159 mg/L 와 20.2 %로 가장 높았다. 반면, CO_2 5 % 일 때는 가장 낮은 수치를 보였다. *N. oculata*는 CO_2 의 농도가 2 % 일 때, 건조 균체량과 biomass productivity, total fatty acid, 지질의 함량은 공기만 주입했을 때 보다 증가하였다(Table 4).

위의 실험을 바탕으로 적절한 농도의 CO_2 의 공급은 조류의 성장에 영향을 미치는 것을 판단하여[45], *N. oculata*종은 CO_2의 농도가 2 %일 때, 최적 CO_2 농도로 고정하여 나머지 실험을 진행하였다.

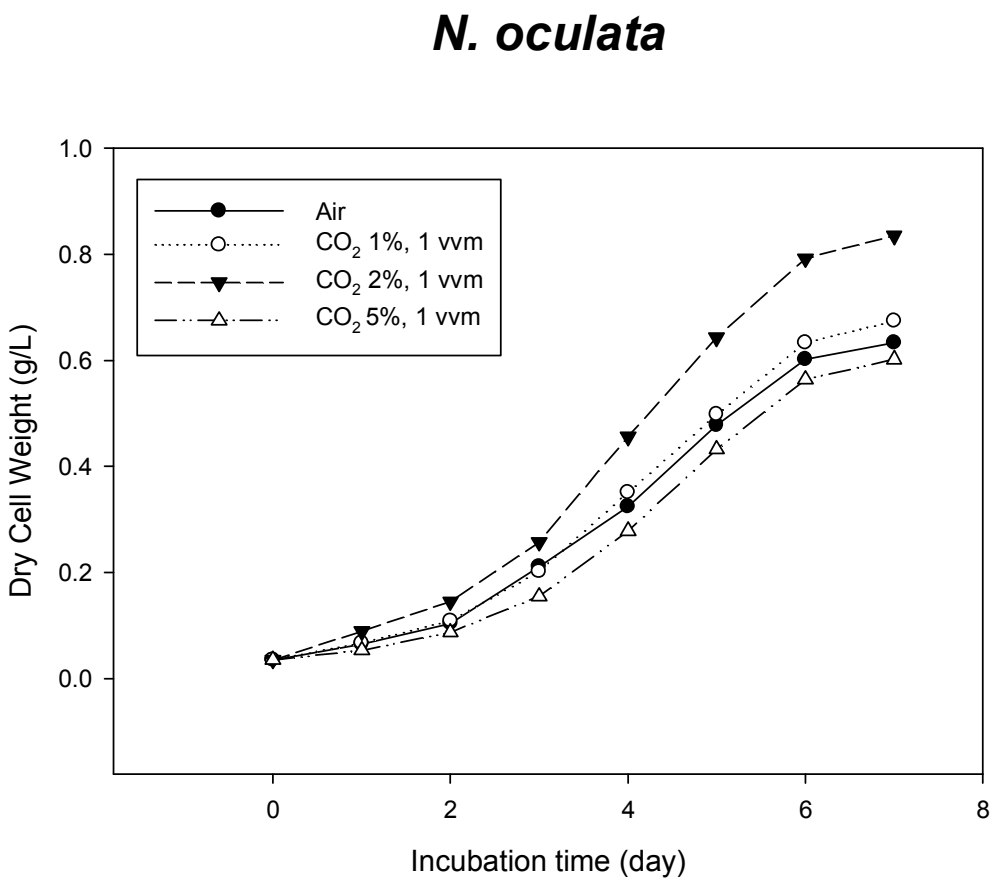


Fig. 14. Effect of CO_2 concentration on *N. oculata* growth.

Table 4. Effect of CO_2 concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty acid and oil content

	Biomass Productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil Content (%)
Air, 1 vvm	116.0	78.2	11.2
CO_2 1%, 1 vvm	115.0	116.0	16.8
CO_2 2%, 1 vvm	132.0	159.0	20.2
CO_2 5%, 1 vvm	105.0	98.3	15.6

3. 인산염 농도의 영향

3.1 *Tetraselmis chui*

T. chui 균주의 배지에 함유된 인산원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 지질의 함량을 조사하기 위해 F/2 -si x 3 배지에 함유된 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 의 농도를 0, 1.5, 3, 6 ml 조절하여 배양하였다. 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지하고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급한 균주의 성장곡선을 나타냈다(Fig. 15).

그 결과 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 5 일 째 되는 날의 *T. chui* 의 균체 건조량은 각각 0.16 g/L, 0.38 g/L, 0.57 g/L, 0.47 g/L 로 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5g/L 을 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 균체 건조량이 가장 높게 나타났다.

NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 biomass productivity 의 값은 각각 40 mg/L/day, 94.5 mg/L/day, 142.5 mg/L/day, 118.5 mg/L/day 으로 3 ml 넣어 배양하였을 때, biomass productivity 역시 가장 높았다. 지질의 함량은 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 모두 16−20 % 안 밖을 웃도는 수치로 비슷비슷 하였으나, NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 20.3 %로 가장 높게 나타났다(Table 5).

이를 토대로 인산의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. *T. chui* 종은 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 건조 균체량과 지질의 함량이 가장 높이 나타난 것을 바탕으로 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 진행하였다.

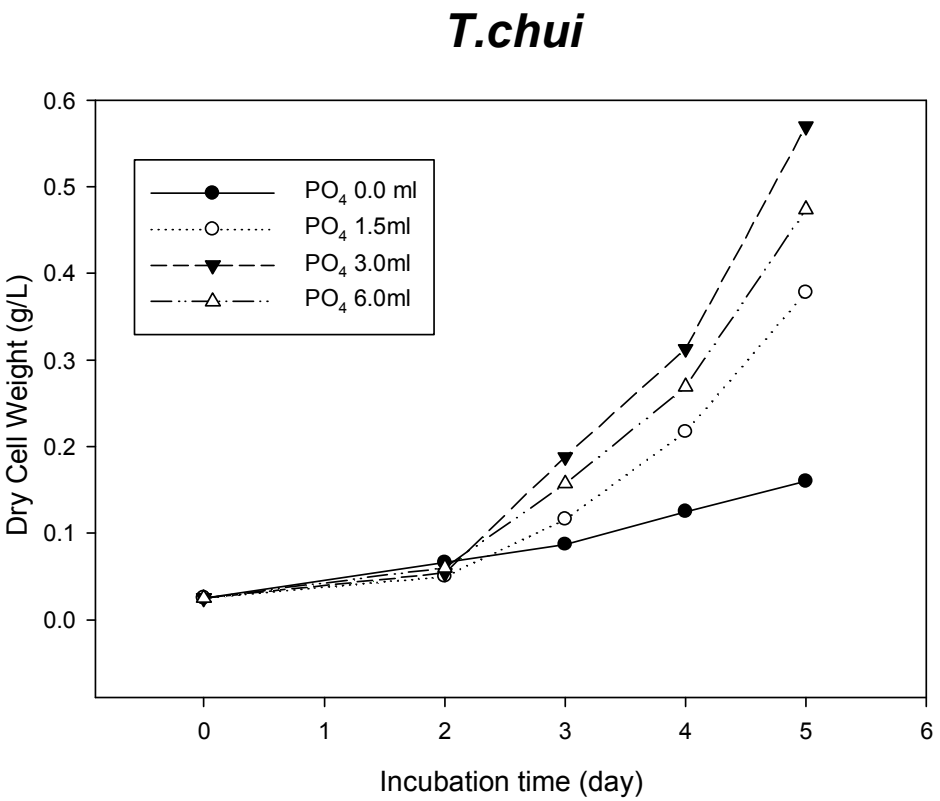


Fig. 15. Effect of phosphate concentration on *T. chui* growth.

Table 5. Effect of phosphate concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-PO_4$ 농도 (ml)	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
0.0	40.0	26.8	16.8
1.5	94.5	74.4	19.6
3.0	142.5	115.6	20.3
6.0	118.5	90.0	19.2

3.2 *Dunaliella tertiolecta*

D. tertiolceta 균주의 배지에 함유된 인산원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 지질의 함량을 조사하기 위해 F/2 -si x 3 배지에 함유된 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 의 농도를 0, 1.5, 3, 6 ml 조절하여 배양하였다. 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지하고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급한 균주의 성장곡선을 나타냈다(Fig. 16).

NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 *D. tertiolceta* 의 균체 건조량은 각각 0.529 g/L, 0.871 g/L, 0.748 g/L 로 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 을 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 균체 건조량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

그 결과 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 biomass productivity 의 값은 각각 105.8 mg/L/day, 174 mg/L/day, 150 mg/L/day 으로 3 ml 넣어 배양하였을 때, biomass productivity 또한 가장 높았다. 지질의 함량 역시 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 26.3 %로 가장 높이 나타났으며, total fatty acid 도 229 mg/L 로 가장 높게 나타났다(Table 6).

이를 토대로 인산의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. *D. tertioleecta* 종은 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, biomass production 과 지질의 함량이 가장 높이 나타난 것을 바탕으로 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 실행하였다.

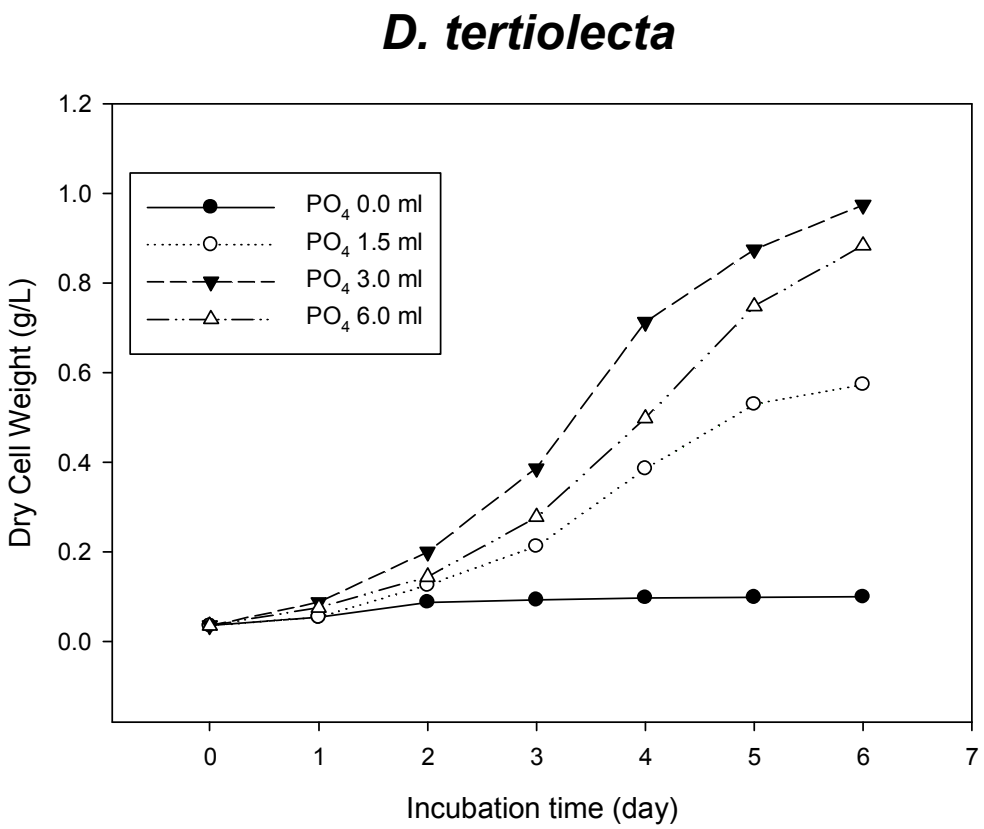


Fig. 16. Effect of phosphate concentration on *D. tertiolecta* growth.

Table 6. Effect of phosphate concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-PO_4$ 농도 (ml)	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
0.0	16.0	27.0	16.7
1.5	105.8	100.0	18.9
3.0	174.0	229.0	26.3
6.0	150.0	142.0	19.2

3.3 *Nannochloropsis oculata*

N. oculata 균주의 배지에 함유된 인산원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 지질의 함량을 조사하기 위해 F/2 -si x 3 배지에 함유된 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 의 농도를 0, 1.5, 3, 6 ml 조절하여 배양하였다. 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 $\mu mol/m^2/s$ 로 유지하고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급한 균주의 성장곡선을 나타냈다(Fig. 17).

그 결과 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 *N. oculata* 각각 0.436 g/L, 0.696 g/L, 0.666 g/L 로 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 을 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 biomass productivity 의 값은 각각 73 mg/L/day, 116 mg/L/day, 111 mg/L/day, 118.5 mg/L/day 으로 3 ml 넣어 배양하였을 때, biomass productivity 또한 가장 높았다. 지질의 함량 역시 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 21.3 %로 가장 높이 나타났으며, total fatty acid 역시 148 mg/L 로 가장 높게 나타났다(Table 7).

이를 토대로 인산의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. *N. oculata* 종은 NaH_2PO_4 $4H_2O$ 5g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, biomass production 과 지질의 함량이 가장 높이 나타난 것을 바탕으로 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 실행하였다.

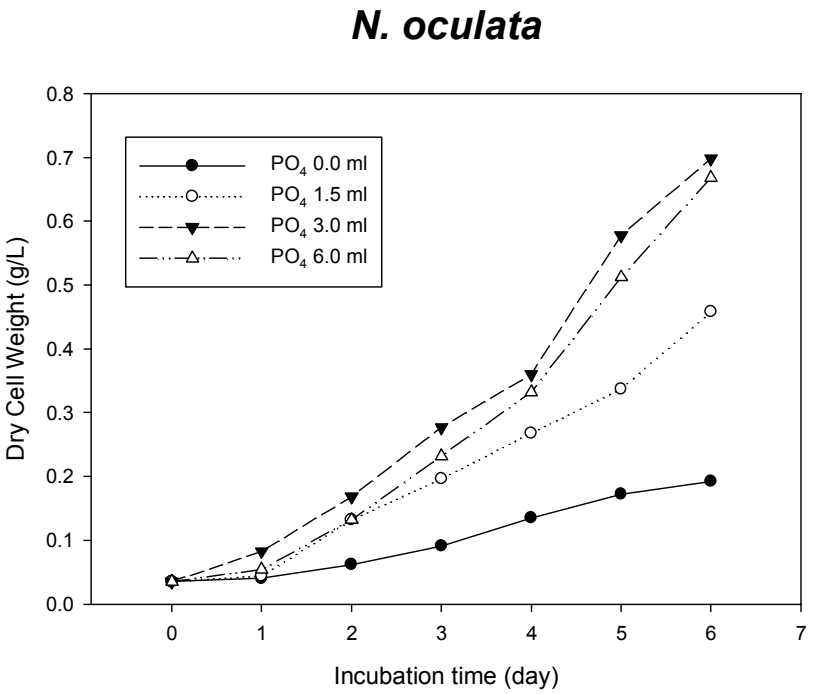


Fig. 17. Effect of phosphate concentration on *N. oculata* growth.

Table 7. Effect of phosphate concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-PO_4$ 농도 (ml)	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
0.0	32.0	27.8	14.5
1.5	73.0	73.6	16.8
3.0	116.0	148.0	21.3
6.0	111.0	114.0	17.2

4. 질소원 농도의 영향

4.1 *Tetraselmis chui*

T. chui 균주가 배지에 함유된 질소원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 지질의 함량을 조사하기 위해 F/2 -si x 3 배지에 $NaNO_3$ 75 g/L 을 각각 0, 1.5, 3, 6 ml 넣었다. 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m2/s 로 유지시키고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급시킨 균체 건조량의 결과를 나타내었다(Fig. 18).

그 결과 $NaNO_3$ 75 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 *T. chui* 의 균체 건조량은 각각 0.78 g/L, 0.858 g/L, 0.804 g/L 으로 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 균체 건조량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

$NaNO_3$ 75 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 biomass productivity 의 값은 각각 130 mg/L/day, 143 mg/L/day, 134 mg/L/day 으로 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, Biomass productivity 이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 지질의 함량은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 모두 16-20 % 안 밖을 웃도는 수치로 비슷비슷 하였으나, $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 20.4 %로 가장 높이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Table 8).

이를 토대로 질소원의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. *T. chui* 종은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 건조 균체량과 지질의 함량이 가장 높이 나타난 것을 바탕으로 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 진행하였다.

T. chui

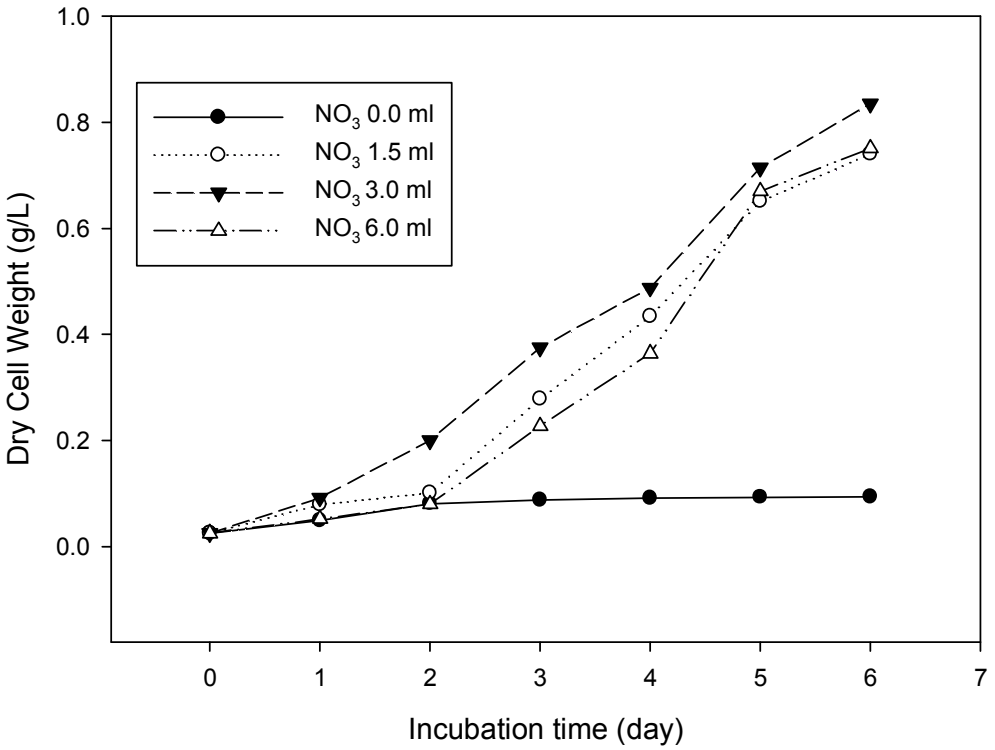


Fig. 18. Effect of nitrate concentration on *T. chui* growth.

.

Table 8. Effect of nitrate concentration on *T. chui* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-NO_3$ 농도 (ml)	Biomass Productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
0.0	17.0	27.0	15.8
1.5	130.0	129.0	19.8
3.0	143.0	145.0	20.4
6.0	134.0	130.0	19.5

4.2 *Dunaliella tertiolecta*

D. tertiolecata 균주가 배지에 함유된 질소원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 oil 의 함량을 조사하기 위하여 F/2 -si x 3 배지에 $NaNO_3$ 75 g/L 을 각각 0, 1.5, 3, 6 ml 넣고 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m2/s 로 유지시키고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급시킨 균체 균체량의 결과를 나타내었다(Fig. 19).

$NaNO_3$ 75g/L 를 0, 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 *D. tertiolecta* 의 균체 건조량은 각각 0.1 g/L, 0.573 g/L, 0.974 g/L, 0.883 g/L 으로 $NaNO_3$ 75g/L 를 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 균체 건조량이 가장 높게 나타났다.

$NaNO_3$ 75g/L 를 1.5 ml, 3 ml, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 biomass productivity 의 값은 각각 125 mg/L/day, 162 mg/L/day, 53.5 mg/L/day 으로 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, biomass productivity 이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 지질의 함량은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 각각 17.8 %, 24.5 %, 18.6 %로 나타났으며, 지질의 함량 역시 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 24.5 %로 가장 높이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Table. 9).

이를 토대로 질소원의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. *D. tertiolecta* 종은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 건조 균체량과 지질의 함량이 가장 높이 나타난 것을 바탕으로 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 진행하였다.

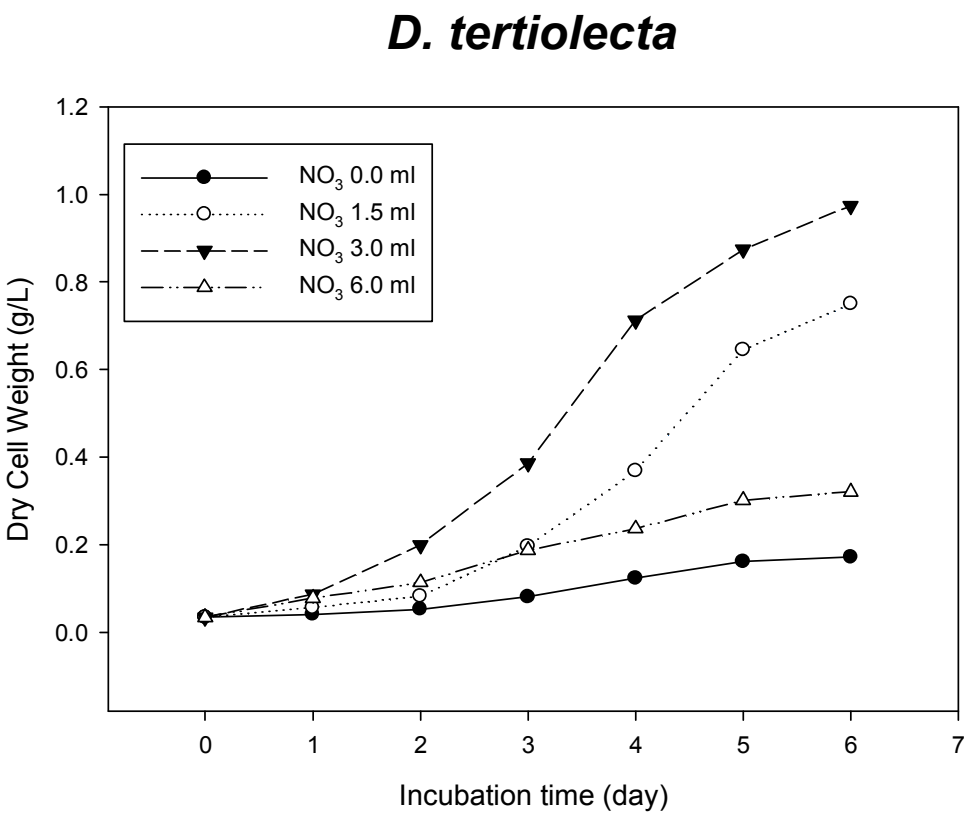


Fig. 19. Effect of nitrate concentration on *D. tertiolecta* growth.

Table 9. Effect of nitrate concentration on *D. tertiolecta* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-NO_3$ 농도 (ml)	Biomass Productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil Content (%)
0.0	30.0	29.7	16.5
1.5	125.0	133.5	17.8
3.0	162.0	246.0	24.5
6.0	53.5	60.0	18.6

4.3 *Nannochloropsis oculata*

N. oculata 균주가 배지에 함유된 질소원의 영향에 따른 세포의 성장과 생산된 지질의 함량을 조사하기 위해 F/2 -si x 3 배지에 $NaNO_3$ 75 g/L 을 각각 0, 1.5, 3, 6 ml 넣고 온도는 23℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m2/s 로 유지시키고 CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급시킨 균체 건조량의 결과를 나타내었다(Fig. 20).

$NaNO_3$ 75 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 *N. oculata* 의 균체 건조량은 각각 0.549 g/L, 0.678 g/L, 0.75 g/L 으로 $NaNO_3$ 75 g/L 를 6 ml 넣어 주어 배양하였을 때, 균체 건조량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

$NaNO_3$ 75g/L 를 1.5, 3, 6 ml 넣어 배양한지 6 일 째 되는 날의 total fatty acid 의 값은 각각 86.7 mg/L, 144 mg/L, 131 mg/L 으로 3 ml 넣어 주어 배양하였을 때, total fatty acid 의 함량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 지질의 함량은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 1.5, 3, 6 ml 각각 15.8 %, 20.7 %, 17.5 %로 나타났으며, 지질의 함량 역시 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 20.7 %로 가장 높이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Table. 10).

건조 균체량은 $NaNO_3$ 75 g/L 를 6 ml 넣어 주었을 때, 가장 높았으나 total fatty acid 와 지질의 함량이 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 넣어 주었을 때, 더 높게 나타나서 이를 토대로 질소원의 양이 많이 들어간다고 해서 조류의 균체량이 더 크게 증가하거나 지질의 함량이 증가하는 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. 따라서, *N. oculata* 종은 최적 질산원의 농도는 $NaNO_3$ 75 g/L 를 3 ml 을 최적 반응 배지농도로 판단하여, 나머지 실험을 진행하였다.

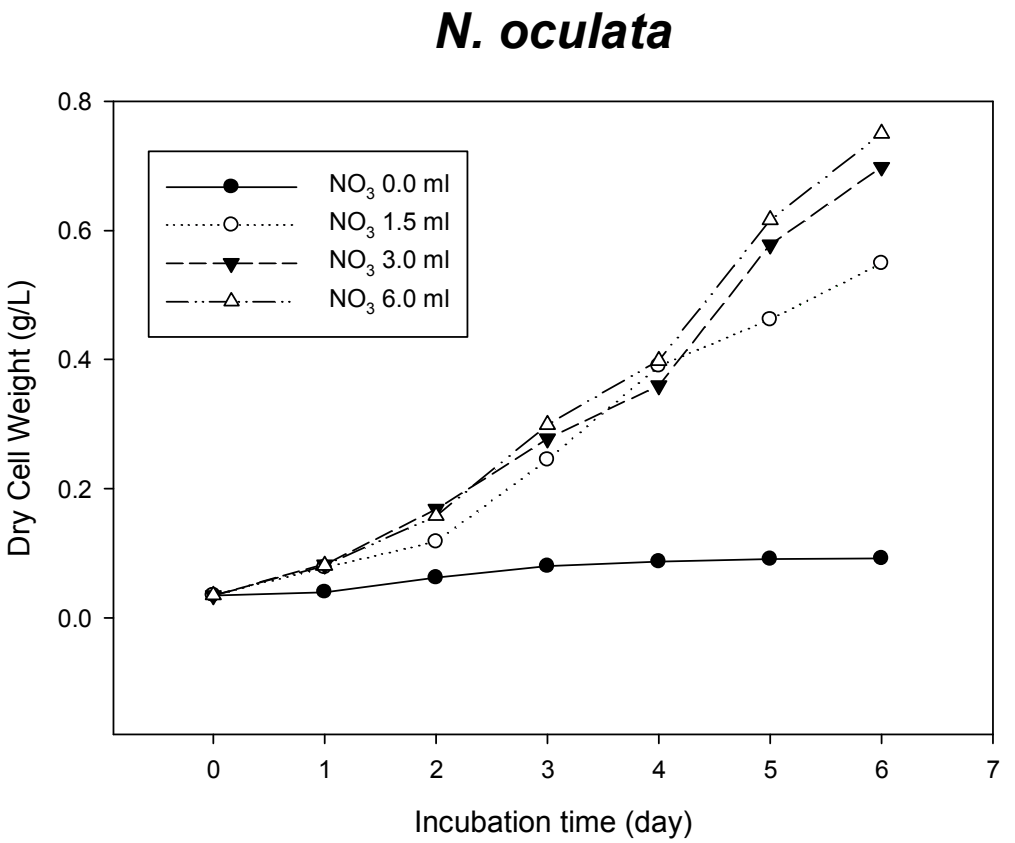


Fig. 20. Effect of nitrate concentration on *N. oculata* growth.

Table 10. Effect of nitrate concentration on *N. oculata* biomass productivity, total fatty acid and oil content

$-NO_3$ 농도 (ml)	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
0.0	15.0	20.6	13.7
1.5	91.5	86.7	15.8
3.0	116.3	144.0	20.7
6.0	125.0	131.0	17.5

5. 질소원과 인산원 최적농도

배지의 질소원과 인산원의 농도변화에 따른 세포의 건조 균체량과 total fatty acid 의 양을 능선분석을 수행하여 반응표면을 살펴보았다. *T. chui* 과 *D. tertiolecta* 의 질소원과 인산원의 농도에 따른 건조 균체량의 반응표면은 점차 증가하다가 3.0 ml 이 되는 시점에서 감소하는 형태를 보이지만 *N. oculata* 는 두 변수가 증가하는 방향으로 반응표면을 보이고 있다(Fig. 21). 하지만 total fatty acid 의 반응표면은 세 균주 모두 점차 증가하다가 질소원과 인산원의 양이 3.0 ml 이 되는 시점에서 감소하는 형태를 보였다(Fig. 22). *T. chui* 와 *D. tertiolecta* 의 질소원과 인산원의 농도에 대한 최적 결정 값을 살펴보면 건조 균체량과 total fatty acid 의 생산을 위한 결정 값은 stock 의 양을 3.0 ml 넣어 배양한 조건으로 동일하였다. *N. oculata* 의 건조 균체량에 따른 반응표면은 질소원과 인산원의 양이 증가할수록 최적 결정 값을 나타내지만 total fatty acid 에 따른 반응표면은 질소원과 인산원의 양이 3.0 ml 이 되는 시점에서 최적 값을 나타내므로 total fatty acid 의 함량이 최적인 3.0 ml 을 최적 결정 값으로 선정하였다.

반응표면분석(RSM)을 통해 얻어진 세 균주의 배지에 함유된 질소원과 인산원의 최적 배양 농도는 3.0 ml 로 고정하여, 균체의 성장율을 높이기 위해서 반복식 유가공정을 시행하였다.

(a)

(b)

(c)

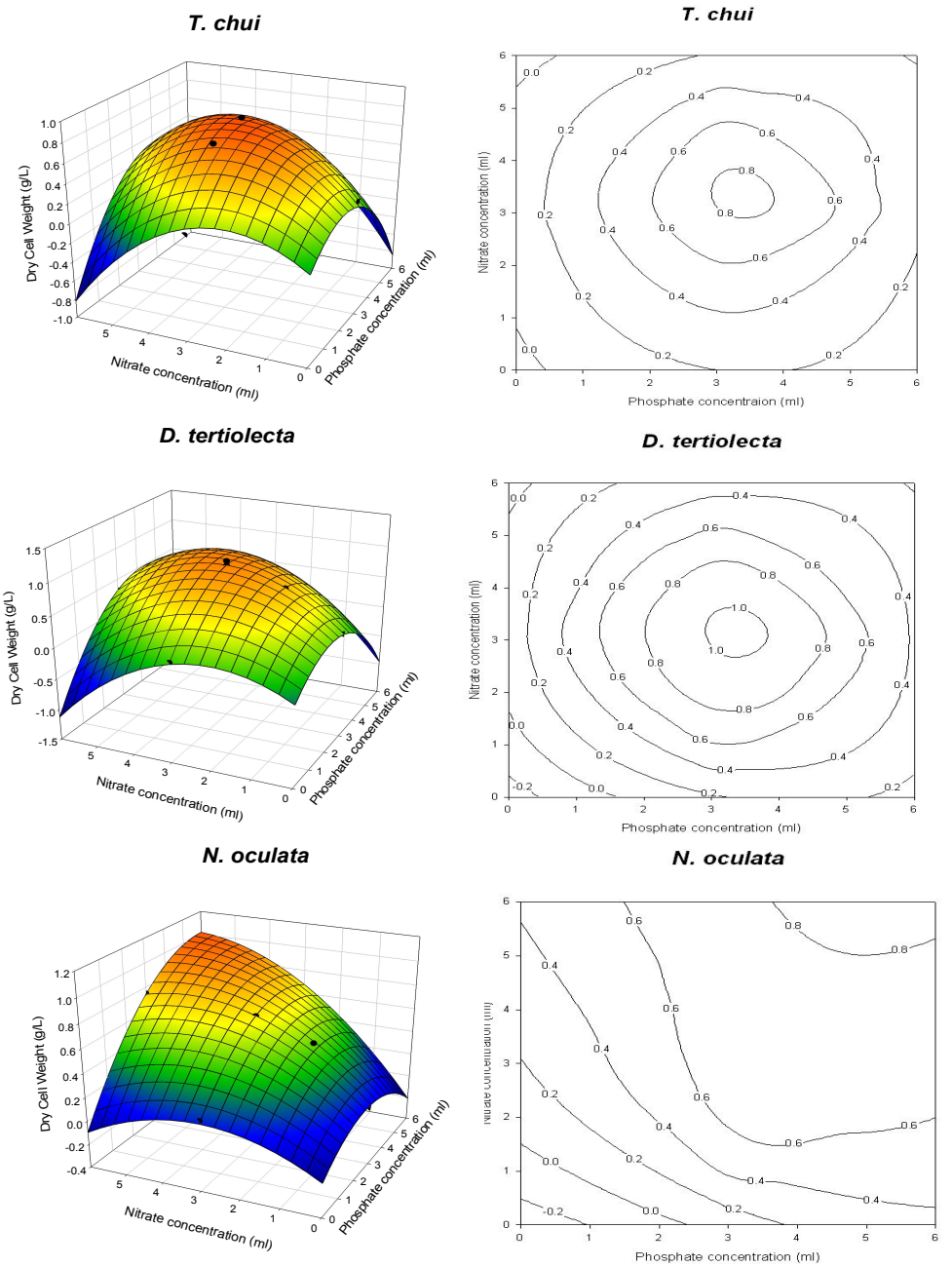


Fig. 21. 3-D response surface of dry cell weight (a) *T. chui*, (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* according the variation of nitrate and phosphate

concentration.

Table 11. Estimated regression coefficients for dry cell weight (*T. chui*, *D. tertiolecta* and *N. oculata*)

	Coefficient	Std. Error	t	p
T. chui				
Y_0	−0.1206	0.2172	−0.5555	0.6344
A	0.2795	0.0927	3.0147	0.0947
B	0.2383	0.0927	2.5701	0.1239
C	−0.0617	0.0143	−4.3095	0.0499
D	−0.0581	0.0143	−4.0598	0.0557
E	0.0407	0.0002	251.7257	<0.0001
D. tertiolecta				
Y_0	−0.1950	0.1098	−1.7754	0.2178
A	0.3739	0.0469	7.9726	0.0154
B	0.3318	0.0469	7.0755	0.0194
C	−0.0834	0.0072	−11.5167	0.0075
D	−0.0811	0.0072	−11.1994	0.0079
E	0.0597	8.1684E−005730	0.4259	<0.0001
N. oculata				
Y_0	−0.1122	9.94E+05	−1.13E−07	1
A	0.1695	331198.9	5.12E−07	1
B	0.1835	331198.9	5.54E−07	1
C	−0.031	0.008	−3.8527	0.0612
D	−0.0301	0.0098	−3.0829	0.0911
E	0.0336	110399.6	3.05E−07	1

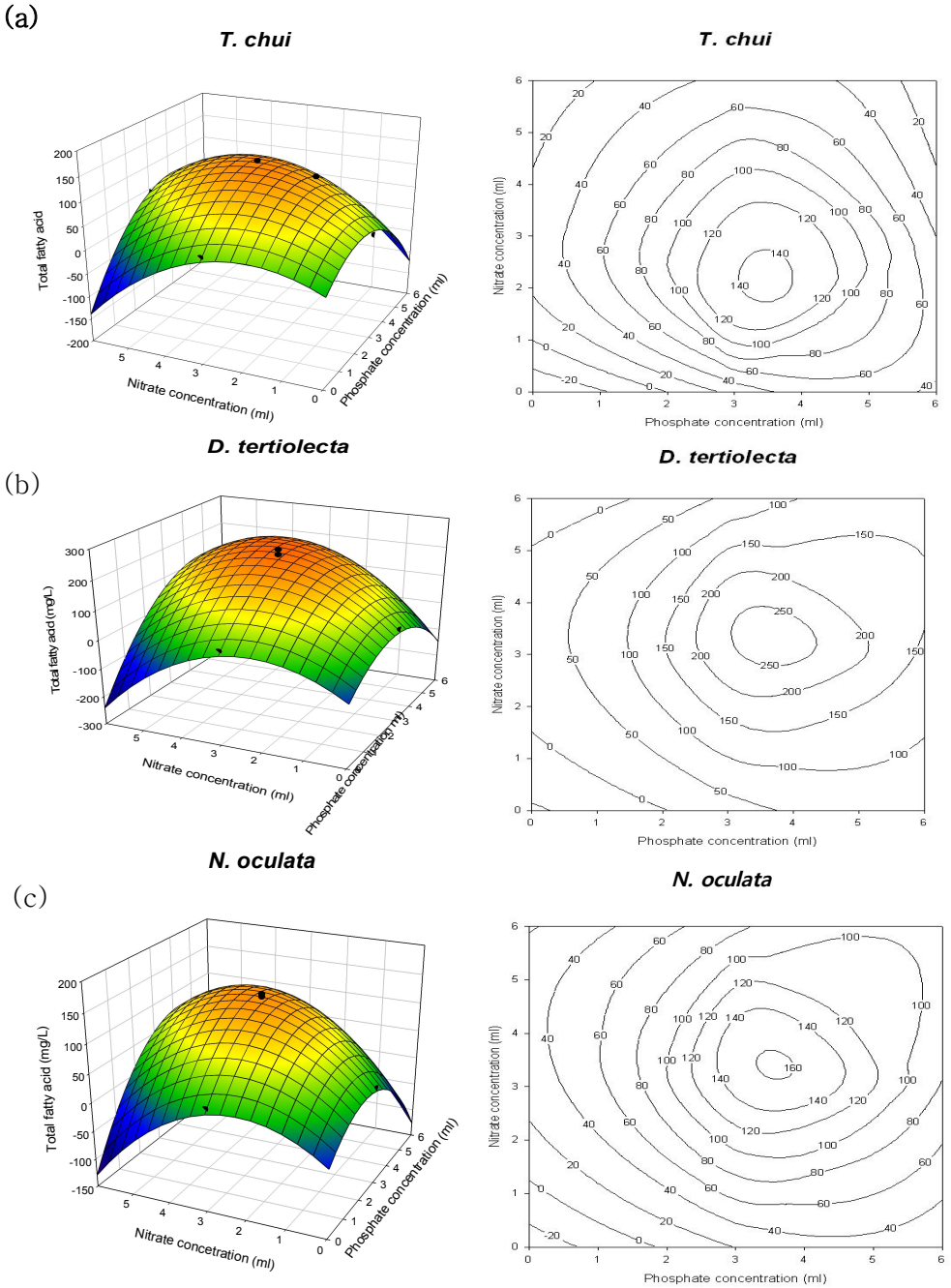


Fig. 22. 3-D response surface of total fatty acid (a) *T. chui*, (b) *D. tertiolecta* and (c) *N. oculata* according the variation of nitrate and phosphate

concentration.

Table 12. Estimated regression coefficients for total fatty acid (*T. chui*, *D. tertiolecta* and *N. oculata*)

	Coefficient	Std. Error	t	p
T. chui				
Y_0	−23.3787	21.0123	−1.1126	0.3817
A	38.8737	8.9706	4.3334	0.0493
B	34.7336	8.9706	3.8719	0.0607
C	−7.7154	1.3848	−5.5713	0.307
D	−7.2634	1.3848	−5.245	0.0345
E	6.3024	0.0156	40.33508	<0.0001
D. tertiolecta				
Y_0	−43.0435	50.0892	−0.8593	0.4807
A	66.9849	21.3842	3.1324	0.0886
B	46.1290	21.3842	2.1572	0.1637
C	−11.2667	3.3012	−3.4130	0.0762
D	−10.6121	3.3012	−3.2147	0.0847
E	8.3285	0.0372	223.6026	<0.0001
N. oculata				
Y_0	−32.6254	30.9955	−1.1816	0.3588
A	40.9179	13.2327	3.0922	0.0906
B	39.1008	13.2327	2.9549	0.098
C	−7.5183	2.0428	−3.6804	0.0665
D	−6.7585	2.0428	−3.3085	0.0805
E	6.775	0.023	293.9421	<0.0001

6. 반복유가식 배양공정 개발

6.1 *Tetraselmis chui*

직접 제작한 구경 75 mm, 높이 350 mm 인 광 반응기에 배지를 1 L 씩 넣고 *T. chui* 은 배지의 10 %(v/v)를 접종 하였다. 배지는 2% 해수 F/2-si x 3 배지를 사용하였고 접종한 균주의 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr(light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지시키고, CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급하여 배양하였다. 처음 접종 후, 균체 성장이 최고인 4 일 후에 균체량 만큼 배지를 다시 공급하여 주었으며, 배양 4 일 후 부터는 이틀에 한 번씩 harvest 와 배지공급을 반복하여 2 주간 배양 하였다(Fig. 23).

T. chui 을 repeated fed-batch 를 시행하였을 때, 건조 균체량과 biomass productivity 을 나타낸 그래프이다. 초기 배양 4 일이 지난 후 224 mg/L/day 의 biomass productivity 를 가졌으나, 2 일에 한 번 꼴로 배지의 수확과 공급을 반복한 repeated fed-batch 를 시행할 수록 biomass productivity 는 증가하여 최고 415 mg/L/day 를 나타내었다(Fig. 24). 이는 다른 논문에 *Tetraselmis sp.*가 회분식 배양을 했을 때, 300 mg/L/day 의 biomass productivity 보다 115 mg/L/day 가 높은 값을 얻을 수 있었다. Total fatty acid 는 최고 173.1 mg/L 의 함량을 가졌으며, 다른 논문에 *Tetraselmis sp.*가 회분식 배양을 했을 때, 14.7 %의 지질의 함량이 나오는 것에 비교해 5.3 % 정도 높은 지질의 함량인 20 % 내외로 유지되는 것을 확인하였다[46](Table 11).

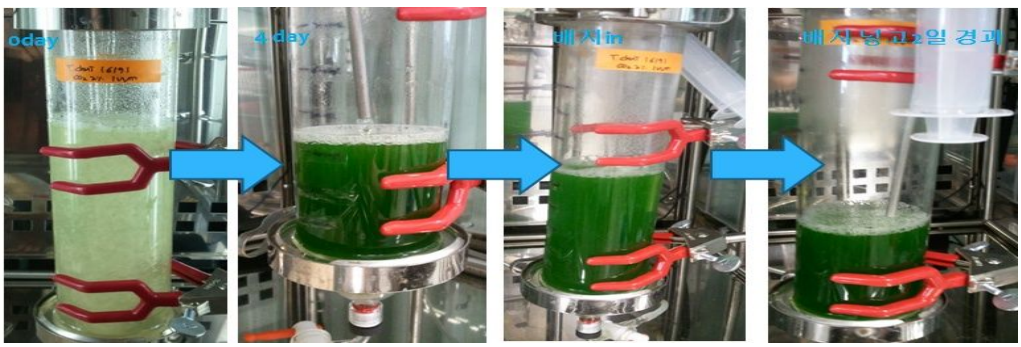
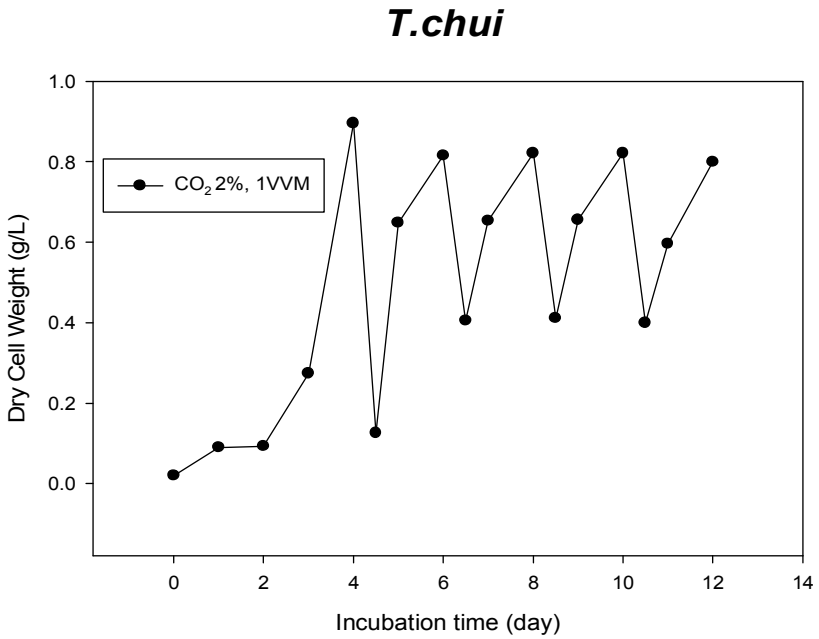


Fig. 23. Repeated fed-batch culture of *T. chui.*

(a)



(b)

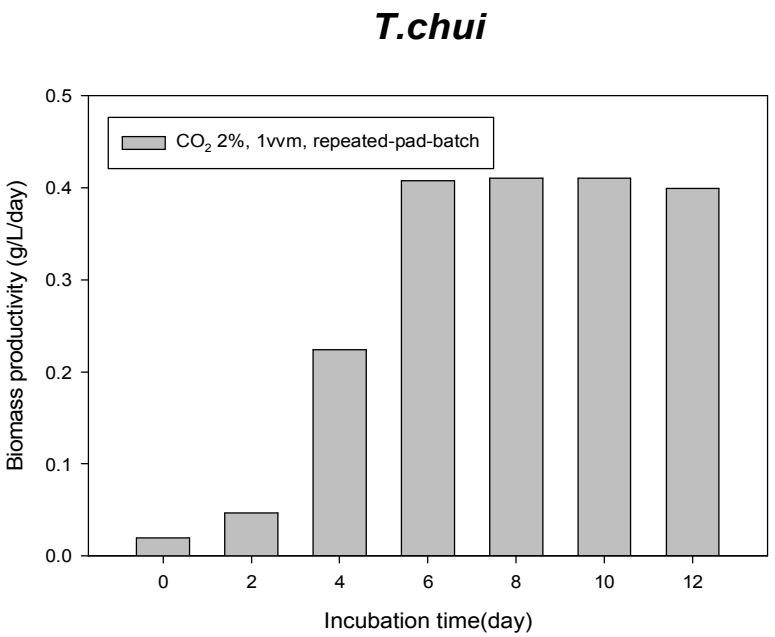


Fig. 24. Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *T. chui* with the repeated fed-batch culture.

Table 13. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *T. chui* on repeated fed-batch culture

	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
4 일	224.0	98.4	18.6
#1 (6 일)	408.0	135.9	20.0
#2 (8 일)	411.0	171.7	22.0
#3 (10 일)	415.0	173.1	19.8
#4 (12 일)	400.0	155.0	19.4

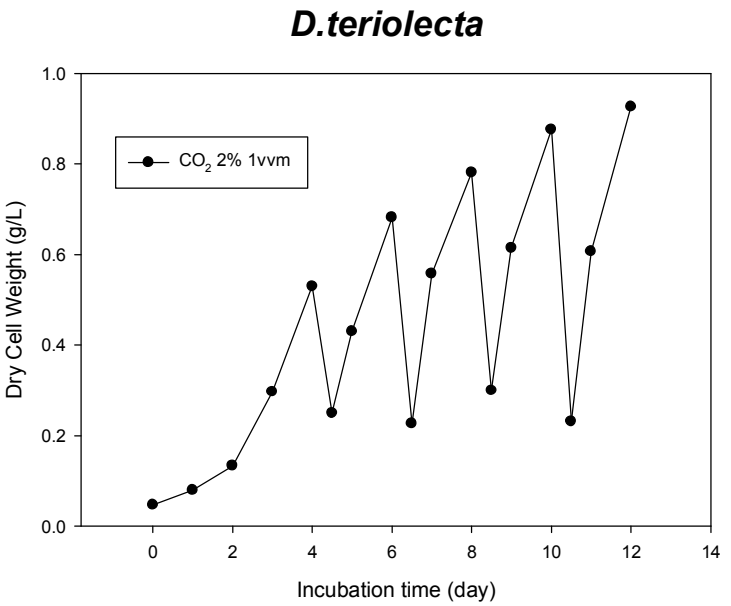
6.2 *Dunaliella tertiolecta*

직접 제작한 구경 70 mm, 높이 350 mm 인 광 반응기에 배지를 1 L 씩 넣고 *D. tertiolecta* 은 배지의 10 %(v/v)를 접종 하였다. 배지는 2% 해수 F/2-Si x 3 배지를 사용하였고 접종한 균주의 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr(light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지시키고, CO_2의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급하여 배양하였다. 처음 접종 후, 균체 성장이 최고인 4 일 후에 균체량 만큼 배지를 다시 공급하여 주었으며, 배양 4 일후 부터는 이틀에 한 번씩 harvest 와 배지공급을 반복하여 2 주간 배양 하였다(Fig. 25).

D. tertiolecta 을 repeated fed-batch 를 시행하였을 때, 건조 균체량과 biomass productivity 을 나타낸 그래프이다. 초기 배양 4 일이 지난 후 113 mg/L/day 의 biomass productivity 를 가졌으나, 2 일에 한 번 꼴로 배지의 수확과 공급을 반복한 repeated fed-batch 를 시행할 수록 biomass productivity 는 점점 증가하여 최고 478 mg/L/day 를 나타내었다(Fig. 26). 이는 다른 논문에 *D. tertiolecta* 가 회분식 배양을 했을 때, 360 mg/L/day 의 biomass productivity 보다 118 mg/L/day 가 높은 수치를 얻었다[47]. Total fatty acid 는 최고 170 mg/L 의 함량을 가졌으며, 다른 논문에 *D. tertiolecta* 가 회분식 배양을 했을 때, 21.7 %의 지질의 함량과 비슷한 19-21 % 내외로 유지되었으며 최고 21.6 %의 지질의 함량을 가지는 것을 확인하였다[46-47](Table 12).

Fig. 25. Repeated fed-batch culture of *Dunaliella tertiolecta.*

(a)



(b)

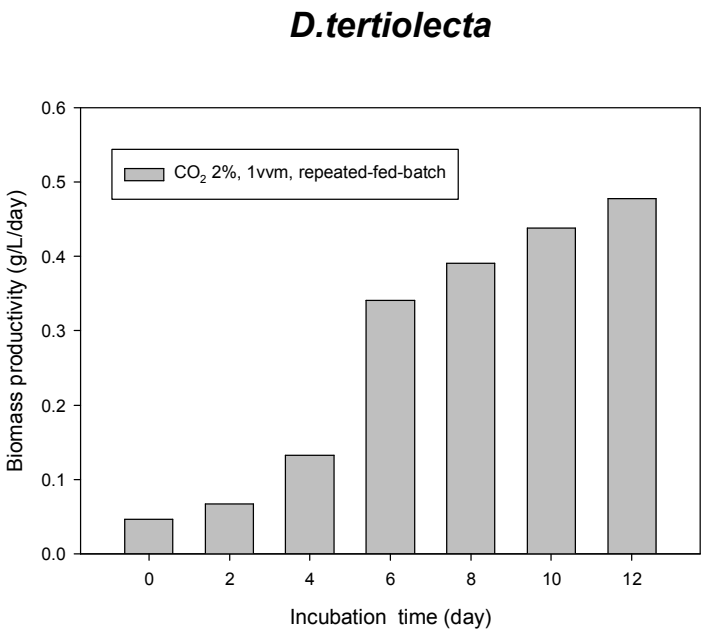


Fig. 26 . Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *D. tertiolecta* with the repeated fed-batch culture.

Table 14. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *D. tertiolecta* on repeated fed-batch culture

	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
4 일	133.0	179.0	20.0
#1 (6 일)	341.0	158.0	21.6
#2 (8 일)	390.0	168.0	20.5
#3 (10 일)	438.0	170.0	20.7
#4 (12 일)	478.0	155.0	19.4

6.3 *Nannochloropsis oculata*

직접 제작한 구경 70 mm, 높이 350 mm 인 광 반응기에 배지를 1 L 씩 넣고 *N. oculata* 은 배지의 10 %(v/v)를 접종 하였다. 배지는 2% 해수 F/2-Si x 3 배지를 사용하였고 접종한 균주의 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr(light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지시키고, CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 의 유속으로 공급하여 배양하였다. 처음 접종 후, 균체 성장이 최고인 6 일 후에 균체량 만큼 배지를 다시 공급하여 주었으며, 배양 6 일 후 부터는 이틀에 한 번씩 harvest 와 배지공급을 반복하여 2 주간 배양 하였다(Fig. 27).

N. oculata 을 repeated fed-batch 를 시행하였을 때, 건조 균체량과 biomass productivity 을 나타낸 그래프이다. 초기 배양 6 일이 지난 후 104 mg/L/day 의 biomass productivity 를 가졌으나, 2 일에 한 번 꼴로 배지의 수확과 공급을 반복한 repeated fed-batch 를 시행할 수록 biomass productivity 는 점점 증가하여 최고 337 mg/L/day 의 biomass productivity 를 나타내었다(Fig. 28). 이는 다른 논문에 *N. oculata* 가 회분식 배양을 했을 때, 142-180 mg/L/day 의 biomass productivity 보다 2 배가 높은 수치를 얻었다. Total fatty acid 는 최고 167.4 mg/L 의 함량을 가졌으며, 지질의 함량은 앞의 두 종보다는 조금 낮은 16-17 % 내외로 유지되었으며 최고 16.7 %의 지질의 함량을 가지는 것을 확인하였다(Table 13) [48].

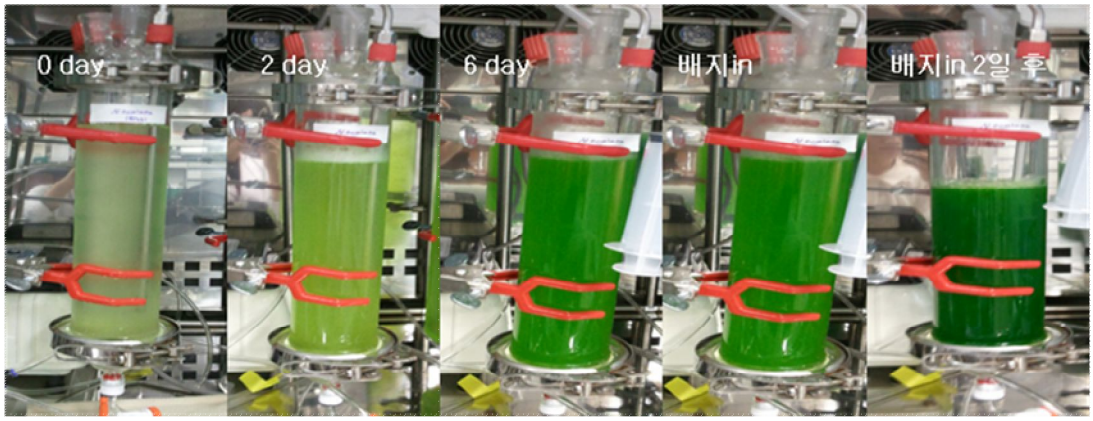
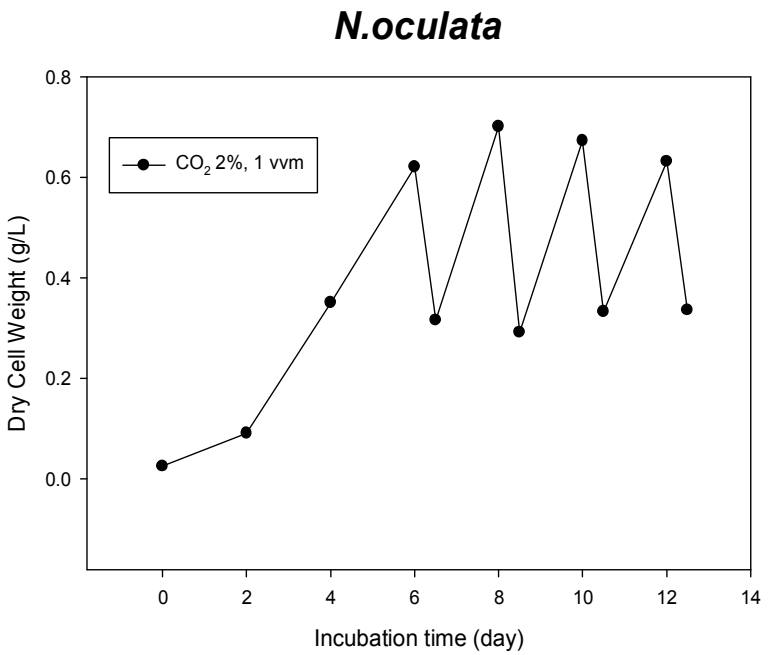


Fig. 27. Repeated fed-batch culture of *N. oculata.*

(a)



(b)

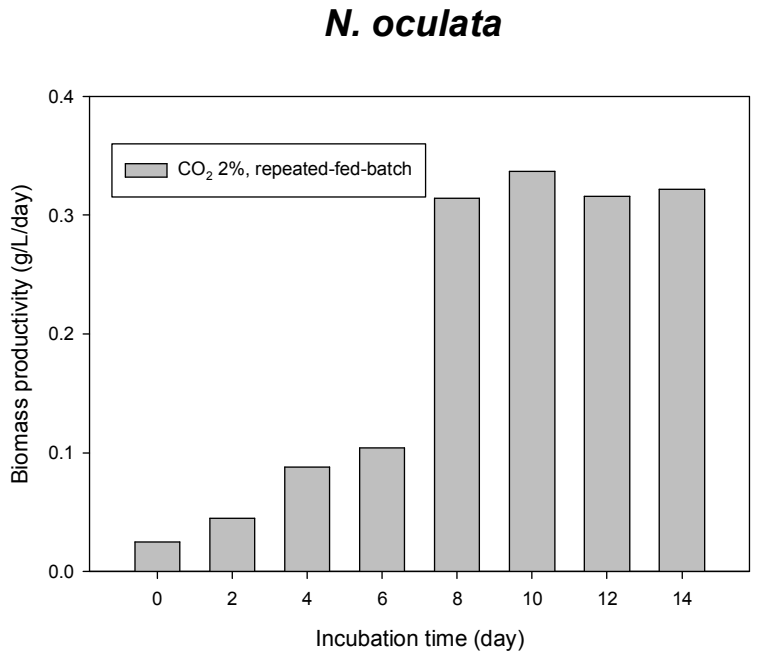


Fig. 28. Changes of (a) dry cell weight and (b) biomass productivity of *N. oculata* with the repeated fed-batch culture.

Table 15. Biomass productivity, total fatty acid and oil content of *N. oculata* on repeaed fed-batch

	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil contents (%)
4 day	88.0	71.7	7.2
6 day	104.0	142.3	14.0
#1(8 day)	314.0	152.4	15.3
#2 (10 day)	337.0	163.5	16.4
#3 (12 day)	316.0	157.4	15.7
#4 (14 day)	322.0	167.4	16.7

7. 비닐백을 이용한 배양공정

7.1 *Tetraselmis chui*

반응기 초기 제작비용을 절감하기 위해서 비닐백 반응기를 이용하여 배지는 2 % 해수 F/2-si x 3 배지를 사용하였고 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지시키고 CO_2 농도는 2%로 유량을 1 vvm 유지하여 6 일간 배양하였다(Fig. 29).

그 결과 6 일 째 유리반응기와 비슷한 0.84 g/L 의 건조 균체량을 가지는 것을 확인하였다(Fig. 30). Biomass productivity 는 다른 논문에 *Tetraselmis sp.*가 회분식 배양을 했을 때, 300 mg/L/day 의 biomass productivity 보다 절반이 낮은 유리 반응기와 비슷한 140 mg/L/day 였지만, 지방의 함량은 다른 논문에 *Tetraselmis sp.*가 회분식 배양을 했을 때, 14.7 %의 지질의 함량이 나오는 것에 비교해 배양 마지막 날인 6 일 후엔 29.6 %로 두 배정도 높게 나왔으며, 유리 반응기에 비해 10 % 높은 지질의 함량을 가지는 것을 확인하였다[46] (Table 14).

Fig. 29. Use of plastic bag photobioreactor for *T. chui.*

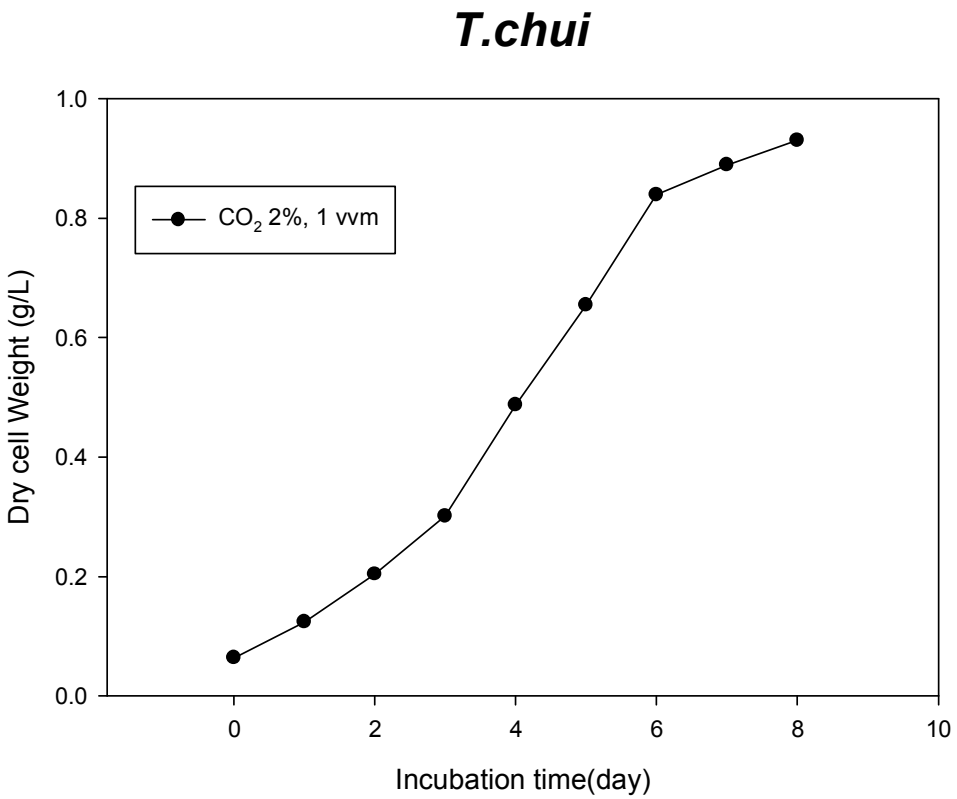


Fig. 30. *T. chui* growth curve using plastic bag photobioreactor.

Table 16. Biomass productivity, fatty acid weight and oil content of *T. chui* on plastic bag photobioreactor

	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
3 day	100.0	55.7	18.5
4 day	122.0	121.6	25.0
6 day	140.0	248.0	29.6

7.2 *Dunaliella tertiolecta*

반응기 초기 제작비용을 절감하기 위해서 비닐백 반응기를 이용하여 배지는 2 % 해수 F/2-si x 3 배지를 사용하였고 온도는 23 ℃, 빛의 주기는 14:10 hr (light:dark), 조도는 110 μmol/m^2/s 로 유지시키고 CO_2 농도는 2 %로 유량을 1vvm 6 일간 배양하였다(Fig. 31).

그 결과 6 일 째 유리반응기와 비슷한 0.84 g/L 의 건조 균체량을 가지는 것을 확인하였다(Fig. 32). Biomass productivity 는 다른 논문에 *D. tertiolecta* 가 회분식 배양을 했을 때, 360 mg/L/day 의 biomass productivity 보다 3 배가 낮은 유리 반응기와 비슷한 140 mg/L/day 였지만, 지방의 함량은 다른 논문에 *D. tertiolecta* 가 회분식 배양을 했을 때, 21.7 %의 지질의 함량이 나오는 것에 비교해 배양 마지막 날인 6 일 후엔 30.8 %로 10 % 높은 지질의 함량을 가지는 것을 확인하였다[46-47](Table 17).

Fig. 31. Use of plastic bag photobioreactor for *Dunaliella tertionlecta.*

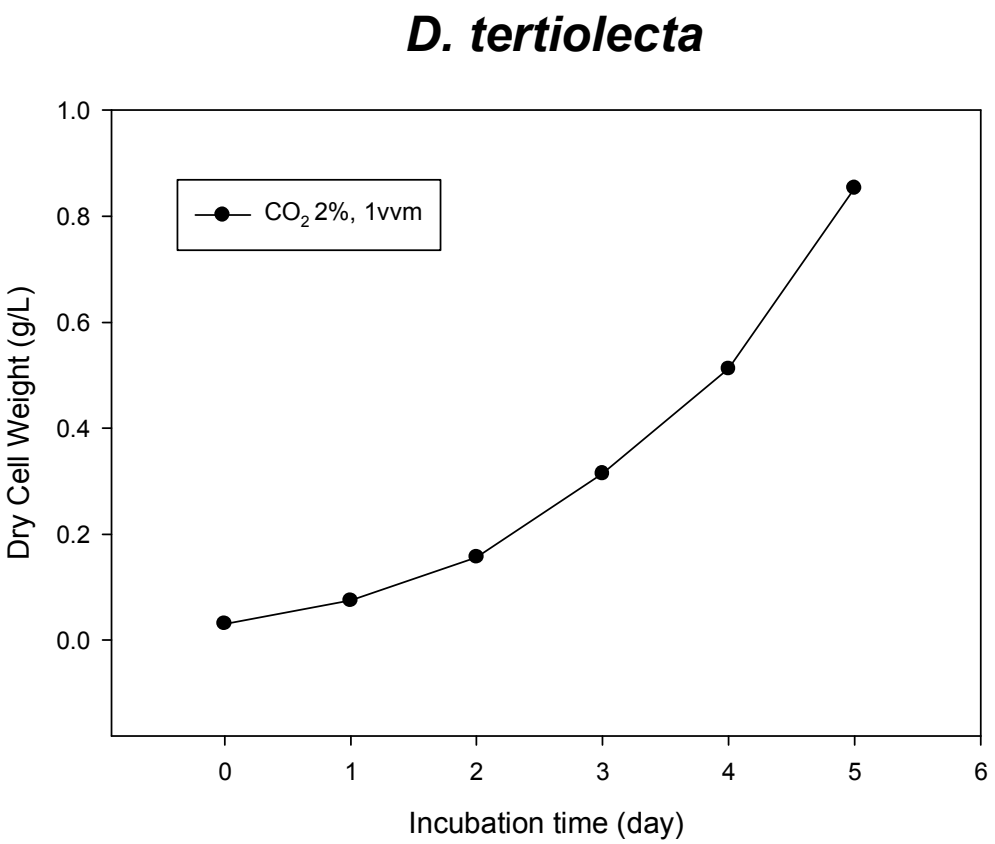


Fig. 32. *D. tertiolecta* growth curve using plastic bag photobioreactor.

Table 17. Biomass productivity, fatty acid weight and oil content of *D. tertiolecta* on plastic bag photobioreactor

	Biomass productivity (mg/L/day)	Total fatty acid (mg/L)	Oil content (%)
3 day	104.7	67.9	21.6
4 day	128.0	150.9	29.4
5 day	170.6	262.4	30.8

제 5 장 결론

본 연구에서는 미세조류의 성장과 지질의 성분을 최대로 생산을 위해 균주를 선별하고 성장 조건을 최적화 실험을 진행하였다. 균체 성장률이 높고 지질의 함량이 높은 균주를 대량배양을 위해서는 배양에 영향을 미칠 수 있는 인자로서 조도, 빛 주기, 이산화탄소, 산소와 같은 기체의 전달, 배지, 온도, CO_2 의 농도와 대한 최적를 위한 중요한 요인들이다. 그래서 성장 요인을 조절하여 배양하였다.

T. chui, D. tertiolecta, N. oculata 세 종 모두 최적배양 조건은 온도 23 ℃, 조도 110 μmol/m^2/s, 빛 주기 14:10 hr (L:D) cycle, 배지 F/2-si x 3, CO_2 의 농도는 2 %로 1 vvm 유속으로 공급해서 배양하였을 때, 균체 건조량와 지방의 함량이 가장 높게 나타났다. *D. tertiolecta* 는 가장 높은 균체 건조량인 1.14 g/L 와 지방 함량인 26.3 %, *T. chui* 과 *N. oculata* 종은 각각 0.86 g/L, 0.79 g/L 의 균체 건조량를 나타냈고, 지방의 함량은 각각 24.3 %와 20.2 %를 나타내었다.

각 균주의 biomass productivity 를 증가 시키기 위해서 균체의 성장이 최고인 시점에 균체량 만큼의 배지를 공급하고 2 일에 한 번 꼴로 배지를 공급하고 수확하는 repeated fed-batch 를 2 주간 시행하였다.

세 종 중에서, *D. tertiolecta* 의 biomass productivity 는 초기 배양 4 일이 지난 후 133 mg/L/day 에서 배지의 수확과 공급이 반복 될수록 점점 증가하여 최고 478 mg/L/day 로 4 배 정도 증가하였고 지방의 함량 역시 repeated fed-batch 가 반복되어도 20 % 내외로 유지되었으며 최고 21.6 %의 지방의 함량을 가졌다. *T. chui* 의 biomass productivity 도 초기 배양 4 일 후엔 224 mg/L/day 에서 배지의 수확과 공급이 반복하여 최고 415 mg/L/day 로 2 배 정도 증가하였고 지방의 함량은 20 % 내외를 유지하였고 최고 22 %의 지방의 함량은 가졌다. *N. oculata* 역시 biomass productivity 은 초기 배양 6 일 후에 104 mg/L/day 에서 배지의 수확과 공급이 반복 될수록 증가하여 최고 337 mg/L/day 로 3 배정도 증가하였고 지방의 함량은 다른 종들보다 보다 낮은 16 % 내외를 유지하였으며, 최고 16.7 %의 지방의 함량을 가졌다.

유리 광 생물반응기는 깨지기 쉬우며, 초기 제작 비용이 많이 들기 때문에 반응기 제작 원가를 절감하기 위해서 비닐백을 이용해서 배양하였다. *D. tertiolecta*은 배양 마직막 날 균체 건조량이 유리 광 생물반응기와 비슷한 1.024 g/L 가 나왔으나, 지방의 함량은 30.8 % 유리 반응기에 비해 5 %가 높은 수치가 나왔다. *T. chui*은 또한 균체건조량이 유리 광 생물반응기와 비슷한 0.84 g/L 의 건조 균체량를 가졌으나 지방의 함량은 29.8 %로 유리 광 생물반응기에 비해 10 %가 높은 효율을 얻었다.

참고문헌

1. S. H. Choi, Y. T. Oh and J. D. So (2006), "Characteristics of Exhaust Emmision by the Application of Biodiesel Fuel and Oxygenates as an Alternative Fuel in an agricultural Diesel Engine." *J. Biosystems Eng.* 31: 457-462
2. S. M. Jeon, I. H. Kim, J. M. Ha, J. H. Lee (2008), "Overview of technology for fixation of carbon dioxide using microalgae." *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 19(2): 145-150.
3. J. I. Park, H. C. Woo, J. H. Lee (2008), "Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives." *Korean Chem. Eng. Res.* 46: 833-844
4. H. M. Oh, C. Y. Ahn (2009), "CO_2 fixation and biodiesel production using microalgae." *Korean Ind. Chem. News.* 12(5): 12-20.
5. M. L. Ghirardi, L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, (2000), "Microalgae: a green source of renewable H_2." *Trends Biotechnol.* 18(12): 506-511
6. A. S. Fedorov, S. Kosourov, M. L. Ghirardi, M. Seibert. (2005), "Continuous H_2 photproduction by Chlamydomonas reingardtii using a novel tow-stage, ulfate-limited chmostat system." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121124:403-12
7. Chisti, Y. (2007) "Biodiesel from microalgae." *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306
8. X. Miao, Q. Y. Wu (2006), "Biodiesel production from Heterotrophic microalgal oil." *Bioresour. Technol.* 97(6): 841-846.

9. A. Widjaja, C. C. Chien, Y. H. Ju (2009), “Study of increasing lipid production from fresh water micro algae Chlorella vulgaris.” *J. Taiwan Institite Chem. Engin.* 40(1): 13-20.
10. A. Richimond (1986), "Microalgae of Economic Potential. In hand book of microalgae mass culture". *CRC press, ed. A Richimond, Florida*, 199-243
11. A. Hallmann (2007), “Algae transgenics and biotechnology.” *Transgenic* 1(1): 81-98
12. B. H. Cho, H. J. Cha, (2010), “Biodiesel production using microalgal marine biomass.” *KSBB journal.* 25: 109-115
13. A. M. Illman, A. H. Scragg, S. W. Shales (2000), " Increase in Chlorella strains calorific val-ues when grown in low nitrogen medium." *Enzyme Microb. Technol*, 27(8): 631-635
14. M. E. Huntley, D. G. Redalje, (2007), "CO_2 mitigation and renewable oil from photosynthetic microbe: A new appraisal." *Mitig Adapt Strat Glob change*. 12(4): 573-608
15. P. M. Schenk, S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer (2008), “Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production.” *Bioenerg. Res.* 1: 20-43
16. L. Jiang, S. Luo, X. Fan, Z. Yang, R. Go (2011), “Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO_2.” *Appl. Energy.* 88(10): 3336-3341
17. J. N. Rosenberg, G. A. Oyler, L. Wilkinson, M. J. Betenbaugh (2006) “A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution.” *Current Opinion Biotechnol.* 19: 430-436

18. L. Qiang, D. Wei, L. Dehua (2008), “Perspectives of microbial oils for biodiesel production.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 749-756
19. 김세권 (2000), 미래가 보이는 해양의학과 과학, 양서각 :200-205
20. I. A. Guschina, J. L. Harwood (2006), “Lipid and lipid metabolism in eukaryotic algae.” *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186
21. P. M. Schenk, S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer (2008), "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production." *Bioenerg. Res.* 1: 20-43
22. B. D. Fernandes, F. M. Dragone, J. A. Teixeira, A. A. Vicente (2010) "Light Regime Characterization in an Airlift Photobioreactor for Production of Microalgae with High Starch Content.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161: 218-226
23. C. G. Lee (1999) “Calculation of light penetration depth in photobioreactors.” *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4: 78-81
24. S. S. Oncel, E. I amoglu, E. Gunerken, F. V. Sukan (2011) "Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of Haematococcus pluvialis and Chlorella zofingiensis." *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86: 414--420
25. J. H. Mussgnug, S. T. Hall, J. Rupprecht, A. Foo, V. Klassen, A. McDowall(2007) "Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion." *Biotechnol. Journal.* 5: 802-.814
26. M. Janssen, P. Slenders, J. Tramper (2001) "Photosynthetic efficiency of Dunaliella tertiolecta under short light/dark cycles." *Enzyme Microb. Tech.* 27: 431-437

27. S. M. Renaud, L. V. Thinh, G. Lambrinidis, D. L. parry, (2002), "Effect of temperature on growth, chmical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures." *Aquaculture*, 211: 195-214

28. A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, M. D. Borghi (2009), "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production." *Chem. Engin. Processing* . 48: 1146-1151

29. M. M. Basova (2005), "Fatty acid composition of lipid in microalgae." *Int. J. Algae.* 7: 33-57

30. L. Brennan, P. Owende (2010) "Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products." *Renewable. Sustaninable Energy Reviews.* 14: 557-577

31. L. Jiang, S. Luo, X. Fan, Z. Yang, R. Guo (2011) "Biomass and lipid production for marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO_2." *Appl.Energy.* 88: 3336-3341

32. E. M. Grima, F. G. Acie ´ n Ferna ´ ndez, F. Garcı ´ a Camacho, Y. Chisti (1999) "Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup." *J. Biotechnol.* 70: 231-247

33. N. Zhila, G. Kalacheva, T. Volova (2005), "Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga Botryococcus braunii Kutz IPPAS H-252." *Russian. J. Plant Physiol.* 52: 31-319

34. J. Jo, D. Lee, J. Park (2006), "Modeling and optimization of photosynthetic hydrogen gas production by green alga Chlamydomonas reinhardtii in sulfur-deprived circumstance." *Biotech. Prog.* 22: 431-437

35. G. Kirst (1990) "Salinity tolerance of eukaryotic marine-algae." *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 41: 21-53

36. S. Merchant, M. Allen, J. Kropat (2006) "Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*." *Biochem. Biophys. Acta.* 1763: 578-594

37. C. T. Evans, C. Ratledge (1984) "Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts.", *J. Gen. Microbiol.* 130: 1693-1704

38. G. Turcotte, N. Kosaric (1988) "Biosynthesis of lipid by Rhodosporidium toruloides ATCC 10788." *J. Biotechnol.* 8(3): 221-237

39. J. Sheehan, T. Dunahaym J. Benemann, P. Roessler (1998) "A look back at the U.S. department of energy 's aquatic species program-biodiesel from alga." *Office fuels development.* 1: 96-149

40. H. S. Kim (2003), "Enzyme-catalyzed transesterification of soybean oil into biodiesel." *J. Korean oil chemists' Soc.* 20(3): 251-258

41. S. H. Ha, S. H. Lee, S. M. Hwang, Y. M. Koo (1999) "Enzyme and microbial technology.", 41: 480-483

42. M. M. Bradford (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 76: 248-254

43. M. G. de Morais, J. A. V. Costa, (2007) "Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide." *Energy Conv. Manag.* 48: 2169-2173

44. E. H. Chang, S. S. Yang, (2003) "Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide." *Bot. Bul. Acad. Sin.* 44: 43-52

45. H. Hu, K. Fao, (2003), "Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, Nannochloropsis sp. with enriched carbon sources." *Biotechnol. Lett.* 25: 421-425

46. C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah, D. J. Lee, J. S, Chang (2011), "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review." *Bioresource Technol.* 102(1): 71-81

47. H. Tang, N. Abunasser, M. E. D. Garcia, M. Chen, K.Y. Simon, S. O. Salley (2011) "Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel." *Appl. Energy*. 88:3324-3330

48. A. L. Ahmad, N. H. M. Yasin, C. J. C. Derek, j. K. Lim (2011) "Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review." *Renewable. Sustainable. Energy Reviews.* 15: 584-593

감사의 말

지난 시간 동안 대학원 석사과정을 마무리 하면서 많은 도움을 주신 분들께 감사의 말씀을 전하고자 합니다. 2010 년도에 처음 실험실에 들어와 지금까지 부족한 점 투성인 저를 받아주시고, 항상 저에게 많은 가르침과 도움을 주신 이중헌 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 바쁜 시간을 쪼개어 논문 준비에 많은 도움을 주시고, 항상 많은 가르침을 주신 김정규 교수님과 신현재 교수님께 진심으로 감사드립니다. 학부 때부터 항상 가르침과 따뜻한 격려 해주신 김선일 교수님, 차월석 교수님, 이재욱교수님, 조병욱 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 항상 조언과 격려 해주신 노성희 박사님, 손정선 박사님, 최수경 박사님께 감사드립니다.

그리고 2007 년도부터 지금까지도 잊지 않고 따뜻한 격려와 조언 해주는 려화언니, 길면 길고, 짧으면 짧은 시간 동안 격려해 준 고운언니, 지용오빠, 춘화언니, 홍일오빠, 그리고 같이 생활은 하지 않았지만 항상 격려해주신 찬준오빠, 춘희언니에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 항상 옆에서 묵묵히 챙겨주는 현우오빠, 항상 웃음을 주는 보람이와 새로미, 안지는 오래 되었지만 이제 같이 생활하게 된 보미와 세희, 부족하지만 잘 따라준 민성, 아라, 지나, 혜영이, 그리고 항상 힘이 되어준 경량오빠, 성욱오빠, 승현오빠, 윤수오빠, 현정언니에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 그리고 함께 석사 과정을 하면서 힘들 때 힘이 되어 주고 격려해주던 승우오빠, 영덕이, 지은이, 현이에게 항상 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

마지막으로 25 년동안 절 키워주시고, 때론 앞에서 끌어주시고, 때론 뒤에서 힘이 되어 주신 부모님께 감사드립니다. 또한 석사과정을 준비하면서 안 좋은 일로 걱정을 끼쳐드린 점 죄송합니다. 때론 어린아이처럼 어리광을 부리고, 때론 오빠인양 힘이 되어준 동생 지헌이에게 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

항상 감사하는 마음을 가지고 살며, 많이 부족하지만 더 잘 할 수 있도록 노력하는 지순이가 되도록 하겠습니다. 감사합니다.

2012 년 1 월

김 보 람