

Article

실외 배양 조건에서 요소를 첨가한 배지 성분에 따른
*Spirulina (Arthrospira) platensis*의 성장 비교

이대원¹ · MD Abu Affan⁴ · 이현용⁵ · 마채우⁶ · 박흥식¹ · 권문상³ · 강도형^{2*}

¹한국해양과학기술원 태평양해양연구센터

²한국해양과학기술원 해외생물자원연구센터

³한국해양과학기술원 해양정책연구소

(426-744) 경기도 안산시 상록구 해안로 787

⁴Marine Biology Department, Faculty of Marine Science, King AbdulAziz University
Jeddah 21589, Saudi Arabia

⁵서원대학교 바이오융합학부 식품공학과

(361-742) 충북 청주시 무심서로 377-3

⁶순천향대학교 자연과학대학 해양생명공학과

(336-745) 충남 아산시 순천향로 22

Comparison of Biomass Production of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in
Outdoor Culture Conditions Using Different Media by Urea Addition

Dae-Won Lee¹, MD Abu Affan⁴, Hyeon-Yong Lee⁵, Chae Woo Ma⁶, Heung-Sik Park¹,
Moon-Sang Kwon³, and Do-Hyung Kang^{2*}

¹Pacific Ocean Research Center, KIOST

²Global Bioresources Research Center, KIOST

³Ocean Policy Institute, KIOST

Ansan 426-744, Korea

⁴Marine Biology Department, Faculty of Marine Science, King AbdulAziz University
Jeddah 21589, Saudi Arabia

⁵Department of Food Science and Engineering, Department of Food Science and Technology
Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

⁶Department of Marine Biotechnology, College of Natural Sciences, Soon Chun Hyang University
Asan 336-745, Korea

Abstract : One of the most important challenges facing the *Spirulina* mass cultivation industry is to find a way to reduce the high production costs involved in production. Although the most commercial medium (Zarrouk's medium) for *Spirulina* cultivation is too expensive to use, it contains higher amount of NaHCO₃ (16.80 g L⁻¹), trace metals and vitamin solutions. The purpose of this study was to increase the efficiency of *Spirulina platensis* biomass production by developing a low-cost culture medium at an isolated tropical island such as Chuuk State, Federated States of Micronesia (FSM). This study set out to formulate a low-cost medium for the culture of *S. platensis*, by substituting nutrients of Zarrouk's medium using fertilizer-

*Corresponding author. E-mail : dohkang@kiost.ac

grade urea and soil extract with a different concentration of carbon source under natural weather condition. In order to select a low-cost culture medium of *S. platensis*, 10 culture media were prepared with different concentrations of nitrogen (urea and NaNO_3) and NaHCO_3 . The highest maximum specific growth rate (μ_{max}) and mass production were 0.50 day^{-1} and 1.05 g L^{-1} in modified medium (NaHCO_3 7.50 g L^{-1} , urea 2.00 g L^{-1} without NaNO_3) among all the synthesized media. Protein (56.14%) and carbohydrate (16.21%) concentrations of the lyophilized standard samples were estimated with highest concentration of glutamic acid (14.93%). This study revealed that the use of a low concentration of urea and NaHCO_3 with soil extract was an affordable medium for natural mass cultivation in the FSM.

Key words : *Spirulina platensis*, cyanobacteria, low-cost medium, protein, urea

1. 서 론

스피롤리나는 NASA 및 WHO에서 인증한 우주식품이자 슈퍼푸드로 알려져 있으며, 그 영양학적 가치를 기반으로 건강 보조 식품 및 기능성 식품 연구(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. 1996) 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 1998; Ahsan 2008). 한편 스피롤리나를 생산하기 위한 표준배지(Zarrouk's medium or modified zarrouk's medium)는 고가의 제조가격 때문에 대량배양에서 투입비용에 문제점이 있어(Richmond 2004), 이를 해결하기 위한 방법으로서 표준배지 조성(Zarrouk 1966) 중 대부분을 차지하는 중탄산나트륨(NaHCO_3) 및 질산나트륨(NaNO_3)의 함량을 줄이는 방법 또는 축산 폐수를 질소 원료로 전환하여 배양에 이용한 연구(Olguin et al. 2001; Hong et al. 1993; Lun and Cheng 2006), 요소($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), 염화암모늄(NH_4Cl), 질산암모늄(NH_4NO_3), 인산암모늄($\text{H}_12\text{N}_3\text{O}_4\text{P}$), 유안($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 등을 질소원료로 이용한 연구(Meeks et al 1983; Faintuch et al. 1992; Costa et al. 2001) 및 단일의 과인산염(single superphosphate), 염화칼륨(KCl)을 첨가하여 스피롤리나 배양액 제조를 위한 비용을 줄이는 연구 등이 보고되고 있다(Raouf et al. 2006). 또한 광 효율을 높이기 위해 실내 배양실에 반사판을 설치하고, 배양액의 질소원을 요소로 사용하여 일반적인 생산량 보다 훨씬 상회하는 6.9 g L^{-1} 의 높은 바이오매스를 생산한 연구도 보고되고 있다(Ajayan et al. 2012). 그러므로 저가의 탄소원과 요소를 사용하고 광효율을 증진시킬 수 있는 시스템이 갖춰진다면 통상 스피롤리나의 평균생산량($1 \text{ g L}^{-1} \text{ week}^{-1}$) 보다 높은 생산량을 얻을 수 있다. 또한, 스피롤리나 배양을 위해 요소를 질소원료로 활용하

는 연구는 이미 다양한 결과를 가져왔는데, 요소로부터 전환된 암모니아에 의한 성장저해(Faintuch et al. 1992, Costa et al. 2001) 및 첨가된 요소의 농도에 따라 스피롤리나의 성장 변화(Danesi et al. 2002)가 나타난다고 하였다.

미국은 해양심층수를 활용한 배지 개발과 이러한 배지 환경에서 20여년간 적응시킨 개량 스피롤리나(*S. platensis pacifica*)를 이용하여 기업형 대량배양 조건이 구축(Cyanotech 2013)되어 있는 반면, 국내에서는 실험실, 20톤급 플랜트 규모의 배양 및 생리활성에 대한 연구가 진행되고 있다. 또한 이 연구를 수행한 지역인 마이크로네시아 연방의 축주는 태양광 조건과 기온이 스피롤리나 배양에 적합한 자연환경을 보유하고 있으나, 상대적으로 안정적 대량생산을 위한 인프라가 낙후된 곳이므로 저가 배양액 개발 및 양호한 품질을 가진 지역 상품으로 개발하는데 중요한 고려기준이 될 수 있다. 따라서 스피롤리나의 성장 및 품질은 동일한 배지를 사용하더라도 배양환경에 따라 종종 다르게 나타나는 특성(Goksan et al. 2007)을 고려하여 자연조건에서 요소를 첨가한 배지를 사용하여, 가능성을 평가하고 안정적인 스피롤리나의 대량배양을 위한 경제적 배양배지 개발 및 품질평가의 기초자료를 얻고자 이 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

연구 지역

스피롤리나 균주(*Spirulina platensis*)의 배양은 마이크로네시아 연방 축주에 위치한 웨노섬에서 ($7^{\circ}27'08.8''\text{N}$, $151^{\circ}53'53.8''\text{E}$)에서 수행하였다(Fig. 1). 축주는 육지 면적이 49.2 평방 마일, 연평균 기온이 $29\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 이며, 강우량은 연평균 약 $3,650 \text{ mm}$ 로 국지성 호우(squall)가 잦은 지역이다. 7월부터 11월 사이에는 무역풍이 부는 시기이며, 이 시기에는 태양광이 보다 강하다. 1월부터 3월이 건기에 해당하며, 2월이 연중 가장 건조한 시기인데(Eroarome 2009), 본 실험은 2007년 9월 실외배양 조건에서 14일 동안 진행되었다.

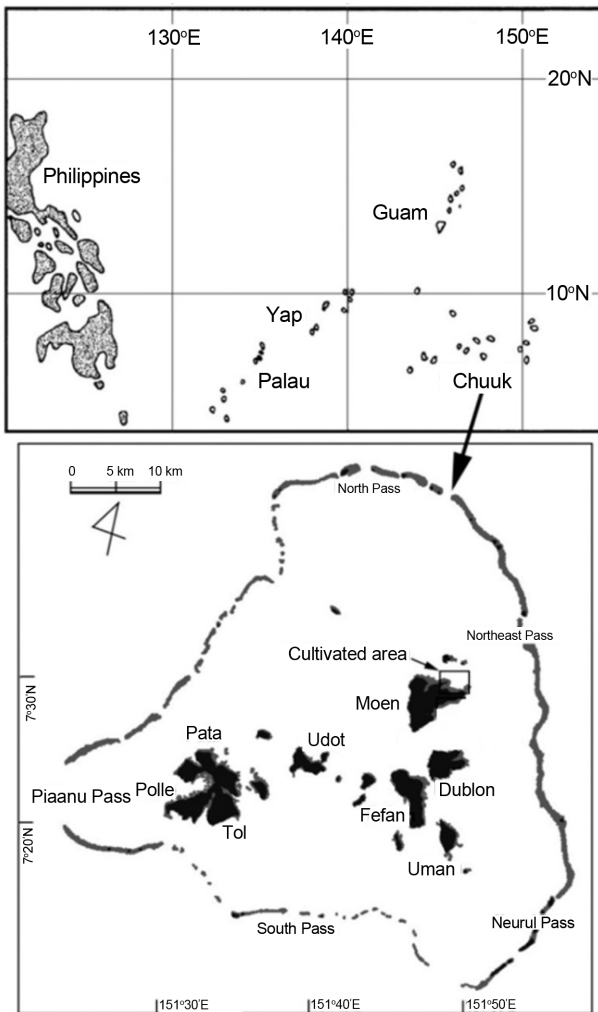


Fig. 1. Study area for outdoor culture of *Spirulina platensis* located in Korea South Pacific Ocean Research Center

배지 준비

현지에서 지하 50 m에서 채수한 지하수를 이용하여 배양수와 산의 표층부에서 채취한 일반토양을 각각 500:1 (w/w) 비율로 희석시키고 90°C까지 가열한 후 실온에서 12시간 보관하여 침전물을 가라앉게 하였고 토양 희석액의 상등액만을 멸균된 20-L 플라스틱 용기에 옮겨 담아 토양 추출물을 만들었고, 스피롤리나 배양에 필요한 다른 영양염들을 추가로 첨가하여 배지로 사용하였다.

일반적으로 토양추출물은 토양에 포함된 영양염을 배양수에 녹여 배지로 사용하는 것으로 다양한 미세조류의 배양에 활용되어 왔으며, 미세조류 원종 관리를 위해 일부 종에 한해 현재까지도 계속 사용되고 있다. 간단하게 인과 질소원에 토양추출물 만을 첨가하여 미세조류를 배양하기도 한다(Andersen 2004).

실험에 사용된 요소(CO(NH₂)₂, 남해화학㈜)는 농업용으로 사용되는 등급이며, 요소 외의 다른 시약은 모두 실험용(Junsei Chemical, Japan)으로 사용되는 등급으로 배지에 첨가하였다. 실험구 A에는 요소 2 g L⁻¹, 실험구 B는 요소 4 g L⁻¹, 실험구 C는 요소 6 g L⁻¹를 유지하였고, A-C 실험구의 1,2,3에는 각각 5, 7.5, 10 g L⁻¹의 중탄산나트륨을 첨가하여 A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, 질소원으로 요소 대신 질산나트륨을 첨가한 대조군 R1까지 총 10개의 실험을 실외에서 진행하였다. 탄소원으로 탄산나트륨(Na₂CO₃)을 추가로 첨가하였으며 질소원 및 탄소원 외에 다른 영양염들은 Zarrouk's 배지와 동일하게 첨가하였다(Table 1). 미량원소는 토양 추출물로 대체하였으며(Andersen 2004), 배지 내 토양 추출물의 농도는 A, B, C 실험구 및 대조구(R1)에 동일하게 2 g L⁻¹이 유지되도록 하였다.

Table 1에서 R2(Raouf et al. 2006)의 배지 조성은 일반적으로 스피롤리나를 배양하기 위해 사용되는 Zarrouk's 배지이며, R3(Celekli and Yavuzatmaca 2009)의 배지 조성은 Zarrouk's 배지에서 일부 개량된 형태의 배지 조성이다.

배양환경 측정

스피롤리나의 배양환경 중 광량변화는 조도측정기(Lux/Fc Light Meter-205, TENMARS, Electronics Co., Ltd, Taiwan)를 사용하여, 2일 간격으로 오전 9시, 오후 1시, 오후 5시에 각각 측정하였다. 배양액의 수온, pH 및 염분은 광량 측정과 동일한 시간에 수질측정기(MPS556, YSI Incorporated, USA)를 사용하여 측정하였다.

성장 및 바이오매스 평가

스피롤리나 배양 실험은 투명한 원통형 플라스틱 재질의 용기(20-L)에서 진행되었다. 용기속에서 지속적인 교반을 위해 브로워 펌프(AD60, Air high-tech)를 사용하였다. 초기 접종량은 건조 중량으로 0.001 g L⁻¹이었다. 각각의 배양용기에서 20 mL씩 2일 간격으로 시료를 채수하였고, 수집된 시료는 미리 무게를 잰 GF/F(Whatman) 필터를 통과시킨 후 60°C 조건의 건조 오븐에서 24시간 건조하였으며 증류수 20 mL을 통과시킨 GF/F 필터를 대조구로 사용하였다. 건조된 필터의 무게를 측정하였고, g L⁻¹로 환산하여 표기하였다.

단위 시간당 바이오매스의 증가는 최대 비성장률 [maximum specific growth rate: $\mu_{max}(\text{day}^{-1}) = \ln(X_1/X_0)/(t_1 - t_0)$]을 이용하여 산정하였다(Pirt 1975). X₀와 X₁은 최초 접종 시점부터 최대성장 사이에 선택된 시간 중 실험시작(t₀)과 종료(t₁) 시의 바이오매스 생산량을 의미한다.

Table 1. Modified media formulation for cultivation of *S. platensis*

Medium Components	Urea used as nitrogen source									NaNO ₃ used as nitrogen source		
	A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	C3	R1	R2	R3	
NaHCO ₃	5.00	7.50	10.00	5.00	10.00	5.00	7.50	10.00	9.00	16.80	13.61	
Na ₂ CO ₃	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	4.03	-	4.03	
NaNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	2.50	2.50	2.50	
Urea	2.00	2.00	2.00	4.00	4.00	6.00	6.00	6.00	-	-	-	
NaCl	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	
K ₂ HPO ₄	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.50	0.50	
K ₂ SO ₄	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	
Na ₂ EDTA	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	
Vitamin B12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00015	
A5 Solution (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00		
Metal solution (mL)											6.00	
Micronutrient solution (mL)											1.00	
Soil extract	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	-		

Added medium components unit : g L⁻¹

R1: Control group in this study

R2: Raouf et al. (2006) / Zarrouk's medium, 2.5 L erlenmeyer flask, 30°C, 12L:12D, 18 days growth duration

R3: Celekli and Yavuzatmaca (2009) / Modified Zarrouk's medium (Schlösser, 1982), 250 mL erlenmeyer flask, 30°C, 10 days growth duration

현미경 관찰

실험 종료일에 오염생물 출현 여부 및 스피롤리나 개체의 나선 횟수는 1-mL의 샘플을 혈구계수판에 넣어 도립현미경(Olympus, CKX41, Japan)으로 관찰하였다. 최종적으로 각 실험구별 배양 스피롤리나는 실험 종료일에 20 µm 망목의 물러가제를 사용하여 모두 수확하였고, -70°C의 초저온냉동고에 보관하였다. 보관 48시간 후, 스피롤리나의 생화학적 분석을 위해 동결건조기(Ilshin biobase, FD8518)로 건조하였다.

일반성분 및 아미노산 분석

배양기간 중 성장이 가장 우수했던 실험구 A2의 건조분말을 우선적으로 선택하여 AOAC(Association of Official Analytical Chemists; Thompson and Merola 1993) 방법에 따라 조체의 단백질, 지방, 탄수화물, 수분, 회분 및 아미노산 함량을 분석하였다.

3. 결 과

배양 환경

실험 및 배양기간 동안 광량은 479-2,492, 429-3,300 및

182-660 µmol photon m⁻² s⁻¹(9:00 am, 1:00 pm 및 5:00 pm)을 각각 나타냈다. 실험구별 수온의 변화는 유의한 차이가 없었으며, 전 실험구의 배양 수온은 평균 29.22-29.47°C 범위에서 유지되었다. 요소를 질소원으로 사용한 실험구들(A-C)의 염분은 평균 3.85-5.76 psu의 범위를 보였고, 배양기간 동안 C2 배지에서 가장 높게 나타났다(6.28 ± 0.42 psu). 질산나트륨을 질소원으로 사용한 대조군 R1의 염분 값은 평균 8.46 ± 0.54 psu로 요소를 질소원으로 사용한 실험군보다 유의하게 높은 값을 나타냈다. pH의 범위는 모든 실험구에서 큰 차이가 없었다. 요소를 질소원으로 사용한 실험구에서는 평균 7.94-8.19의 범위를 나타냈고, 평균값은 8.12 ± 0.32로서 질산나트륨을 질소원으로 사용한 대조군 R1의 평균값 8.14 ± 0.23와 유사하였다 (Table 2).

배지에 따른 성장 및 바이오매스 수득량

스피롤리나는 배양 일주일 만에 사멸한 B2를 제외하고는 배지 조성에 따라 0.71-1.05 g L⁻¹의 범위에서 서로 다른 바이오매스를 나타냈으며, 실험군의 단위시간 당 최대 비성장률(µ_{max})은 0.47-0.50 day⁻¹ 범위를 기록하였으며 전반적으로 배양 12일에서 14일차에 나타났다. 최대비성

Table 2. Variation of light intensity, and of mean values of water temperature, salinity and pH for the period of *S. platensis* cultivation

Light intensity (day)	0	2	4	6	8	10	12	14			
9:00 am	2260.5	2310.0	478.5	2491.5	2491.5	2112.0	2062.5	1897.5			
1:00 pm	2491.5	2970.0	429.0	3300.0	3300.0	2491.5	1584.0	1617.0			
5:00 pm	346.5	330.0	181.5	379.5	429.0	297.0	643.5	660.0			
	R1	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	
Temperature	29.26±0.83	29.47±0.83	29.38±0.82	29.28±0.79	29.26±0.81	29.32±0.83	29.22±0.83	29.33±0.80	29.35±0.83	29.22±0.88	
Salinity	8.46±0.54	3.85±0.26	4.43±0.24	4.26±0.38	4.97±0.21	4.92±0.24	4.08±0.33	5.76±0.27	6.28±0.42	3.97±0.18	
pH	8.14±0.23	8.18±0.35	8.14±0.36	8.07±0.32	8.17±0.30	7.94±0.27	8.12±0.31	8.19±0.30	8.14±0.29	8.08±0.31	

*Light intensity unit : $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ day}^{-1}$, water temperature unit : $^{\circ}\text{C}$, salinity unit : psu

Table 3. Maximum specific growth rate (μ_{max}), coil number and biomass production of this study

Factors	Experimental groups								
	R1	A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	C3
$\mu_{\text{max}} (\text{day}^{-1})^*$	0.49	0.47	0.50	0.47	0.48	0.49	0.48	0.48	0.49
Coil No.	8.55	9.45	8.55	7.75	10.30	7.55	9.60	7.80	11.95
Biomass (g L^{-1})	0.97	0.75	1.05	0.71	0.85	0.97	0.87	0.80	1.02

* $\mu_{\text{max}} (\text{day}^{-1})$: Maximum specific growth rate in a day

Table 4. Major nutrients and amino acids compositions (%) of lyophilized *S. platensis* cell from A2 experiment

	Protein		Lipid		Carbohydrate			Ash		Moisture							
Major nutrients	56.14		0.75		16.21			20.98		4.92							
	Asp	Thr ^e	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val ^e	Met ^e	Iso	Leu	Tyr	Phe ^e	Lys ^e	His ^e	Arg
Amino acids	10.40	5.92	4.79	14.90	4.51	5.07	7.61	0.56	6.76	3.10	6.76	0.85	0.56	6.76	7.04	2.54	10.40

*^e: Essential amino acids

장률 및 바이오매스는 A2에서 각각 0.5 day^{-1} 과 1.05 g L^{-1} 로 가장 높았고, 대조군 R1보다 높게 나타났으며, 일간 최대성장률 또한 A2에서 가장 높게 나타났다(Table 3). A, B 그룹에서는 7.5 g L^{-1} , C 그룹에서는 10.0 g L^{-1} 의 중탄산나트륨을 첨가한 배지에서 성장이 가장 높았다.

배양기간 중 현미경 관찰 결과 다른 미세조류에 의한 오염은 실험 종료일까지 없었다. 사상체의 나선 횡수는 7.55-11.95를 기록하였는데, C3에서 11.95로 가장 높게 나타났고, B1, A1순으로 높게 나타났다(Table 3). 중탄산나트륨이 10 g L^{-1} 첨가된 A3에서는 7.75, B3에서는 7.55를 나타냈는데, C3를 제외하고 전반적으로 높은 농도의 중탄산나트륨이 첨가된 실험구에서 나선 횡수가 적은 것으로 나타났다.

일반성분 및 아미노산 조성

일반성분 분석결과 단백질 56.14%, 탄수화물 16.21%, 지방 0.75%, 수분 4.92%, 회분은 20.98%를 각각 기록하였으며, 아미노산 중에서는 glutamic acid가 14.93%로 가

장 높았고, aspartic acid(10.42%), arginine(10.42%)이 그 다음을 차지하였다(Table 4).

4. 고 찰

스피롤리나(*S. platensis*)의 최대 배양을 위해서는 우선 적정량의 광량, 영양염, 탄소원의 지속적인 공급 및 높은 배양온도($30\text{-}35^{\circ}\text{C}$)가 필요하지만(Oliveira et al. 1999), 이 연구에서는 축 주 현지의 자연환경을 이용하고 경제적인 배양방식을 고려하는 것이 목적이므로 온도 및 광량, 자연으로부터 유입되는 우수까지도 현지의 자연적인 기후조건에 의존하여 실험을 수행하였다. 광량은 일반적으로 맑은 날과 흐린 날의 최대값이 각각 3,300과 $429 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 로 그 차이가 꽤 크게 나타났으며, 수온은 실험구별 유의한 차이는 없었다. 염분은 배지에 첨가된 영양염의 함량에 따라 다르게 나타났는데, 요소를 첨가한 배지보다 질산나트륨을 첨가한 배지(R1)에서 높게 나타났다. pH는 B2 실험구에서 다른 실험구에 비해 낮은 값을 나타냈

다. 실험이 진행된 지역의 실외 배양환경은 연중 기온이 일정하게 유지되기는 하나 강수량이 많고, 조도가 높다는 점은 미세조류를 안정적으로 배양하는데 있어서 고려되어야 할 부분으로 생각 된다. 또한 실외배양 시 배양 대상종 외 다른 동·식물 플랑크톤에 대한 오염은 배양배지의 영양염 이용에 대한 경쟁, 독성물질 생성 및 포식현상 등 생물생산량이 감소하는 심각한 문제를 야기할 수 있지만 (Becker 2008), 이번 연구에서는 실험 종료일까지 현미경으로 관찰한 결과 다른 생물에 의한 오염은 관찰되지 않았다.

요소는 질소원으로 중탄산나트륨은 탄소원으로 모두 미세조류의 성장과 밀접한 관계가 있기 때문에(Becker 2008) 저비용으로 최대 성장을 이끌어 내기 위해서는 두 영양염의 상관관계도 향후 실험에서 고려되어야 할 것으로 생각된다. 2 g L⁻¹의 요소가 첨가된 배지(A1-A3)에서는 7.5 g L⁻¹의 중탄산나트륨이 첨가된 배지(A2)에서 1.05 g L⁻¹의 바이오매스를 생산하여 5 g L⁻¹ 및 7.5 g L⁻¹의 중탄산나트륨을 첨가한 배지(A1, A3)보다 높은 값을 나타낸 반면, 6 g L⁻¹의 요소가 첨가된 배지(C1-C3)에서는 7.5 g L⁻¹의 중탄산나트륨이 첨가된 배지(C2)에서 0.80 g L⁻¹의 바이오매스를 생산하였는데 이는 10 g L⁻¹의 중탄산나트륨을 첨가한 배지(C3, 1.02 g L⁻¹)보다 낮은 바이오매스로 스피롤리나의 최대 성장 도달에 중탄산나트륨이 부족했던 것으로 생각된다. 요소를 질소원으로 사용한 배양배지 내에서 높은 농도의 요소로부터 전환된 암모니아에 의해 일부 성장저해 현상이 일어나는데(Danesi et al. 2002), 본 실험에서는 암모니아에 의한 성장 저해는 없었던 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 또한 성장 저해의 원인 중 인산암모늄, 황산암모늄 및 요소 등을 이용한 다른 스피롤리나의 배양 연구에서 인산암모늄의 농도가 0.01 M 환경에서 사상체가 잘게 잘리거나 세포벽이 녹는 현상이 관찰된 바 있는데, 이는 요소의 일부가 암모니아 가스(NH₃) 또는 암모늄 이온(NH₄⁺)으로 전환되어 스피롤리나의 형태에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으나(Costa et al. 2001, Faintuch et al. 1992), 본 실험에서는 현미경 상에서 사상체가 잘게 잘리거나 녹는 현상은 관찰되지 않았다. 또 다른 측면에서 Avila-Leon et al. (2012)는 배지 내 요소의 농도에 따른 스피롤리나의 성장을 비교하였는데, 배양 배지 내 높은 잔류 암모니아 농도에 의해 성장이 느려지는 것이 관찰되었고, 0.3 g L⁻¹의 낮은 농도로 요소를 첨가한 경우가 1.415 g L⁻¹로 가장 높은 바이오매스를 나타냈다. 이는 2.5 g L⁻¹의 질산나트륨을 첨가하여 1.63 g L⁻¹의 바이오매스를 얻은 R2배지에 첨가된 질산나트륨에 비해 약 8배나 적은 양이며, 결과적으로 요소는 질소원으로서의 경제적 가치를 유의하게 나타내고 있다. 이와 유사한 연구로 Danesi et al. (2002)는 배지 내 요소를 24시간 및 48시간

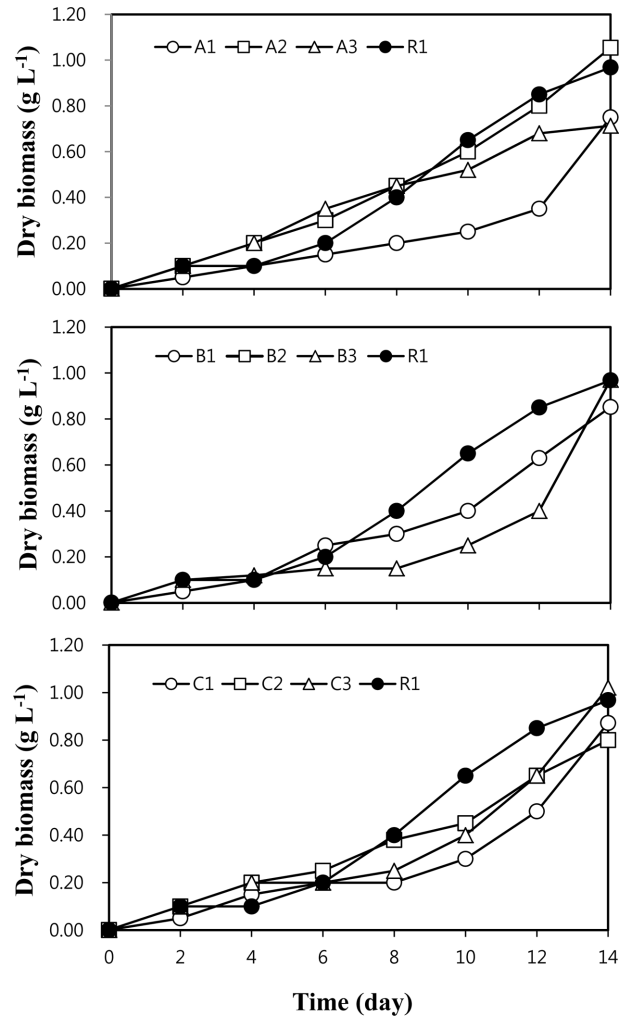


Fig. 2. Dry biomass production for the period of *S. platensis* cultivation

그리고 지속적으로 공급한 실험에서 일별 첨가 보다는 2.5 g L⁻¹의 요소를 14일 동안 나누어 지속적으로 첨가하였을 경우가 1.591 g L⁻¹으로 가장 높은 바이오매스를 나타냈는데(Table 5), 결과적으로 많은 양의 요소가 높은 성장을 가져오지는 않으며, 역시 배지 내 높은 암모니아 농도가 스피롤리나의 성장을 저해한다고 하였다. Costa et al. (2001)은 결과적으로 질산나트륨을 첨가한 실험구에서 스피롤리나의 성장이 높은 것으로 나타났지만, 대량배양 시 경제적인 측면을 생각해 볼 때, 요소는 좋은 질소원이 될 것으로 전망하였다. 이 연구뿐만 아니라 선행연구들에서 보고된 결과로부터 요소를 질소원으로 사용한 미세조류의 대량배양에 있어서 주요 문제점으로 높은 농도의 요소가 배양 배지에 녹아 있을 때 발생하는 암모니아의 독성으로 파악되며, 이를 해결하기 위해서는 낮은 농도의 요소가 배양환경에 계속해서 유지될 수 있도록 소량의 요소를 지속적으로 공급하는 fed-batch 공정과정으로 배양하는

Table 5. Summaries on urea-used *S. platensis* culture experiments and biomass production in the previous studies with this study

Urea (g L ⁻¹)	Culture period (day)	Biomass (g L ⁻¹)	Culture scale	References
0.03	18	0.683	Laboratory	Avila-Leon et al. (2012)
0.30	18	1.415		
2.50	14	1.591	Laboratory	Danesi et al. (2002)
5.60	14	1.490		
0.60	28	0.910	Laboratory	Costa et al. (2001)
1.80	28	0.091		
3.00	28	0.059		
2.00	14	1.050		A2
4.00	14	0.970	Outdoor	B3 (In this study)
6.00	14	1.020		C3

NaNO ₃ (g L ⁻¹)	Culture period (day)	Biomass (g L ⁻¹)	Culture scale	References
2.5	18	1.630	Laboratory	R2, Raoof et al. (2006)
2.5	10	3.495	Laboratory	R3, Celekli and Yavuzatmaca (2009)

것이 좋을 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 실내 배양에 비해 현저하게 불안정한 실외 배양환경에서도 실내배양 못지 않거나, 보다 양호한 성장이 이루어졌고(Table 5), 이 연구에 사용되었던 A2 배지(요소 2.00 g L⁻¹ 및 중탄산나트륨 7.50 g L⁻¹, 토양 추출물 2.00 g L⁻¹)가 향후 열대환경에서 스피룰리나의 경제적인 생산을 위한 기초자료로 이용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 이 연구에서의 단백질 함량은 56.14%를 나타내었는데, 일반적으로 스피룰리나(*S. platensis*)의 단백질 조성이 46-63%(Becker 2008)인 것을 감안할 때 상대적으로 높은 함량이다. 따라서 실험에 사용된 배지 조성은 스피룰리나의 생산량 및 생화학적 조성을 고려했을 때, 향후 대량배양 연구 및 상용화 단계에 있어 활용이 가능할 것으로 생각된다.

사 사

이 연구는 한국해양과학기술원의 기관고유사업 열대태평양기지사원생물생산 및 기본연구활동지원(PE99161), 적도태평양 연구인프라 구축사업(PE98962), 조류를 이용한 바이오에너지 자원화 기술개발(PE98931)에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

Ahsan MB, Mashuda P, Tim CH, Mohammad RH (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

Ajayan KV, Selvaraju M, Thirugnanamoorthy K (2012) Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. *Biomass Bioenergy* **47**:436-441

Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seya T (2009) Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice. *Cancer Sci* **100**: 1494-1501

Alonso DL, Maroto FG (2000) Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol Adv* **18**:481-497

Amha Belay (2002) The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Am Nutraceut Assoc* **5**(2):27-48

Andersen RA (2004) *Algal Culturing Techniques*. ELSEVIER Academic Press, Amstredam, 596 p

Avila-Leon I, Chuei Matsudo M, Sato S, JCM de Carvalho (2012) *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. *J Appl Microbiol* **112**(6):1086-1094

Ayehunie S, Belay A, Baba TW, Ruprecht RM (1998) Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **18**:7-12

Becker EW (2008) *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 293 p

Celekli A, Yavuzatmaca M, (2009) Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource Technol* **100**:1847-1851

Costa JAV, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G (2001) Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World J Microbiol Biotechnol* **17**:439-442

Cyanotech Corporation (2013) Cyanotech. <http://www.cyanotech.com> Accessed 6 Dec 2013

Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Sato S (2002) An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg* **23**:261-269

- Eroarome MA (2009) Country Pasture/Forage Resource Profiles, Federated States of Micronesia. FAO, 12 p
- Faintuch, BL, Sato S, Aquarone E (1992) Emprego de Algumas Fortes Nitrogenadas na Obtengcao de Biomassa de *Oscillatoria limnetica*. Revista de Microbiologia **23**:32-36
- Goksan T, Zekerlyaoglu A, Ak L (2007) The growth of *Spirulina platensis* in different culture systems under greenhouse condition. Turk J Biol **31**:47-52
- Hayashi O, Katoh T, Okuwaki Y (1994) Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **40**:431-441
- Hong S, Lee N (1993) Growth of *Spirulina platensis* in effluents from wastewater treatment plant of pig farm. J Microbiol Biotechnol **3**:19-23
- Iwata K, Inayama T, Kato T (1990) Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **36**:165-171
- Kay RA (1991) Microalgae as food and supplement. Crit Rev Food Sci Nutr **30**:555-573
- Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS (2005) Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. Curr Pharm Biotechnol **6**:373-379
- Kulshreshtha A, Zacharia AJ, Jarouliya U, Bhadauriya P, Prasad GB, Bisen PS (2008) *Spirulina* in health care management. Curr Pharm Biotechnol **9**:400-405
- Lun FD, Cheng WZ (2006) Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. J Zhejiang Univ Sci B **7**:34-37
- Mazo VK, Gmoshinskii IV, Zilova IS (2004) Microalgae *Spirulina* in human nutrition. Vopr Pitan **73**:45-53
- Meeks JC, Wycoff KL, Chapman JS, Enderlin CS (1983) Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by Anabaena species. Appl Environ Microbiol **45**:1351-1359
- Olguin EJ, Galicia S, Angulo GO, Hernández E. (2001) The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. Bioresource Technol **77**:19-24
- Oliveira MACL, Monteiro MPC, Robbs PG, Leite SGF (1999) Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquacult Int **7**:261-275
- Pirt SJ (1975) Principles of microbe and cell cultivation. John Wiley and Sons, New York, 274 p
- Raof BDK, Prasanna R (2006) Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass Bioenergy **30**:537-542
- Rasool M, Sabina EP (2009) Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study. J Nat Med **63**:169-75
- Richmond A (2004) Handbook of Microalgal Culture. Blackwell Publishing Company, Hoboken, New Jersey, 566 p
- Sautier C, Tremolieres J (1998) Food value in *Spirulina* algae in humans. Ann Nutr Aliment **136**:109-120
- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickler D (1988) Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. Nutr Cancer **11**:127-134
- Thompson RH, Merola GV (1993) A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multi-component foods. J AOAC Int **15**:236-244
- Wu LC, Ho JA, Shieh MC, Lu IW (2005) Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. J Agric Food Chem **53**:4207-4712
- Zarrouk C (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers' facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph.D. Thesis, Université de Paris, Paris, 83 p

Received Sep. 16, 2013

Revised Oct. 18, 2013

Accepted Nov. 18, 2013