

제3차년도
최종보고서

치어 양식을 위한 동물성 플랑크톤의 먹이 조류
배양조 개발에 관한 연구

A Study on the development of photobioreactor
for mass production of microalgae as live feed
for animal plankton

연구기관
부 경 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “치어양식을 위한 동물성 플랑크톤의 먹이조류 배양조 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12.

주관연구기관명 : 부 경 대 학 교

총괄연구책임자 : 한 봉 호

연 구 원 : 조 만 기

연 구 원 :

협동연구기관명 :

협동연구기관명 :

요 약 문

I. 제 목

치어 양식을 위한 동물성 플랑크톤의 먹이조류 배양조 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

수산식품이 건강식품 또는 장수식품으로 인식되면서 양식어업이 급속도로 발전하고 있다. 그러므로 양식어업에서 기초 사료로 쓰이는 단세포조류의 효율적 대량 배양이 가능한, 그리고 어민들이 손쉽게 다룰 수 있는 배양조를 개발하는 것이 본 연구의 목적이다. 단세포조류 중, *Chlorella*는 현재 대부분이 노천의 연못형 배양조에서 배양되고 있어서 1년중 특정 시기에만 배양이 가능할 뿐, 부족한 양은 전적으로 수입에 의존하고 있는 실정이다. 그러므로 생산성이 높은 소규모 배양조를 개발하여 연중 배양을 계속 함으로써 단세포조류의 수입을 대체하고, 대량 배양시의 잉여 단세포조류를 육상동물의 사료, 식품소재 등으로 이용하는 것은 어민들의 수입증대와 직결되는 중요한 과제이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. *Chlorella*의 최적 배양조건 설정
2. 실험실 규모의 모형 배양조 제작 및 특성 비교
3. 모형 배양조의 규모 확대
4. 배양공정의 자동화 시스템 개발
5. 해수 멸균 및 *Chlorella*의 보존 방법 개발

6. 현장 적용성 검토

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *Chlorella*의 최적 배양조건 설정

가. 해수산 *Chlorella* sp.(국립수산진흥원)의 최적 배양조건

배양조 : Vertical Tubular Photobioreactor (VT-PBR).

온도 : 20℃, 조도 : 6,000 lx, 공기 공급량 : 0.56vvm

배양조 : Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor (RVC-PBR).

CO₂ 공급량 : 0.375×10⁻³vvm, pH : 7.2~7.5

나. 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 최적 배양조건

배양조 : Plant Cell Photobioreactor (PC-PBR).

온도 : 25℃, 조도 : 6,000 lx, 교반속도 : 1000rpm, pH : 7.5

2. 실험실 규모의 모형 배양조 제작 및 성능 비교

여섯 가지 형태의 소규모 모형 배양조를 제작하고, 온도, 조도, pH 등의 조절에 따른 *Chlorella* sp.의 배양특성을 비교하여 <표 1>에 나타내었다. 그 중에서 반구면 형태의 배양조(Spherical Surface Type Photobioreactor-II)에서 배양속도가 가장 빨랐으며, 그 다음으로는 우리 나라 고유의 물레방아형 배양조(Water Wheel Type Photobioreactor, WWT-PBR)의 배양속도가 빨랐다.

3. 모형 배양조의 규모 확대

해수산 *Chlorella* sp.의 성장속도가 비교적 빠른 Spherical Surface Type Photo-

bioreactor-II(SST-PBR-II)의 규모를 확대, 제작하고, Water Wheel Type Photobioreactor(WWT-PBR)와 Raceway Pond Type Photobioreactor(RPT-PBR) 및 Plate Type Photobioreactor(PT-PBR)의 특징을 혼합, 확대하여 Slanting Plate Type Photobioreactor(SPT-PBR, 경사 평면형 배양조)를 제작하였다.

<표 1 > 모형 배양조의 배양 성능 비교

| 배양조의 종류 | 표면적 대 체적비 (S/V, m^{-1}) | 평균 조도 (lux) | 초기 농도 (g/l) | 최고 농도 (g/l) | $\frac{\text{최고 농도}}{\text{초기 농도}}$ |
|---|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------------|
| Cylinder Type Photobioreactor | 19.73 | 5872 | 0.022 | 0.207 | 9.409 |
| Spherical Surface Type Photobioreactor-I | 80.38 | 5424 | 0.055 | 0.224 | 4.073 |
| Spherical Surface Type Photobioreactor-II | 46.2 | 6000 | 0.013 | 0.448 | 34.462 |
| Plate Type Photobioreactor | 16.59 | 6000 | 0.017 | 0.274 | 16.118 |
| Raceway Pond Type Photobioreactor | 33.09 | 5949 | 0.013 | 0.297 | 22.846 |
| Water wheel Type Photobioreactor | 21.23 | 6000 | 0.014 | 0.444 | 31.714 |

4. 전체 배양공정의 자동화 시스템 개발

전체 배양공정에서 온도, pH 및 유속을 일괄 통제할 수 있는 control unit를 제작하여 배양조에 장착하였다. 또한 시간에 따른 *Chlorella* sp.의 증식정도를 측정하기 위하

여 광센서를 장착하여 배양액의 혼탁도를 액정 digital unit상에 출력시킴으로서 어민들도 손쉽게 성장정도를 측정할 수 있도록 하였다.

5. 해수의 멸균 및 *Chlorella* sp.의 보존 방법 개발

가. 냉장 및 냉동 저장

배양액을 원심분리로 농축하여 저온(4℃), 25℃, 온도조절을 하지 않은 상온 및 동결 상태로 저장하는 방법의 경우, 저온(4℃)에 냉장저장한 것이 용존산소의 소비 정도를 기준으로 한 신선도에서 가장 우수하였다. 냉장저장 또는 동결한 *Chlorella* sp.는 저장 3개월 후에도 *Brachionus plicatilis*가 사료로 섭취함을 확인하였다.

나. 분무건조

배양액을 원심분리로 농축하여 102±0.5℃에서 순간적으로 분무건조(spray drying)시킨 완전 분말 형태의 *Chlorella* sp.를 진공포장함으로써 장기간 저장이 가능하였고, *Brachionus plicatilis*가 사료로 섭취함을 확인하였다.

다. 음가열

배양액을 음가열(ohmic heating)법으로 열처리하는 경우, 배양액의 pH를 알칼리 영역으로 조절하여도 *Chlorella*가 심하게 변색되는 결점을 나타내었다. 그러나 어민들은 보존방법보다는 ohmic heating법이 배양조에 공급되는 해수의 멸균에 탁월한 효과를 나타낸다는 사실에 오히려 지대한 관심을 나타내고 실용화를 요구하였다.

어류에 질병을 일으키는 *Vibrio anguillarum*을 인위적으로 접종시킨 해수를 ohmic heating법으로 열처리하였을 때, 전계강도 800V/m에서 온도를 80℃로 상승시키는 49초 동안에 사실상 해수의 멸균이 가능함을 확인하였다.

6. 현장 적용

모형 배양조의 규모를 확대, 제작한 반구면형 배양조(Spherical surface type photobioreactor-II)와 경사 평면형 배양조(Slating plate type photobioreactor) 중, 배

양조의 분해, 조립, 세척 등의 편의성 등을 감안하여 어민들이 손쉽게 다룰 수 있는 경사 평면형 배양조를 전라남도 여천군 소재 진남배양장에 보급하고, 현장의 노천 연못형 배양조와 성능을 비교 검토하였다. 그리고 현재 충청남도 서산 소재 해인수산에서도 경사 평면형 배양조의 현장 적용성을 검토 중에 있다.

가. 배양 기간

1997년 8월 4일 ~ 현재 (여천군 진남배양장)

1997년 9월 27일 ~ 현재 (해인수산)

나. 배양 방법

진남배양장의 연못형 배양조에서 *Chlorella* sp. 시료를 채취, 여과하여 경사 평면형 배양조에 접종, 배양하였다. *Chlorella* sp.가 최고 농도에 이를 때까지 연속배양한 후, 일부 배양액을 회수하고 같은 양의 여과한 바닷물을 첨가하여 다시 배양하는 방법으로 *Chlorella* sp.가 최고 농도에 이를 때까지의 시간 및 성장률을 조사하여 생산량을 산출하였다.

다. 배양 결과 및 생산량의 비교

진남배양장의 60m³(60Ton) 규모의 연못형 배양조에서 *Chlorella* sp.가 도달할 수 있는 최고 농도는 10⁷cell/ml였고 그에 소요되는 시간은 3일이었다. 그러나 0.5m³(0.5Ton) 규모의 경사 평면형 배양조에서는 최고 농도가 10⁸cell/ml였고, 그에 소요되는 시간은 1일이었다.

연못형 배양조에서는 3일 간격으로 생산된 *Chlorella* sp. 40m³를 회수하고 40m³의 해수를 공급하고 있었으나, 경사 평면형 배양조에서는 매일 0.5m³의 *Chlorella* sp. 배양액을 회수하고 0.25m³의 해수를 보충할 수 있었다. 이와 같은 조건에서 생산량을 서로 비교하면 다음의 <표 2>와 같다.

<표 2> 연못형 배양조와 경사 평면형 배양조의 *Chlorella* sp. 생산량 비교

| Reactors | Open pond type photobioreactor (연못형 배양조) | Slanting Plate Type Photobioreactor (경사 평면형 배양조) |
|--|--|--|
| Total culture volume | 60 m ³ | 0.5 m ³ |
| Maximum cell concentration | 10 ⁶ cells / ml (10 ¹³ cells / m ³) | 10 ⁸ cells / ml (10 ¹⁴ cells / m ³) |
| Reproduction time | 3 days | 1 day |
| Discharged culture volume | 13.33 m ³ /day | 0.25 m ³ /day |
| Produced cell concentration | 1.33 × 10 ¹⁴ cells/day | 2.5 × 10 ¹⁵ cells/day |
| Produced cell concentration per unit time and volume | 2.22 × 10 ¹² cells/day/m ³ | 5.00 × 10 ¹⁵ cells/day/m ³ |

배양조 단위 체적당 하루에 생산되는 *Chlorella* sp.의 양은 0.5m³ 규모의 경사 평면형 배양조의 경우 5.00 × 10¹⁵ cells/day/m³ 이며, 이는 진남배양장의 60m³ 규모의 연못형 배양조의 생산량 2.22 × 10¹² cells/day/m³의 22.5배에 이른다.

이상의 배양결과 비교에서 알 수 있듯이, 경사 평면형 배양조는 체적이 연못용 배양조의 1/120이면서도, 1일 1m³당의 *Chlorella* sp. 생산량은 연못형 배양조의 22.5배여서 적은 면적에서 대량 배양이 가능하였다. 또한 경사 평면형 배양조는 밀폐형이어서 각종 오염이나 배양액의 증발을 방지할 수 있는 이점도 지니고 있었다.

7. 활용에 대한 건의

치어 양식용 동물성 플랑크톤의 먹이조류인 *Chlorella* sp.에 대한 종묘배양업체의 경우, 지역적 특성을 나타내고 있었다. 일부 지역에서는 *Chlorella* sp.의 생산은 도외시하고 수입 *Chlorella* sp.에 의존하는 경향이 짙었다. 그러나 일부 지역에서는 치어의 품질을 좌우하는 것은 근본적으로 사료라는 인식하에 배양조에서 직접 생산한 *Chlorella* sp.만을 사료로 고집하며, 인공 사료 또는 수입 *Chlorella* sp.를 배격하고 있었다. 그러므로 최종보고서 제출과 동시에 해양수산부 어촌지도국 또는 수산업협동조합중앙회를 통하여 본 연구개발사업에서 성능이 확인된 경사 평면형 배양조를 적극 홍보하여 어민들에게 공급할 계획이다. 현재 농업분야의 사료전문회사인 미화주식회사(경기도 이천 소재)에서 사료용 녹조류의 대량 배양을 위하여 본 연구개발사업의 결과에 대하여 지대한 관심을 나타내고 있다.

Summary

I. Title

A study on the development of photobioreactor for mass production of microalgae as live feed for animal plankton

II. Object and importance of the research

Seafoods are well known to be useful for prevention of adult diseases. For this reason, the industrial aquaculture has been rapidly developed in Korea. In the aquaculture industry, a photobioreactor with high productivity is a prerequisite for mass production of microalgae, i.e. *Chlorella* sp., a feeding fry for animal plankton. On the other hand, the importance of microalgae as resources of marine bioactive substances increases more and more. But in Korea, the cultivation of *Chlorella* sp. has been carried out in an open pond. In this case, the productivity of *Chlorella* sp. would be affected severely by climate. This study was, therefore, oriented to develop a photobioreactor for mass production of microalgae, *Chlorella* sp., free from the restriction of climate.

III. Range and scope of the research

1. Establishment of optimal culture condition for *Chlorella* sp.
2. Manufacture of model photobioreactors in laboratory scale and comparison of

efficiency

3. Scale-up of the selected model photobioreactors
4. Automation of the culture system
5. Pasteurization of sea water and preservation of *Chlorella* sp.
6. Applicability of the photobioreactor at fish seedling culture station

IV. Results and recommendation for practical use

1. Optimal culture conditions for *Chlorella*

- ① Culture conditions of marine *Chlorella* sp., delivered from the National Fisheries R & D Agency, in a Vertical Tubular Photobioreactor (VT-PBR) :
- Temperature : 20°C, Light intensity : 6,000lux, Air flow rate : 0.56vvm

Culture conditions of marine *Chlorella* sp., delivered from the National Fisheries R & D Agency, in a Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor (RVC-PBR) :

- CO₂ flow rate : 0.375×10^{-3} vvm, pH : 7.2~7.5

- ② Culture conditions of fresh water *Chlorella vulgaris* 211-11b, purchased from the Göttingen University in Germany, in a Plant Cell Photobioreactor (PC-PBR).
- Temperature : 25°C, Light intensity : 6,000lux, Agitating speed : 1000rpm, pH : 7.5

2. Manufacture of model photobioreactors in laboratory scale and comparison of efficiency

Six different types of model photobioreactors, such as Cylinder Type Photobioreactor(CT-PBR), Spherical Surface Type Photobioreactor- I (SST-PBR- I), Spherical Surface Type Photobioreactor-II (SST-PBR-II), Plate Type Photobioreactor(PT-PBR), Raceway Pond Type Photobioreactor(RPT-PBR) and Water Wheel Type Photobioreactor(WWT-PBR), were manufactured. Culture characteristics of *Chlorella* sp. in each photobioreactor under controlled temperature, light intensity and pH conditions were investigated. The SST-PBR-II revealed the highest performance and then WWT-PBR as shown in Table 1.

Table 1. Comparison of culture characteristics of *Chlorella* sp. in model photobioreactors

| Photobioreactors | S/V (m^{-1}) | I_{mean} (lux) | X_i (g/l) | X_{max} (g/l) | $\frac{X_i}{X_{max}}$ |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Cylinder Type PBR | 19.73 | 5872 | 0.022 | 0.207 | 9.409 |
| Spherical Surface Type PBR- I | 80.38 | 5424 | 0.055 | 0.224 | 4.073 |
| Spherical Surface Type PBR- II | 46.2 | 6000 | 0.013 | 0.448 | 34.462 |
| Plate Type PBR | 16.59 | 6000 | 0.017 | 0.274 | 16.118 |
| Raceway Pond Type PBR | 33.09 | 5949 | 0.013 | 0.297 | 22.846 |
| Water Wheel Type PBR | 21.23 | 6000 | 0.014 | 0.444 | 31.714 |

* PBR : Photobioreactor, S/V : Surface/volume, X_i : Initial concentration of *Chlorella*, X_{max} : Maximal concentration of cultured *Chlorella*

3. Scale-up of the model photobioreactors

The model photobioreactor SST-PBR-II, which showed the highest performance, was scaled up. A new photobioreactor, Slanting Plate Type Photobioreactor (SPT-PBR), was manufactured as a improved type of SST-PBR-II, WWT-PBR, RPT-PBR and PT-PBR with respecting to the efficiencies.

4. Automation of the culture system

An automation system for control of temperature, pH and flow rates of O₂ and CO₂ during culturing of microalgae were developed. The system was so designed that the fisherman can easily operate and recognize the growth rate of *Chlorella* by reading the digital output of turbidity measured by photosensor.

5. Preservation method of *Chlorella* sp. and pasteurization of sea water

① Concentrated *Chlorella* sp. was stored at 4°C, 25°C and ambient temperature without control for 3 months. Concentrated and frozen *Chlorella* sp. was also stored at -5°C for 3 months. The *Chlorella* sp. stored at 4°C showed the best freshness and then the frozen with respect to the content of dissolved oxygen. Both of the refrigerated and frozen *Chlorella* sp. could be used as feed for *Brachionus plicatilis*.

② Powdered *Chlorella* sp., which was obtained by spray drying at 102±0.5°C, could also be used as feed for *Brachionus plicatilis*. The powdered and vacuum packaged *Chlorella* sp. stored for 3 months at ambient temperature did not show any remarkable quality changes.

③ Seawater supplied to the *Chlorella* culture system could be effectively pasteurized by ohmic heating. The temperature rising time of the seawater

necessary to reach 80°C was 49sec, and the concentration of *Vibrio anguillarum*, fish pathogenic bacteria, could be reduced to $10^{-5.6}$ within this time at the electrical field strength of 800V/m. But in the case of *Chlorella* sp., green color of the microalga changed deeply to black during the ohmic heating at 70°C, even though the pH of the culture medium was adjusted to alkaline state.

6. Applicability of the photobioreactor at fish seedling culture station and aquaculture farm

SPT-PBR was delivered to JIN-NAM fish seedling culture station in Yocheon-gun, Jeolla-namdo, and also to Hae-In fishery Co., a aquaculture farm in Seosan, Chungcheong-namdo, to improve the applicability of the photobioreactor. The performance of the SPT-PBR was compared with the Open Pond Type Photobioreactor(OPT-PBR).

① Experimental terms of the SPT-PBR :

Aug. 4th, 1997 ~ until now (Jin-Nam fish seedling culture station)

Sep. 27th, 1997 ~ until now (Hae-In Fishery Co.)

② Culturing method :

In Jin-Nam fish seedling culture station, *Chlorella* sp. was inoculated into culture medium and cultured in the SPT-PBR and OPT-PBR. When the concentration of *Chlorella* sp. reaches maximum value, a part of the culture medium was harvested and substituted by same amount of filtered seawater.

③ Comparison of productivity of SPT-PBR with that of OPT-PBR :

Maximal *Chlorella* sp. concentration in the OPT-PBR with a magnitude of $60m^{\wedge}(60M/T)$ was 10^7 cell/ml and the reproduction time was 3 days.

But in the SPT-PBR with a magnitude of $0.5m'(0.5M/T)$, the maximal concentration of *Chlorella* sp. was 10^8 cell/ml and the reproduction time was 1 day.

As shown in Table 2, $40m'$ of cultured *Chlorella* sp. cultured in the OPT-PBR could be harvested and substituted by the same amount of filtered or pasteurized seawater in every 3 days. But in the SPT-PBR, $0.25m'$ of cultured *Chlorella* sp. could be harvested and substituted by same amount of seawater every day. The cell concentration of *Chlorella* sp. produced in SPT-PBR per unit time and volume was calculated as 5.00×10^{13} cells/day/ m' , whereas that in OPT-PBR was 2.22×10^{12} cells/day/ m' .

According to these results, the concentration of *Chlorella* sp. harvested from the SPT-PBR is 22.5 times higher than that harvested from the OPT-PBR, even though the magnitude of the SPT-PBR is 1/20 of that of OPT-PBR. Moreover, the culture of *Chlorella* sp. in the SPT-PBR is prevented from any contamination of micro-organism and the evaporation of culture medium during operating is minimized, because the system operates in a closed system.

7. Recommendation for application

Recently, some of artificial feeding material for fish are available in aquaculture farm. But most of the fishermen in aquaculture farms and fish seedling culture station have opinions that the quality of fishes produced in aquaculture farm depends mainly on the feeding materials, and they prefer natural feeding sources more than the artificial materials. Therefore, mass production of *Chlorella* sp., a phytoplankton for feeding *Rotifer* an animal plankton is a prerequisite at fish seedling culture station. It was recognized that the object can be achieved by the use of the Slanting Type Photobioreactor developed in this study.

Table 2. Comparison of the magnitude and cell concentration of *chlorella* sp. between the Open Pond Type and Slanting Plate Type Photobioreactor

| Reactors | Open Pond Type Photobioreactor | Slanting Plate Type Photobioreactor |
|--|---|---|
| Total culture volume | 60m' | 0.5m' |
| Maximum cell concentration | 10' cells/ml (10 ¹³ cells/m') | 10 ⁸ cells/ml (10 ¹⁴ cells/m') |
| Reproduction time | 3days | 1day |
| Discharged culture volume | 13.33m'/day | 0.25m'/day |
| Produced cell concentration | 1.33 × 10 ¹³ cells/day | 2.5 × 10 ¹³ cells/day |
| Produced cell concentration per unit time and volume | 2.22 × 10 ¹² cells/day/m' | 5.00 × 10 ¹⁵ cells/day/m' |

For this reason, the Slanting Type Photobioreactor for microalgae culture with high productivity could be delivered to all aquaculture farms and fish seedling stations by propaganda of Fishing Community Development Bureau in Ministry of Maritime Affairs & Fisheries or Fisheries Cooperative Association.

Contents

| | |
|---|----|
| I. Introduction | 28 |
| II. Outlines of microalgae culture | 33 |
| 1. Cell production | 33 |
| 2. Nutrient requirements for microalgae culture | 36 |
| A. Nutrients | 36 |
| B. Algal nutrition and physiology | 37 |
| (1) Composition of microalgal cell | 37 |
| (2) Nitrogen source | 37 |
| (3) Other nutrients | 37 |
| Ⓐ Potassium | 38 |
| Ⓑ Magnesium | 38 |
| Ⓒ Sulfur | 38 |
| Ⓓ Chlor | 38 |
| Ⓔ Others | 38 |
| 3. Useful compounds from microalgae | 38 |
| A. Vitamins | 38 |
| B. Pigments | 39 |
| C. Phytols | 39 |
| D. Amino acids | 39 |
| E. Polysaccharides | 40 |
| F. Polyols and other carbohydrates | 40 |
| G. Pharmaceuticals and bioactive compounds | 41 |
| (1) Pharmaceuticals and antibiotics | 41 |
| (2) Growth stimulating compounds | 41 |
| 4. Kinetics of microalgal growth | 42 |
| A. Specific growth rate | 42 |
| B. Factors influencing on specific growth rate | 42 |
| (1) Light intensity | 42 |

| | |
|--|----|
| (2) Temperature | 43 |
| (3) CO ₂ concentration | 44 |
| (4) Self inhibition | 45 |
| 5. Photosynthesis | 47 |
| A. Definition of photosynthesis | 47 |
| B. Pigments for photosynthesis mechanism | 47 |
| C. Electron flow in photosynthesis | 49 |
| D. Gas transfer | 50 |
| 6. Comparison of basic photobioreactors | 51 |
| 7. Conclusion | 58 |
| | |
| III. Establishment of optimal growth condition | 60 |
| 1. Introduction | 60 |
| 2. Materials and methods | 60 |
| A. Basic photobioreactors | 60 |
| (1) Vertical tubular photobioreactor | 60 |
| (2) Recirculating vertical cylindric photobioreactor | 61 |
| (3) Plant cell photobioreactor | 63 |
| B. Algal strains | 63 |
| C. Culture medium for <i>Chlorella</i> | 63 |
| D. Mesuring methods for cell concentration | 66 |
| (1) Cell counting | 66 |
| (2) Measurement of optical density | 67 |
| 3. Results and discussion | 67 |
| A. Factors influencing on the specific growth rate of <i>Chlorella</i> | 67 |
| (1) Vertical Tubular Photobioreactor | 67 |
| (A) Temperature | 67 |
| (B) Flow rate of air | 67 |
| (C) Light intensity | 68 |
| (D) Flow rate of CO ₂ | 72 |
| (2) Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor | 76 |
| (A) Concentration of CO ₂ | 76 |

| | |
|---|-----|
| ⓑ Gas exchanger | 77 |
| (3) Plant Cell Photobioreactor | 80 |
| Ⓐ <i>Chlorella</i> sp. in sea water | 80 |
| ⓑ <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b in fresh water | 84 |
| B. Problems in culturing of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 85 |
| C. Culturing of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b in sea and fresh water | 86 |
| D. Comparison of basic photobioreactors | 93 |
| 4. Conclusion | 95 |
| | |
| IV. Manufacture and comparison of model photobioreactors | 96 |
| 1. Introduction | 96 |
| 2. Materials and methods | 97 |
| A. Construction of model photobioreactors | 97 |
| (1) Establishment of model photobioreactor types | 97 |
| (2) Gas exchanger | 97 |
| (3) Controllers | 98 |
| B. Types of model photobioreactors | 99 |
| (1) Cylinder Type Photobioreactor | 99 |
| (2) Spherical Surface Type Photobioreactor- I | 100 |
| (3) Spherical Surface Type Photobioreactor- II | 100 |
| (4) Plate Type Photobioreactor | 101 |
| (5) Raceway Pond Type Photobioreactor | 101 |
| (6) Water Wheel Type Photobioreactor | 102 |
| C. Culture of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b in model photobioreactors | 109 |
| (1) Microalgal strains | 109 |
| (2) Culture medium | 109 |
| (3) Mesuring methods for cell concentration | 109 |
| Ⓐ Cell counting | 109 |
| ⓑ Measurement of optical density | 109 |
| 3. Results and discussion | 109 |
| A. Culture in Cylinder Type Photobioreactor | 110 |
| B. Culture in Spherical Surface Type Photobioreactor- I | 110 |

| | |
|---|-----|
| C. Culture in Spherical Surface Type Photobioreactor-II | 110 |
| D. Culture in Plate Type Photobioreactor | 111 |
| E. Culture in Raceway Pond Type Photobioreactor | 111 |
| F. Culture in Water Wheel Type Photobioreactor | 111 |
| 4. Conclusion | 112 |
| | |
| V. Verification of performance | 120 |
| 1. Introduction | 120 |
| 2. Materials and methods | 120 |
| A. Environment of cultivation room | 121 |
| B. Conditions for culturing of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 121 |
| C. Culture of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b immobilized in capsule type | 124 |
| (1) Microencapsulation of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 124 |
| (2) Culture of microencapsulated <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 125 |
| 3. Results and Discussion | 126 |
| A. Verification of model photobioreactors | 126 |
| B. Selection of model photobioreactor | 126 |
| (1) Spherical Surface Type Photobioreactor-II | 130 |
| (2) Slanting Plate Type Photobioreactor | 130 |
| (3) Water Wheel Type Photobioreactor | 130 |
| C. Optimization of cultivation system | 131 |
| (1) Microencapsulation with <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 131 |
| A Conditions of microencapsulation | 131 |
| B Microencapsulation with <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b | 135 |
| C Characteristics of microencapsulation | 135 |
| (2) Settler for continuous culture of <i>Chlorella</i> | 140 |
| A Characteristics of continuous culture | 140 |
| B Microencapsulated culture of <i>C. vulgaris</i> 211-11b with settler | 140 |
| C Continuous culture of <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b using settler | 141 |
| 4. Conclusion | 146 |

| | |
|---|-----|
| VI. Automation of microalgae culturing process | 147 |
| 1. Introduction | 147 |
| 2. Block diagram for automation of microalgae culturing process | 147 |
| A. Purpose of automation | 147 |
| B. Basic facilities of photobioreactors and automation | 148 |
| 3. Test-bed type automatic control process | 149 |
| A. Outlines of Test-bed type system and equipments | 149 |
| B. Facilities of Test-bed type reactors | 149 |
| (1) Input part | 149 |
| Ⓐ RTI-820 | 149 |
| Ⓑ 5V02 Backplane | 153 |
| Ⓒ 5B30 Millivolt and voltage input module | 153 |
| Ⓓ 5B37 Thermocouple input module | 157 |
| Ⓔ O.D. Input module | 157 |
| Ⓕ pH Input module | 157 |
| (2) Output part | 162 |
| Ⓐ 5B39 Current output module | 162 |
| Ⓑ LG Inverter module | 162 |
| (3) Driver | 162 |
| (4) Control part | 166 |
| C. Interface with PC | 166 |
| D. Man-Machine interface | 166 |
| E. Algorithm | 169 |
| (1) Temperature control algorithm | 169 |
| (2) pH control algorithm | 169 |
| (3) Flow rate control algorithm | 169 |
| 4. Construction of practical automatic control process | 173 |
| A. Outlines of system | 173 |
| B. Facilities of system | 173 |
| (1) Input part | 173 |
| Ⓐ pt-100 Temperature sensor input module | 173 |
| Ⓑ O.D. Input module | 178 |

| | |
|---|-----|
| © pH Input module (pH-6000) | 178 |
| (2) Output part | 181 |
| Ⓐ O.D. Display module | 181 |
| (3) Control part | 181 |
| 5. Results and discussion | 186 |
| 6. Conclusion | 186 |
| | |
| VII. Preservation of <i>Chlorella</i> , pasteurization of sea water and Application of Slanting Plate Type Photobioreactor | 190 |
| 1. Introduction | 190 |
| 2. Materials and methods | 193 |
| A. Preservation methods of <i>Chlorella</i> | 193 |
| (1) Cold storage | 193 |
| (2) Powdered storage | 194 |
| (3) Ohmic heated storage | 194 |
| B. Pasteurization of sea water | 194 |
| (1) Manufacture of ohmic heater | 194 |
| (2) Ohmic heating of <i>Vibrio anguillarum</i> | 195 |
| C. Application of Slanting Plate Type Photobioreactor | 199 |
| (1) Application term | 199 |
| (2) Culturing process | 199 |
| 3. Results and discussion | 199 |
| A. Preservation of <i>Chlorella</i> | 200 |
| (1) Cold and frozen storage of <i>Chlorella</i> | 200 |
| (2) Powdered storage of <i>Chlorella</i> | 200 |
| (3) Ohmic heated storage of <i>Chlorella</i> | 201 |
| B. Pasteurization of sea water | 201 |
| (1) Heating rate of sea water | 201 |
| (2) Destruction of <i>Vibrio anguillarum</i> | 205 |
| C. Applicability of Slanting Plate Type Photobioreactor | 207 |
| 4. Conclusion | 210 |
| | |
| References | 212 |

목 차

| | |
|---|----|
| 제 1 장 서 론 | 28 |
| 제 2 장 조류 배양의 기본 지식 | 33 |
| 제 1 절 조류의 균체생산 | 33 |
| 제 2 절 조류 배양에 필요한 영양물질 | 36 |
| 1. 필요 영양분 | 36 |
| 2. 조류 영양과 관련된 생리학 | 37 |
| 가. 조류의 세포 성분함량 | 37 |
| 나. 질소원 | 37 |
| 다. 기타 영양원 | 37 |
| 1) Potassium | 38 |
| 2) Magnesium | 38 |
| 3) Sulfur | 38 |
| 4) Chlor | 38 |
| 5) 기 타 | 38 |
| 제 3 절 단세포조류에서 추출되는 유용한 물질 | 38 |
| 1. Vitamin | 38 |
| 2. Pigment | 39 |
| 3. Phytol | 39 |
| 4. Amino acid | 39 |
| 5. Polysaccharide | 40 |
| 6. Polyols 및 기타 carbohydrate | 40 |
| 7. 의약품과 생물학적 활성물질 | 41 |
| 가. Pharmaceuticals와 antibiotics | 41 |
| 나. 성장 촉진제 | 41 |
| 제 4 절 조류의 증식과 동력학 | 42 |
| 1. 비증식속도 | 42 |
| 2. 비증식속도에 영향을 주는 인자 | 42 |

| | |
|---|----|
| 가. 광도 | 42 |
| 나. 온도 | 43 |
| 다. CO ₂ | 44 |
| 라. 자가억제 | 45 |
| 제 5 절 광합성 | 47 |
| 1. 광합성의 정의 | 47 |
| 2. 광합성 기구의 색소 | 47 |
| 3. 광합성 전자흐름의 유형 | 49 |
| 4. 기체전달 | 50 |
| 제 6 절 기존 배양조의 비교 | 51 |
| 제 7 절 결 론 | 58 |
| | |
| 제 3 장 <i>Chlorella</i> 의 최적 성장 조건 | 60 |
| 제 1 절 서 설 | 60 |
| 제 1 절 재료 및 방법 | 60 |
| 1. 기본 배양조 | 60 |
| 가. Vertical Tubular Photobioreactor | 60 |
| 나. Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor | 61 |
| 다. Plant Cell Photobioreactor | 63 |
| 2. 배양용 <i>Chlorella</i> | 63 |
| 3. 배 지 | 63 |
| 4. <i>Chlorella</i> 의 측정 | 66 |
| 가. 세포수의 측정 | 66 |
| 나. 흡광도의 측정 | 67 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 67 |
| 1. 배양조별 배양인자의 영향 | 67 |
| 가. VT-PBR | 67 |
| 1) 온도의 영향 | 67 |
| 2) 공기 공급속도의 영향 | 67 |
| 3) 조도의 영향 | 68 |
| 4) CO ₂ 공급속도의 영향 | 72 |
| 나. RVC-PBR | 76 |

| | |
|---|-----|
| 1) CO ₂ 농도의 영향 | 76 |
| 2) 가스 교환기의 영향 | 77 |
| 다. PC-PBR | 80 |
| 1) 해수산 <i>Chlorella</i> sp.의 배양 | 80 |
| 2) 담수산 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 배양 | 84 |
| 2. <i>Chlorella vulgaris</i> 의 배양시 문제점 | 85 |
| 3. 담수 및 해수 배지에서서의 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 배양 | 86 |
| 4. 기본 배양조의 비교 | 93 |
| 제 4 절 결 론 | 95 |
| | |
| 제 4 장 모형 배양조의 특성 비교 | 96 |
| 제 1 절 서 설 | 96 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 97 |
| 1. 배양조의 구성 | 97 |
| 가. 배양조의 형태 설정 | 97 |
| 나. 가스 교환기 | 97 |
| 다. 조절기 | 98 |
| 2. 모형 배양조의 형태 | 99 |
| 가. Cylinder Type Photobioreactor | 99 |
| 나. Spherical Surface Type Photobioreactor-I | 100 |
| 다. Spherical Surface Type Photobioreactor-II | 100 |
| 라. Plate Type Photobioreactor | 101 |
| 마. Raceway Pond Type Photobioreactor | 101 |
| 바. Water Wheel Type Phorobioreactor | 102 |
| 3. 모형 배양조에서의 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 배양 | 109 |
| 가. 실험에 사용한 단세포조류 | 109 |
| 나. <i>Chlorella</i> 배양용 배지 | 109 |
| 다. <i>Chlorella</i> 의 농도 측정 | 109 |
| 1) 세포수 계수 | 109 |
| 2) 흡광도 측정 | 109 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 109 |
| 1. CT-PBR에서의 배양결과 | 110 |

| | |
|---|-----|
| 2. SST-PBR- I 에서의 배양결과 | 110 |
| 3. SST-PBR- II 에서의 배양결과 | 110 |
| 4. PT-PBR에서의 배양결과 | 111 |
| 5. RPT-PBR에서의 배양결과 | 111 |
| 6. WWT-PBR에서의 배양결과 | 111 |
| 제 4 절 결 론 | 112 |
| | |
| 제 5 장 배양조의 검증 | 120 |
| 제 1 절 서 설 | 120 |
| 제 2 절 재 료 및 방 법 | 120 |
| 1. 배양실의 조성 | 121 |
| 2. <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 배양조건 | 121 |
| 3. <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 고밀도 배양 | 124 |
| 가. <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 미세 캡슐화 | 124 |
| 나. 고정화 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 고밀도 배양 | 125 |
| 제 3 절 결 과 및 고 찰 | 126 |
| 1. 모형 배양조의 검증 | 126 |
| 2. 모형 배양조의 선택 | 126 |
| 가. 반구형 폭포식 배양조 | 130 |
| 나. 사면 평판형 배양조 | 130 |
| 다. 물레방아형 배양조 | 130 |
| 3. 배양 시스템의 최적화 | 131 |
| 가. <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 고밀도 배양 | 131 |
| 1) 고정화 조건 | 131 |
| 2) 고정화 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 고밀도 배양 | 135 |
| 3) 고밀도 배양의 장단점 | 135 |
| 나. 연속 배양을 위한 침전조 | 140 |
| 1) 연속 배양의 특징 | 140 |
| 2) 침전조를 이용한 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 고밀도 배양 | 140 |
| 3) 침전조를 이용한 <i>Chlorella vulgaris</i> 211-11b의 연속 배양 | 141 |
| 제 4 절 결 론 | 146 |

| | |
|---|-----|
| 제 6 장 배양공정의 자동화 | 147 |
| 제 1 절 서 설 | 147 |
| 제 2 절 공정 자동화를 위한 전체 구성도 | 147 |
| 1. 배양공정 자동화의 목적 | 147 |
| 2. 기본 배양조 설비와 공정 자동화 구성 | 148 |
| 제 3 절 Test-bed형 공정자동화 시스템 구성 | 149 |
| 1. Test-bed형 시스템 구성 및 장치 개요 | 149 |
| 2. Test-bed형 배양조 시스템 설비 | 149 |
| 가. 입력부 | 149 |
| 1) RTI-820 | 149 |
| 2) 5V02 Backplane | 153 |
| 3) 5B30 Millivolt와 Voltage Input Module | 153 |
| 4) 5B37 Thermocouple Input Module | 157 |
| 5) O.D. Input Module | 157 |
| 6) pH Input Module | 157 |
| 나. 출력부 | 162 |
| 1) 5B39 Current Output Module | 162 |
| 2) LG Inverter Starvert-iG | 162 |
| 다. Driver | 162 |
| 라. 제어부 | 166 |
| 3. PC와의 인터페이스 구성 | 166 |
| 4. Man-Machine 인터페이스 구성 | 166 |
| 5. 제어 알고리즘 | 169 |
| 가. 온도제어 알고리즘 | 169 |
| 나. pH제어 알고리즘 | 169 |
| 다. 유속제어 알고리즘 | 169 |
| 제 4 절 시작품형 공정자동화 시스템 구성 | 173 |
| 1. 시스템 구성장치 개요 | 173 |
| 2. 시스템 구성설비 | 173 |
| 가. 입력부 | 173 |
| 1) pt-100 온도 Sensor Input Module | 173 |
| 2) O.D. Input Module | 178 |
| 3) pH Input Module (pH-6000) | 178 |

| | |
|--|-----|
| 나. 출력부 | 181 |
| 1) O.D. Display Module | 181 |
| 다. 제어부 | 181 |
| 3. PID 알고리즘을 이용한 pH 제어 알고리즘 | 183 |
| 제 5 절 공정자동화 결과 및 고찰 | 186 |
| 제 6 절 결 론 | 186 |
| 제 7 장 <i>Chlorella</i> 보존방법, 해수 멸균 및 배양조의 현장 적용성 | 190 |
| 제 1 절 서 설 | 190 |
| 제 2 절 재료 및 방법 | 193 |
| 1. <i>Chlorella</i> 의 보존방법 | 193 |
| 가. 저온 보존법 | 193 |
| 나. 분말화 보존법 | 194 |
| 다. 음가열법 | 194 |
| 2. 해수의 멸균 | 194 |
| 가. 음가열 장치의 제작 | 194 |
| 나. <i>Vibrio anguillarum</i> 의 음가열 처리 | 195 |
| 3. 경사 평판형 배양조의 현장 적용성 | 199 |
| 가. 현장 적용 기간 | 199 |
| 나. 배양과정 | 199 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 | 199 |
| 1. <i>Chlorella</i> 의 보존방법 | 200 |
| 가. <i>Chlorella</i> 의 냉장 및 동결저장 | 200 |
| 나. <i>Chlorella</i> 의 분말화 보존 | 200 |
| 다. <i>Chlorella</i> 의 음가열 처리 | 201 |
| 2. 해수의 멸균 | 201 |
| 가. 해수의 가열속도 | 201 |
| 나. <i>Vibrio anguillarum</i> 의 사멸 | 205 |
| 3. 배양조의 현장 적용성 | 207 |
| 제 4 절 결 론 | 210 |
| 참고 문헌 | 212 |

제 1 장 서 론

단세포조류는 육상의 일반 녹색 식물과는 다른 구조를 가지고 있으며, 혈관계도 가지고 있지 않은 형태이다. 그러나 녹색 식물처럼 광합성 과정을 통해 빛 에너지를 화학적 에너지로 전환시키며 chlorophyll을 가지고 있다. 현재 해양에는 단세포 형태로 수천 종의 단세포조류가 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 단세포조류는 순환계를 가지고 있지 않으므로, 성장 또는 증식을 위해서는 개개의 세포 자신이 주위로부터 직접 필요한 영양분을 흡수하여야 한다. 이러한 이유 때문에 단세포조류의 증식은 영양분을 공급 받을 수 있는 액상에서만 진행된다. 따라서 이제까지의 단세포조류의 배양은 주로 영양분을 첨가한 수심이 얇은 연못식 배양조에서 천천히 교반하면서 이루어져왔다.

단세포조류에 관한 연구는 1970년대 후반에서 1980년대 초반에 걸쳐 활발하게 진행되었으며, 단세포조류에 대한 관심은 식품 및 사료로 직접 이용할 수 있다는 사실에서 출발되었다. 일반적인 농업생산과 비교해 볼 때 단세포조류의 배양은 단위 면적당의 생산량이 훨씬 많으며, 또한 다량의 단백질을 함유하고 있기 때문에 단백질 공급원으로서도 대단히 중요하다(Lawrie, 1970). 그리고 액체배지에서 배양되기 때문에 일반 농업에서와 같이 양질의 토양을 필요로 하지 않는다. 그러나 전체 부피의 0.2% 정도만이 목적하는 biomass이기 때문에 수확이 대단히 비경제적이며, 단단한 세포벽을 가지고 있기 때문에 소화흡수를 용이하게 하기 위하여서는 세포벽을 분해시키는 공정을 필요로 하는 어려움도 있다.

단세포조류는 대기로부터 질소를 고정하는데, 질소는 일반 농업에서 필요한 사료성분으로 알려져 있다. 그러므로 단세포조류를 대량으로 생산할 수 있다면, 현재 질소비료의 필요량 중 40% 정도를 공급할 수 있게 된다. 따라서 농업용 비료로서 단세포조류를 사용한다면 합성비료 제조에 소요되는 에너지의 소비감소에도 큰 몫을 담당할 수 있게 된다. 또한 단세포조류 중, 적조류 *Odonthalia Washingtoniensis* 및 *O. floccosa*의 메탄을 추출물인 methylanosol은 양상치의 성장을 촉진하여 배축(hypocotyl)이 더 풍부해지

고 잎이 더 싱싱하고 푸르게 되며 잔뿌리가 많이 발생하도록 하는 작용이 있음이 확인되어 있기도 하다. 이는 지금까지 알려진 식물 호르몬 gibberelline의 성장촉진 효과와 같은 천연 추출물의 효과로서, 다른 육상 식물에 대해서도 성장촉진 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Isao kubo, 1989).

최근 유럽에서는 단세포조류의 이용범위와 잠재력이 재인식되고 있다. 즉, 단세포조류는 다양한 특성 때문에 식품으로서 뿐만 아니라 제약, 화장품, 직물, 환경 및 농업분야에까지 활용 방안이 확대, 연구되고 있으며, 특히 생리의학적 측면에서 항균성, 항바이러스성, 항종양성, 거부반응 억제성, 지혈성분의 추출 등에 관심이 모아지고 있다.

그 대표적인 예를 들자면 스웨덴 해역에서 서식하고 있는 홍조류(red algae)인 *Furcellaria lumbricalis*의 메탄올 및 에탄올 추출물인 histamine은 불수의근을 수축시키고, 혈관 안에 주사하면 모세관의 확장이 일어나서 혈압이 내리는 작용이 있어서 혈압강화제로 쓰일 수 있는 생리활성물질이라고 보고되고 있다(Goran lidgren 등, 1985년). 또, 브라질 북동부 해안에서 서식하고 있는 *Rhodophyta*(홍조류), *Phaeophyta*(갈조류), *Chlorophyta*(녹조류)속 조류의 격막에 존재하는 다당류는 혈액응고방지 활성과 항균활성이 있는 것으로 밝혀져 있다. 이 중 heparin은 무코다당류의 일종으로서 thrombin의 작용을 억제하여 혈액응고를 억제하고 lipase 생성을 유도하여 혈액을 맑게 하는 생리활성물질로 보고되어 있다(de Campos-Takaki 등, 1988). 특히 *Rhodophyta* 속의 조류 11종 중, 9종이 항미생물활성을 보이고 있으며, 이 중 *Hypnea musciformis* 종이 14종의 bacteria, A-F, Yeasts, Fungi를 대상으로 한 실험에서 1종을 제외하고 모두 inhibition zone을 형성한 것으로 보고되었다(de Campos-Takaki 등, 1988).

그리고 단세포조류의 추출물 중에는 항바이러스 활성을 가지는 종류가 보고되고 있다. 예를 들면 인도 해안에 서식하는 녹조류(green algae)인 *Ulva tasciate*는 75%의 anti-semiliki Forest virus(SFV) 활성을 보이고, *Codium elongatum*은 50%의 SFV 활성과 45%의 anti-semiliki Ranikhet Disease(RD) 활성을 나타내는가 하면, 홍조류(red algae)인 *Chandria armata*는 75%의 SFV 활성을 가지고 있으며, *Spyridia insignis*는 Vaccinia virus에 대해 50%의 억제 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Kamat 등, 1992).

Anne beress 등(1993)은 북대서양 연안에서 흔히 볼 수 있는 홍조류인 *Fucus vesiculosus*가 human immunodeficiency virus(HIV)에 대해 억제 활성이 있는 것으로 보고하였으며, 이 조류의 주된 구성성분은 alginic acid, sulfated polysaccharide인 fucoidan과 다양한 phlorotannin, polyphenol 등으로서 항HIV 특성이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 물질의 고순도 추출법으로는 열수 추출법이 이용되고 있다. 즉, 조체를 뜨거운 물로 처리하여 추출하고, 추출물은 XAD₂ chromatography와 glacial HoAc를 지닌 비흡착 혼합물 촉진제를 사용하여 에탄올로 gel filtration을 행하며, 최종적으로는 HPLC로 정제된 활성 화합물을 얻을 수 있다. 이 방법은 다른 조류에서도 더욱 정제된 활성 다당류와 polyphenol의 분리를 위하여 이용될 수 있는 새로운 방법으로 보고되고 있다(Anne beress 등, 1993). 이외에 홍조류인 *Schizymenia pacifica*의 수중 추출물은 세포의 DNA polymerase alpha, avian retrovirus 및 mammalian retrovirus의 전환 transcripase를 저해하여 retroviruses에 의해 발생하는 질병을 막을 수 있으며, 이 추출물은 넓은 pH 영역(1-11)에서 안정하고, 단백질 분해효소인 pronase의 작용 후에도 활성을 잃지 않는다고 보고되어 있다(Nakashima 등, 1987).

한편, 항종양성 또는 항암성 활성물질에 대한 연구도 보고되고 있다. 스웨덴 해역에서 채취된 갈조류인 *Fucus serratus*와 *Ceramium rubrum*의 추출물은 종양세포의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다(Andersson 등, 1986). 또, Itoh 등(1993)은 갈조류인 *Sargassum thumbergii* 추출물 GIV-A가 쥐를 대상으로 한 실험에서 20mg/Kg/day×10의 사용량으로 독성의 흔적없이 Ehrlich ascites암에 걸린 8마리 중 5마리에 대하여 치유효과를 나타내었으며, 평균 생존시간을 248.3% 증가시켰다고 보고하였다. GIV-A는 물리학적 특성과 IR-, NMR-spectra 분석에 의해 L-tucansultate, tucoidan을 포함하는 hexourouic 산으로 밝혀졌다. GIV-A는 종양세포에 직접적으로 cytocidal 작용을 하는 것이 아니고 tucoidan에 의한 보체 C3의 활성화와 phagocytic 활성을 자극함으로써 면역 반응의 향상과 관계한다고 밝혀졌다. 그리고 카리브해에 서식하는 적조류 *Vidalia obtusaloba*에서 새로운 항염증성 bromophenols인 Vidalols A와 B가 밝혀졌다. 이 새로운 화합물은 지방산을 분해하는 phospholipase A₂를 저해하여 항염증성 활성을 나타내며 부종(浮腫, edema)을 효과적으로 조절한다고 보고되고 있다(Wiemer 등, 1991).

단세포조류는 생리의학적 활성물질 뿐만 아니라 태양 에너지를 이용할 수 있다는 점에서 다양한 용도를 생각할 수 있다. 빛 에너지를 이용하는 일반적인 방법은 에너지를 선택하고 저장하는 분리공정을 필요로 한다. 이 두 가지의 공정은 단세포조류의 배양에서 동시에 해결이 가능하다. 광합성은 빛 에너지로부터, 효소소화에서 메탄올을 생산하고 혐기성소화에서는 메탄올을 생산할 수 있는 화학결합으로 변환시킬 수 있다(Johnson, 1975). 이러한 변환효율은 5%에 이른다(Oswald, 1973). 에너지 생산의 측면에서 조류에 대한 연구의 예를 들면, Miura 등(1992)은 녹조류인 *Chlamydomonas* sp. strain MGA 161와 해양 광합성 bacteria W-IS의 조합을 통해 glucose 발효에서 보다 안정적, 지속적으로 고농도의 수소를 생성함을 확인할 수 있었다고 보고하였다. 즉, glucose 발효시에는 4 mol H₂/mol의 수소가 생성되는데 비해 8 mol H₂/mol의 높은 전환력이 있음이 보고되었다.

이 외에도 호기성 소화에서 산소급원으로서도 단세포조류가 이용된다. 단세포조류의 성장과 유기물의 세균성 부패가 동시에 일어나는 공생배양은 따뜻한 기후 지역에서 일어난다(Oswald, 1973). 이 때 단세포조류의 성장과정에서 발생하는 산소는 세균에 이용되며 세균성부패에서 나오는 이산화탄소와 영양물질은 단세포조류에 공급된다. 별도의 가스공급장치를 감소시킬 수 있다는 관점에서 이러한 공생배양은 폐수처리 시스템에서 경제적인 에너지절감효과를 가져다 줄 수 있다.

국내에서도 최근 단세포조류에 관한 관심과 연구가 증대되고 있는 경향이다. 그러나 상업적 규모의 대량배양은 이루어지고 있지 않으며, 재래식 연못 형태의 배양조에 의한 배양에 의존하고 있는 실정이다. 이러한 개방식 배양조는 온도조절이 불가능하여 일년 중의 일정 시기에만 집중적으로 배양하고 있고, 단위 배양 면적당의 생산성도 대단히 낮은 실정이며, 현지 어민들이 공학적 기술을 전혀 갖추고 있지 못하므로 단세포조류 배양조 개발 역시 전혀 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 실정에 맞고 조작이 간단한 단세포조류 배양조를 개발하고자 하였다. 단세포조류 배양조는 일반 미생물 배양조와는 달리 광합성의 관계인자에 중점을 두어 조건을 설정하여야 한다. 먼저 단세포조류를 대량 배양하기 위해서는 영양인자들의 최적 조건을 찾는 것이 매우 중요하다. 단세포조류는 종류에 따라 그 특성에

차이가 있으므로, 배양조건에 변화를 주어 가면서 최적 배양 시스템을 확립시켜야 한다. 따라서 배양조의 영향인자 측정에 대한 기초 실험과 단세포조류의 최적 증식조건을 확립하는데 주안점을 두고 연구를 진행하였다.

이를 위하여 소규모 배양조를 만들어 단세포조류 배양에서의 각종 제어 인자들을 찾고, 최적 배양조건을 설정하였다. 또한 그 결과를 여러 가지 형태의 모형 배양조에 적용한 후, 최대 수율을 보이는 배양조를 선택하여 실제 생산 가능한 규모와 형태로 규모를 확대(scale-up)시켰다. 이렇게 제작한 배양조는 어민들에게 직접 시험·공급하고자 하였다. 또한 확립된 전체 배양공정을 자동제어할 수 있는 공정자동화 시스템 개발도 병행하였다. 최종적으로는 선택된 배양조를 scale-up시킨 후 배양공정 자동화 시스템을 부착시킴으로써 실제 어민들이 용이하게 사용할 수 있으면서 최적 배양조건을 유지하도록 하였다.

이를 통해 단세포조류의 대량 생산을 유도하여 어민들의 소득원을 증대시키며 양식 어민들의 양어 경비율 절감시키고, 단세포조류의 국내 공급은 물론 수출도 도모함으로써, 불필요한 국고손실을 야기시키고 있는 치어양식을 위한 동물성 플랑크톤 먹이조류의 수입을 국내 생산으로 대체시키고자 하였다.

제 2 장 조류 배양의 기본 지식

제 1 절 조류의 균체생산

단세포조류는 일반 식물들의 생리와 같이 광합성 과정에서 태양 에너지를 이용하며 탄소원인 공기 중의 CO_2 와 질소 기타 무기염류를 동화해서 효율적으로 신속하게 자기 세포의 증식을 일으키기 때문에, Fig. 2-1에서와 같이 CO_2 와 태양 에너지를 많이 이용하는 유효한 미생물의 좋은 예라고 하겠다. 단세포조류 세포는 단백질, 유지, 기타 유효 성분들을 많이 함유하고 있기 때문에 대량 배양에 의한다면 지구상의 어떤 작물보다도 수확량이 많은, 그리고 영양가가 풍부한 유기자원으로서 SCP(single cell protein)의 좋은 대상이 된다.

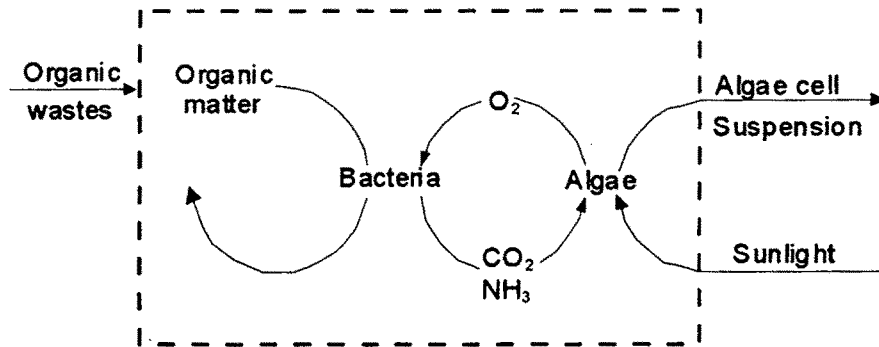


Fig. 2-1. Circulation of organic matter.

태양 에너지의 이용 효율면에서 보면, 현재 농업에서는 0.5~2.0% 정도이나, 단세포조류인 *Chlorella*는 최고 2.5%까지 이용이 가능하다. 또 농작물과는 달리 연중 무휴로 연속배양할 수 있으며, 배양 시설의 대규모화 및 자동화로 능률적 공업생산이 가능한 공업작물이라고 할 수도 있다.

인공배양에 의한 *Chlorella*의 수확량은 연간 최고 10kg/m²로 알려져 있으나, 옥외 시설에 의한 실험 자료에서는 수확량이 약 1/2 이하 즉, 4.94kg/m²라고 한다. 그러나 수확량을 다른 농작물의 그것과 비교하면, Table 2-1에서와 같이, 많은 편이다.

Table 2-1. Comparison of productivities between microalgae and other protein sources

| Protein source | Productivity (kg dry weight/ha/year) |
|-------------------------------|---|
| <i>Spirulina platensis</i> | 24,300 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 15,700 |
| Clover leaf | 1,680 |
| Grass | 670 |
| Peanuts | 470 |
| Peas | 395 |
| Wheat | 300 |
| Milk from cattle on grassland | 100 |
| Meat from cattle on grassland | 60 |

Chlorella 생산 원료는 탄소원으로서의 CO₂ 및 무기질 영양원만으로 충분하므로 원료비가 아주 저렴한 편이다. 탄소원인 CO₂는 연소가스, 각종 산업분야에서의 배기 가스, 그리고 지하 화석연료로부터도 공급이 가능하며, 따라서 이들의 회수방법에 따라서는 공해방지 대책으로서도 인식되고 있다.

*Chlorella*의 균체성분은 Table 2-2와 같이 배양조건에 따라 다르지만, 대체로 단백질

함량이 40~50%, 지방 함량이 10~30%, 탄수화물 10~25%, 회분이 6~10% 정도이며, 건물 1g당의 에너지는 5.5kcal이다. 또한 비타민도 그 종류와 양이 풍부하여 A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, K, biotin 등을 상당량 함유하고 있으며, 아미노산도 Table 2-3에 보는 바와 같이 필수아미노산을 포함하여 다양하게 함유하고 있다.

Chlorella 배양은 자연계에서는 autotrophic culture 이외에 당질, 유기산 등의 유기질 원료를 사용하여 배양하는 heterotrophic culture도 가능하다. 이 때 탱크 내에서 심부배양함으로써 당질에서 효모배양과 같은 방법으로 10시간 이내의 짧은 시간으로 순수한 균체를 생산할 수 있다.

Table 2-2. Protein productivity of microalgae

| Microalgae | Nitrogen source | Culture condition | CO ₂ (%) | Microalgae productivity (g/m ² /day) | protein (%) | Protein productivity (g/m ² /day) |
|----------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|---|-------------|--|
| <i>Uronema barlowi</i> | Urea | Stagnant | 0.03 | 0.91 | 34.77 | 0.32 |
| <i>Hormidium flaccidum</i> | Urea | Stagnant | 0.03 | 0.84 | 31.46 | 0.27 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Stagnant | 0.03 | 1.43 | 51.95 | 0.74 |
| <i>U. barlowi</i> | Urea | Agitated | 0.03 | 6.00 | 27.21 | 1.63 |
| <i>U. barlowi</i> | Urea | Agitated | 1.00 | 17.20 | 30.14 | 5.06 |
| <i>U. barlowi</i> | Urea | Agitated | 3.00 | 19.50 | 28.32 | 5.55 |
| <i>U. barlowi</i> | Urea | Agitated | 5.00 | 20.62 | 28.76 | 5.95 |
| <i>U. barlowi</i> | Urea | Agitated | 10.00 | 18.40 | 21.58 | 3.97 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Agitated | 0.03 | 9.07 | 27.25 | 2.48 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Agitated | 1.00 | 16.61 | 26.25 | 4.36 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Agitated | 3.00 | 20.90 | 25.20 | 5.25 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Agitated | 5.00 | 24.30 | 22.50 | 4.89 |
| <i>U. barlowi</i> | Nitrate | Agitated | 0.03 | 3.60 | 43.00 | 1.55 |
| <i>Ulothrix</i> sp. | Urea | Agitated | 5.00 | 47.80 | 42.70 | 18.70 |
| <i>Hormidium</i> sp. | Urea | Agitated | 5.00 | 42.80 | 43.00 | 17.60 |
| <i>Uronema</i> sp. | Urea | Agitated | 5.00 | 39.20 | 42.10 | 16.90 |
| <i>Stigeoclonium</i> sp. | Urea | Agitated | 5.00 | 39.00 | 49.00 | 19.10 |

Table 2-3. Amino acid contents of microalgae and whole egg

| Algae | Lys | Thr | Cys | Val | Met | Ileu | Tyr | Phe | Trp |
|------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 10.2 | 2.8 | 0.2 | 5.5 | 1.4 | 3.5 | 2.8 | 2.8 | 2.1 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 2.4 | 1.9 | - | 2.7 | 0.6 | 1.7 | - | 2.1 | 0.4 |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | 5.9 | 4.9 | 0.7 | 7.9 | 0.6 | 4.5 | 1.7 | 4.2 | - |
| <i>Ulothrix</i> sp. | 1.5 | 1.8 | - | 2.6 | - | 0.6 | 4.5 | 3.4 | - |
| <i>Uronema gigas</i> | 6.3 | 4.0 | 0.5 | 6.8 | - | 4.0 | 0.6 | 4.7 | - |
| <i>Spirulina maxima</i> | 4.6 | 4.6 | 0.4 | 6.5 | 1.4 | 6.0 | 4.0 | 4.9 | 1.4 |
| Whole egg | 6.6 | 4.8 | 2.3 | 6.1 | 3.3 | 5.0 | 6.0 | 4.8 | 1.9 |
| FAO reference | 4.2 | 2.8 | 2.0 | 4.2 | 2.2 | 4.2 | 5.0 | 2.8 | 2.8 |

| Algae | Leu | His | Arg | Asp | Ser | Glu | Pro | Gly | Ala |
|------------------------------|------|-----|------|-----|-----|------|-----|------|------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 6.1 | 3.3 | 15.8 | 6.4 | 3.3 | 7.8 | 7.2 | 6.2 | 7.7 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 1.2 | 0.7 | 2.4 | - | - | - | - | 2.2 | - |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | 9.3 | 1.7 | 5.8 | 8.8 | 5.2 | 10.5 | 5.0 | 10.4 | 12.2 |
| <i>Ulothrix</i> sp. | 1.4 | 1.4 | 3.2 | 1.4 | 0.7 | 7.8 | - | 1.4 | 5.5 |
| <i>Uronema gigas</i> | 10.5 | 0.9 | 11.5 | 9.1 | 6.8 | 13.5 | - | 6.5 | 13.2 |
| <i>Spirulina maxima</i> | 8.0 | 0.8 | 6.5 | 8.6 | 4.2 | 12.6 | 3.9 | 4.8 | 6.8 |
| Whole egg | 8.2 | 2.3 | 6.4 | 9.7 | 7.1 | 12.6 | 3.7 | 3.1 | 5.5 |
| FAO reference | 1.4 | 4.8 | - | - | - | - | - | - | - |

제 2 절 조류배양에 필요한 영양물질

1. 필요 영양분

*Chlorella*는 1890년대에 Beijerinck에 의하여 순수 분리되었다. 1919년에는 Otto warburg가 광합성 연구를 통하여 *Chlorella*의 이용 가능성을 제시하였는데, 이 때 사용된 배지는 고등식물의 수경재배에 이용되던 것이었다. *Chlorella* sp.는 Burlew(1953b)에 의하여 영양적, 배양환경적으로 적합한 규정배지에서 최초로 배양되었다. 녹조류의 배양에 서 필요한 무기원소에는 N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn 그리고 Zn 등이 있다 (Krauss, 1958).

2. 조류영양과 관련된 생리학

가. 조류의 세포성분함량

Chlorella sp. 세포의 성분함량은 건물기준으로 탄소 51.4~72.6%, 산소 28.5~11.6%, 그리고 수소 7.0~10.0%로 되어있다(Krauss, 1955). 그리고 대부분의 단세포조류는 건물 기준으로 7%의 질소를 함유하고 있다(Kanazawa, Yuhara & Sasa, 1958).

나. 질소원

조류배양에 있어 보편적으로 사용되는 질소원으로는 ammonium salt, nitrate, 그리고 urea 등이 있다. Ammonium 이나 nitrate를 질소원으로 사용하면 배지의 pH는 변화한다. 단세포조류가 성장하면서 $(NO_3)^-$ 이온을 흡수하면 배지의 pH는 높아지고 이와 반대로 $(NH_4)^+$ 를 흡수하면 배지의 pH는 낮아진다. 하지만 질소원으로 urea를 사용하면 배지의 pH는 거의 변화하지 않는다(Davis et al., 1953). 단세포조류는 질소원을 공급하지 않고, 탄소원과 빛만을 공급하면 세포 내에 지질이나 전분을 축적한다(Dubinsky, Berner & Aaronson, 1978).

다. 기타 영양원 (K, Mg, S and Cl)

(1) Potassium

건물기준으로 1~2%를 차지하며 전분합성효소의 생성에 필수적이다(Hawker, Maschner & Krauss, 1979).

(2) Magnesium

Chlorophyll, ribosome 및 염색체의 성분으로서(Metzler, 1977) 여러 가지 효소작용에 필수적인 물질이다(Wyn Jones & Pollard, 1983).

(3) Sulfur

대부분의 S는 sulfate의 환원에 관계된다.

(4) Chlorine

Cl은 주로 Chloroplast 활성화와 관련이 있는데, 특히 photosystem II 작용에 필수적이다(Izawa, Heath & Hind, 1969).

(5) 기타

그 이외의 미량성분으로는 Mn, Fe, Zn, Cu, Mo 등이 있다.

제 3 절 단세포조류에서 추출되는 유용물질

1. Vitamin

단세포조류의 vitamin 함량은 조류마다 다르며, 빛의 강도, 배지조성 그리고 증식단계 등 여러 가지 인자에 의하여서도 달라지며(Carlucci & Bowes, 1970), 대부분의 수용성 vitamin은 단세포조류 배양액의 상층액에 존재한다. 이러한 vitamin은 단세포조류에 의하여 능동적으로 분비되거나 또는 사멸될 때 분비된다. 그리고 단세포조류의 vitamin 분비량 역시 배양조건과 증식단계에 따라 달라진다(Aaronson et al., 1971). 유용

vitamin으로서 riboflavin은 1975년에 *Chlorella vulgaris*의 변종에서 분리되었다(Schwarze, 1975).

2. Pigment

단세포조류는 chlorophyll 계통의 색소를 제외하고도 phycobilin이나 phycoerythrin과 같은 부가적인 색소, 그리고 다양한 carotenoid 계통의 색소를 형성한다. 또한 특정한 단세포조류에 있어서는 이러한 부가적인 색소를 chlorophyll 계통의 색소보다 많이 형성하기도 한다. 이러한 단세포조류에는 β -carotene을 다량으로 축적하는 *Dunaliella salina*와 astaxanthin을 생성하는 *Haematococcus pluvialis* 등이 있다(Lwoff & Lwoff, 1930).

Carotenoid는 적황색 계통으로 isopolyene 색소이다. 그리고 상업적으로 매우 유용하여 천연색소(Emodi, 1978), 연제품 가공용 고기폴의 색소보강(Bauernfeind, 1976), 계란 노른자의 색소증강(Moorehouse, 1961), 그리고 가축의 영양성을 증강시키는데 이용된다(Jackson, 1981). 단세포조류에 있어서 carotenoid 계통의 색소는 주로 photoprotective agent의 기능을 가지며, photosystem에서는 부가적인 색소로 작용한다(Krinsky, 1976). 그리고 단세포조류의 안점은 carotenoid 계통의 색소로 만들어진다(Batra & Tollin, 1964). 식물 호르몬인 abscisic acid 및 vitamin A와 같은 carotenoid 유도체는 성장촉진 작용 및 항암성이 있다(Peto et al., 1981).

3. Phytol

Phytol은 trans-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol($C_{20}H_{39}OH$)이고, vitamin A, E, K 및 β -carotene과 같은 물질의 전구체로 작용하며, chlorophyll을 약산으로 가수분해시켜 얻을 수 있다.

4. Amino acid

단세포조류가 생산하는 유리아미노산은 배양조건 및 증식주기에 따라 다양하다(Tindall et al., 1977). 그 예로서 *Aphanothece halophytica*는 대수증식기 동안에는 높은 염농도(2~3M NaCl)에서 glutamic acid, methionine 그리고 phenylalanine의 함량이 가장 많고, 이와 반대로 유도기 동안에는 낮은 염농도(1M NaCl)에서 aspartic acid의 함량이 많다고 보고되어 있다(Tindall et al., 1977).

5. Polysaccharide

다당류는 충전제, 윤활제 그리고 응집제로 이용되고 있다. 조류에서 획득할 수 있는 다당류는 주로 macrophytes인 *Laminaria*, *Macrocystis*, *Gracilaria*, 그리고 *Eucheuma* (Gellenbeck & Chapman, 1983)를 원료로 사용하여 얻고 있다. 그리고 특정한 조류 다당류는 항암활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Furusawa & Furusawa, 1985).

현재 단세포조류에 의하여 생성되는 다당류는 상업적으로 매우 유용하며, *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium aerugineum*, 그리고 *Porphyridium* sp. 등의 단세포조류를 이용하여 특정한 배양조건하에서 체외로 분비케 함으로써 획득할 수 있다(Ramus, 1972). 이러한 다당류에는 D-xylose, D-glucose, D,L-galactose, 3-O-methylxylose, 3,4-O-methylgalactose 그리고 D-glucuronic acid 등이 있다(Percival & Foyle, 1979). 다당류는 7~10% 정도의 ester bonded sulfate를 함유하고 있고, 5~7% 정도가 단백질과 결합되어 있다.

그리고 증식과정에서 정체기에 다당류를 축적하는 단세포조류도 있는데 이러한 단세포조류조류에는 *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Prymnesium parvum*, *Pyramimonas* sp., *Rhodella maculata*, 그리고 *Rhodomonas* sp. 등이 있다(Guillard & Wangersky, 1958).

6. Polyols 및 기타 carbohydrate

단세포조류는 다양한 다당류를 생성하는데 starch, floridean starch, glycogen과 같은 저장성 물질, 그리고 glycerol, trehalose, mannitol, sorbitol과 같은 삼투압조절성 물질을

생성한다. 녹조류인 *Pleurococcus vulgaris*는 ribitol을 축적하고 *Trentepohlia aurea*와 *Trentepohlia umbrina*는 glycerol, erythritol, ribitol 및 volemitol을 축적한다(Kremer, 1980).

7. 의약품과 생물학적 활성물질

가. Pharmaceuticals 와 antibiotics

세포추출물과 단세포조류(e.g. *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas pyrenoidosa*)의 배양액 추출물에서 얻어지는 물질은 *in vitro* 실험상에서 Gram positive균과 Gram negative균에 대한 활성이 있다(Aubert, Aubert & Gauthier, 1979; Reichelt & Borowitzka, 1984). 그리고 *Porphyridium cruentum*는 arachidonic acid를 생성하는데(Nichols & Appleby, 1969), 이와같은 arachidonic acid는 필수적인 소화보조물질이며 prostaglandins, prostacyclins 그리고 thromboxanes와 같은 C₂₀ 화합물의 천연전구체이다.

나. 성장 촉진제

Chlorella 및 *Scenedesmus*와 같은 단세포조류의 추출물은 효모나 다른 단세포조류의 증식을 촉진시킨다(Balloni, Florenzano & Favilli, 1968). 그 예로 *Scenedesmus obliquus*의 열수추출물은 *Rhizobium japonicum*의 배양에서 yeast extract와 비교하여 3배 이상 증식율이 높다(Fingerhut, Webb & Soeder, 1984). 그리고 단세포조류의 추출물은 식물의 성장에도 촉진작용을 하는데, 이는 부분적으로 auxins, gibberellins, cytochinins, 그리고 다른 hormone이 존재하기 때문에 가능하다(cf. Abetz, 1980). 또한 단세포조류는 식물의 성장과 관련이 있는 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid를 생성한다(Nelson & Van Staden, 1985).

제 4 절 조류의 증식과 동력학

1. 비증식속도

*Chlorella*와 다른 단세포조류의 증식은 일반적으로 다음의 식 (4-1)과 같이 나타내어진다.

$$\frac{dN}{dt} = f(N) \quad (4-1)$$

여기서 N 은 단세포조류의 농도, t 는 증식시간이며, 모든 세포가 일정한 조건 아래서 최적 증식속도를 유지할 때의 관계식은 다음과 같다.

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (4-2)$$

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t \quad (4-2a)$$

식 (4-2)의 비증식속도(μ)는 배양조건에 따라서 그 값이 변할 수 있다.

2. 비증식 속도의 측정

식 (2)에서 비증식속도는 단위 시간 및 단위 질량의 *Chlorella*의 농도증가를 나타내며, 이것은 실험값으로 대략 세포수 1000에서 허용오차는 $\pm 3\%$ 정도이다. 비증식속도는 세포수 이외에도 세포부피, 세포무게 및 흡광도(optical density) 등의 수단으로 측정이 가능하다.

3. 비증식속도에 영향을 주는 인자

가. 광 도

연속배양법에서는 배양액의 두께를 매우 얇게 유지하면서 광도의 영향에 따른 μ 의 변화를 측정할 수 있다. Fig. 2-2에는 텅스텐 조명을 사용하였을 때의 *Chlorella pyrenoidosa*의 광도에 따른 증식곡선을 나타내었다. 약 100 foot candles일 때 비증식속도 μ 는 최대값 $1.96(\text{day}^{-1})$ 을 보이고 있다. I_s 는 최대 비증식속도를 나타내는 광도이며, 비증식속도가 작은 부분에서의 광도 I_b 는 호흡과 기초대사를 유지하는 데에 필요한 광도이다. 광원을 설치할 때 발광 정도를 표준화하기는 매우 어렵다. 텅스텐 조명과는 다른 광원인 태양광선으로 빛을 공급할 때는 전혀 다른 비증식곡선을 나타내게 된다. 또한 각각의 세포가 모든 방향에서 빛을 받을 때와 한 방향으로만 빛을 받을 때는 광도가 전혀 달라지게 된다.

*Chlorella*의 배양공정에서 각각의 세포가 빛을 흡수하는 정도를 직접 구하기란 불가능하다. Strain(1950)에 의하면 2% chlorophyll 용액이 두께가 $5\mu\text{m}$ 일 때 적색광과 청색광을 80% 흡수하는 것으로 보고하였다. 이를 통해 *Chlorella* 현탁액의 경우에는 각 세포가 입사된 적색 및 청색광의 30~40%를 흡수하는 것으로 추정된다. *Chlorella*의 최적 증식에 필요한 최소 광도는 400 foot candle로 보고되어 있다.

나. 온 도

빛 공급의 포화상태에서 *Chlorella pyrenoidosa*의 증식은 20°C 및 30°C 에서보다 25°C 에서 비교적 빠르다. 또한 Milner에 의한 실험에서는 야간에는 온도가 대략 $15\sim 20^\circ\text{C}$ 로 내려가는 자연광의 조건하에서 배양할 때에도 비교적 높은 증식속도를 보인다고 한다.

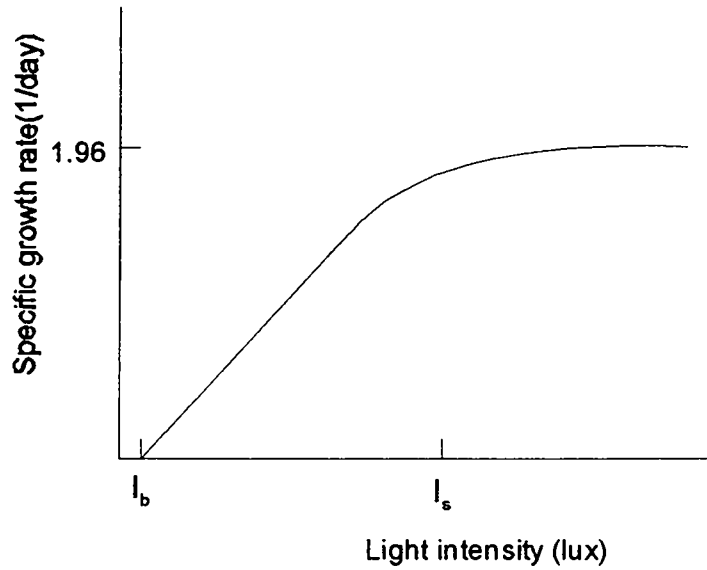


Fig. 2-2. Growth rate of *Chlorella pyrenoidosa* as a function of light intensity.

다. CO₂의 농도

CO₂는 광합성의 필요 인자로서 단세포조류의 증식속도에 크게 영향을 미치는데

*Chlorella*는 CO₂ 또는 H₂CO₃의 형태로 이를 흡수한다(약간은 HCO₃⁻ or CO₃). 포화 CO₂ 농도는 대략 0.1% 이하이며, 5% 이상에서는 증식저해가 나타나게 된다. 따라서 *Chlorella*의 증식속도가 CO₂ 농도 0.1~5%에서는 영향을 받지 않지 때문에 일반적 배양에서는 5%의 CO₂를 사용한다.

라. 자가억제

미생물은 배양시간이 길어지면 대사산물의 축적으로 인하여 증식속도가 점차 감소하게 된다. 단세포조류의 경우에는 높은 합성력과 낮은 배출량을 가지고 있으므로 이러한 영향은 중요하게 고려되지 않는다. 오히려 스스로 생산하는 자가억제제의 영향이 더 크게 작용한다. *Chlorella vulgaris*의 경우, 세포 내에서 생산되어 배지 중으로 매우 낮은 농도의 물질을 배출하는데, 이로 인해서 성장이 저해를 받게 된다(Pratt). 이 물질을 "Chlorellin"이라고 하며 다른 조류나 박테리아의 성장도 억제한다. 그리고 *Chlorella pyrenoidosa*는 박테리아의 성장을 억제하는 광산화된 지방 형태의 저해제를 생산한다고 알려져 있다(Spoehr et al.).

Table 2-4에는 조류와 기타 미생물들에 있어서 각각의 증식조건에 따른 비증식속도를 비교하여 나타내었다.

Table 2-4. Growth rates of algae and other microorganisms

| Organism | μ^b (day ⁻¹) | temp(°C) | conditions |
|--|------------------------------|----------|--|
| Bacteria | | | |
| <i>Escherichiacoli</i> | 60.0 | c | lactosebroth |
| <i>Azotobacter chroococcum</i> | 14.0 | c | urea, glucose |
| | 3.0 | c | sugar, mineral salts |
| Yeast | | | |
| <i>Willia anomala</i> | 14.0 | 30 | glucose, yeast extract |
| Protozoon | | | |
| <i>Tetrahymena geleii</i> | 4.1 | 25 | yeast autolysate |
| Algae | | | |
| <i>Anabaena cyndrica..</i> | 0.74 | 23 | light, CO ₂ , NO ₃ ⁻ |
| | 1.96 | 25 | light, CO ₂ , NO ₃ ⁻ |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Emerson strain) | 0.92 | 25 | dark, glucose, NO ₃ ⁻ |
| | 0.48 | 25 | dark, acetate, NO ₃ ⁻ |
| <i>Chlorella vulgaris</i> (Wann strain) | 2.0 | 25 | light, glucose, CO ₂ ,NO ₃ ⁻ |
| | 1.1 | 23 | light, glucose, NH ₄ NO ₃ |
| <i>Chlorella(Tx 115)</i> | 0.67 | 23 | dark, glucose, NH ₄ NO ₃ |
| | 5.8 ^a | 39 | light, CO ₂ , NO ₃ ⁻ |
| <i>Euglena gracilis</i> (Vischer strain) | 1.4 | 25 | light, CO ₂ ,NH ₄ ⁺ , B1, B12 |
| | 0.58 | 25 | dark, butyrate, NH ₄ ⁺ , B1, B12 |
| <i>Euglena gracilis var.</i> <i>baccillaris</i> | 0.97 | 25 | light, CO ₂ ,NH ₄ ⁺ , B1, B12 |
| | 0.97 | 25 | dark, butyrate, NH ₄ ⁺ , B1, B12 |
| <i>Prorocentrum micans</i> | 0.46 | 18 | light, sea water, soil extract |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | 2.02 | 25 | light, CO ₂ ,NO ₃ ⁻ |
| | 1.08 | 24.5 | light, CO ₂ ,NO ₃ ⁻ |
| <i>Scenedesmus costulatus</i> | 0.48 | 24.5 | dark, glucose, NO ₃ ⁻ |
| | 1.08 | 24.5 | light, glucose, CO ₂ ,NO ₃ ⁻ |

a : Additional useful data on other algae are available, but not adequate for accurate estimate of k.

b : In terms of log e units per day; a value of 0.69 corresponds to a generation time or doubling of once per day.

c : At the optimum temperature of the organism.

d : Preliminary value only, from unpublished data by C.Sorokin.

제 5 절 광합성

1. 광합성의 정의

단세포조류의 성장과 번식을 위한 에너지원은 태양 에너지이다. 단세포조류는 엽록소를 함유하고 있어서 태양 에너지를 광합성을 통해서 포획하며 ATP 와 NADPH 형태의 화학 에너지로 변환시켰다가 이를 사용하여 세포가 필요로 하는 탄수화물이나 기타 유기물질을 만든다. 이 때 탄소와 산소의 근원은 CO_2 이며, 물이 환원제로 쓰이기 때문에 산소가 외부로 발생된다.

단세포조류의 광합성은 엽록체에서 이루어진다. 엽록체 안에 있는 틸라코이드 막은 미토콘드리아 내막처럼 전자전달과 그에 동반된 인산화를 수행한다. 광합성의 첫단계는 엽록체 내의 엽록소에 의한 빛의 흡수이다. 흡수된 에너지는 색소와 색소로 전달되어 반응중심에 도달함으로써 화학적으로 유용한 에너지가 된다.

반응중심에는 두 가지가 있는데, 그 중 하나는 제 1 광계에 있고 다른 하나는 제 2 광계에 있다. 전자는 NADPH를 생성하며, 후자는 물을 광분해하여 O_2 를 생성한다. 이 때 두 광계를 연결하는 전자전달연쇄를 통하여 전자가 흐른 결과 틸라코이드막을 경계로 한 양성자 기울기가 조성되며, 이는 ATP 합성의 추진력이 된다. 빛이 존재할 때 행해지는 이 명반응에서는 빛 에너지가 ATP와 NADPH와 같은 화학 에너지로 변한다. 암반응에서는 명반응의 생성물을 이용하여 CO_2 를 환원시킨다.

2. 광합성 기구의 색소

광합성 색소의 양은 정량적인 색소의 조성에 의존하며, 그 양에 따라 미생물 용액은 녹색, 청록색, 갈색 등으로 보여진다. 단세포조류의 대표적인 색소 chlorophyll의 흡수 파장 영역은 450nm (청색) 및 $650\sim 1100\text{nm}$ (붉은 적외선 영역)이고, Carotenoid는 주로 $400\sim 550\text{nm}$ 이다.

가. Chlorophyll

단세포조류의 주된 색소는 chlorophyll a이며, 그 구조는 Fig. 2-3에 나타내었으며, 최

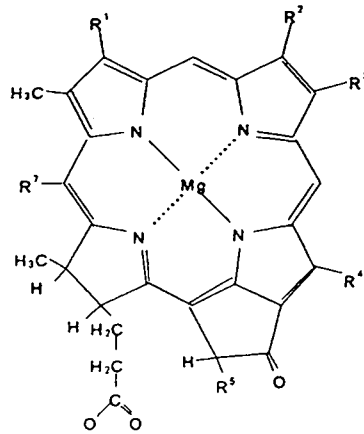


Fig. 2-3. The suructrue of chlorophyll a.

대 흡수스펙트럼은 680~685nm이다.

나. Carotenoid

Carotenoid는 광합성 생물의 부수적인 색소이고, 주로 파장 400~550nm에서 빛을 흡수하며, 광합성에서 안테나 색소의 역할을 가지고 광산화로부터 보호작용 등의 기능을 한다. 광합성 생물은 빛을 받자마자 대사과정에서 생성된 O₂로부터 단일상태의 산소분자를 만들게 된다. 이 때 Carotenoid 색소는 이 산소분자의 소광물질(quencher)로 작용하여 세포를 치명적인 광산화로부터 보호한다.

다. 색소합성의 조절 및 틸라코이드

색소의 합성에는 빛의 세기 및 산소가 중요한 인자가 된다. 세포 내에서 색소의 양은 빛의 세기가 적을수록 많아지게 된다. 높은 빛의 세기 및 산소의 존재하에서는 색소를 유지하는 막구조의 형성을 억제하여 bacteriochlorophyll 및 carotenoid의 합성을 억제하게 된다.

3. 광합성 전자흐름의 유형

광활성화되어 산화된 상태의 반응중심 chlorophyll은 전자전달계에서 전자공여체와 수용체로서 각각 작용한다. 이러한 체계는 Fig. 2-4에 나타내었으며 이를 순환적 광인산화반응(cyclic photophosphorylation)이라고 한다. 그러나 이것으로부터 전자를 회수할 수 없기 때문에 환원형 피리딘 뉴클레오티드의 형태로 환원력을 생성하기 위해서는 또 다른 전자원이 요구된다. 전자원이 물에 의존하느냐 하지 않느냐에 따라 전자흐름의 양상에 근본적인 차이가 있는데, 그 이유는 0.8V의 비교적 높은 전위에서만 물의 산화가 일어나기 때문이다. 산화의 산물은 O_2 가스이다. 따라서 조류와 같이 물을 이용하는 생물체는 산소발생형 광합성(oxygenic photosynthesis)을 한다고 한다.

환원력은 비순환적 광인산화반응 (noncyclic photophosphorylation)이라는 과정에 의해서 생성된다(Fig. 2-5). 전자전달 양식에서 산화된 반응중심 박테리오 클로로필은 다른 전자원에서 공급된 전자전달계로부터 전자를 받고, 활성화상태에서 박테리오클로로필로부터 이탈한 전자는 피리딘 뉴클레오티드의 환원에 이용된다.

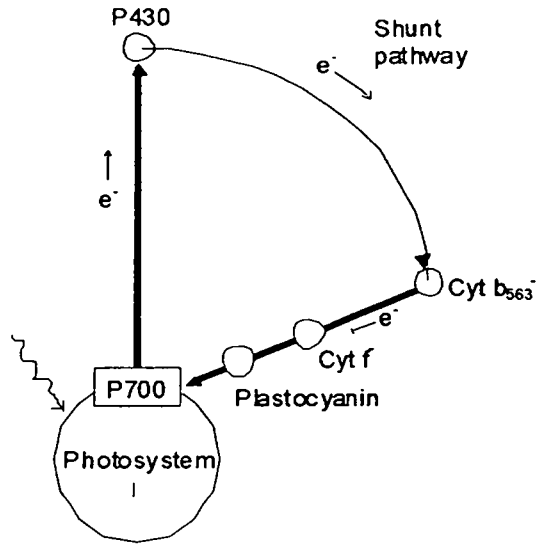
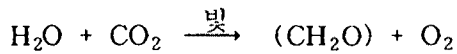


Fig. 2-4. Pathway of electrons in cyclic photophosphorylation.

총체적으로 광계 I (photosystem I)이라 부르는 반응중심의 비활성화된 클로로필 분자들은 물로부터 전자를 받을 수 있을 만큼 강력한 산화제가 되지 못한다. 산소발생형 광합성에서 광계 I은 보다 높은 환원전위의 영역에서 작용하는 광계 II (photosystem II)라는 다른 형태의 반응중심과 병행하여 작용한다. 광계 I과 광계 II는 함께 물을 산화시키고 피리딘 뉴클레오티드를 환원시키는 데에 요구되는 양 이상의 환원전위의 변화를 매개할 수 있다. 여분의 환원력은 광계 II의 활성화된 상태인 클로로필과 광계 I의 산화된 상태인 클로로필간을 흐르는 광합성 전자전달계에 의해 소비된다. 광계 I은 순환적 광인산화반응을 매개한다.

4. 기체전달

단세포조류의 에너지원 생성반응인 광합성의 기본반응식은 다음과 같다.



이 때 결과적으로 생성된 산소는 물에서부터 기인된 것으로서 광합성이 진행되는 동안 계속 발생하게 되고 탄소원인 이산화탄소를 점차 다량으로 필요하게 된다. O₂ 가스의 지속적인 축적이 발생되면 광합성의 저해요인이 되므로 능률적인 제거가 필요하다. 일반적으로 CO₂는 배지 중에 용해되어 있는 형태로부터 흡수하게되나 실제로는 용해도가 낮은 까닭으로 배양이 진행될수록 필요분의 증가량에 따라 한계인자가 된다.

제 6 절 기존 배양조의 비교

단세포 조류(microalgae) 배양기술은 1970년대 후반부터 1980년대 초반에 걸쳐 급속하게 발전하였다. 이러한 기술개발의 목적은 단순히 단세포 조류 자체를 사료 또는 식품으로 이용하기 위한 것이었으며, 이용된 공정기술은 극히 초보단계를 벗어나지 못하였다.

배양조로는 대부분 연못 형태의 것이 이용되었고, 여기에 배양액을 채워 자연광선으로 빛을 공급하였다. 이런 형태의 배양조에서는 밀집된 조류의 경우, 빛의 투과가 균일하지 못하여 빛이 제대로 공급되지 못하는 부분 즉, 배양조 밑에서 서식하고 있는 단세포의 경우에는 빛을 충분히 공급받을 수 없게 된다. 이와 같은 문제점 때문에 배양조의 깊이는 15~30cm 이상으로 할 수가 없었다. 그리고 배양능력을 높이기 위해서는 배양 표면적을 증가시켜야 하기 때문에 대단히 넓은 면적이 필요하게 된다.

또 다른 단점은 이러한 형태의 배양조의 경우에는 교반을 시킬 수 없을 뿐만 아니라, CO₂의 공급도 어렵게 된다. 단세포조류의 왕성한 성장과 일정한 증식속도의 유지에 필요한 탄소원인 CO₂는 배양조 표면에서 배지속으로 침투되어 단세포조류의 대사에 이용되는데, 이 경우에도 빛의 공급에서와 마찬가지로 표면에 있는 단세포조류에만 CO₂가 충분히 공급되는 결점이 있다. 대기 중에 존재하는 CO₂의 양은 0.033% 정도로서, 소위 농도구배가 극히 작기 때문에 단순한 공기의 공급으로는 CO₂가 배지속으로 원활하게 공급될 수가 없다. 또한 단세포조류에 의하여 생성되는 O₂의 농도도 효과적인 제어없이

는 배지에 용존하게 되어 오히려 단세포조류의 성장에 악영향을 줄 수 있는 정도에 달하게 된다. 그 이외의 문제점으로는 전체 배양조 온도의 자동조절이 매우 어렵다는 점을 들 수 있다. 이러한 여러가지 저해요인 때문에 이 유형의 배양조의 생산성은 매우 낮다. 그러나 배지중에 빛과 영양성분을 적당히 공급해주기만 하면, 비록 생산성은 낮더라도 배양은 일단 가능하다는 이점도 있지만, 매우 넓은 면적의 배양조가 필요하기 때문에, 부동산 가격이 현저하게 비싼 우리 나라의 경우에는 이러한 연못식의 배양조를 이용하는 방법은 극히 비경제적이라 할 수 있다.

극히 기본적인 형태를 조금 개선한 배양조의 제작에는 보통 여러 가지 소재로써 만들어지는데 콘크리트, 돌, PVC 등을 제작 소재로 이용한다. 충분한 교반, 침전의 방지를 위해서 물레방아, air-lift system 및 펌프를 이용하며, 이러한 배양조를 Raceway-pond라 한다. 그러나 이러한 system은 온도의 자동조절이 불가능하고 CO₂의 공급도 표면에서의 가스 주입을 통해서 실행하는데, 이 경우에도 가스의 효율적인 공급을 위해서 배지의 층을 비교적 얇은 두께(15~30 cm)로 한다.

다른 가스주입 방법으로는 배지액을 교반하기전에 미리 가스를 주입시키는 방법이 있다. 이 방법의 단점은 용존 가스량이 용액의 흐름방향으로 연속적으로 줄어든다는 점이며, 이 영향 때문에 조류의 성장속도가 낮아질 수 있다. 그리고 또 하나의 단점으로는 pH 조절을 통하여 CO₂ 공급량이 조절되는 경우, pH 조절의 범위가 극히 한정적이라는 점을 들 수 있다. 이와 같은 배양조의 모식도를 Fig. 2-6에 나타내었다. 이 그림에서 볼 수 있듯이 살균은 불가능하고, 따라서 미생물의 오염은 피할 수가 없다. Fig. 2-6에서 보듯이 이 배양조는 교반과 이산화탄소의 공급에서의 문제점을 원시적인 배양조보다 극소화시키기 위한 것이나, 그러한 문제점을 완전히 다 해결할 수는 없는 형태이다.

Fig. 2-7에는 관형배양조의 개략적인 구조를 나타내었다. 이 배양조는 빛이 통과할 수 있는 관들로 이루어졌고, 단세포 조류 배양에 필요한 영양성분 또는 배양액은 펌프를 통하여 중력에 의하여 개개의 관에 공급된다. 이산화탄소의 공급은 펌프를 통하여 수행되고, 배양조에서 형성된 산소는 배양액이 펌프에 들어가기 전에 제거된다. 용존산소의 농도증가에 따른 조류의 배양 저해 정도는 배양액의 공급률에 의해서 결정되므로, 용존산소는 관의 길이를 제한하는 요소로서 작용하게 된다. 이러한 장치는 관의 연장과 병렬구조의 설치를 통하여 그 크기를 크게 할 수 있다.

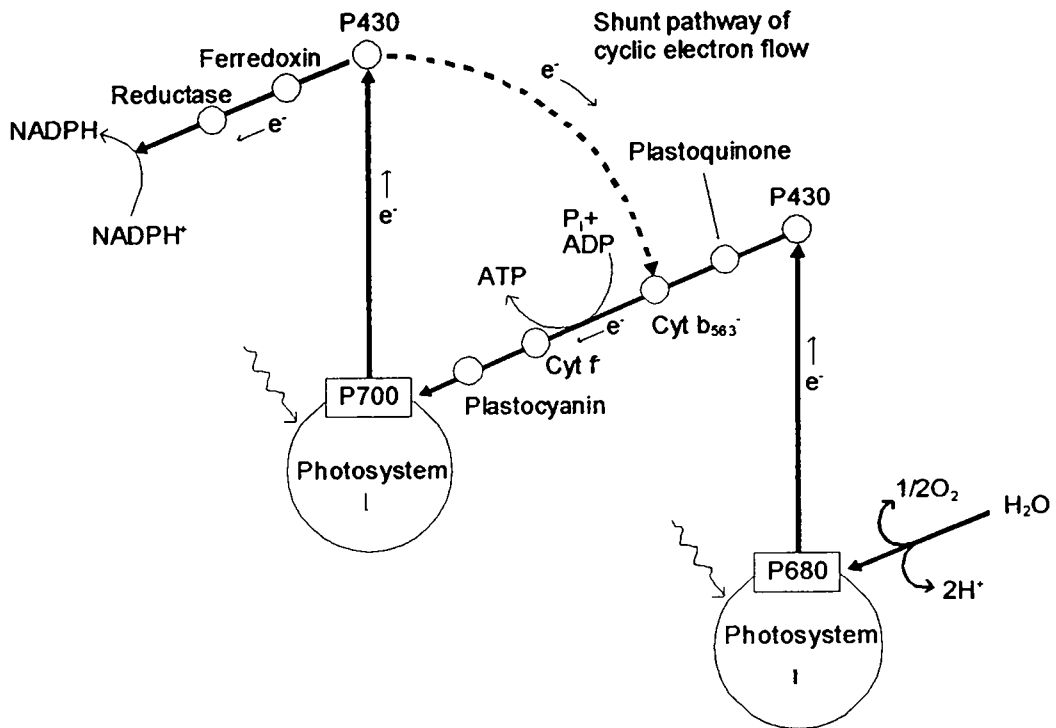


Fig. 2-5. The cooperation of photosystems I and II in noncyclic plant photosynthesis.

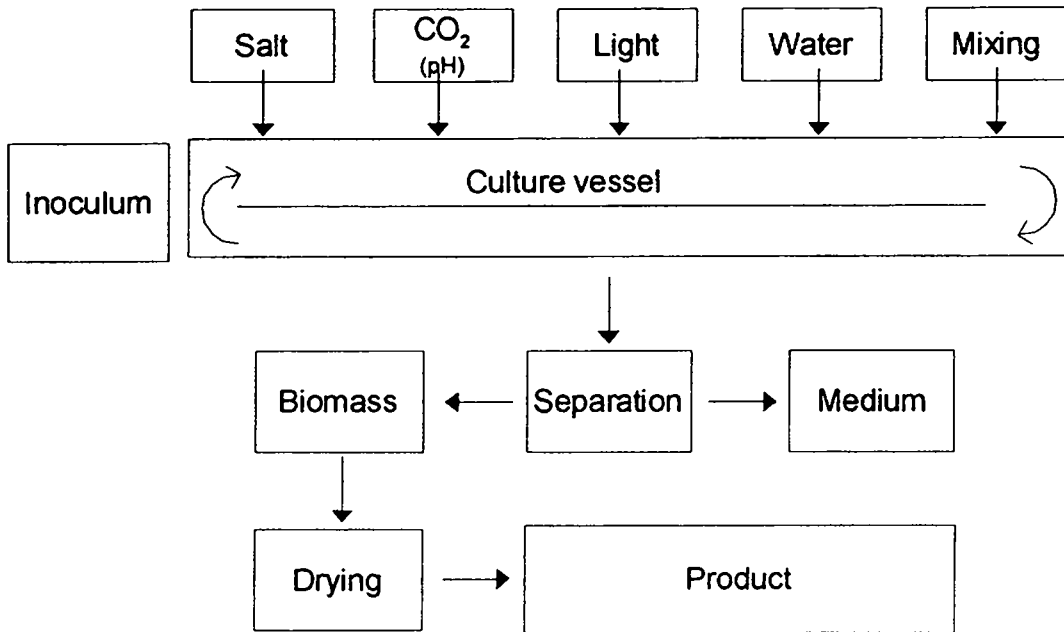


Fig. 2-6. The structure of open system for cultivation of microalgae.

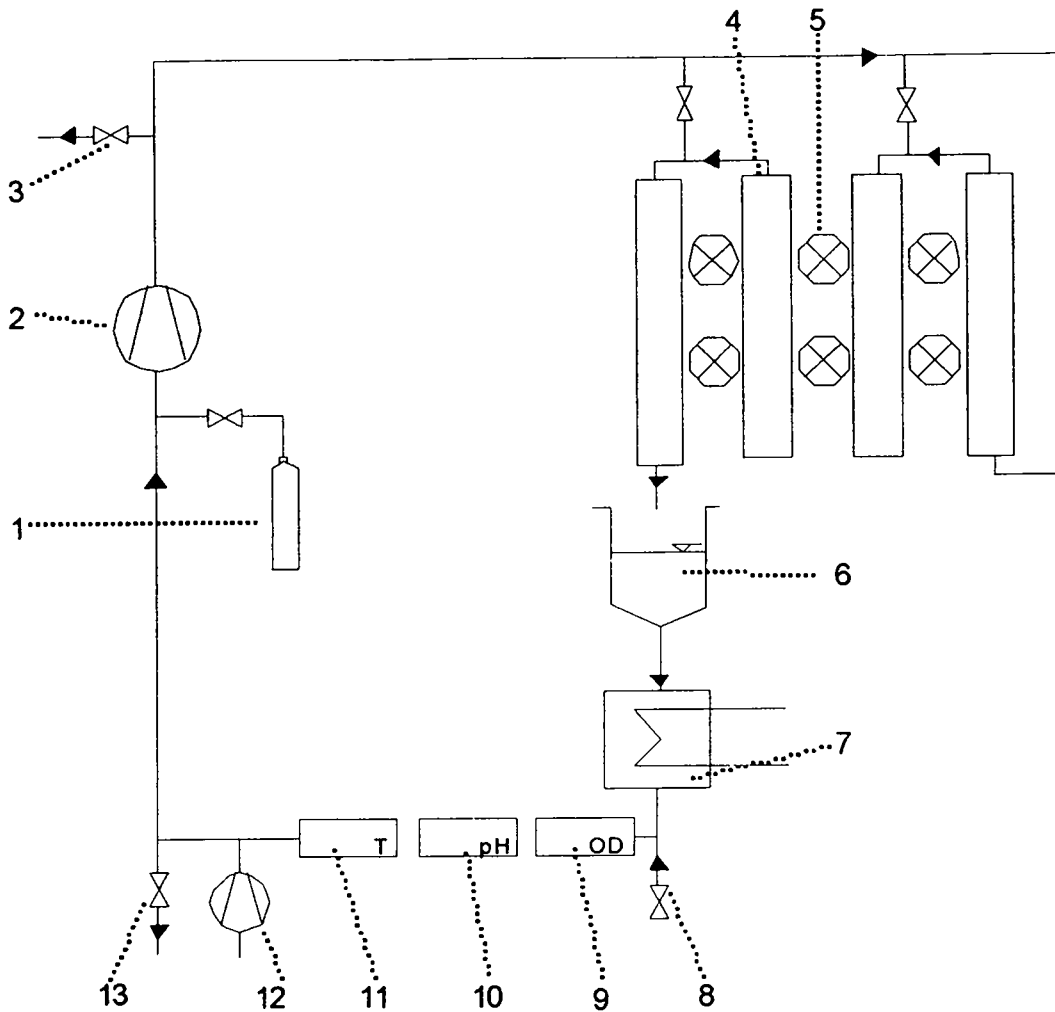


Fig. 2-7. Schematic diagram of Cylinder Type Photobioreactor for cultivation of microalgae.

1. CO₂ bombe 2. pump 3. sampling part 4. cylinder supplied light 5. light source 6. apparatus for elimination oxygen 7. cooler 8. inlet to put wash in a reactor 9. measuring optical density 10. measuring pH 11. measuring temperature 12. pump for supply medium 13. outlet

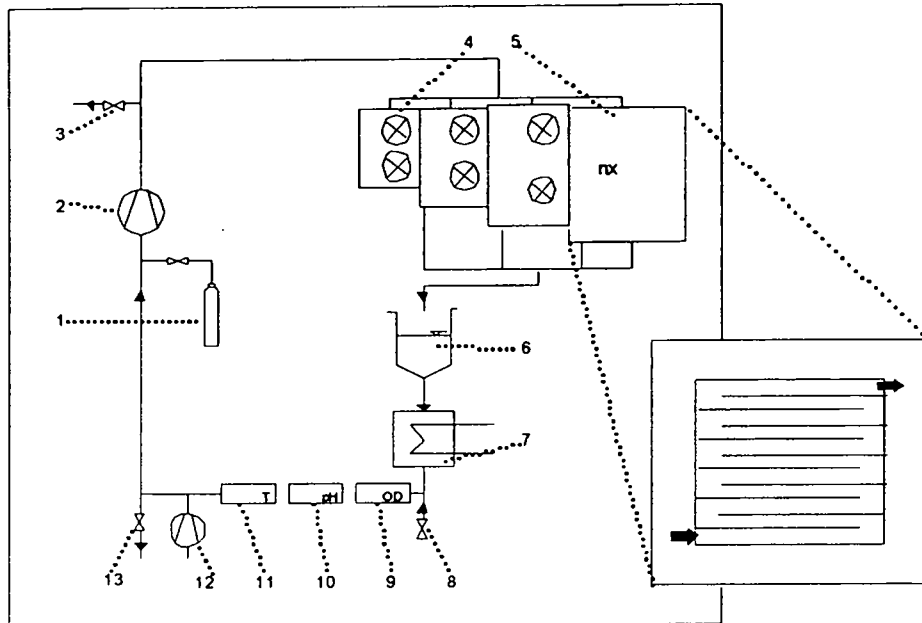


Fig 2-8. The structure of Plate Type Photobioreactor.

1. CO₂ bombe 2. pump 3. sampling part 4. light source 5. plate
supplied light 6. apparatus for elimination oxygen 7. cooler 8. inlet to
put wash in a reactor 9. measuring optical density 10. measuring pH 11.
measuring temperature 12. pump for supply medium 13. outlet

Fig. 2-8에는 판형 배양조를 나타내었다. 이 배양조는 두 개의 빛이 통과할 수 있는 평면 판으로 구성되고, 평면의 끝 부분은 봉합된 것으로서, 평면 안에는 평행으로 층층이 막을 설치시켜 놓는다. 액의 공급은 이와 같은 층층이 형성된 막을 통하여 수행된다.

이 장치의 기본 원리는 얇은 평면막에서 단세포 조류와 빛의 연속적인 접촉이 이루어지도록 한 것이다. 그 막의 두께는 빛을 통과시키는 평면의 간격에 의해 결정되는데, 보통 1cm~5cm 정도이며, 개방식 배양조 비교하여 빛의 공급은 충분히 이루어진다. 따라서 활발한 광합성 작용을 유도시킬 수 있고, 설치에 있어서도 수직 방향으로 기술적으로 크기를 조절할 수 있다. 이산화탄소의 공급은 관형 배양조에서와 같이 펌핑 전에 수행되며, 또한 펌프로 용액을 주입시키기 전에 생성된 산소를 제거시킨다.

평면판형 배양조에서는 관형배양조에서와 같이 배양액의 이동경로에 따라 산소에 의해 단세포 조류가 성장에 제한을 받는다. 그러나 이 배양조의 장점은 기본 면적을 수직으로 계속해서 여러 층 겹쳐 놓을 수 있기 때문에, 단위 면적당의 생산 능력을 향상시킬 수 있다. 그리고 단점을 들자면 전체 배양조를 살균시킬 수 없기 때문에 배양조를 무균상태에서 운전할 수가 없다. 그러나 치어의 먹이인 플랑크톤의 배양에 필요한 클로렐라(*Chlorella*)와 같은 조류의 배양에 있어서는 별 커다란 문제없이 이러한 배양조를 사용할 수 있다.

다음으로 단세포 조류의 배양에 이용될 수 있는 것이 Bubble column reactor를 들 수 있다. 이 reactor는 주로 빛을 통과시킬 수 있는 실린더형의 배양조로서 그 밑층으로부터 가스를 주입하고, 주입가스의 흐름을 통하여 교반도 가능하게 한다. 교반작용에 대해서는 다양한 유체역학적 이론이 응용되는데, 간단한 가스 공급장치에서부터 상당히 큰 펌프에 이르기까지 사용될 수가 있다.

빛의 공급 문제에 있어서는 실린더 높이와 지름과의 상관 관계가 커다란 작용을 한다. 고밀도 배양(10g/L)에 있어서는 빛의 통과 깊이가 최대한 5cm 정도이다. 이와 같은 문제를 현실화시킴에 있어 보통 사용되는 높이와 지름과의 관계가 factor 1.5인 경우, 10L 탱크에서 전체 볼륨이 25% 정도가 빛을 받지 못한다고 볼 수 있다. 그러나 이러한 reactor의 volume이 커짐에 따라서 빛을 받지 못하는 부분도 점점 증가하는데, 예를 들어 5000L의 reactor volume에서는 단지 10~15%만이 사용가능 volume으로 이용된다.

Bubble column reactor에서는 bubble의 보다 나은 이용을 위한 높이와 지름과의 비(H/D)가 10정도이며, 빛의 공급을 증가시킬 수 있는 최대 비율은 19 정도이다. 만약 이

최대치를 벗어나면 이 bubble column reactor는 오히려 관형 배양조라고 불러야 한다.

이 장치의 장점은 산소의 제거 및 이산화탄소의 공급, 교반이 용이하며, 또한 태양빛 이외에 인공적인 빛에 의해서도 가동이 된다는 점이다. 이상적인 빛의 공급은 실린더의 지름을 줄임으로써 이를 수 있는데, 그렇게 하면 관형 배양조에서 볼 수 있는 단점들이 나타나게 된다.

단세포 조류로부터 생리활성물질을 얻기 위한 reactor 형태에는 Stirred Tank를 들 수 있으나, 지나치게 높은 시설투자비용 및 관리비용 때문에 이 Stirred Tank는 부가가치가 매우 높은 생리활성물질 생산에 집중적으로 이용되고 있다.

제 7 절 결 론

단세포조류를 배양하기 위하여 개발된 기존의 배양조에는 연못형이 주를 이루고 있으며 이외에 관형 및 판형식 배양조가 이용되고 있다. 여기서 보다 높은 능률을 가지는 배양조를 설계하기 위해서는 그 배양조 내에서 일어나는 생물학적 변화와 필요조건을 만족시키는 것이어야 한다.

조류와 같은 광영양성 미생물의 경우에는 광합성에 필요한 빛이 요구된다. 온도조절과 함께 충분한 빛을 조사하는 것은 단순한 문제가 아니다. 비광합성 생물체의 배양에 있어서 온도조절은 incubator를 사용하거나, 원하는 온도로 고정된 온도조절장치를 사용함으로써 조절될 수 있다. 그러나 이러한 상업적으로 유용한 대부분의 모형은 내부조명계가 구비되어 있지 않으므로 광영양체인 조류의 배양에는 사용될 수 없다.

배지를 일광에 노출시키면 비교적 조절되지 않은 불연속적인 빛의 조사가 이루어질 수 있지만 태양광선에 직접 노출시키는 것은 강도가 너무 강하고 온도도 생장이 저해되는 정도까지 올라갈 수도 있다. 그러나 많은 광합성미생물들은 연속적인 광조사에 견딜 수 있으며, 그들의 생장은 이러한 상태에서 더욱 빠르므로 인공적인 광원이 유리하다.

인공광원을 사용할 때 그 광원의 방출스펙트럼은 중요한 요소가 된다. 750~1000nm 범위에 있는 파장의 빛을 이용하는 미생물에게 절대적으로 유리한 백열전구는 높은 강도로 사용 시 열의 방출이 문제가 된다. 그러나 조류는 700nm보다 단파장의 빛을 사용하는 광합성을 사용하므로 가시광선스펙트럼의 장파장과 적외선 근처의 파장에서 손실이 많은 형광등을 사용하는 것이 적당하다. 또한 이 형광등은 비교적 적은 열을 방출하므로 실제적으로 유용하며 적정온도를 유지하기도 어렵지 않다.

조류를 배양함에 있어서 절대적으로 필요한 또다른 인자는 충분한 양의 CO₂를 공급해주는 것이다. 비록 대기로부터 배지로 CO₂가 확산되어 들어가 생장이 일어나도록 해준다 하더라도 대기중의 CO₂농도는 0.03%정도로 매우 낮으므로 단세포조류의 성장률은 이러한 상태하에서 CO₂의 유용성에 의해 제한을 받을 때가 가끔 있다. 해결책은 인위적으로 풍부하게 CO₂가 함유된 공기를 주입시켜 1~5%의 CO₂를 공급하는 것이다. 그러나 이 때에는 pH 조절의 문제가 발생하게 되므로 적절한 조절이 필요하게 된다.

제 3 장 *Chlorella* sp.의 최적 성장 조건 확립

제 1 절 서 설

치어 양식에 필수적인 동물성 플랑크톤의 먹이조류인 *Chlorella* sp.의 대량생산을 위한 배양조의 개발에는 *Chlorella* sp.의 최적 성장 조건의 파악이 필수적이다. 따라서 *Chlorella* sp.의 성장에 영향을 미치는 각종 인자의 최적 조건을 파악하기 위하여 3개 형태의 기본적 배양조를 제작 또는 조립하고, 이를 이용하여 배양온도, pH, 공기 공급 속도, CO₂ 공급속도 및 조도의 영향을 *Chlorella* sp.의 비증식속도(specific growth rate)를 기준으로 비교, 검토하였다.

배양조의 기본 형태로는 Vertical Tubular Photobioreactor(VT-PBR), Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor(RVC-PBR) 및 Plant Cell Photobioreactor(PC-PBR)을 택하였고, 배양용 *Chlorella* sp.로는 해수산과 담수산을 택하여 각 모형 배양조에서의 비증식속도를 비교하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 기본 배양조

가. Vertical Tubular Photobioreactor

Vertical Tubular Photobioreactor(VT-PBR)의 전체 개략도는 Fig. 3-1에 나타내었다. 배양조 몸체는 회분식 bubble column reactor 형태로서 유리로 제작하였으며, 빛 공급장치, 온도조절 장치, 공기 및 CO₂ 공급속도 조절기로 구성하였다.

배양조 몸체는 직경 3.2cm, 높이 31cm로 멸균이 가능하게 하였으며, 배양조의 윗 부분은 실리콘 패킹으로 완전 밀봉한 후, 직경 2mm의 유리관을 장착하여 *Chlorella* sp.의 광합성 과정에서 발생하는 산소 및 비용해성 잔여 기체가 배출되도록 하였다. 빛 공급 장치로는 3파장 램프 4개를 배양조의 주위에 10cm 간격으로 배치하였고, 점등하는 램프의 수에 따라서 조도가 조절되도록 하였으며, 조도계(luxmeter, ANAF9, Japan)를 사용하여 빛의 강도를 측정하였다. 배양조의 온도는 항온기(MO.MIR 152, SANYO, Japan)를 이용하여 일정하게 유지되도록 하였다. 기체는 최대 유량이 4l/min 인 펌프로 공급하였으며, 공기와 CO₂의 혼합 기체는 로우터미터(RMA-13-SSV, Dwyer Instruments Inc., U.S.A)를 이용하여 공급하였다. 그리고 외부로 부터의 오염을 최소화하기 위하여 각 기체의 입구에는 여과기를 장착하였다.

나. Recirculating Vertical Cylinder Type Photobioreactor

Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor(RVC-PBR)의 개략도는 Fig. 3-2에 나타내었다. 이 배양조는 VT-PBR의 단점들을 개선하기 위하여 배양조의 원통형 몸체의 규모를 확대시키고 3개를 직렬식으로 연결하였다.

Chlorella sp.의 배양중에 생성된 산소의 신속한 제거를 위하여 가스 교환기를 장착하여 *Chlorella* sp.의 농도가 높아졌을 때의 배양액 중의 산소가 제거되도록 하였다. 전체적으로는 빛 공급장치, 배양온도의 제어를 위한 냉각장치, 가스 공급속도 조절 장치 및 원통형 몸체로 구성하였다. 원통형 몸체는 직경 9.8cm, 높이 31cm의 투명 아크릴로 제작하였고, 배양액이 3개의 원통형 몸체를 순환되게 하였다. 냉각장치와 가스 공급속도 조절 장치는 VT-PBR에서와 같은 방법으로 구성하였고, 빛 공급장치는 자연광에 가까운 할로젠 램프를 사용하였다.

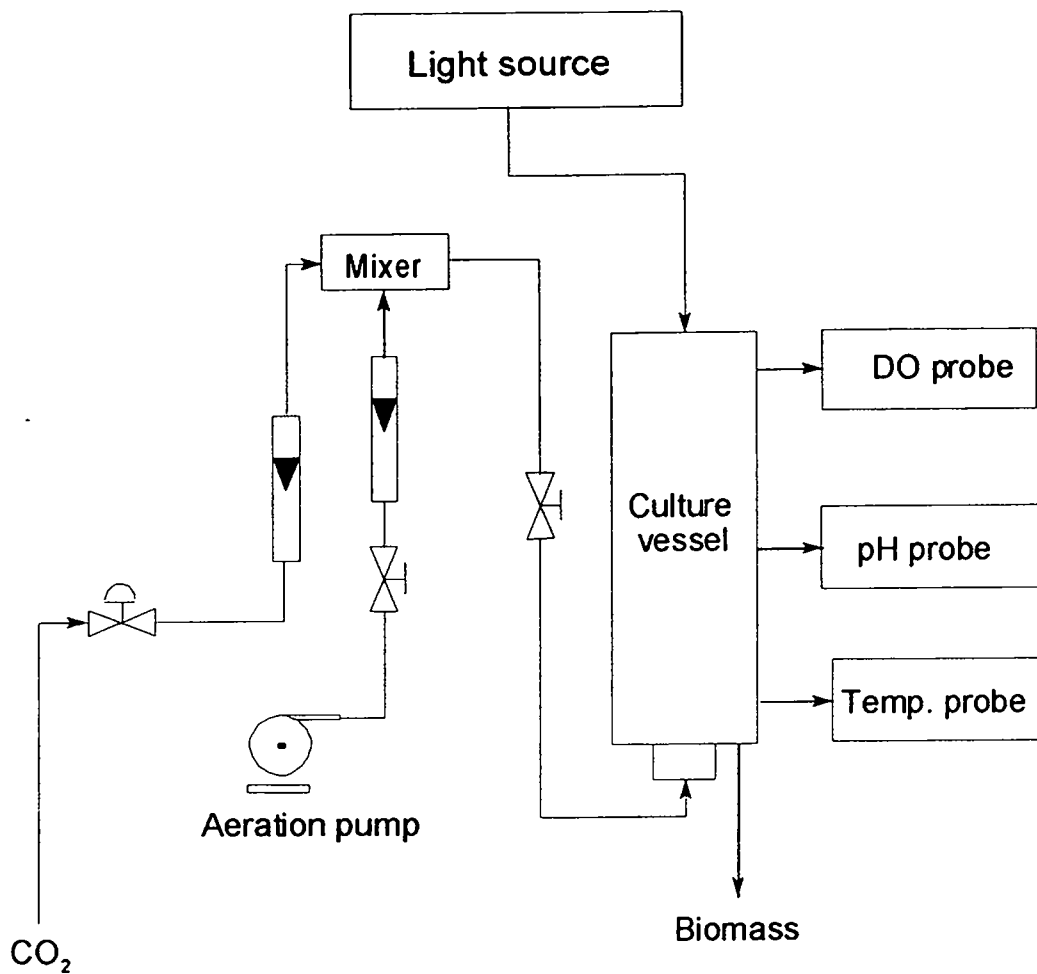


Fig. 3-1. Schematic diagram of Vertical Tubular Photobioreactor(VT-PBR).

다. Plant Cell Photobioreactor

Plant Cell Photobioreactor(PC-PBR)는 RVC-PBR가 pH를 일정하게 유지하기 어려운 단점이 있어 이를 개선한 형태로서, CO₂ 공급속도 조절과 그에 따른 pH의 조절이 가능한 실험실 규모의 air-lift형 fermentor(Model KLF2000, Bioengineering, Swiss)에 illumination jacket을 장착시켜 *Chlorella* sp.의 배양에 적합하도록 개조한 것이며, 그 개략도는 Fig. 3-3에 나타내었다.

전체적으로 pH controller, pO₂ indicator, illumination controller, gas mixing station으로 이루어진 control box와 배양조를 둘러싸고 있는 illumination jacket으로 구성하였고, 배양온도는 배양조 외부에 장착된 저온 순환수조 및 배양조 자체에 장착된 가열기를 이용하여 조절되도록 구성하였다. 그리고 pH는 CO₂의 공급량에 따라 조절되도록 하였다.

2. 배양용 *Chlorella* sp.

Chlorella sp.로는 국립수산진흥원 남해수산연구소 충무분소에서 어민들에게 공급하기 위하여 노천 배양하고 있는 해수산 *Chlorella* sp.와 독일 Göttingen 대학교 조류종자 보관소에서 분양받은 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 사용하였다.

3. 배 지

담수산 *Chlorella* sp. 배양용 배지로는 f/2 배지를 사용하였다(Guilard and Ryther, 1962). 배지의 성분 조성은 Table 3-1에 나타내었으며, 121.1℃, 1.5lb에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 그리고 해수산 *Chlorella* sp. 배양용 배지로는 인공 해수를 사용하였으며, 그 성분 조성은 Table 3-2에 나타내었다.

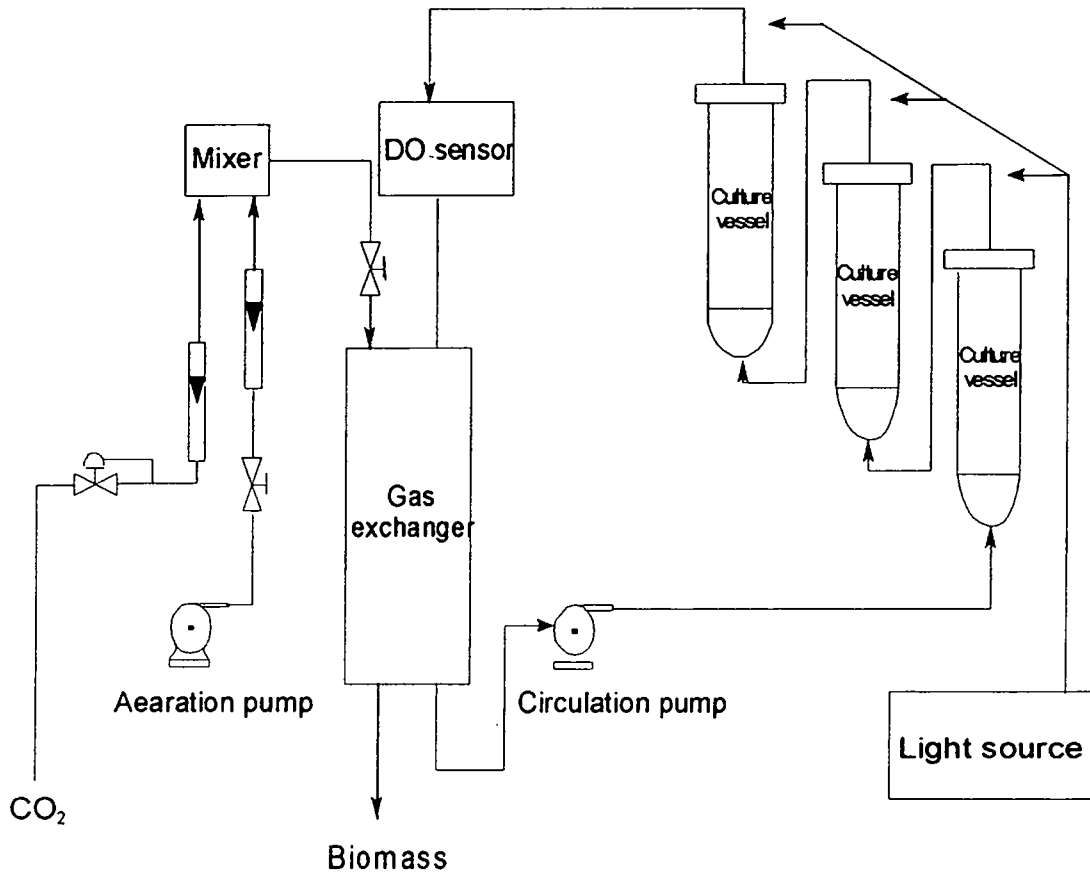


Fig. 3-2. Schematic diagram of Recirculating Vertical Cylindric Photobioreactor in cascade. (RVC-PBR)

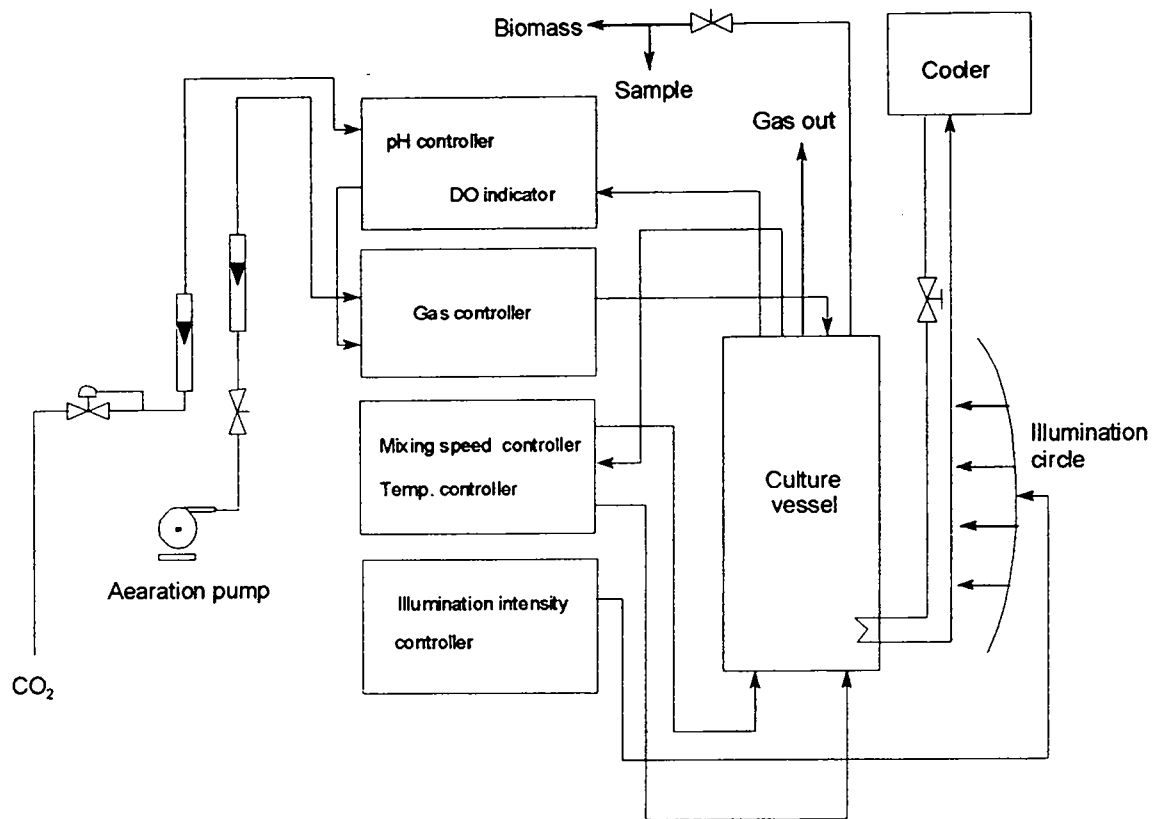


Fig. 3-3. Schematic diagram of Plant Cell Photobioreactor(PC-PBR).

Table 3-1. Composition of f/2 media for *Chlorlla vulgaris* 211-11b

| Component | Content(mg/ ℓ) | Component | Content(mg/ ℓ) |
|---------------------------------------|-----------------|--|-----------------|
| NaNO ₃ | 150 | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.044 |
| Na ₂ HPO ₄ | 8.69 | Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O | 60 |
| Ferric EDTA | 10 | Na ₂ MoO ₃ · 9H ₂ O | 0.012 |
| MnCl ₂ | 0.22 | B ₁₂ | 0.001 |
| CoCl ₂ | 0.11 | Biotin | 0.001 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.0196 | Thiamine · HCl | 0.0002 |

Table 3-2. Compositon of artificial seawater for *Chlorella* sp.

| Component | content(g/ ℓ) | Component | content(g/ ℓ) |
|---------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|
| NaCl | 30.0 | KCl | 1.5 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 10.0 | CaSO ₄ | 2.0 |

4. *Chlorella* sp.의 농도 측정

가. 세포수의 계수

매일 일정한 시간에 배양액 중 표면으로부터 10mm 깊이의 배양액을 일정량 채취하여 혈구계측기를 사용하여 광학현미경으로 계수하였다. 이때 실험 오차를 줄이기 위해 매번 5회 반복 계수하고 평균 세포수를 구하였다.

나. O.D.의 측정

매일 일정한 시간에 배양액의 표면으로 부터 10mm 깊이의 배양액을 일정량 채취하고 분광광도계를 사용하여 750nm에서의 흡광도(Optical Density, O.D.)를 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 배양조별 배양 인자의 영향

가. VT-PBR

1) 온도의 영향

해수산 *Chlorella* sp.의 최적 배양 온도를 설정하기 위하여 공기 공급속도를 2.78vvm, 조도를 20,000lux로 고정시키고, 17℃, 20℃ 및 25℃에서 10일 동안 배양하였으며, 이 때의 증식곡선을 Fig. 3-4에 나타내었다.

최대 비증식속도(max. specific growth rate, μ_{max})는 20℃에서 0.18day⁻¹로서 가장 컸으며, 17℃에서는 0.13day⁻¹, 25℃에서는 0.15day⁻¹였다.

2) 공기 공급속도의 영향

공기 공급속도의 변화에 따른 *Chlorella* sp.의 비증식속도 변화를 알아보기 위하여, 배양 온도를 20℃, 조도 20,000lux로 고정시키고 공기의 공급속도를 0.56vvm~5.56vvm의 범위에서 달리하였을 때의 비증식 속도를 비교하여 Fig. 3-5에 나타내었다.

공기 공급속도가 0.56vvm일 때 μ_{max} 가 가장 커서 0.31day⁻¹였고, 공기 공급속도가 빨라질수록 *Chlorella* sp.의 농도와 μ_{max} 가 작아지는 경향을 보였으며, 공기의 공급속도가 느릴수록 *Chlorella* sp.의 농도와 μ_{max} 가 큰 값을 나타내었다. 그리고 배양 초기 3일까

지는 공기 공급속도가 0.56vvm일 때보다 1.67vvm 및 2.78vvm일 때에 배양액 중의 *Chlorella* sp.의 증식이 오히려 빨랐다. 이는 공기 공급속도가 클 때에는 많은 양의 공기가 배양조 내로 유입되어 상대적으로 많은 양의 CO₂가 배양액 중에 용해되기 때문으로 생각되었다. 그러나 배양 3일 이후부터의 증식속도의 변화는 *Chlorella* sp.가 급격하게 성장하면서 산소를 대량 배출함에 따라 배양액 중의 용존 산소 농도가 매우 높아지기 때문으로 생각되었다(Weissman *et al.*, 1987; Boogerd, 1989).

이와 같은 비증식속도의 차이가 용존 산소의 농도에 의한 저해 때문인지를 알아 보기 위하여, 배양액 중으로 공급되는 산소의 용해도가 큰 porous형 공기 취입기(sparger)와 산소의 용해도가 적은 nozzle형 sparger를 사용하였을 때의 *Chlorella* sp.의 비증식 속도를 비교하였으며, 그 결과를 Fig. 3-6에서 나타내었다.

산소의 용해가 적은 nozzle형 sparger를 사용하였을 때에 μ_{max} 와 *Chlorella* sp. 농도가 더 큰 값을 나타내었다. 그러나 이 때에도 배양 초기 3일째까지는 porous형 sparger를 사용하였을 때에 세포의 농도가 다소 높았다.

3) 조도의 영향

조도에 따른 *Chlorella* sp.의 증식속도 변화를 관찰하기 위하여, 배양온도와 공기 공급속도를 20℃와 0.56vvm로 고정시키고, 조도를 6,000lux에서 20,000lux까지 달리하여 12일 동안 배양하였다. 이 때, 조도 15,000lux와 20,000lux 조건에서는 초기 *Chlorella* sp.의 농도를 각각 $2.8 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 및 $3.2 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 로 하였고 6,000lux 및 10,000lux의 조건에서는 $1.55 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 로 하였으며 그 결과는 Fig. 3-7에 나타내었다.

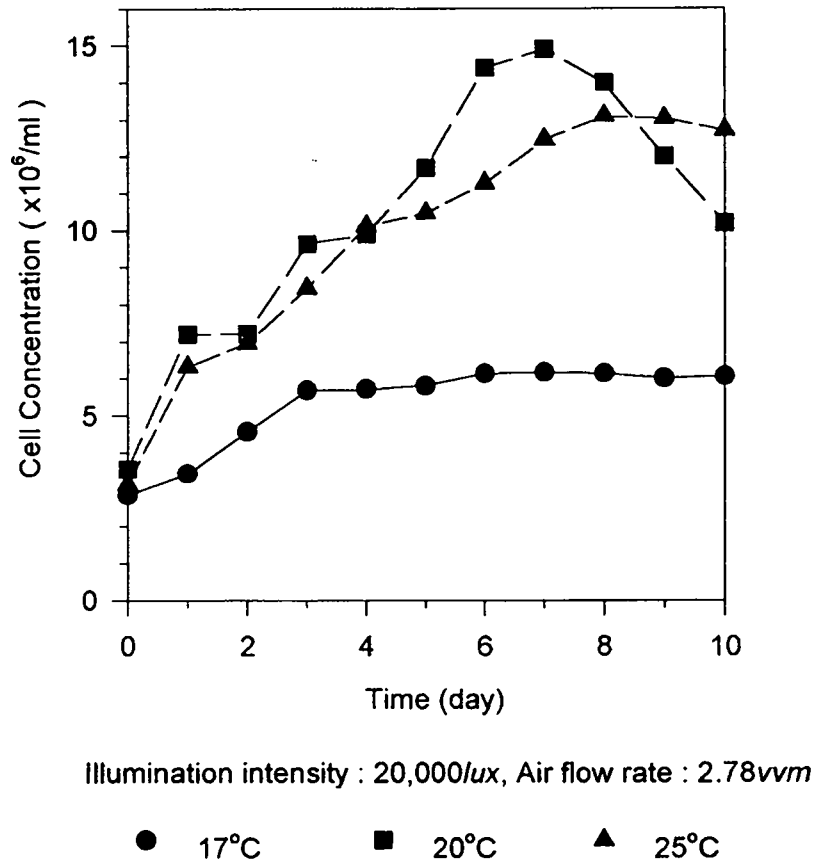
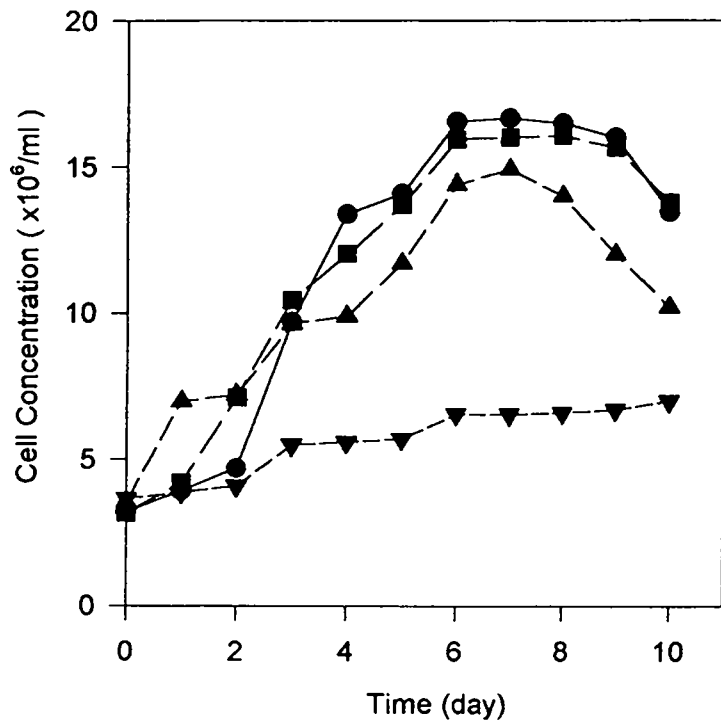


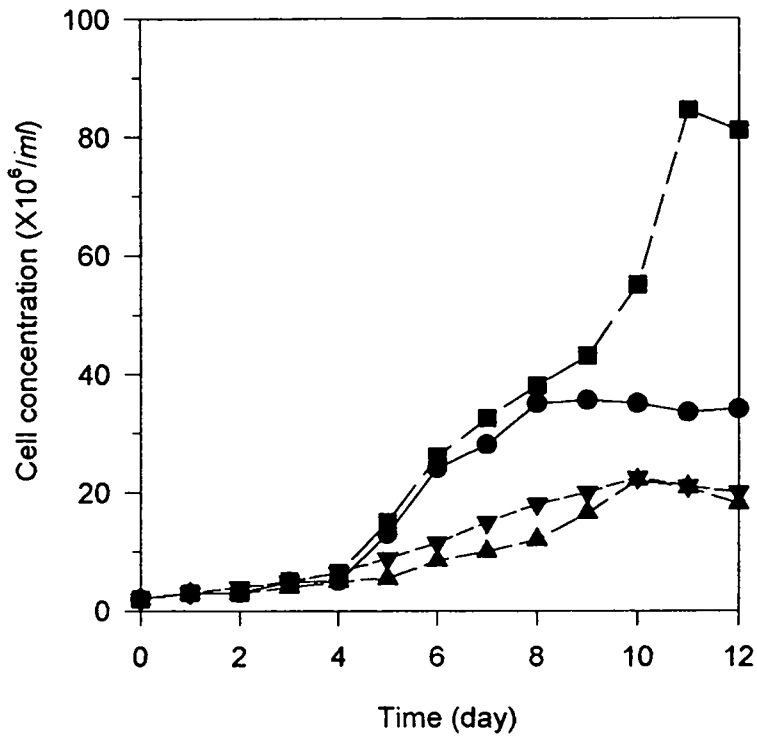
Fig. 3-4. Growth curves of *Chlorella* sp. in a VT-PBR at different temperatures



Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 20,000lux

● 0.56vvm ■ 1.67vvm ▲ 2.78vvm ▼ 5.56vvm

Fig. 3-5. Growth curves of *Chlorella* sp. in a VT-PBR with different air flow rates.



Cultivation temperature : 20°C, Air flow rate : 0.56vvm

- Nozzle type sparger, 10,000 lux
- Nozzle type sparger, 6,000 lux
- ▲ Porous type sparger, 10,000 lux
- ▼ Porous type sparger, 6,000 lux

Fig. 3-6. Growth curves of *Chlorella* sp. in a VT-PBR installed with different types of sparger and several illumination intensities.

조도가 6,000lux 보다 낮은 경우에는 광합성에 필요한 광자가 충분히 공급되지 않아서 *Chlorella* sp.의 성장율이 낮아진다고 알려져 있는데, 본 연구에서도 조도가 6,000lux 일 때 μ_{max} 가 0.34day⁻¹ 로서 가장 컸으며, 조도가 지나치게 큰 경우에는 오히려 증식이 늦어졌다. 그 이유는 조도가 너무 높으면 오히려 photosynthetic receptor system PSII 가 손상을 입어서 광선이 증식저해(photoinhibition)를 일으킨 때문으로 생각되었다 (Stryer, 1987). 이러한 결과들로 미루어 보아 *Chlorella* sp. 배양에서의 최적 조도는 6,000lux 정도로 판단되었다.

4) CO₂ 공급속도의 영향

배양액 중의 CO₂의 농도 즉, CO₂ 공급 속도가 비증식속도에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 *Chlorella* sp. 배양 배지에 공급하는 CO₂ 공급속도를 0.028vvm, 0.056vvm 및 0.083vvm로 달리하여 배양하였다. 이 때 CO₂는 아스피레이터를 이용하여 0.56vvm의 속도로 공급되는 공기와 혼합하여 공급하였고, 배양온도는 20℃, 조도는 6,000lux로 하였다.

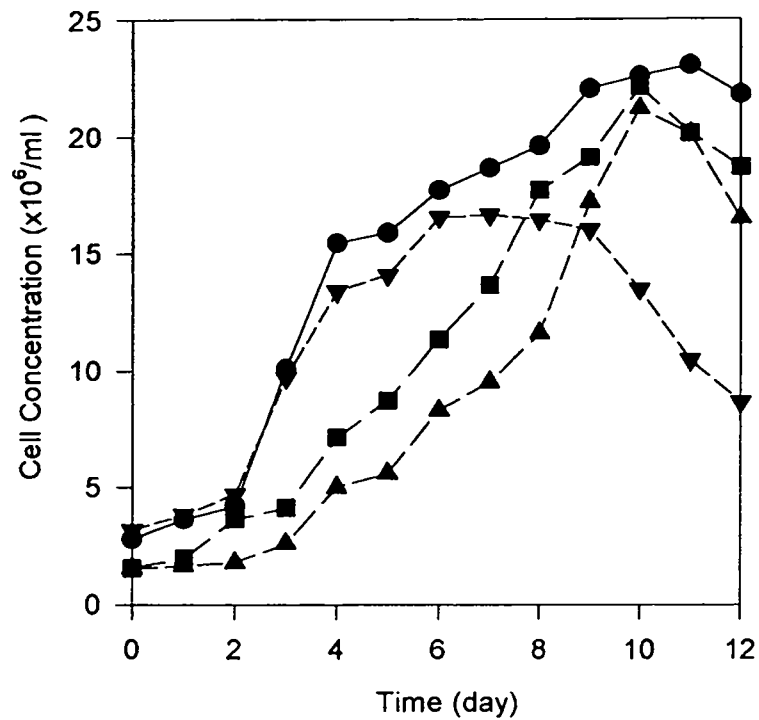
그 결과를 보면 Fig. 3-8에서와 같이 CO₂의 공급속도가 가장 적은 0.028vvm일 때 *Chlorella* sp.의 μ_{max} 가 가장 커서 0.12day⁻¹였으나, pH가 5.0 이하로 낮아지면 거의 성장하지 못하거나, 농도가 감소하는 경향을 나타내었다. 그러므로 *Chlorella* sp. 배양중의 CO₂의 공급량은 배양액의 pH를 떨어뜨리지 않는 범위 내에서 조절되어야 함을 알 수 있었다.

그리고 VT-PBR의 용량이 너무 작은 경우에는 CO₂를 소량 공급하여도 배양액의 pH가 낮아지기 때문에(Weissman *et al.*, 1987; Boogerd *et al.*, 1990), CO₂의 지속적인 공급보다는 배양액의 pH에 따라 CO₂를 유가적으로 보충(incremental feeding)하여야 함을 확인하였다.

VT-PBR를 이용하여 국립수산진흥원 남해수산연구소 충무분소에서 분양받은 해수산 *Chlorella* sp.의 배양 조건을 검토한 결과 배양 최적 온도는 20℃, 조도 6,000lux 공기 공급속도 0.56vvm, 그리고 CO₂ 공급속도는 0.028vvm였고 sparger는 nozzles형이 효과적이었다.

그리고 VT-PBR은 체적에 대한 표면적의 비(S/V)가 커서 세포의 농도가 높아지더라

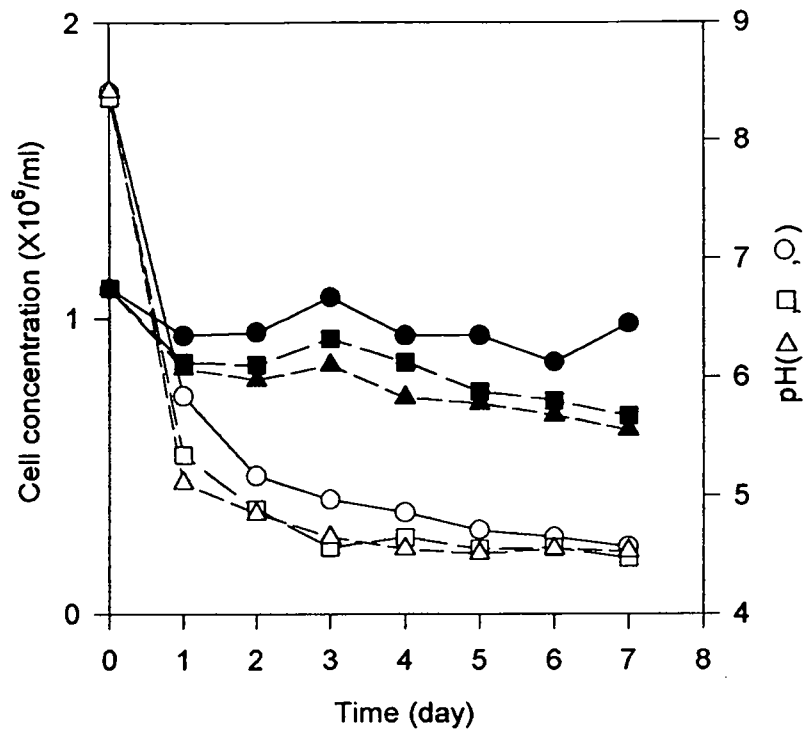
도 빛이 충분히 공급되어 *Chlorella* sp.가 고농도에 이를 수 있는 장점이 있었으나, 배양 용량이 너무 작기 때문에 소량의 CO₂를 공급하여도 배양액의 pH가 낮아지고 *Chlorella* sp.의 증식이 비효과적인 단점이 있었다.



Cultivation temperature : 20°C, Air flow rate : 5.56vvm

- 6,000lux ■ 10,000lux
- ▲ 15,000lux ▼ 20,000lux

Fig.3-7. Growth curves of *Chlorella* sp. in a VT-PBR under different illumination intensities.



Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000/lux

- , ○ CO₂ 0.028vvm
- , □ CO₂ 0.056vvm
- ▲ , △ CO₂ 0.083vvm

Fig.3-8. Growth curves of *Chlorella* sp. and pH changes in a VT-PBR during cultivation with different CO₂ flow rates.

VT-PBR을 확대(scale-up)시킬 때 S/V를 크게 유지하려면 관형으로 제작하는 것이 이론적으로 타당하다. 그러나 관형 배양조의 경우에는 내부 aeration이 불가능하고 산소가 심하게 축적되는 단점이 확인되었으며, 또한 배양 용량이 지나치게 작아서 최적 CO₂ 농도를 찾기 어려운 점도 있었다.

나. RVC-PBR

RVC-PBR은 VT-PBR의 단점들을 개선하기 위하여 배양조의 실린더형 몸체 크기를 확장시키고, 3개를 연결한 형태이다. 발생한 O₂의 신속한 제거를 위하여 가스 교환기를 장착하여 *Chlorella* sp.의 농도가 높아졌을 때의 배양액 중에 발생한 다량의 O₂를 제거하도록 하였다.

전체적으로는 빛 공급장치, 배양 온도 제어를 위한 냉각장치, 가스 공급속도 조절 장치 및 원통형 몸체로 구성되어 있으며, 배양액은 직렬로 연결한 후 3개의 원통형 몸체를 순환되게 하였다. RVC-PBR에서 자연광에 가까운 할로젠 램프를 사용하며 *Chlorella* sp.를 배양하였을 때의 결과는 다음과 같다.

1) CO₂ 농도의 영향

CO₂ 공급 속도가 비증식속도에 미치는 영향을 알아보기 위해 해수산 *Chlorella* sp.를 배양하였다. 이 때, 배지에 대하여 CO₂와 공기를 각각 $0.625 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 와 0.75vvm 로 혼합하여 공급하였고, 배양 온도는 20℃, 조도는 $6,000 \text{lux}$ 로 하였다.

그 결과를 보면 Fig. 3-9에서와 같이, CO₂의 공급으로 초기에는 pH가 7.0 이하로 낮아진 상태에서 *Chlorella* sp.가 증식되다가, 배양이 계속됨에 따라 pH가 7.0 이상으로 높아진 5일째부터 증식이 급속히 진행되었다. 이 때의 μ 는 0.46day^{-1} 였으며, 이로부터 해수산 *Chlorella* sp.는 배양 적정 pH가 적어도 7.0 이상이어야 한다는 것을 확인할 수 있었다.

CO₂ 공급량을 달리 하였을 때의 증식속도의 변화와 pH 변화의 관계를 알아보기 위해 배양 초기에는 CO₂와 공기의 혼합비를 $0.625 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 와 0.75vvm 로 하여 공급하다

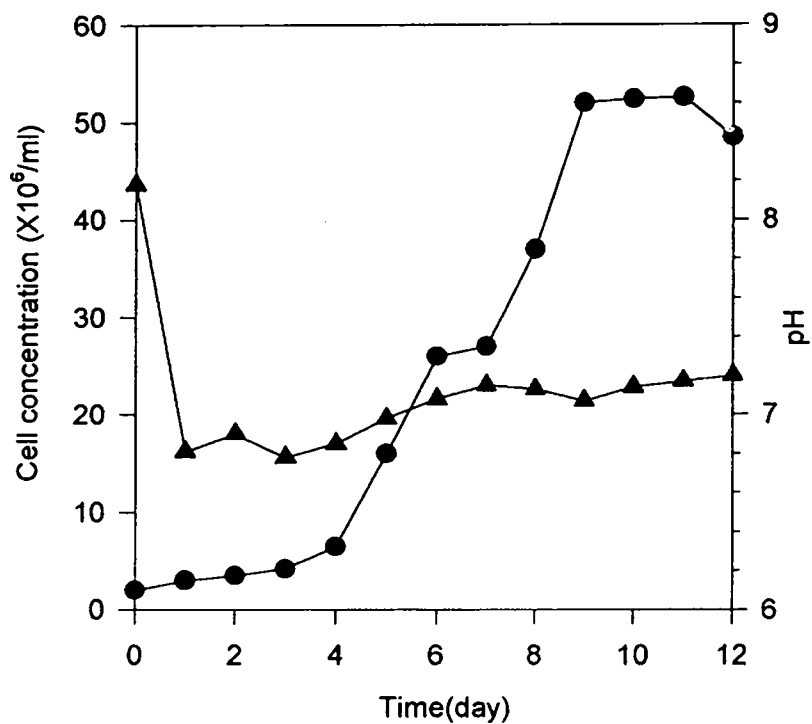
가, 배양 5일째부터 CO_2 공급량을 $0.375 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 로 감소시키되 배양온도와 조도는 20°C 및 $6,000 \text{lux}$ 로 동일하게 하였을 경우의 결과를 Fig. 3-10에 나타내었다. CO_2 공급속도를 $0.625 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 로 하였을 때에는 배양액의 pH가 5.81~6.78 범위여서 *Chlorella* sp.의 농도가 거의 일정하였다. 그러나 CO_2 공급속도를 $0.375 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 으로 줄였을 때에는 pH가 6.92~7.70 범위였으며, *Chlorella* sp.의 농도가 급격하게 증가하기 시작하였다. 특히 pH 7.2~7.5 사이에서 증식이 가장 왕성하였다. 그리고 CO_2 를 $0.375 \times 10^{-3} \text{vvm}$ 로 공급했을 때는 μ_{\max} 가 0.56day^{-1} 여서, 앞의 여러 배양조건에서의 결과와 비교하여 가장 높은 값을 나타내었다.

그러므로 해수산 *Chlorella* sp.의 배양 최적 pH는 7.2~7.5 사이임을 알 수 있었다. 그리고 이러한 결과는 *Chlorella* sp.의 배양을 위한 배양조의 설계에 있어서는 CO_2 는 pH 조절과 연계하여 공급되도록 설계하여야 함을 확인할 수 있었다.

2) 가스 교환기의 영향

가스 교환기에서의 산소 제거 효과를 알아보기 위하여, 교환기에서의 용존산소 농도와 펌프를 통해 순환되는 배양조 끝 부분에서의 용존산소 농도를 측정 비교한 결과를 Fig. 3-11에 나타내었다.

Chlorella sp.의 배양 초기에는 교환기 부분과 배양조 끝 부분에서의 용존산소의 농도가 거의 차이를 보이지 않았다. 그러나 *Chlorella* sp.의 농도가 증가함에 따라 배양조 내에서 이들이 광합성을 할 때 발생시키는 산소의 농도가 높아져서, 배양조에서 교환기로 나가는 배양액 중의 용존산소 농도가 높아짐을 알 수 있었으며, 본 연구에서 제작, 사용한 가스 교환기로는 최대 $0.22 \times 10^{-2} \text{vvm}$ 산소 제거 효과를 얻을 수 있었다. RVC-PBR을 이용한 배양결과 최적 CO_2 공급속도는 $0.375 \times 10^{-3} \text{vvm}$, pH는 7.2~7.5 사이였고, 가스 교환기의 채택은 산소제거에 효과적이었다.

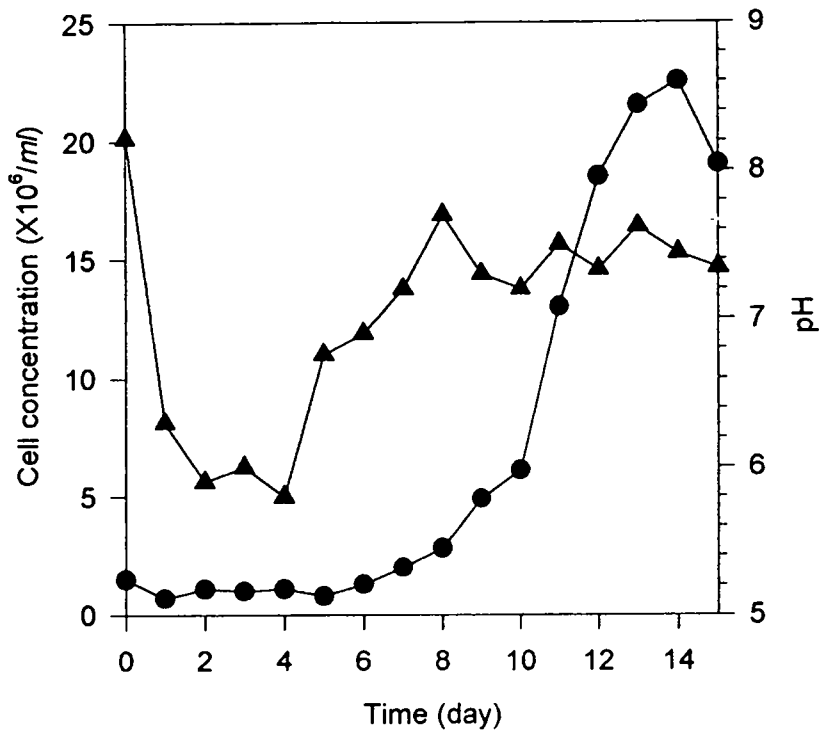


Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000 lux

Air flow rate : 0.75vvm, CO₂ supply : 0.625 X 10⁻³vvm

● Cell concentration ▲ pH

Fig. 3-9. Growth curve of *Chlorella* sp. and changes of pH in a RVC-PBR in cascade.



The amount of CO₂ supply was reduced from 0.625X10⁻³vvm to 0.375X10⁻³vvm from 5th day.

Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000 lux
Air flow rate : 0.75vvm

● Cell concentration ▲ pH

Fig. 3-10. Growth curve of *Chlorella* sp. and changes of pH in a RVC-PBR in cascade.

RVC-PBR의 장점은 가스 교환기의 채택에 따른 aeration에 필요한 동력비의 절감, 배양액에 축적된 산소의 효과적 제거, 배양액의 순환에 의한 세포의 침전 방지 등을 들 수 있다.

그러나 RVC-PBR은 체적에 대한 표면적의 비(S/V)가 $41m^{-1}$ 로서 VT-PBR보다 상대적으로 작아서 *Chlorella* sp.의 최대 농도가 $5.2 \times 10^7 cell/ml$ 정도였다. 또한 가스 교환기에서 CO₂를 공급할 때 대기 중으로 방출되는 CO₂양이 많아서 배양 단가를 상승시키는 요인이 될 수 있었고 일정한 pH의 조절이 어려웠다.

다. PC-PBR

PC-PBR은 RVC-PBR이 pH를 일정하게 조절하기 어려운 단점을 개선하기 위하여, CO₂ 공급속도의 조절과 그에 따른 pH의 조절이 가능한 실험실 규모의 air-lift형 배양조(Model KLF2000, Bioengineering, Swiss)에 illumination jacket을 장착시켜 *Chlorella* sp.의 배양에 적합하도록 개조한 것이다. PC-PBR을 이용하여 *Chlorella* sp.를 배양하였을 때의 결과는 다음과 같다.

1) 해수산 *Chlorella* sp.의 배양

공기 즉, O₂의 공급 여하에 따른 회분식(batch type) 배양조에 있어서의 용존산소 농도의 변화를 살펴보기 위하여 공기를 공급하지 않고 해수산 *Chlorella* sp.를 배양하였다. 그리고 공기를 공급하지 않음으로써 발생하는 *Chlorella* sp.의 침전을 막기 위하여 임펠러(impeller)를 이용하여 1,000rpm으로 회전시키며 충분히 교반하였고, 조도는 6,000 lux, 배양 온도는 20℃로 하였다.

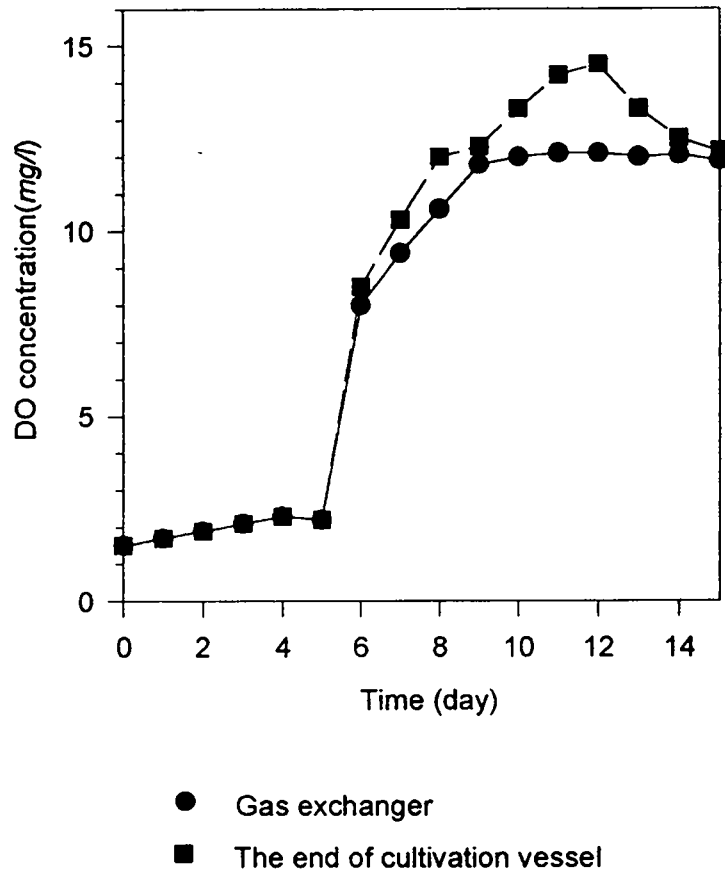


Fig. 3-11. Changes of DO concentration in gas exchanger and at the end of culture vessel of a RVC-PBR in cascade.

배양액에 대하여 CO_2 를 $0.2 \times 10^{-2} \text{vum}$ 의 속도로 공급하다가, 배양 6일째 부터 pH가 7.0으로 고정되도록 CO_2 공급속도를 조절하였을 때의 *Chlorella* sp.의 배양 결과를 Fig. 3-12에 나타내었다.

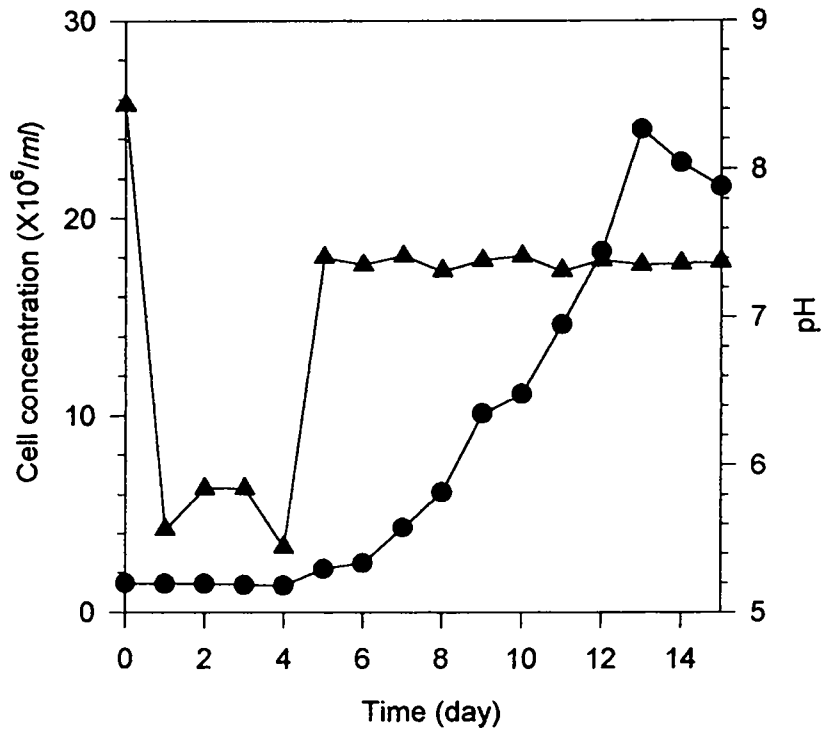
이 배양 조건에서도 역시 배양액에 대하여 CO_2 를 $0.2 \times 10^{-2} \text{vum}$ 로 공급했을 때 pH가 5.45까지 낮아졌고, *Chlorella* sp.의 증식은 거의 볼 수 없었다. 그러나 CO_2 공급을 중단 하였을 때에는 하루만에 pH가 7.05까지 상승하고 *Chlorella* sp.의 증식이 시작되었으며, 이 때부터 배양액의 pH가 7.0 정도로 유지되도록 CO_2 를 유가적으로 공급함으로써 *Chlorella* sp.의 증식이 급격하게 진행되어 0.47day^{-1} 의 비증식속도를 나타내었다. 이러한 결과로 부터 CO_2 의 용해에 따라 pH가 감소하며, *Chlorella* sp.가 광합성을 일으키는 데 필요한 CO_2 량은 pH와 밀접한 관계가 있음을 다시 확인할 수 있었다.

RVC-PBR의 경우 pH 7.2~7.5 사이에서는 *Chlorella* sp.의 비증식속도가 0.56day^{-1} 였으나, PC-PBR의 경우 pH 7.0 부근에서의 비증식속도가 0.47day^{-1} 로서 오히려 낮은 비증식속도를 나타내었다. 그러므로 *Chlorella* sp.는 적정 pH에서 요구되는 CO_2 공급량을 충족시킬 때 최대 비증식속도에 도달할 수 있음을 알 수 있었다.

Fig. 3-13에는 배양 4일째와 5일 사이의 용존산소의 농도 변화를 시간별로 나타내었다. 증식조건이 부적당하여 호흡 작용이 활발하게 진행되면서 용존산소의 농도는 감소하다가, pH가 7.0정도로 조절되었을 때 *Chlorella* sp.가 왕성하게 증식하면서 광합성 과정에서 생산된 산소로 인하여 배양액 중의 용존산소 농도가 급격히 증가하여 최대 0.0147vum 까지 축적됨을 알 수 있었다.

Fig. 3-14에는 배양액 중의 용존산소 농도의 변화를 나타내었다. 배양 초기의 1~5일 사이에는 용존산소의 농도가 감소하는 것이 관찰되었는데, 이 때 pH는 5.0~6.0 사이에서 *Chlorella* sp.가 거의 증식하지 않았고, 오히려 그 농도가 약간 감소함을 확인할 수 있었다.

PC-PBR에서 축적된 용존산소의 최대 농도는 공기에 의해 포화된 염분 배지의 용존산소 농도인 약 $0.7 \times 10^{-2} \text{vum}$ 의 두배에 달하는 과포화상태로서, Weissman et al.(1987)은 포화공기 이상으로 산소가 축적될 때 산소는 오히려 증식에 저해를 일으킨다고 보고하였다.



CO₂ supply was controlled from 0.2×10^{-2} vvm to maintain pH 7.0 from 5th day.

Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000 lux

Impeller speed : 1,000 rpm

● Cell concentration

▲ pH

Fig. 3-12. Growth curve of *Chlorella* sp. and changes of pH in a PC-PBR.

2) 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양

배양 온도 25℃, 조도 6,000lux, 교반속도 1,000rpm의 조건에서 공기는 공급하지 않고 배양액의 pH를 7.0과 7.5로 유지하면서 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였을 때의 비증식속도 변화를 Fig. 3-15에 나타내었다.

Chlorella vulgaris 211-11b도 pH 7.5 부근에서 배양하였을 때에 비증식속도가 0.96 day⁻¹로서 pH 7.0에서 배양했을 때의 0.55day⁻¹보다 커서 해수산 *Chlorella* sp.와 비슷하게 pH 7.5부근에서 증식이 왕성함을 알 수 있었다.

pH 7.5 부근에서 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양할 때 공기의 공급이 용존산소의 농도에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해, 배양 5일째부터는 공기를 0.2vvm의 속도로 공급하였으며, 그 결과는 Fig. 3-16에 나타내었다.

공기를 공급하지 않은 4일째까지 용존산소의 농도가 약 0.021vvm에 이르렀다가, 공기의 공급을 재개하였을 때 그 농도가 0.015vvm이하로 낮아졌다. 이로부터 공기로 포화된 해수배지 중의 용존산소 농도(0.8×10⁻²vvm)보다 높은 0.021vvm으로 과포화된 배양액에 공기를 공급하면, 배양액 중의 용존산소가 오히려 배양 중의 회분식 배양조에서라 하더라도 교반을 통한 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 침전 방지에 혼합 효과뿐만 아니라, 배양액 중에 포화된 산소의 제거에도 큰 효과가 있음을 알 수 있었다.

그러나 지나치게 많은 공기의 공급은 오히려 증식에 저해를 미치는 것으로 판명되었기 때문에, 공기 공급속도는 앞에서의 공기 공급속도 조절 실험 결과에서 알 수 있었듯이, 배지에 대하여 0.56vvm이하가 되어야 하는 것으로 생각되었다. 그리고 내부 aeration이 아닌 경우에는 가스교환기를 설치한다면, 이러한 공기 공급은 필요하지 않은 것으로 생각되었다.

그리고 pH 7.0의 해수산 *Chlorella* sp.와 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도를 비교해 보면, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도가 0.55day⁻¹로 해수산 *Chlorella*의 0.47day⁻¹보다 큰 값을 나타내었다. 이로 보아 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 수울면에서 더 우수한 종으로 판단되었다.

따라서 PC-PBR에서 해수배지를 이용하여 *Chlorella* sp.를 배양한 결과를 종합하면

국립수산진흥원 남해수산연구소 충무분소의 *Chlorella* sp.의 배양최적 pH는 7.2~7.5이고, 이를 지표로 CO₂를 공급하는 것이 바람직하였다. 그리고 회분식 배양조에서 *Chlorella* sp.를 배양할 때, 배양액 중의 과포화 용존산소의 제거에는 공기의 공급이 필수적이었다. 독일 Göttingen 대학에서 분양 받은 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 해수 배지에서의 최적 pH는 7.5 부근이었다. 그리고 해수배지보다는 담수배지에서 비증식속도가 크기 때문에 대량 배양에서는 해수산 *Chlorella* sp.보다 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 더 유리하였다.

그러나 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양에서는 세포의 농도가 높으면, 빛의 투과성이 낮아지므로 배양조를 설계할 때에는 S/V가 커지도록 설계하여야 한다. 그리고 PC-PBR은 VT-PBR이나 RVC-PBR에 비해 S/V가 작아서 빛의 부족 현상 때문에 고농도 배양이 어려우며, PC-PBR을 10배 정도로 확대시키면 S/V는 3.17 m⁻¹ 정도로 더욱 작아져서 대량 배양을 위한 대형 배양조로는 부적합하게 되는 단점이 확인되었다.

2. *Chlorella vulgaris* 211-11b 배양시의 문제점

Chlorella vulgaris 211-11b의 배양 결과를 *Chlorella* sp. 배양 결과와 비교하였을 때, 다음과 같은 몇가지 문제점이 제기되었다.

첫째, 같은 biomass 농도에서 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 경우 *Chlorella* sp.에 비해 엽록체의 색깔이 매우 짙기 때문에 배양 중에 그 농도가 높아지면 빛의 투과성이 떨어짐을 확인할 수 있었다. *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양할 때 3.3×10⁵cell/ml의 농도에서는 6,000lux의 빛이 투과되어 배양조 반대편에서의 조도가 약 5,000lux 정도였으나, Fig. 3-17에서와 같이 1.75×10⁷cell/ml의 농도에서는 약 760lux로 조도가 현저하게 낮아졌다.

그러므로 고농도 배양시에 배양조 내부에서는 최적 조도인 6,000lux보다 조도가 낮아져서 광합성에 필요한 충분한 광자를 공급받지 못하는 light inhibition 현상 때문에 증식속도가 늦어질 수밖에 없게 된다. 따라서 배양조를 설계할 때에는 light inhibition을 해결하기 위한 새로운 광원의 개발 뿐만 아니라, 배양조의 기하학적 형태의 결정이 매우 중요하게 된다. 즉, 배양조의 형태를 결정할 때 체적에 대한 표면적의 비(S/V)가 최대가 되도록, 두께는 최소가 되도록 설계하는 것이 light inhibition을 최소화하는 형태가

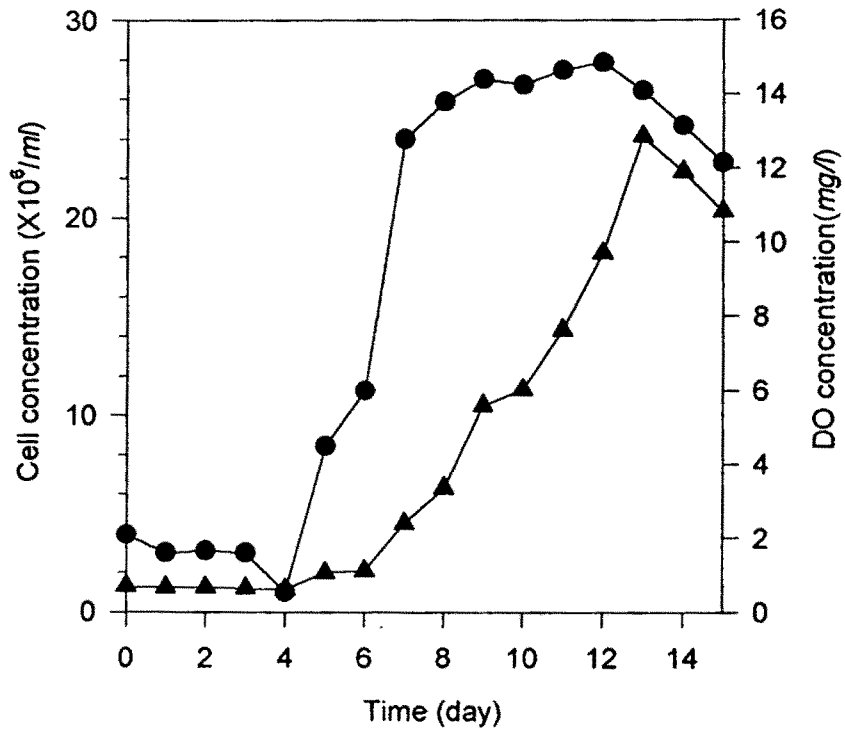
될 것이다.

둘째, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 경우 광합성을 통해 *Chlorella* sp.보다 상대적으로 많은 산소를 발생시키므로, 용존산소의 축적이 많아지게 되어 대량 배양시에는 산소에 의한 증식저해가 커지게 된다. 그러므로 효과적인 산소 제거 방법이 연구되어야 한다. 이러한 산소 제거 방법으로 본 연구에서는 회분식 배양에서는 배양 중에 포화상태 이상으로 축적된 산소를 공기의 공급을 통하여 제거하는 방법이, 그리고 순환식 배양의 경우에는 폭포처럼 배양액을 대기와 접촉시켜 축적된 산소를 제거할 수 있는 가스 교환기를 장치하는 것이 효과적인 것으로 확인되었다.

3. 담수 및 해수 배지에서 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양

담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 해수 배지에서 적용성을 알아보기 위해 담수 및 해수 배지에서 배양하여 그 결과를 비교하였다. 먼저 다른 무기염의 농도는 동일하게 하고 해수 대신에 증류수를 사용한 담수 f/2배지에서 온도를 25℃, 조도를 6,000lux, 교반속도를 1,000rpm, 공기 공급속도를 30 l/min로 하여 pH 7.5에서 배양하였으며, 동일한 조성을 가지는 해수 배지에서 같은 조건으로 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였다.

그 결과 Fig. 3-18에서와 같이 *Chlorella vulgaris* 211-11b는 해수 배지에서 배양하였을 때보다 담수배지에서 더 높은 증식속도를 나타내었다. 즉 최대 비증식속도 μ_{max} 를 비교해 보면 담수배지의 경우는 $1.12day^{-1}$ 로서 같은 배양 기간 동안의 해수 배지의 $0.82day^{-1}$ 보다 비증식속도가 컸다. 이는 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 해수에서는 증식에 저해를 받기 때문으로 판단되었다. 그러나 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 증식속도는 느리지만 해수 배지에서도 증식이 가능하였으므로, 증식이 빠른 담수배지에서 배양한 다음에 해수산 동물성 플랑크톤의 먹이 생물로 사용하는 것이 가능함을 알 수 있었다.



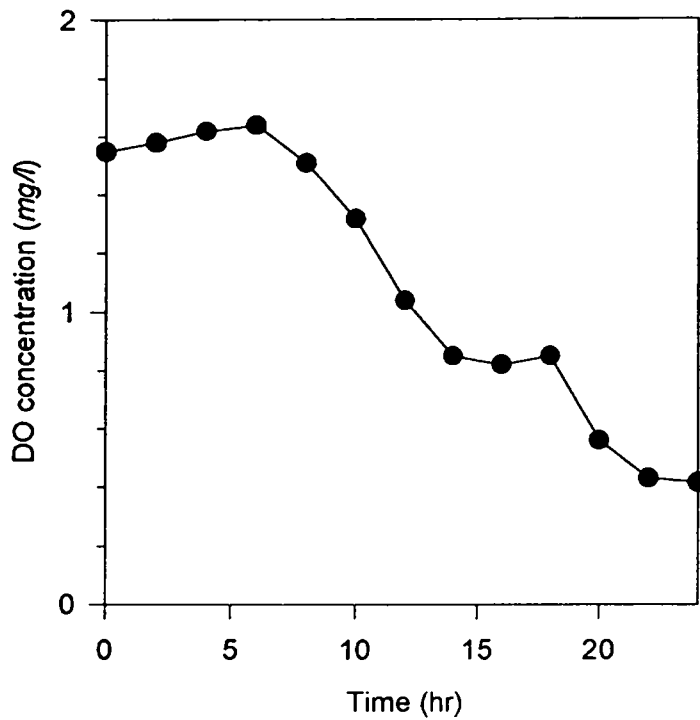
CO₂ supply was controlled 0.2X10⁻²vvm to maintain pH 7.0 from 5th day

Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000 lux

Impeller speed : 1,000 rpm

▲ Cell concentration ● DO concentration

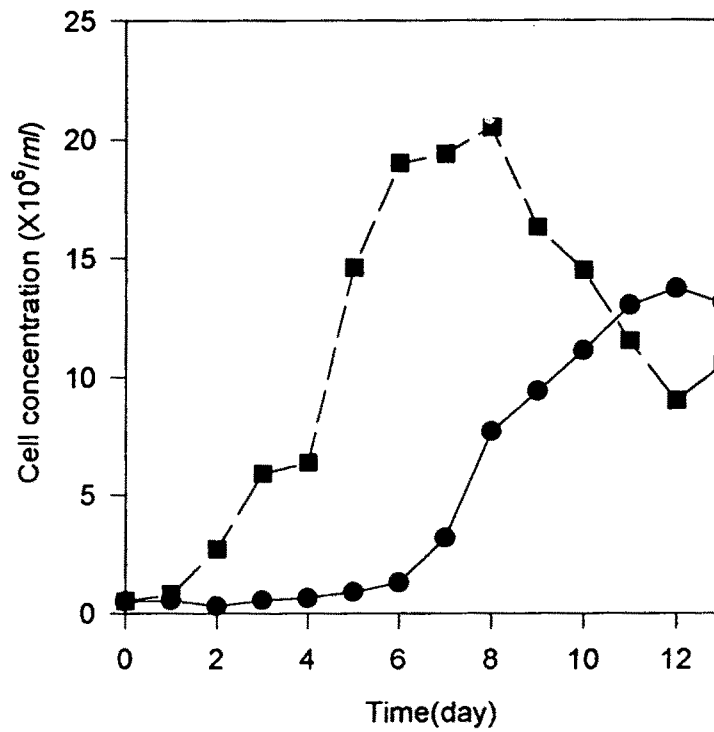
Fig. 3-13. Growth curve of *Chlorella* sp. and changes of DO concentration in a PC-PBR.



Cultivation temperature : 20°C, Impeller speed : 1,000 rpm

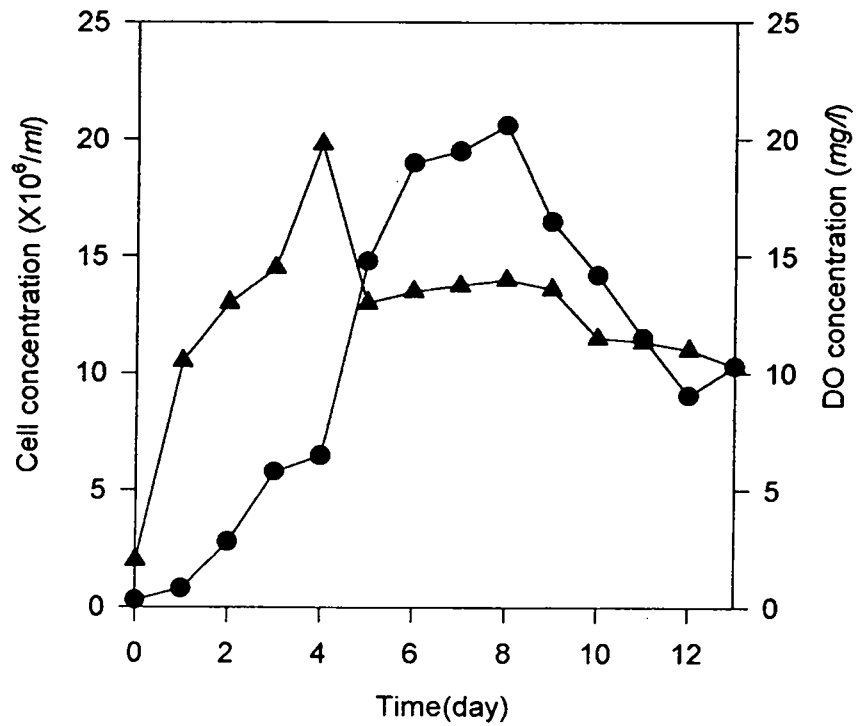
Cultivation temperature : 20°C, Illumination intensity : 6,000 lux

Fig. 3-14. Changes of DO concentration in PC-PBR during cultivation of *Chlorella* sp. for 1 day without aeration.



Cultivation temperature : 25°C, Illumination intensity : 6,000 lux,
 Impeller speed : 1,000 rpm ● pH 7.0 ■ pH 7.5

Fig. 3-15. Growth curves of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a PC-PBR at different pH in the range of 7.0~7.5.



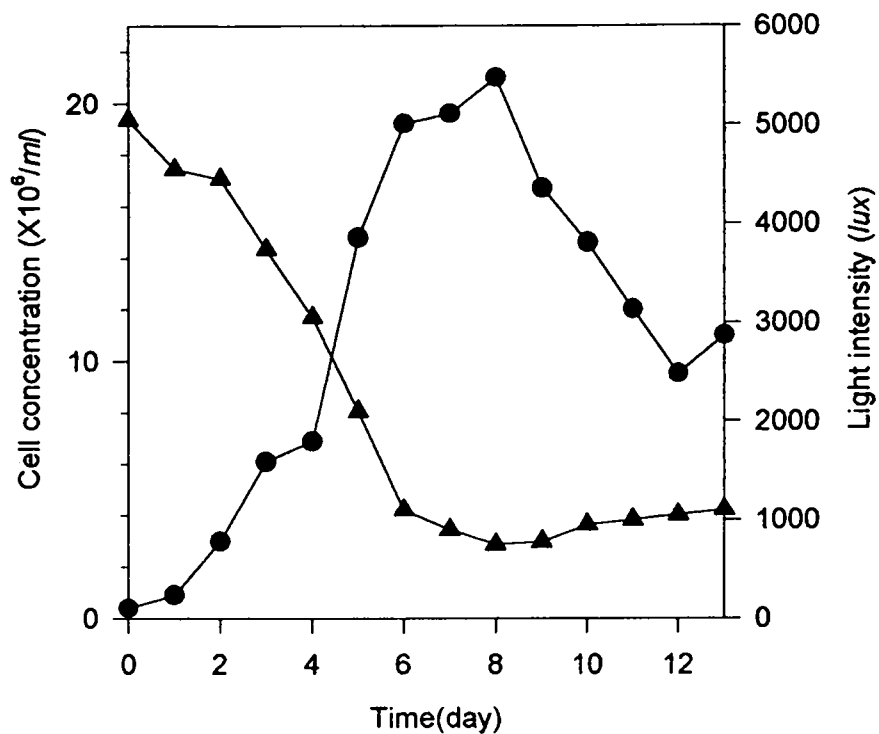
Aeration was started from 5th day.

Cultivation temperature : 25°C, Illumination intensity : 6,000 lux

Impeller speed : 1,000 rpm, Air flow rate : 0.2vvm

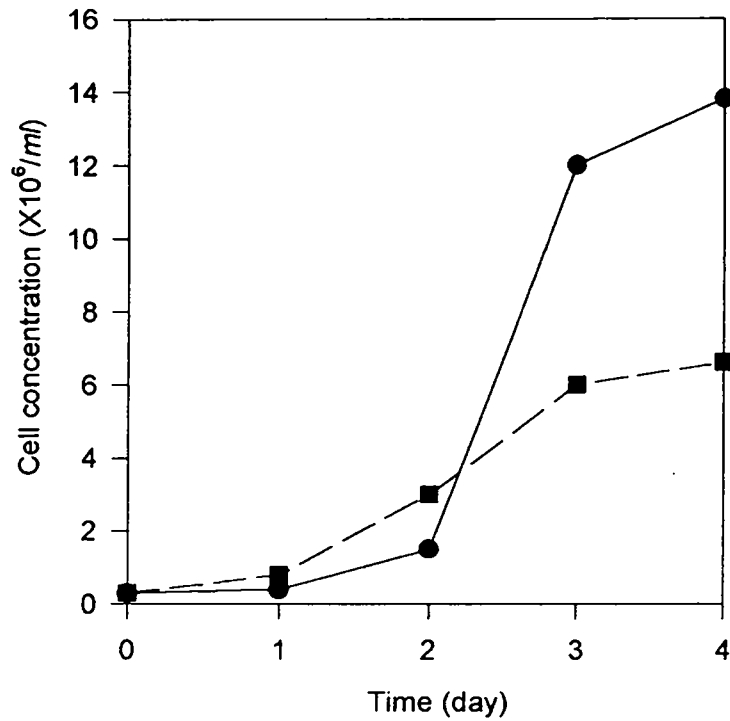
● Cell concentration ▲ DO concentration

Fig.3-16. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b and changes of DO concentration in a PC-PBR.



Cultivation temperature : 25°C, Illumination intensity : 6,000 lux,
 Impeller speed : 1,000 rpm, Air flow rate : 0.2 vvm
 ● Cell concentration ▲ Diffusing intensity

Fig.3-17. Changes of light intensity at shadow areas caused by concentrated *Chlorella vulgaris* 211-11b in a PC-PBR.



Cultivation temperature : 25°C, Illumination intensity : 6,000 lux
 Impeller speed : 1,000 rpm, Air flow rate : 0.2 vvm

● fresh water ■ sea water

Fig.3-18. Growth curves of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a PC-PBR in fresh and sea water.

4. 기본 배양조의 비교

배양중에 *Chlorella* sp.의 농도가 높아질 경우 빛의 부족에 의한 증식속도가 감소하게 되는데, 이러한 현상은 체적에 대한 표면적의 비(S/V)가 커질수록 감소하게 된다. 모형 배양조들의 S/V와 배양중에 도달한 최대 세포 농도를 비교해 보면, S/V가 커질수록 최대 세포 농도도 커짐을 알 수 있었다. Table 3-3과 Table 3-4에는 문헌상에 발표된 배양조들과 실험에서 사용한 배양조들의 체적에 대한 표면적의 비(S/V)를 나타내었다.

S/V가 커짐에 따라 빛이 투과하는 깊이가 커지게 되어 *Chlorella* sp.의 농도가 높아져도 빛의 부족에 의한 증식 중단 현상은 일어나지 않았다. 그러므로 배양조는 S/V가 커지도록 배양조의 기하학적 형태를 결정하고 최적의 환경 인자들은 모두 정확하게 기계적으로 조절할 수 있어야 가장 높은 생산성을 갖는 배양조가 됨을 확인하였다.

Table 3-3. S/V of several photobioreactors

| Culture vessel type | S/V(m ⁻¹) | System | References |
|---|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | Open system | |
| Raceway pond | 3 - 5 | | Vonshk, 1987 |
| Inclined PBR | 40 | | Doucha, 1981 |
| | | Tubular system | |
| Tubular PBR | 30 - 120 | | Gudin, 1991 Lee, 1992 |
| | | Laminar system | |
| Laminar plate | 50 | | |
| Plate-type PBR | 50 - 60 | | Pulz, 1991 |
| Vertical tublar panel | 60 - 80 | | Tredici, 1991 |
| | | Fermenter system | |
| Stirred vessel | 2 | | Takano, 1992 |
| Vessel with light diffus- ing optical fibers(LDOF) | 500 - 600 | | Matsunaga, 1992 |
| | | Our culture vessel system | |
| ^s VT-PBR | 60 | | |
| RVC-PBR | 41 | | |
| PC-PBR | 32 | | |

Table 3-4. Comparison of S/V and max. cell concentration of 3 photobioreactors

| Photobioreactor | S/V (m ⁻¹) | Max. cell concentration (×10 ⁸ /ml) |
|-----------------|------------------------|---|
| VT-PBR | 60 | 84.2 |
| RVC-PBR | 41 | 52.2 |
| PC-PBR | 32 | 20.4 |

제 4 절 결 론

VT-PBR과 RVC-PBR을 이용하여 해수산 *Chlorella* sp.를 배양하여 최적 성장 조건을 측정하였다. VT-PBR에서 국내 해수산 *Chlorella* sp.의 최적 배양조건은 온도 20℃, 조도 6,000lux, 공기 공급속도 0.556vvm, 그리고 CO₂ 공급속도는 0.028vvm이었다. 또한 RVC-PBR을 이용한 배양결과 최적 CO₂ 공급속도는 $0.375 \times 10^{-3} \text{vvm}$, pH가 7.2~7.5 사이였고, 가스 교환기의 채택은 산소제거에 효과적이었다.

PC-PBR에서는 pH 7.0의 해수산 *Chlorella* sp.와 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도를 비교하기 위해 동일한 조건에서 배양하였을 때, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도가 0.55day^{-1} 로서 해수산 *Chlorella* sp.의 0.47day^{-1} 보다 컸다. 이로 보아 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 수율면에서 더 우수한 종으로 판단되었다.

Chlorella sp.는 배양 중에 증식이 진행됨에 따라 점차 많은 양의 CO₂를 필요로 하며, 그 공급량과 pH 변화량은 서로 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에 배양조 설계시에는 이 두가지를 연계하여야 함이 확인되었다. 또한 S/V가 작을 때에는 빛의 부족으로 인하여 고농도 배양이 어려우므로, 배양조 설계에서는 배양조의 기하학적 형태에 따른 *Chlorella* sp.의 증식속도가 감안되어야 한다.

제 4 장 모형 배양조의 제작 특성 비교

제 1 절 서 설

현재 국내에서의 *Chlorella* sp.의 배양에는 일반적으로 연못 형태의 개방형 배양조가 이용되고 있는데, *Chlorella* sp.의 광합성에 필요한 빛으로서 자연 광선을 이용하는 단순한 형태에 지나지 않는다. 이런 배양조에서는 초기 배양 기간에는 문제가 되지 않으나, 점차 세포 농도가 증가하여 일정 농도 이상이 되면 빛의 투과가 균일하지 못하여서 빛이 전체 배양조 내에 고르게 공급되지 않는다. 따라서 배양조 밑 부분에서 자라고 있는 *Chlorella* sp.의 경우에는 충분한 빛을 공급 받을 수 없게 된다. 이와 같은 현상을 방지하기 위하여서는 빛을 받는 배양조 표면적의 극대화가 요구되기 때문에 연못 형태의 개방형 배양조의 경우에는 대단히 넓은 면적이 필요하게 된다.

또한 단세포조류 즉, *Chlorella* sp.의 성장과 더불어 광합성에 필요한 CO₂의 공급도 문제가 된다. 연못형 배양조에서의 단세포조류는 일정한 증식속도의 유지에 필수적인 탄소원을 배양조의 표면으로부터 배양액 중으로 침투되는 CO₂로부터 공급받는다. 그런데 *Chlorella* sp.의 배양중에 일정량의 CO₂를 공급하면, 배양 초기에는 CO₂의 공급이 과다하여 배양액의 pH를 산성으로 변화시키게 되므로 *Chlorella* sp.의 증식에 부정적 영향을 미치게 된다. 따라서 단세포조류의 증식 정도에 따라 CO₂의 공급량을 변화시켜야 한다. 즉, CO₂가 배양액에 공급되면 HCO₃⁻에 의해 배양액의 pH가 변하는 점을 감안하여 배양액이 일정한 pH를 유지할 수 있도록 CO₂ 공급속도 조절기를 이용하여 CO₂의 공급량을 조절하였다.

그러나 연못형 배양조에서는 CO₂가 공급의 경우에도 빛의 경우에 같이 표면에 있는 *Chlorella* sp.에만 CO₂가 충분히 공급되는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 단세포조류 배양조 설계에 영향을 미칠 수 있는 각종 인자들을 고려하여 모형 배양조들을 설계하였다. 설계는 기본 배양조를 기초로 하였으며, 이를 발전시켜 형태를 다양하게 제작하고 *Chlorella* sp.를 배양하면서 어민들이 사용하기에 적절하고 경제적인 배양조의 모형을 선정하였다.

배양조 개발과는 별도로 연속배양을 위한 기초 공정을 개발하고, 침전조를 설계함으로써 배양조의 생산성 향상을 위한 최적 배양 시스템을 결정하고자 하였다. 그리고 microencapsulation 방법을 이용하여 *Chlorella* sp.의 고밀도 배양이 가능하게 함과 동시에 배지의 회수 및 biomass의 수율 확대가 가능하게 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 배양조의 구성

모형 배양조는 전체 운전공정을 세부분으로 구분하여 제작하였다. 즉, 자연의 태양광을 이용하여 *Chlorella* sp.가 증식하는 부분, 광합성 중에 발생한 O₂의 제거와 필요한 CO₂의 공급이 이루어지는 가스 교환기 부분 및 전체 공정을 제어하는 조절기 부분의 세 가지로 배양조를 구성하였다.

가. 배양조의 형태 설정

배양조 내에서 광합성이 충분히 일어나도록 빛의 공급율을 최대한으로 유지하는 데에 중점을 두었다. 이를 위하여서는 배양조의 형태를 다양화하되, 배양액의 부피에 대한 빛을 받는 표면적의 비(S/V)를 각각 구하여 *Chlorella* sp.의 비증식속도를 기준으로 효율을 비교하였다.

나. 가스 교환기

배양조 내에서의 광합성 과정에서 O₂가 부산물로 생성되는데, 이 O₂가 필요 이상으로 배양액에 축적되면 오히려 저해요인이 되어 *Chlorella* sp.의 증식을 저해한다. 또한 광합성에는 CO₂가 필수적이므로, 가스교환기에서는 배양액 중의 O₂가 제거되고 CO₂가 주입된 후에 배양조로 공급되도록 하여 최적 조건이 유지되도록 하였다.

다. 조절기

Chlorella sp.의 배양시에 공급되는 CO₂는 물에 용해되어 [H₂CO₃]으로 수화되고 [H⁺]와 [HCO₃⁻]으로 분해된다. 여기서 [H⁺]의 농도에 따라 pH가 변하므로 pH를 측정함으로써 배양액에 용해되어 있는 CO₂의 변화량을 추정할 수 있다. CO₂의 배지로의 흡수 과정은 다음과 같은 반응식에 따른다(Chang. R., 1994).



이 때의 1차 해리 상수 Ka'는 4.2×10^{-7} 이다. 1차 해리된 HCO₃⁻는 다시 다음과 같이 2차 해리 단계를 거치게 된다.



이 때의 2차 해리 상수 Ka''는 4.8×10^{-11} 이다.



용해된 CO₂ 모두가 H₂CO₃의 형태로 변형되었다고 가정하면, (4-2)의 반응식에서 다음과 같이 식 (4-5)를 유도할 수 있다.



여기서 식 (4-3)과 (4-4)의 HCO₃⁻와 H₂O의 해리에 의하여 생성되는 [H⁺]의 기여도는 H₂CO₃에 비하여 무시할 수 있다. 그러므로,

$$\begin{aligned} \text{pH} &= -\log [\text{H}^+] \\ [\text{H}^+] &= 10^{-\text{pH}} \end{aligned} \quad (4-6)$$

따라서 식 (4-5)와 (4-6)으로부터 다음의 식을 유도하게 된다. 이 때 공급된 CO₂가 100% 배양액에 용해된다는 가정하에 다음의 식(4-7)을 유도할 수 있다.

$$[\text{CO}_2]^2 = (10^{-\text{pH}})^2 / 4.2 \cdot 10^{-7} \quad (4-7)$$

식 (4-7)로부터 배양액의 pH와 용해되어 있는 CO₂ 양과의 관계를 알 수 있다. 그러므로 *Chlorella* sp.의 배양이 진행됨에 따라 CO₂ 소모량은 증가하므로 배양액 내의 CO₂ 농도는 감소하게 되고, pH는 증가하게 된다.

이와 같은 관계로부터 *Chlorella* sp.의 배양이 계속됨에 따라 CO₂의 농도는 감소하고 pH는 증가함을 알 수 있다. 따라서 CO₂ 공급속도 조절기와 pH meter를 연계시켜 일정한 pH를 유지하도록 하면 배양액 내의 CO₂의 양을 일정하게 유지할 수 있으므로 소모된 CO₂의 양만큼 공급할 수 있도록 하였다.

2. 모형 배양조의 형태

가. Cylinder Type Photobioreactor

Cylinder Type Photobioreactor(CT-PBR)의 모식도는 Fig. 4-1에 나타내었다. 이 배양조는 2개의 원통형 몸체, 가스 교환기, CO₂ 공급속도 조절기, 순환 펌프 및 침전조로 구성되었다. 배양액은 직경 9.8cm, 높이 31cm로 투명 아크릴로 제작된 2개의 원통형 몸체를 연결하여 순환되게 하였다.

광원 공급에 있어서는 현장에서 적용력을 높일 수 있도록 자연광을 이용하였다. CO₂를 공급할 때에 배양액의 pH가 낮아지고 과잉량의 CO₂가 공급될 가능성이 있기 때문에 최적 pH를 유지하는 범위 내에서 효과적으로 CO₂를 공급할 수 있도록 CO₂ 조절

장치를 제작하였다.

조절장치는 i8097 CPU와 시그널 증폭기, 출력되는 신호에 따라 밸브를 개폐하는 릴레이 부분으로 구성하였다. pH 미터에서 출력되는 신호가 설정치(pH 7.0) 이상이면 밸브를 1.5초 동안 개방하여 CO₂를 공급하고 전체 배양액이 순환하는 30초 후에 다시 출력 신호를 받아 판단하는 루프를 이용하여 전체 공정을 조절하였다.

CT-PBR의 체적유량은 4 l/min였으나, 배양조의 용량에 비해 이동하는 배지의 양이 적고 계속 관형으로 연결되어 있어서 *Chlorella* sp.의 증식 중에 발생한 O₂가 배양액에 계속 축적되기 때문에 가스 교환기에서의 용존산소량은 매우 높아지게 된다. 이는 O₂가 공기 중으로 배출될 수 있는 부분이 가스 교환기 외에는 없기 때문이다.

그러나 대기 중에 노출되는 표면은 가스 교환기의 표면적(0.06m²) 뿐이어서 배양액의 표면 증발량은 매우 낮아지게 된다. 그리고 표면적 대 체적비는 40.48(m⁻¹)로 비교적 낮은 편이었다.

나. Spherical Surface Type Photobioreactor- I

Spherical Surface Type Photobioreactor- I (SST-PBR- I)의 모식도는 Fig. 4-2에 나타내었다. 이 배양조는 빛의 공급 면적이 최대가 되게 만든 배양조로서, 기본 구조는 2개의 구형 플라스크, 가스 교환기, CO₂ 공급속도 조절기, 순환 펌프 및 침전조로 구성되었다.

가스 교환기와 CO₂ 조절기는 위의 CT-PBR에서와 같은 원리로 제작하였다. 배양액은 거꾸로 세운 2개의 둥근 플라스크 내부에서 위쪽으로 분무되고 균등하게 벽면을 타고 흘러 내리도록 하여 광원을 받는 면적을 최대화시켰다. 분사 노즐에서의 분무량은 각각 4 l/min로 조절하였고, 이 때의 표면적 대 체적의 비는 80.38(m⁻¹)였다. 그리고 SST-PBR- I은 다른 배양조에 비해 빛을 받는 배양액의 두께가 매우 얇다는 특징을 가지고 있다.

다. Spherical Surface Type Photobioreactor- II

이 배양조는 SST-PBR- I의 형태를 기본으로 하여 설계한 제2의 Spherical Surface

Type Photobioreactor- II (SST-PBR-II)로서, 모식도는 Fig. 4-3에 나타내었다.

앞에서 설명한 SST-PBR-I의 개량형인 이 배양조는 빛을 받는 부분을 극대화시켰고, 형태나 크기에 있어서 중간 단계로 확대된 형태이다. 전체적으로는 빛을 받는 구형의 아크릴 부분, CO₂ 공급속도 조절기, 가스 교환기, 순환 펌프 및 침전조로 구성하였다. 배양액은 순환 펌프에 의하여 배양조의 가장 상층부로 공급되어 구형의 아크릴 부분을 지나면서 빛을 받게 하였다.

라. Plate Type Photobioreactor

Plate Type Photobioreactor(PT-PBR)의 모식도는 Fig. 4-4에 나타내었다. 이 배양조는 온도 조절기, 가스 교환기, CO₂ 공급속도 조절기, plate, 순환 펌프 그리고 침전조로 구성하였다. 배양액의 *Chlorella* sp. 농도가 높아짐에 따라 빛의 조사 효율이 크게 떨어져 배양액을 2cm 정도밖에 투과할 수 없다는 점을 감안하여 제작하였다.

Plate 규격은 30cm×30cm×2cm로 하여 체적 대 표면적의 비를 최대화시킴으로써 빛 공급 효율을 극대화시켰다. Plate 내부에는 2cm 간격으로 격벽을 설치하여 단면적 4cm²의 육각 관을 형성시켰으며, 관의 전체 길이는 2m에 달하였다. 또한 plate와 격벽의 모서리에 방해판(baffle plate)을 설치하여 모서리 부분에 *Chlorella* sp.가 쌓이는 현상을 극소화시켰다.

기존의 배양조에서는 가스의 공급을 가스 및 열 교환기에서 실시하는데 공급가스의 물질 전달률을 높이기 위해 plate내에 가스 취입기(sparger)를 설치하여 배양액 공급 시점에서 가스가 공급되도록 하였다. PT-PBR의 체적유량은 4 l/min였으며, 표면적 대 체적의 비는 113.3(m⁻¹)였다. 그리고 PT-PBR의 규모를 200 l의 대형으로 확대시킨 것도 함께 실험에 사용하였다.

마. Raceway Pond Type Photobioreactor

Raceway Pond Type Photobioreactor(RPT-PBR)는 연못 형태의 배양조를 기본으로 하고 빛의 공급 향상을 목표로 개량한 모형이며, 모식도는 Fig. 4-5에 나타내었다. 이 배양조는 온도 조절기, 가스 교환기, CO₂ 공급속도 조절기, 순환 펌프, raceway pond

type plate 및 침전조로 구성되어 있다. 전체 배양액은 다른 배양조와 마찬가지로 순환 펌프에 의해서 순환되게 하였다. 그리고 체적유량은 $4\ell/\text{min}$ 였고 표면적 대 체적의 비는 $83.3(\text{m}^{-1})$ 였다. RPT-PBR은 다른 모형 배양조에 비해 배양액의 표면이 공기 중에 노출되는 정도가 크기 때문에 일조량이 많은 날에는 배양액의 표면 증발량이 매우 많았으며, 실제 측정된 증발량은 평균 $3.4\text{ml}/\text{min} \cdot \text{m}^2$ 였다.

바. Water Wheel Type Photobioreactor

Water Wheel Type Photobioreactor(WWT-PBR) 역시 연못형 배양조의 단점을 보완시켜 자체 배양액의 물질순환 및 에너지 교환을 향상시킨 형태이며, 모식도는 Fig. 4-6에 나타내었다. 배양액 중의 *Chlorella* sp.가 빛을 받는 표면적을 최대화시키고 배양액이 폭포와 같이 떨어지게 함으로써 O_2 의 발산이 용이하게 하기 위한 모형 배양조로서 가스 교환기, CO_2 공급속도 조절기, 침전조, 물레방아 형태의 wheel 및 wheel을 회전시키는 모터로 구성하였다. Wheel에는 원 주위의 여덟 부분에 각각 3개씩 소형 배양컵을 부착하여 총 24개를 회전시키며 분당 6회전하도록 하였다.

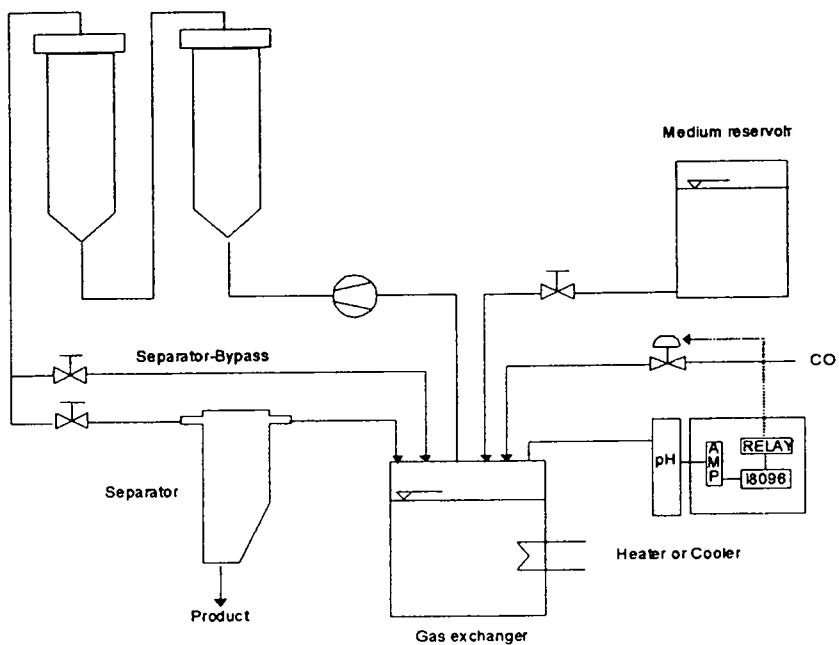


Fig. 4-1. Schematic diagram of Cylinder Type PBR.

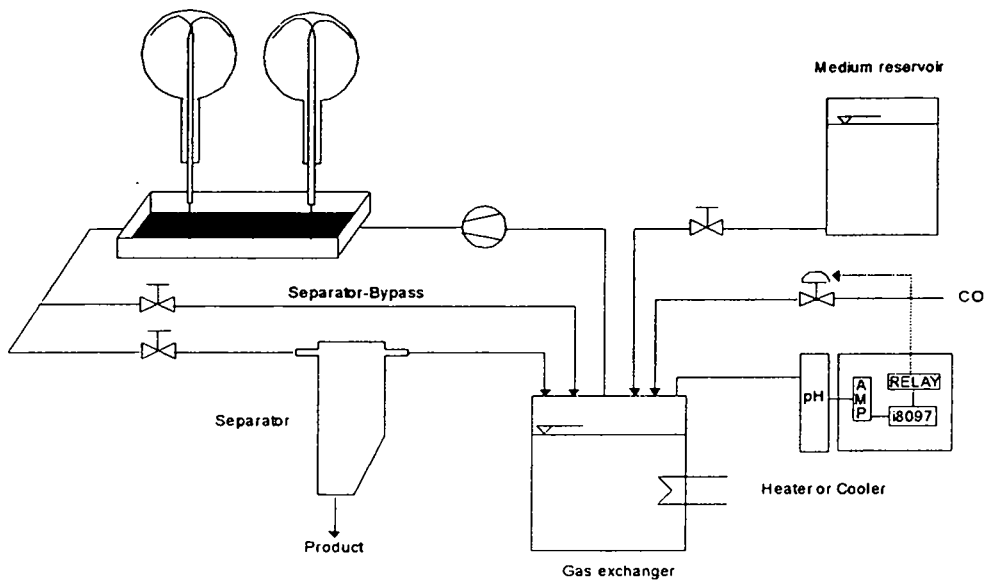


Fig. 4-2. Schematic diagram of Spherical Surface Type PBR-1.

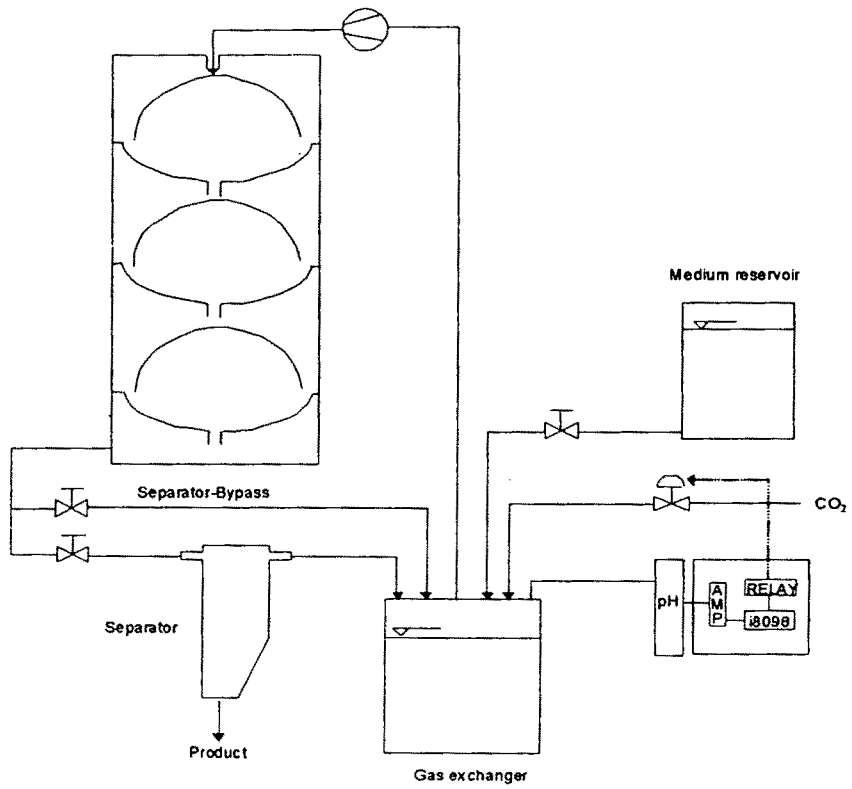


Fig. 4-3. Schematic diagram of Spherical Surface Type PBR-II

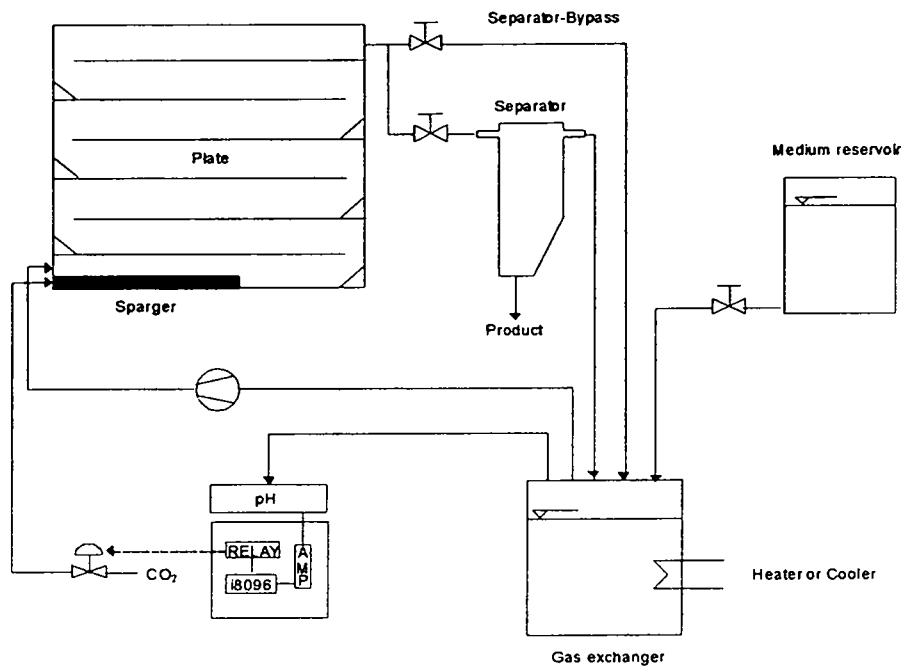


Fig. 4-4. Schematic diagram of Plate Type PBR.

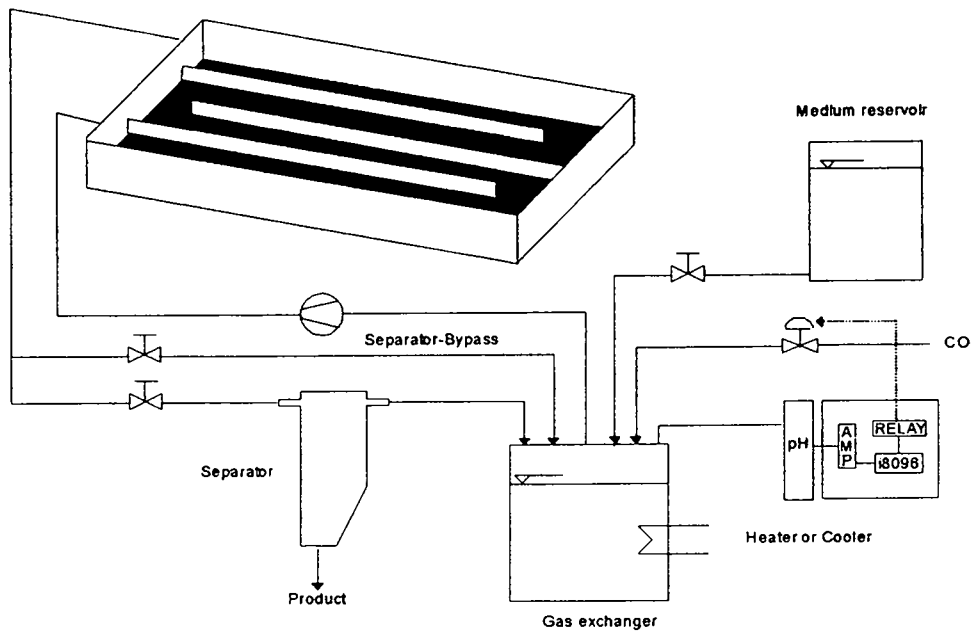


Fig. 4-5. Schematic diagram of Raceway Pond Type PBR.

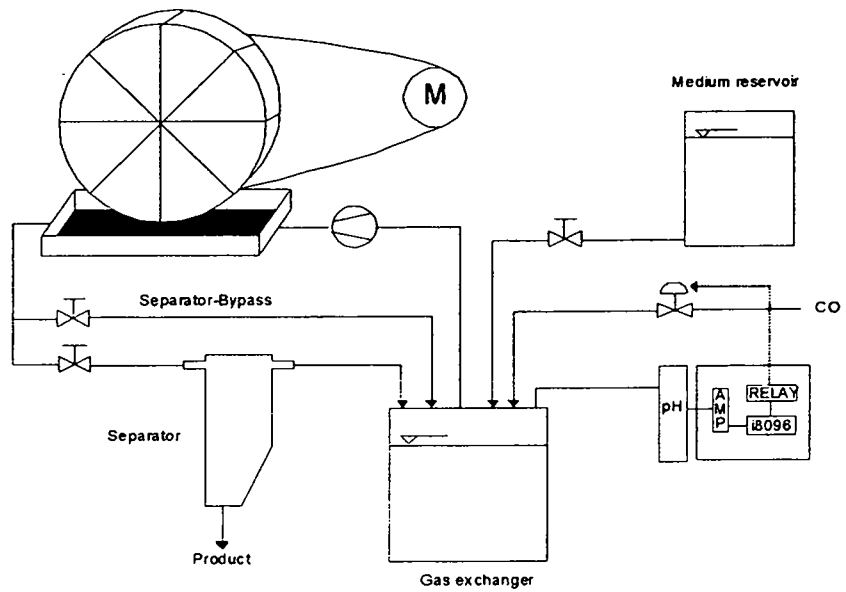


Fig. 4-6. Schematic diagram of Water Wheel Type PBR.

3. 모형 배양조에서의 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양

가. 실험에 사용한 단세포조류

실험에 사용한 단세포조류는 독일 Göttingen 대학교 조류종자 보관소에서 분양받은 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b였다.

나. *Chlorella* sp. 배양용 배지

담수산 *Chlorella*의 배양용 배지로는 f/2 배지를 사용하였고(Guilard and Ryther, 1962), 121.1°C, 1.5lb에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

다. 세포수의 측정

1) 세포수 계수

매일 일정한 시간에 배양액 중 표면으로부터 10mm 깊이의 배양액을 일정량 채취하여 혈구계측기를 사용하여 광학현미경으로 계수하였다. 이때 실험오차를 줄이기 위해 매번 5회 반복 계수하고 평균 세포수를 구하였다.

2) 흡광도 측정

세포수 계수와 동시에 배양액 중 표면으로부터 10mm 깊이의 배양액을 일정량 채취하여 분광광도계를 사용하여 파장 750nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다. 각 배양조별의 배양 과정에서 광원은 자연광을 이용하였고, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식 정도는 O.D.로 나타내었으며, O.D.와 biomass 양과의 상관관계를 Fig. 4-7에 나타내었다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 배양 결과

가. CT-PBR에서의 배양

2개의 관형을 연결하여 만든 CT-PBR에서 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였을 때의 평균조도는 5872lux였고, 초기 농도는 0.081(O.D.)이었다. 그리고 CO₂를 주입하면서 25일 간 배양하였을 때 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 농도는 최고치 1.52(O.D.)에 도달하였으며, 그 결과는 Fig. 4-8에 나타내었다.

전체적으로 평균 0.0576(O.D./day) 정도의 증식속도를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 연구에 사용한 CT-PBR의 직경이 약 10cm 정도여서 증식속도가 배양조의 직경과 빛의 투과 가능한 거리와는 밀접한 관계가 있음을 의미하는 것으로 믿어졌다.

나. SST-PBR- I 에서의 배양

SST-PBR- I 에서 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였을 때의 평균조도는 5424 lux였으며, 초기농도는 0.055(O.D.)였다. CO₂를 주입하면서 17일간의 배양하였을 때 그 농도가 최고 0.885(O.D.)에 도달하였으며, 평균 비증식속도는 0.0488(O.D./day)였으며, 그 결과는 Fig. 4-9에 나타내었다.

이 배양조는 배양액이 공기 중에 노출되는 면적이 다른 배양조에 비하여 매우 크기 때문에 배양 중에 배양액의 증발이 심하게 일어나는 단점이 있었다. 또한 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 빛과 접촉하는 시간이 아주 짧아서 광합성을 위한 충분한 양의 빛이 공급되지 못하는 결점이 있었다. 이와 같은 단점을 보완하여 SST-PBR-II를 설계, 제작하였다.

다. SST-PBR- II 에서의 배양

SST-PBR-II에서는 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 초기농도가 0.02(O.D.)였고, 27일간

의 배양 후에는 농도가 최고 0.522(O.D.)에 도달하였으며, 배양 결과는 Fig. 4-10에 나타내었다.

평균 비증식속도는 0.0186(O.D./day)였으며, 이 배양조의 경우 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식속도가 다른 배양조에서 보다 다소 낮은 이유는 배양 당시의 일조량이 적어서 평균조도가 매우 낮았기 때문으로 판단되었다.

라. PT-PBR에서의 배양

PT-PBR에서는 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 초기 농도가 0.245(O.D.)였으며, 35일간의 배양 후에는 그 농도가 최고 1.177(O.D.)였으며, 이러한 Fig. 4-11에 나타내었다.

평균 비증식속도는 0.1373(O.D./day)였으며, 이 결과는 200 ℓ 규모의 판형배양조를 12 ℓ 로 규모 축소(scale-down)시킨 결과와 동일하였다.

마. RPT-PBR에서의 배양

RPT-PBR에서는 평균 조도가 5949lux, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 초기 농도가 0.083(O.D.)였고, 35일간 배양 후의 최고 농도는 1.274(O.D.)였으며, 그 결과는 Fig. 4-12에 나타내었다.

평균 비증식속도는 0.0340(O.D./day)였으며, 이 배양조는 배양액의 표면 증발량이 다른 배양조에 비교하여 비교적 많은 결점을 나타내었다.

바. WWT-PBR에서의 배양

WWT-PBR에서는 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 초기 농도가 0.016(O.D.)였고, 25일간의 배양 후에 최고 0.593(O.D.)의 측정치를 나타내었으며, 그 결과는 Fig. 4-13에 나타내었다.

Chlorella vulgaris 211-11b의 평균 비증식속도는 0.0231(O.D./day)였다. 이 배양조도

개방형이어서 배양액의 심한 증발 및 오염 등이 문제점으로 확인되었다. 또한 이 배양조에서는 소형 배양접으로 순환시킬 수 있는 배양액의 양에 한계가 있어 물질순환이 원활하게 일어나지 못하므로, 순환되는 배양액의 양적 증대가 요구되었다.

제 3 절 결 론

모형 배양조로서 Cylinder Type Photobioreactor(CT-PBR), Spherical Surface Type Photobioreactor-I (SST-PBR-I), Spherical Surface Type Photobioreactor-II(SST-PBR-II), Plate Type Photobioreactor(PT-PBR), Raceway Pond Type Photobioreactor(RPT-PBR) 및 Water Wheel Type Photobioreactor(WWT-PBR)의 여섯 가지 형태를 제작하고, 담수산의 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였을 때의 결과를 요약하면 다음과 같다.

빛 공급원인 태양 광선의 조도가 날씨에 따라 다소 차이가 있기는 하였으나, 각 모형 배양조에서의 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 평균 비증식속도는 CT-PBR에서는 0.0576(O.D./day), SST-PBR-I에서는 0.0488(O.D./day), SST-PBR-II에서는 0.0186(O.D./day), PT-PBR에서는 0.1373(O.D./day), RPT-PBR에서는 0.0340(O.D./day), 그리고 WWT-PBR에서는 0.0231(O.D./day)였다.

이러한 결과로 미루어 보아 본 연구에서 비교한 여섯 종류의 모형 배양조 중에서 PT-PBR이 단세포조류인 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식에 가장 알맞는 모형임을 알 수 있었다.

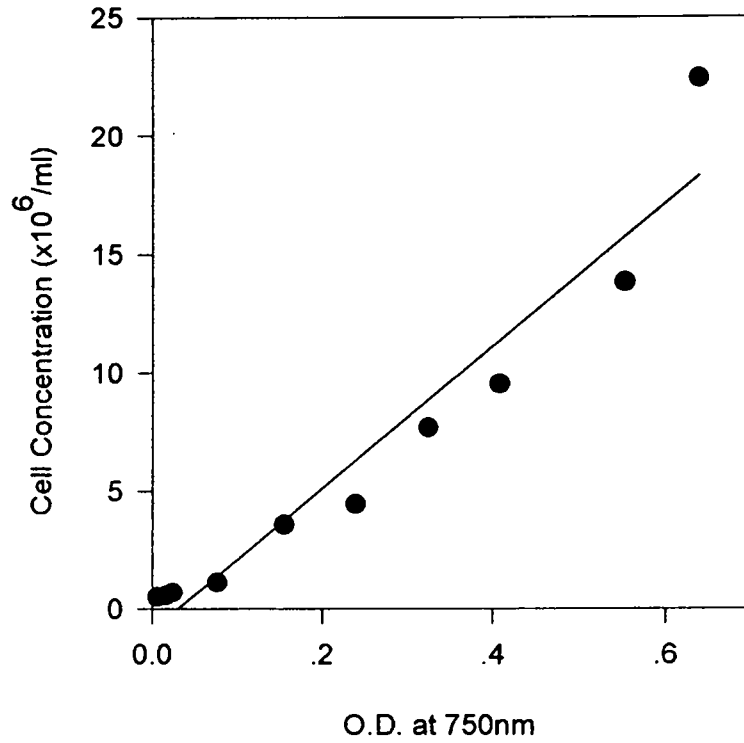


Fig. 4-7. *Chlorella vulgaris* 211-11b concentration vs. O.D

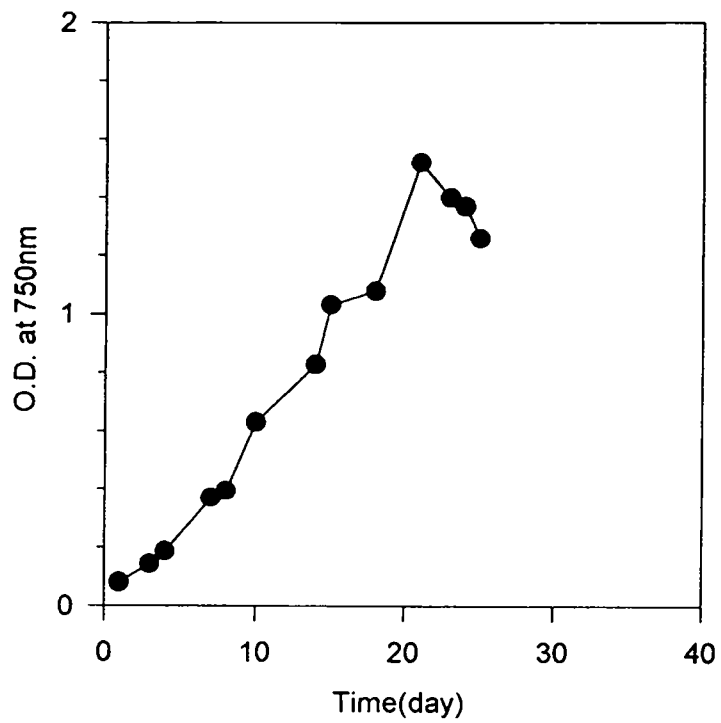


Fig. 4-8. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Cylinder Type PBR

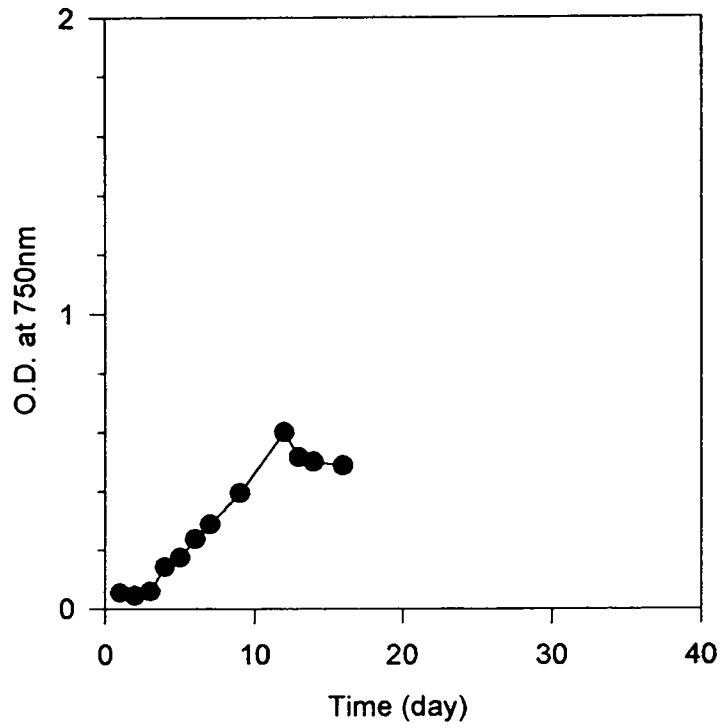


Fig. 4-9. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Spherical Surface Type PBR- I .

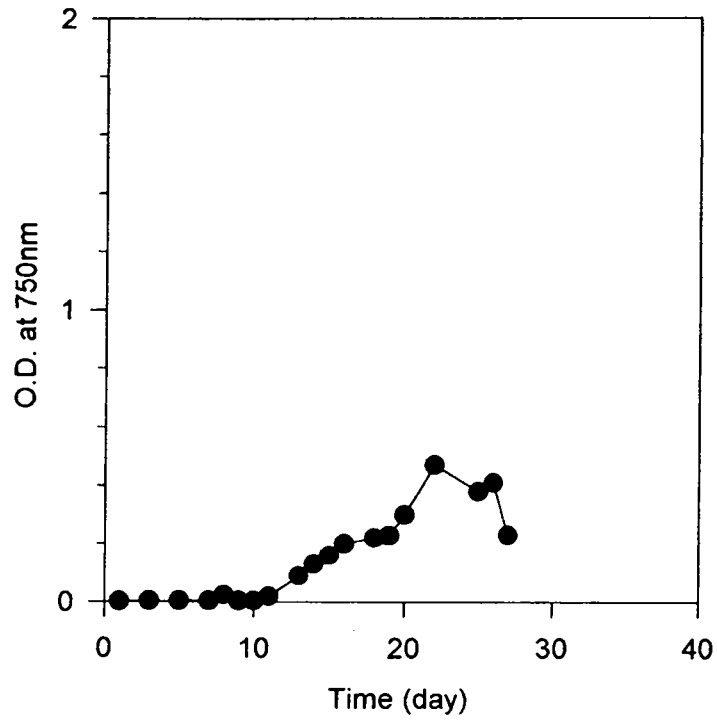


Fig. 4-10. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Spherical Surface Type PBR- II.

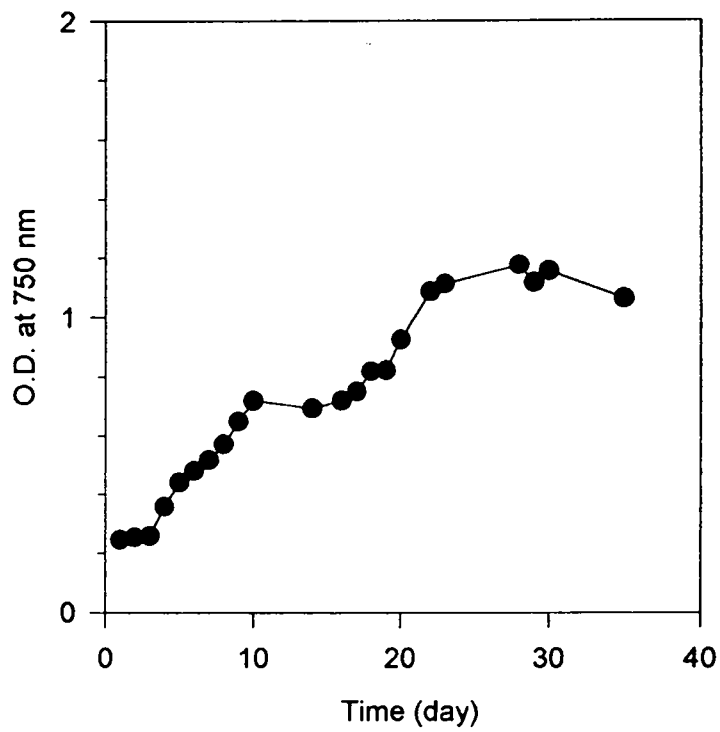


Fig. 4-11. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Plate Type PBR

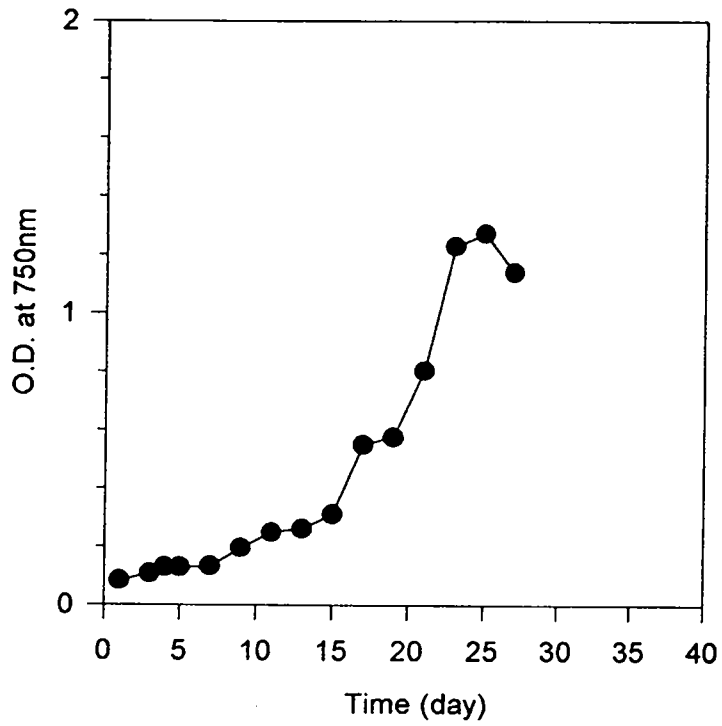


Fig. 4-12. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Raceway Pond Type PBR.

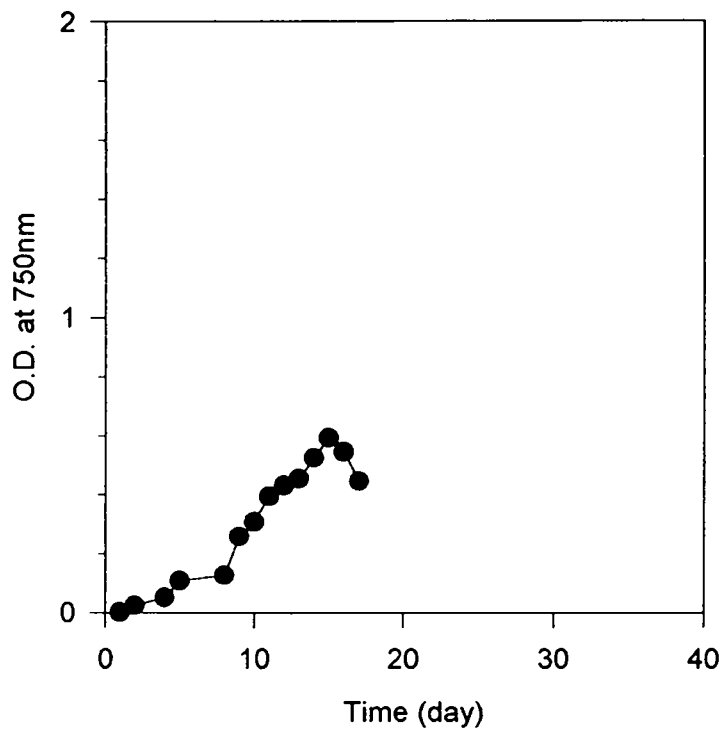


Fig. 4-13. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b in a Water Wheel Type PBR.

제 5 장 배양조의 검증

제 1 절 서 설

제 4 장에서는 6개의 모형 배양조를 이용하여 국립수산진흥원 남해수산연구소 층무분소의 해수산 *Chlorella* sp.와 독일 Göttingen 대학교 조류종자 보관소의 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하며 각 모형조에서의 비증식속도를 비교하였다. 즉, 동일한 장소에서 번갈아 가며 각 배양조에서의 배양결과를 비교하고 PC-PBR이 가장 우수함을 확인하였다.

그러나 자연 조건에서 비증식속도를 비교할 때에는 외기의 온도와 태양 광선의 조도가 조금씩 차이가 날 수 밖에 없으며, 이에 따른 오차를 줄일 수가 없는 어려움이 있었다. 특히 계절적으로 일교 차이가 심하거나 일기가 고르지 못한 경우에는 이러한 어려움이 더욱 심화될 수밖에 없으며, 실제로 강우량이 많은 하절기에는 이와 같은 어려움이 매우 컸었다. 따라서 배양온도, 빛의 조도, CO₂ 공급속도 등의 외부 조건이 일정하게 유지되는 배양실을 조성하고, 이와 같이 균일한 조건에서 *Chlorella*의 배양을 시도하고 그 결과로부터 최대 생산성을 나타내는 배양조를 선택하고자 하였다.

그리고 이 장에서는 단세포조류의 최대 증식속도를 위한 모형 배양조의 선택 이외에 배양 시스템을 최적화시킬 수 있는 부가적 공정을 함께 연구하였다. 즉, 단세포조류를 수확할 때, 고농도로 집적시켜서 배양·수확할 수 있는 microencapsulation법을 이용하여 별도의 공정없이도 고밀도의 *Chlorella*를 직접 생산할 수 있도록 하였으며, 또한 단세포조류의 연속배양을 함께 시도하였다. 단세포조류의 농도는 배양액의 2%이며, 연속배양에서는 배양을 위한 배지의 지속적인 소요가 예상된다. 따라서 침전조를 부착시켜 연속배양을 하는 동시에 *Chlorella*의 밀도도 높이는 방법을 채택하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 배양실의 조성

배양실은 가로 5m, 세로 3.4m, 높이 3m의 크기로 실험실을 개조하여 조성하였다. 배양실에 공급되는 태양 광선은 하나의 창문을 통하여 공급되는 구조로 되어 있어서 배양실 내에서도 위치에 따라 조도의 차이가 생기게 된다. 그러므로 배양실의 환경을 미리 조성하기 위하여 맑은 날을 기준으로 Fig. 5-1에서와 같이 서로 다른 위치에서의 조도를 측정하고, 각 위치에서의 조도의 시간별 변화를 Fig. 5-2에 나타내었다.

Fig. 5-2에 따르면 배양실 내에서는 오후 2시경에 조도가 가장 컸으며, 창문쪽과 실내쪽 사이에는 조도의 차이가 현저하였다. 특히 최대 조도는 최소 조도의 6배 정도나 되었으며, 동시에 여러 배양조를 설치하여 *Chlorella*를 배양할 경우에는 배양조의 위치 선정이 *Chlorella*의 비증식속도에 크게 영향을 미칠 수 있음이 확인되었다.

따라서 모든 배양조에 동일한 환경을 설정하기 위하여 먼저 배양실 내부를 암실로 만들어 외부로부터 공급되는 빛을 완전히 차단하였다. 그리고 배양실 내에서의 조도를 균일하게 유지하기 위하여 천장에 9개의 인공 조명등을 설치하여 평균 20,000lux 이상의 빛이 배양조 표면에 공급되도록 하였다. 또한 실내용 향온기를 함께 설치하여 배양조의 외기온도가 일정하게 유지되도록 하였다.

2. *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양조건

배양실험에는 독일 Göttingen 대학교 조류종자 보관소에서 분양받은 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 사용하였으며, 담수 배지에서 배양하였다. 즉, 6종의 모형 배양조를 동일한 환경을 조성한 배양실에 설치하고 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 배양하였다. 이 때 평균온도는 25℃, 조도는 20,000lux 이상을 유지하였으며, CO₂ 자동 조절 시스템을 함께 설치하여 pH를 7.5로 유지시켰다.

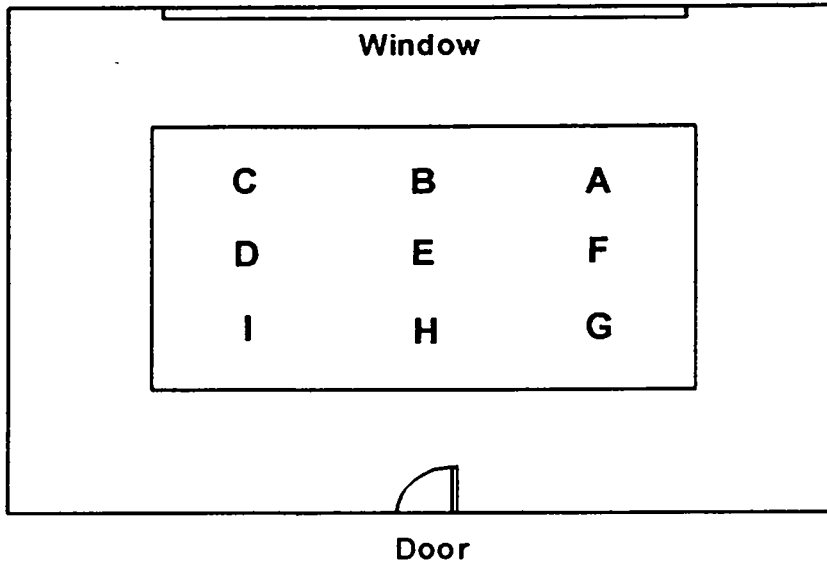


Fig. 5-1. Light intensity measuring points.

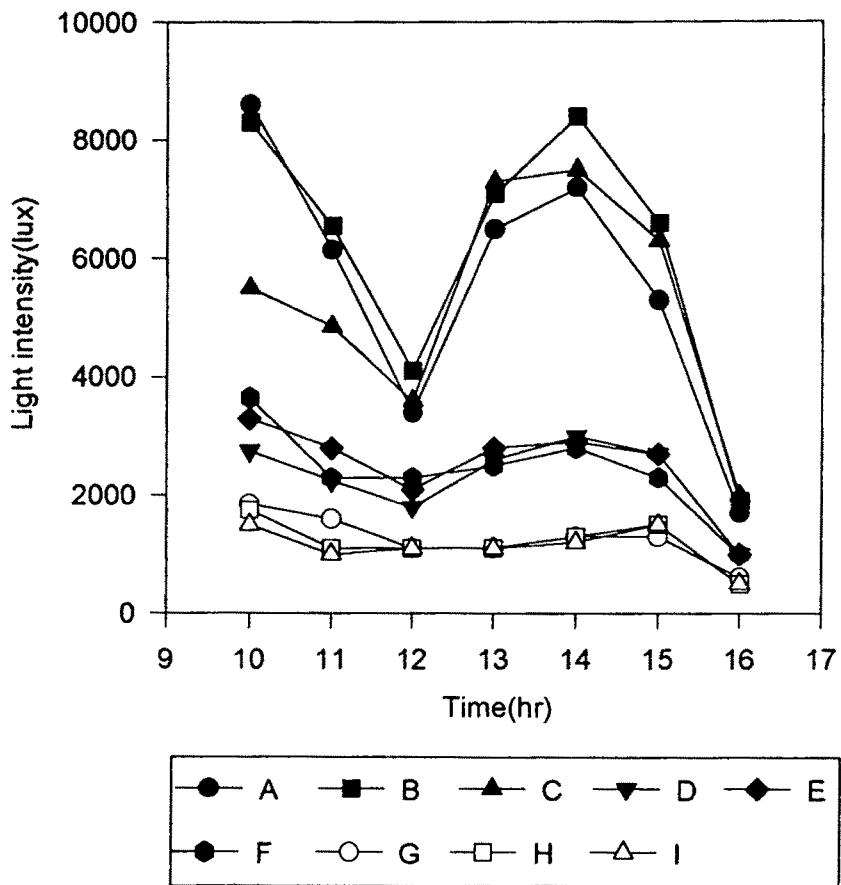


Fig. 5-2. Light intensities at various points.

담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양배지로는 f/2배지(Guilard and Ryther, 1962)를 121.1℃, 1.5lb에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 그리고 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 농도 측정을 위하여서는 매일 일정한 시간에 배양액 중 표면으로부터 10mm 깊이의 배양액을 일정량 채취하고 분광광도계를 사용하여 파장 750nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하여 판정하였다.

3. *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고밀도 배양

가. *Chlorella vulgaris* 211-11b의 미세 캡슐화

미생물의 고정화(immobilization)는 1900년대 말에 시작되었으며(Vorlop, 1983), 초기에는 polymer gel을 이용하여 미생물 또는 효소 등의 생체촉매를 주로 bead 형태로 고정화시켜 이용하였다. 그런데 bead 형태로 고정화시켰을 때에는 bead의 표면에서의 생물촉매의 유실이 심한 단점이 있다. 이 방법을 개선한 것이 마이크로 캡슐화(micro-encapsulation)로서 Spiekermann(1990)이 개발한 후 Sefton 등은 bead의 크기를 작게 하는 system을 개발하였고, Cho 등(1994)은 마이크로 캡슐화를 자동화시키는 장치를 개발하여 대량생산의 기틀을 마련하였다. 현재까지는 주로 생체촉매의 고정화에 마이크로 캡슐화법이 이용되고 있으나, 단세포조류에는 거의 적용되지 않는 초보단계이다.

기존의 배양방법으로는 미생물의 농도가 10^9 cell/ml 정도이지만 microencapsulation법으로는 고농도로 미생물을 배양할 수 있으므로 5~10배 이상까지 생산의 증가가 가능하게 된다. 또한 잡균의 오염도 방지할 수 있고 농축*Chlorella*의 수급에도 부가적인 공정을 필요로 하지 않으므로 경제적인 방법으로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 독일 Göttingen 대학교 조류종자 보관소에서 분양받은 담수산 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 미세 캡슐화하였다. 즉, 일정 농도로 배양된 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 기질로 하여 2% CMC 용액을 제조하였다. 그리고, 캡슐 형성에 관여하는 2% CaCl_2 용액을 제조하고 실제로 이 CaCl_2 와 ionotropic 반응하는 0.8% Na-Alginate 용액을 제조하였다. 캡슐의 형성을 위하여 적당히 배양된 *Chlorella vulgaris* 211-11b와 CMC(2%) 및 CaCl_2 (2%)를 섞어서 0.8% Na-Alginate 용액에 방울

로 떨어뜨렸다. 그 후 수세하고 캡슐막 구조의 안정화를 위하여 20분간 2% CaCl_2 에 침지시켜 캡슐을 완성하였으며, 전체 미세 캡슐화 과정을 Fig. 5-3에 나타내었다.

나. 고정화 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고밀도 배양

미세 캡슐화한 *Chlorella vulgaris* 211-11b는 bubble column형 배양조에서 배양하였으며, 이 때의 조도는 6,000~12,000 lux으로 하고 탄소원으로는 CO_2 를 이용하였다. 공기는 폭기(aeration)에 의하여 배양액에 충분히 공급되도록 하였으며, 장치의 모식도는 Fig. 5-4에 나타내었다.

배양조 내부를 간접적으로 중심부와 외부로 분리시켜 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 내포한 캡슐의 순환이 골고루 이루어지도록 하였다. 매일 일정한 시간에 일정량의 캡슐을 취하여 파쇄하고 분광광도계로 750nm에서의 흡광도(O.D.)를 측정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 모형 배양조의 검증

6종의 모형 배양조에 각각 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 접종시키고 11일 동안 배양하였을 때의 각 배양조에서의 증식곡선을 Fig. 5-5에 나타내었다.

Chlorella vulgaris 211-11b가 배양 1일에서 5일 사이에 본격적으로 증식하였으며, 각 배양조에서의 비증식속도는 뚜렷한 차이를 나타내었다. CT-PBR을 쌓아놓은 형태의 PT-PBR에서 비증식속도가 가장 커서 μ_{\max} 는 1.05(O.D./day)였다. 그리고 RPT-PBR의 μ_{\max} 는 0.93(O.D./day)였으며, 그 다음으로는 SST-PBR-II의 μ_{\max} 가 0.81(O.D./day)였다. 그리고 물레방아 형태의 WWT-PBR은 μ_{\max} 가 0.78(O.D./day)로서 대부분의 배양조들의 μ_{\max} 가 큰 값을 나타내었다. 대체로 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 빛을 받는 양에 따라 즉, S/V가 크고 빛을 받는 시간이 길수록 비증식속도가 큰 경향을 보였다. 그러나 관의 직경이 작아서 그만큼 순환속도가 늦어질 수 밖에 없는 CT-PBR과 배양액이 빛에 노출되는 시간이 제일 짧고 부족한 SST-PBR-I에서의 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도는 그리 크지 못하여서 각각의 μ_{\max} 가 0.22(O.D./day) 및 0.18(O.D./day)였다.

2. 모형 배양조의 선택

모형 배양조의 검증결과를 바탕으로 최종적으로 규모를 확대(scale-up)할 배양조를 선택하였다. 6종의 모형 배양조 중, CT-PBR과 SST-PBR-I은 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도가 다소 낮았으나, 이를 제외한 RPT-PBR, SST-PBR-II 및 WWT-PBR은 실제 규모 확장(scale-up)에 가장 많이 사용되고 있는 PT-PBR에 못지 않는 높은 값의 μ_{\max} 를 나타내었으므로 이들 배양조의 선택하여 최종적으로 규모를 확대시켰다.

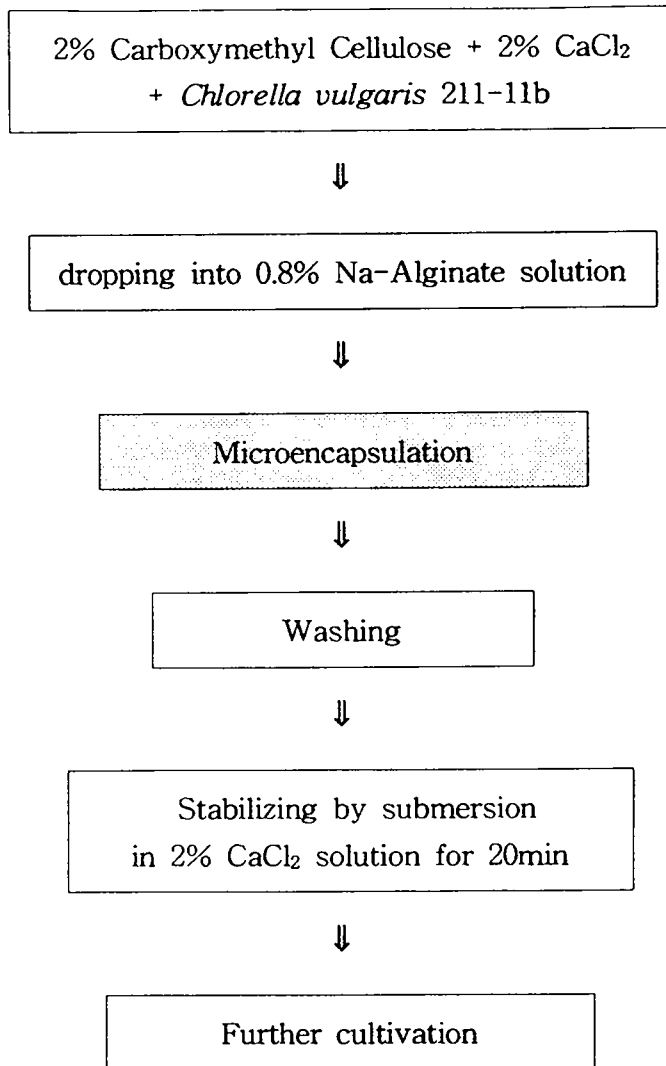


Fig. 5-3. Microencapsulating process for *Chlorella vulgaris* 211-11b

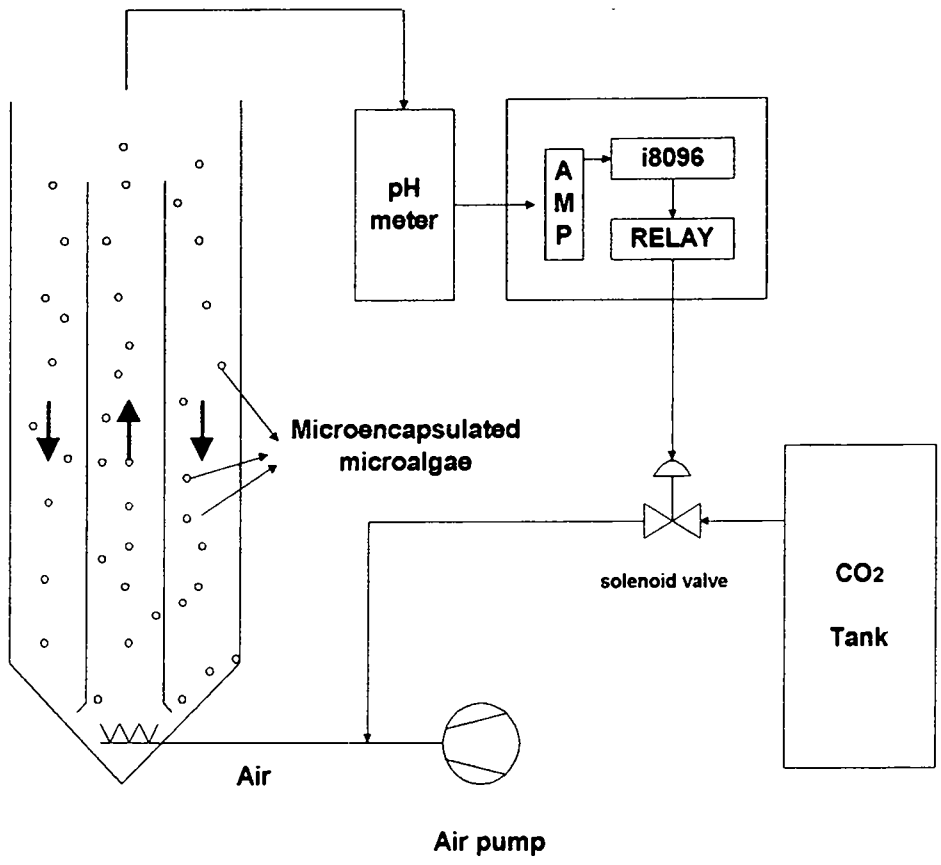
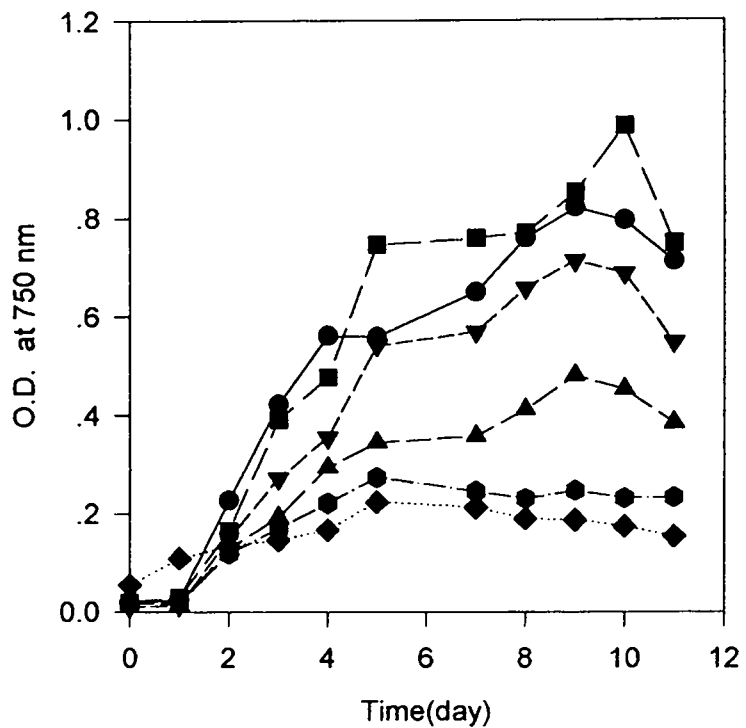


Fig. 5-4. Schematic diagram of photobioreactor for cultivation of microencapsulated *Chlorella vulgaris* 211-11b.



- Spherical Surface Type Photobioreactor-II ● Plate Type Photobioreactor
- ▼— Raceway Pond Type Photobioreactor ▲ Water Wheel Type Photobioreactor
- Cylinder Type Photobioreactor ◆ Spherical Surface Type Photobioreactor-I

Fig. 5-5. Growth curves of *Chlorella vulgaris* 211-11b in model photobioreactors

이 때, RRT-PBR은 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 비증식속도가 컸으나, 규모를 확대시키면 면적을 많이 차지하는 단점이 있으므로, SST-PBR의 원리를 접목시켜 좁은 공간에서 높은 비증식속도를 나타낼 수 있는 형태로 배양조를 제작하였다. 또한 WWT-PBR은 배양컵을 별도로 부착하는 형태였으나 원통 전체를 배양조로 이용하는 형태로 개조하여 규모를 확대시켰다.

가. 반구형 폭포식 배양조

반구형 폭포식 배양조는 SST-PBR-II를 확대시킨 것으로서, 그 구조를 Fig. 5-6에 나타내었다.

중심부에 스테인레스 강의 축을 설치하고 반구형의 배양액 흐름판을 다단으로 조립하였다. 반구형 배양액 흐름판에는 작은 구멍을 두어서 배양액의 흐름이 원활하도록 고려하였다.

나. 사면 평판형 배양조

사면 평판형 배양조(Slanting Plate Type Photobioreactor, SPT-PBR)는 RPT-PBR을 규모 확대시킨 형태로서 Fig. 5-7에 그 구조를 나타내었다.

RPT-PBR에서는 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식은 왕성하지만, 넓은 배양면적이 요구되기 때문에 규모를 확대시키면 더욱 넓은 면적이 필요하게 된다. 따라서 SPT-PBR은 RPT-PBR을 확대시키되, *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식이 왕성한 SST-PBR-II의 형태를 접목시켜 제작하였다. 즉, RPT-PBR을 세로로 쌓아 놓은 모양으로 하고 배양평판을 계단형으로 배치시켜서 좁은 공간에서도 배양면적이 크게하였으며, 많은 빛이 고르게 공급될 수 있도록 각 배양판에서의 배양액의 두께를 얇게 유지할 수 있게 하였다.

다. 물레방아형 배양조

물레방아형 배양조는 이미 검토한 모형 WWT-PBR을 그대로 규모를 확대시킨 형태

로서 그 구조는 Fig. 5-8에 나타내었다.

모형 배양조에서는 별도로 모터를 부착하여 물레방아를 회전시켰으나, 동력 소요량이 많은 단점이 있었다. 따라서 실제 크기로 확장시킬 때에는 물레방아의 원리를 이용하여 위에서 아래로 떨어지는 물의 무게로 배양조를 회전시켰다. 또한 배양컵을 이용할 때 그 용량의 한계가 있으므로 배양컵을 별도로 부착하지 않고 원판의 중심부까지 배양공간을 확대시켜 회전하는 배양액의 양을 확대시켰다.

3. 배양 system의 최적화

가. *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고밀도 배양

(1) 고정화 조건

고밀도 배양은 CMC와 CaCl₂를 이용하여 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 미세 캡슐로 고정화시킴으로써 가능하였다. 미세 캡슐화 조건은 2%의 CMC와 1, 2 및 3%의 CaCl₂로 고정화시킨 후의 증식 정도로서 비교하여 결정하였다. 먼저 CMC 농도는 2%로 하고 CaCl₂를 각 1, 2 및 3%로 하여 100개의 캡슐을 만들고, CaCl₂를 계속적으로 주입하지 않았을 때 캡슐이 파괴되는데 소요되는 시간으로 그 안정성을 조사하였다. 그 결과, 캡슐이 파괴되는 데에 1%의 CaCl₂를 사용하였을 경우 4시간 15분, 2% CaCl₂는 6시간 20분, 그리고 3% CaCl₂의 경우에는 5시간 37분이 소요되었다. 이로 미루어 보아 2% CaCl₂의 경우에 캡슐막(capsule membrane)의 구조가 가장 안정한 것으로 판단되었다.

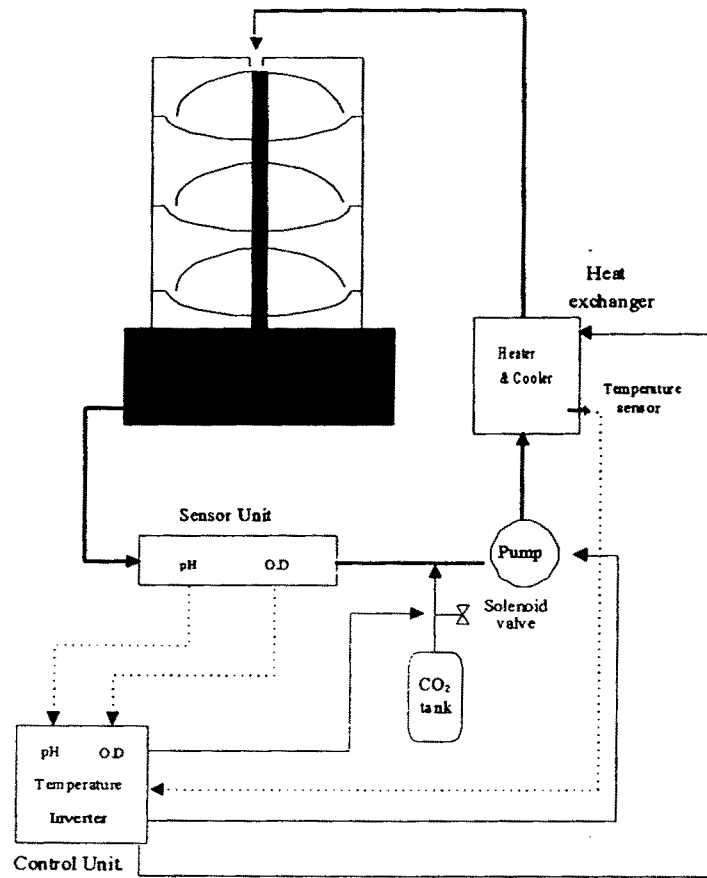


Fig. 5-6. Schematic diagram of Spherical Surface Type Photobioreactor

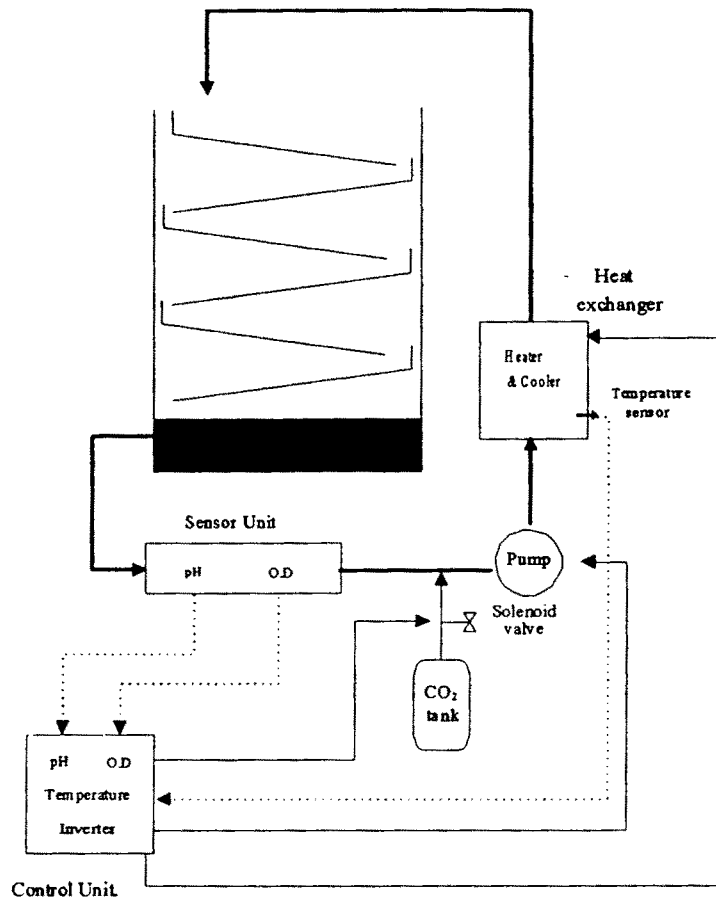


Fig. 5-7. Schematic diagram of Slanting Plate Type Photobioreactor

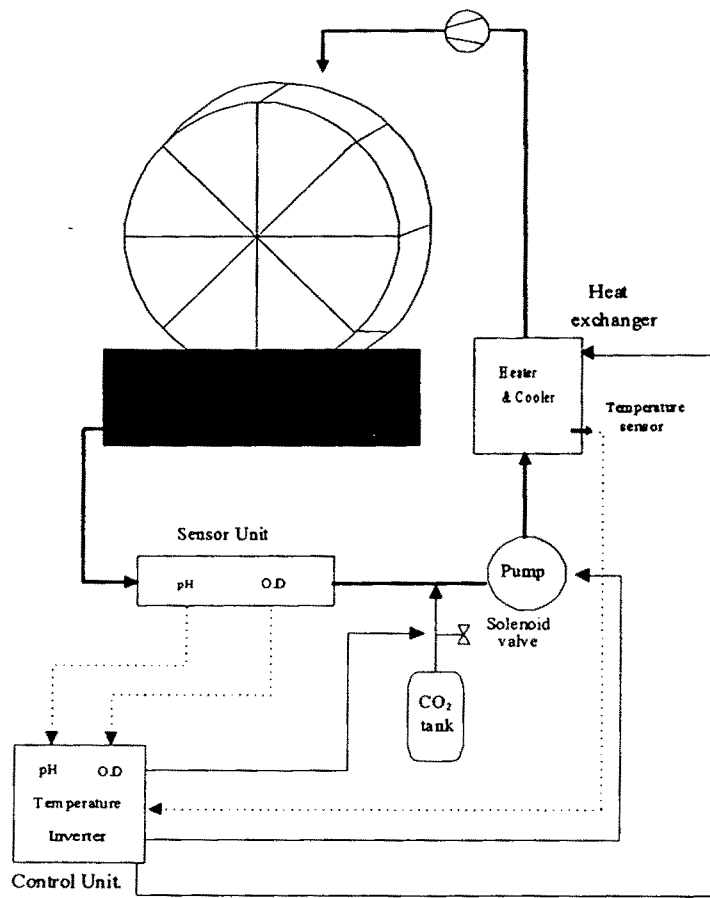


Fig. 5-8. Schematic diagram of Water Wheel Type Photobioreactor

(2) 고정화 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고밀도 배양

미세 캡슐형으로 고정화 시킨 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 배양시간에 따른 배양액 중의 농도변화와 고정화시키지 않은 것의 농도변화를 750nm에서의 흡광도(O.D.) 변화로 비교하여 Table. 5-1에 나타내었다.

고정화시킨 것의 농도는 그렇지 않은 것에 비하여 최소 10배 이상의 농도 차이를 보였다. 이는 *Chlorella vulgaris* 211-11b가 고정화 캡슐 내에서 고밀도로 배양되었음을 의미하는 것으로서, 미세 캡슐화에 의하여 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고밀도 배양이 가능함을 확인할 수 있었다.

고정화 단계에서의 CaCl₂ 농도가 1, 2 및 3%로하여 미세 캡슐형으로 고정화시킨 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 CO₂ 공급여부에 따른 증식곡선을 Fig. 5-9와 Fig. 5-10에 나타내었다. Fig. 5-9에서와 같이 배양 중에 CO₂를 공급하지 않았을 때의 μ_{max} 를 보면, 고정화 단계에서의 CaCl₂ 농도가 1%일 때 μ_{max} 는 0.076day⁻¹, 2%일 때 μ_{max} 가 0.206day⁻¹, 그리고 3%일 때는 0.091day⁻¹여서 CaCl₂ 농도가 2%일 때 최대 비증식속도가 가장 컸다. 그러나 CO₂를 공급하였을 때에는 Fig. 5-10에서와 같이 CaCl₂ 농도가 1%일 때 μ_{max} 는 0.234day⁻¹, 2%일 때는 0.448day⁻¹, 그리고 3%는 0.559day⁻¹로서 서로 큰 차이를 나타내지는 않았으나, CaCl₂ 농도가 2%일 때 최대 비증식속도가 가장 컸다. 전반적으로 CO₂를 공급하는 것이 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 증식에 유리하였으며, 캡슐의 안정성과 캡슐 내에서의 최대 비증식속도가 반드시 일치하지는 않아서 고정화 단계에서의 CaCl₂의 농도는 2%가 적당한 것으로 생각되었다.

(3) 고밀도 배양의 장단점

미세 캡슐화(microencapsulation)는 유용 미생물 혹은 효소 등을 고정화시켜 반복 사용할 수 있게 고안된 방법이다. 본 연구에서 단세포조류인 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 미세 캡슐형으로 고정화시켜 배양하였을 때 생산성 향상이 가능함을 알 수 있었다. 이는 고정화 캡슐은 표면적이 넓어 CO₂와 O₂의 교환이 원활하고, 배양조 내에서의 순환을 통해 광원을 골고루 받을 수 있도록 장치하였기 때문이다. 실제로 여러 차례의 반복 실험에서 얻은 결과는 기존의 배양조에서 얻어지는 생산량보다 적어도 약 10배 이상

의 높은 수율을 얻을 수 있음이 확인되었다. 또한, 단세포조류의 증식을 원활히 하기 위해 CO₂를 공급함으로써 CO₂를 공급하지 않았을 때보다 약 1.5배 정도의 높은 수율을 얻을 수 있었다.

즉, *Chlorella vulgaris* 211-11b를 미세 캡슐 형태로 고정화시킴으로써 캡슐 내에서의 고밀도 배양이 가능하였고, 배양 중에는 CO₂를 공급하는 것이 유리하였다. 이와 같이 미세 캡슐 형태로 고정화시킨 단세포조류의 배양에서는 일반적인 free cell의 배양에 비해 배양 중에 발생할 수 있는 오염을 줄일 수 있으며, 배양 후에 단세포조류의 회수에 별도의 분리기나 농축기를 필요로 하지 않는 이점이 있으며, 배양 중에 캡슐이 파괴되지 않는 한 배양용 배지를 회수하여 재 사용할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 배양중 aeration 조작에서 공기 방울에 의한 캡슐의 파괴를 최소화하여야 하는 단점이 있다.

Table. 5-1. Comparison of *Chlorella vulgaris* 211-11b cell concentration between immobilized in capsule type and free cell type

(Unit : O.D. at 750nm)

| Growth day \ Cell type | Cell immobilized in capsule type | Free cell |
|------------------------|----------------------------------|-----------|
| 1 | 0.5530 | 0.0800 |
| 2 | 0.8170 | 0.1340 |
| 3 | 1.1220 | 0.1500 |
| 4 | 1.7550 | 0.1760 |
| 5 | 2.2200 | 0.1920 |
| 6 | 2.6880 | 0.1390 |
| 7 | 3.9130 | 0.1760 |
| 8 | 4.8030 | 0.1890 |
| 9 | 5.4700 | 0.3130 |
| 10 | 6.9930 | 0.3610 |
| 11 | 9.3130 | 0.5860 |
| 12 | 10.9800 | 0.6200 |
| 13 | 10.2370 | 0.6970 |
| 14 | 10.0000 | 0.6950 |

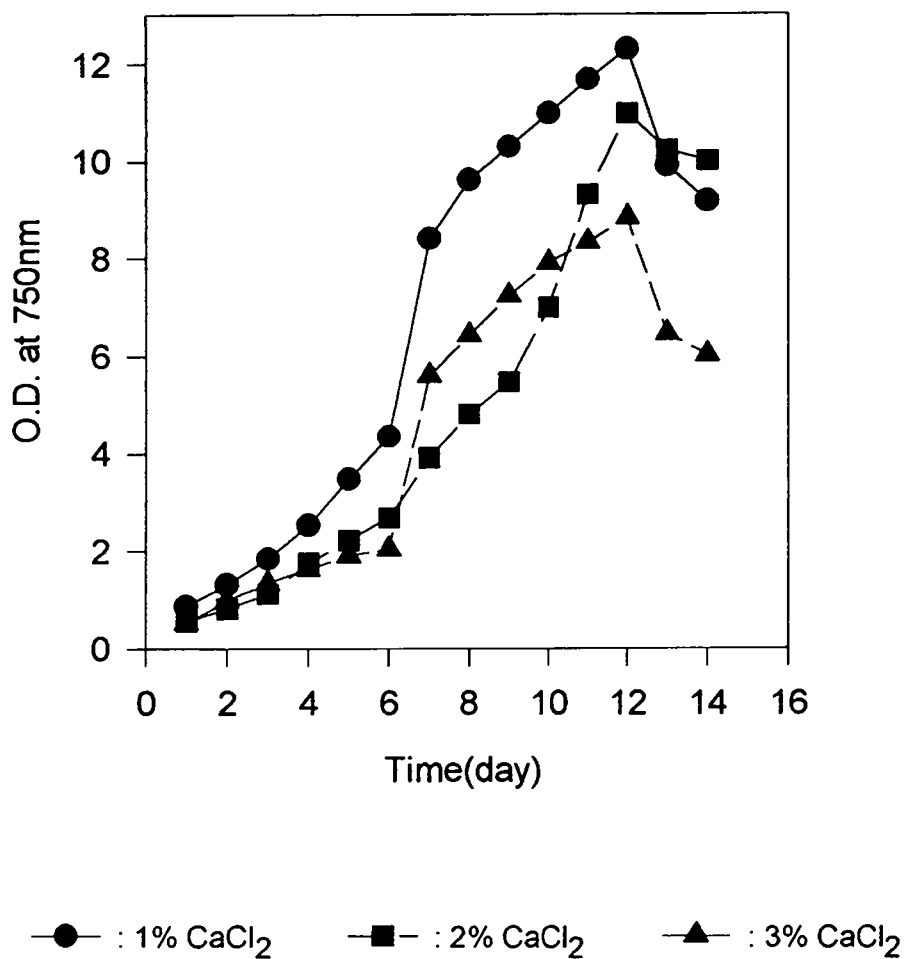


Fig. 5-9. Growth curves of *Chlorella vulgaris* 211-11b without CO₂ supply

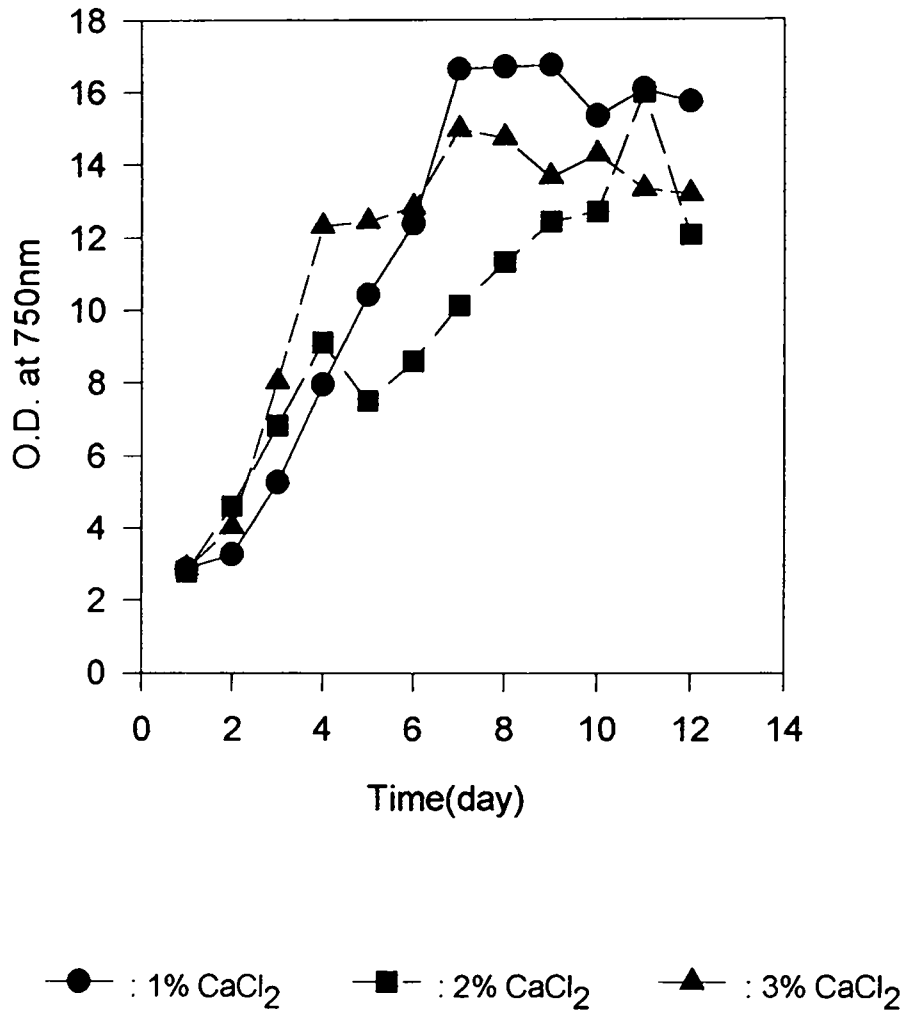


Fig. 5-10. Growth curves of *Chlorella vulgaris* 211-11b with CO₂ supply

나. 연속배양을 위한 침전조

(1) 연속배양의 특징

연속배양은 배양 중에 배지의 공급속도와 배양액의 배출속도가 일정하게 유지되도록 고안된 배양방법이다. 회분배양(batch culture)에서는 배지가 완전히 소비되면 배양이 종료되지만, 연속배양(continuous culture)에서는 이론적으로는 무한하게 배양을 지속할 수는 장점을 가지고 있다.

일반적으로 회분배양에서는 미생물 또는 단세포조류 등 배양생물의 증식과 함께 기질 성분의 소비, 대사생성물의 축적이 진행됨에 따라 배양생물, 기질성분 및 대사생성물의 농도, pH 등이 변한다. 이에 비하여 단조배양이라 하더라도 연속배양에서는 chemostat culture에 의하여 이들 인자들이 항상 일정하게 유지되는 정상상태의 유지가 가능하다.

일반적으로 정상상태를 유지시키는 방법으로 chemostat를 이용하는데 이는 배지공급을 일정한 속도로 개시하여, 공급되는 기질량에 대하여 미생물이 미생물의 증식, 대사활성에 따른 발효조내에서의 증식, 기계적으로 계의 외부로의 유출 등 상호간의 안정된 균형을 가지고 정상상태에 이르게 하는 방법이다. 연속배양에서는 chemostat를 이용하는 경우가 많으며 본 연구에서도 이 방법을 이용하여 *Chlorella*의 연속배양에 적용하였다. 정상상태에서는 미생물의 비증식속도는 희석율, 또는 배지공급속도에 의해 달라지므로 배지공급속도를 인위적으로 바꾸는 것으로 미생물의 비증식속도를 조절할 수 있다.

Fig. 5-11은 Monod chemostat model로부터 계산된 희석율(dilution rate) D 에 따른 유출기질 농도 S , 세포농도 X , 그리고 세포생산성 DX 의 변화를 나타내었다. D 가 μ_{max} 에 접근하면 S 와 X 는 급격히 변하하는데, D 에 따른 S 와 X 의 변화를 보면 D 가 μ_{max} 에 접근하기까지는 큰 변화가 없다가 μ_{max} 근처에서 갑자기 변하는 데 $D_{max} \rightarrow \mu_{max}$ 일 때 $X \rightarrow 0$, $S \rightarrow S_{max}$ 로 되는 현상을 'wash out'라고 한다.

(2) 침전조를 이용한 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 고농도 연속배양

(가) 연속배양을 위한 최대 비증식속도

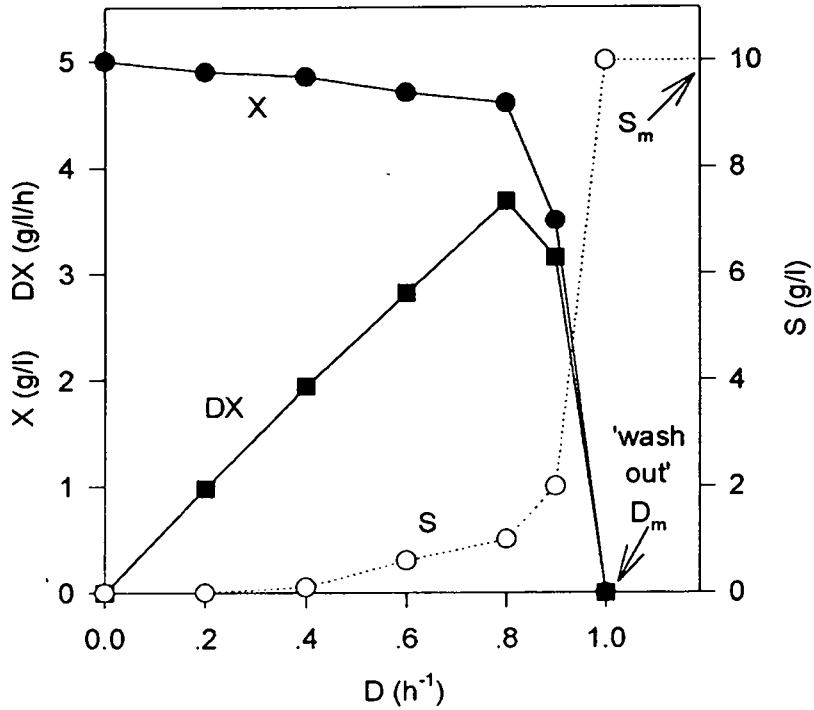
Chlorella vulgaris 211-11b는 f/2 배지를 사용, 최적 배양조건에서 배양하였다. 초기 농도와 최대농도는 $0.257 \times 10^7/ml$, $4.48 \times 10^7/ml$ 이었다. 최대 비증식속도는 0.597 (cell/day)였다(Fig. 5-12).

(나) 연속배양시 최대 세포생산을 나타내는 희석율을 구하기 위한 예비실험결과

각 희석율에 따른 세포생산을 나타내는 결과는 이미 이론치로 규명된 바 있으며 또한 이것은 최대 비증식속도에 조금 미치지 못하는 값으로 통상적으로 wash out을 지나기 직전의 값이다. 그러나 본 실험에서는 이 값을 정확히 규명하여 연속배양에 적용하기 위해 희석율에 따른 세포생산비를 알아보았으며 이 결과는 Fig. 5-13에 나타내었다. Fig. 5-13에 나타난 것과 같이 최적의 희석율은 $0.58day^{-1}$ 인 것으로 나타났다. 또한 이때의 침전조 유입속도 및 침강속도를 알 수 있었다.

(3) 침전조를 이용한 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 연속생산

위 실험의 결과를 바탕으로 하여 최대 세포생산을 나타내는 희석율($D=0.58$)에서 침전조를 이용하여 연속적으로 고농도의 *Chlorella*를 생산하였고 그 결과는 Fig. 5-14에 나타내었다. 초기농도를 $0.96 \times 10^5/ml$ 하였고, 배양 4일째 되는 날로부터 *Chlorella*를 회수할 수 있었으며 그 농도는 평균 $0.9 \times 10^9/ml$ 의 고농도였다. 대략 15일 정도 배양하였으나 계속적으로 일정 농도의 *Chlorella*를 획득할 수 있었다. 최근 저비용으로 고농도의 *Chlorella*를 산출하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 모두 비연속적인 방법으로 이에 따르는 조작이 용이하지 못한 불편함이나 배지의 재이용이 불가능하다는 것 등의 단점이 드러나고 있다. 따라서 본 연구의 결과를 통해 물리적인 방법 등을 이용하지 않고 단순히 중력을 이용하였으므로 저비용으로 고농도의 *Chlorella*를 얻을 수 있다는 면과 연속적으로 이들을 조작할 수 있다는 점에서 매우 효과적이었다.



μ_{\max} (Max. specific growth rate) = 1.0 h⁻¹

K_s (Saturation constant) = 0.2g/l

$Y_{X/S}$ (Yield) = 0.5

S_m (Max. substrate concentration) = 10g/l

D_m (Max. dilution rate) = 1.0 h⁻¹

Fig. 5-11 Changes of cell concentration(X), substrate concentration(S) and biomass productivity(DX) during continuous culture.

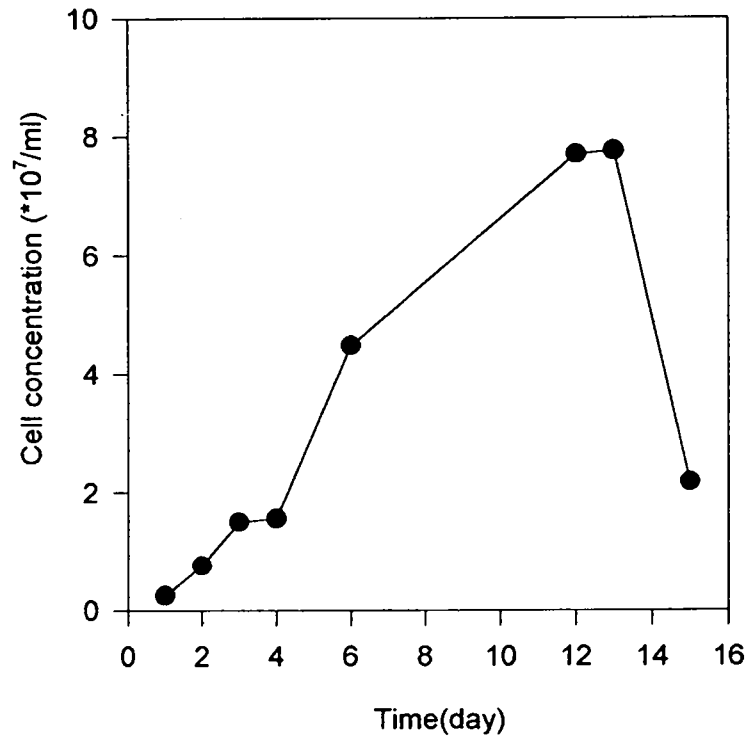


Fig. 5-12. Growth curve of *Chlorella vulgaris* 211-11b during continuous culture

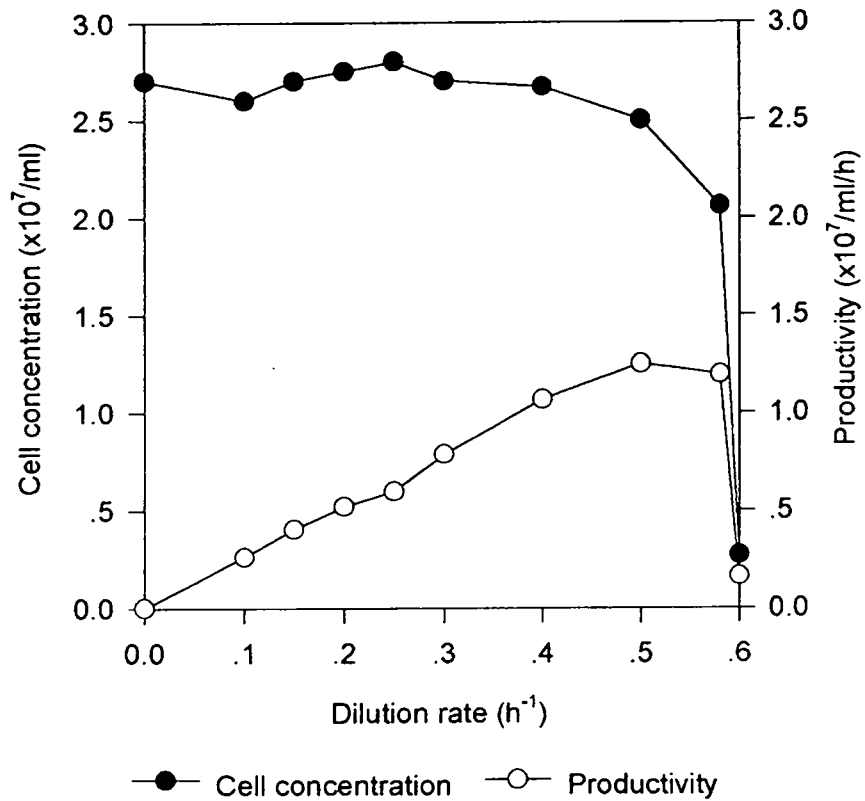


Fig. 5-13. Changes of cell concentration in photobioreactor and productivity with respect to the dilution rate.

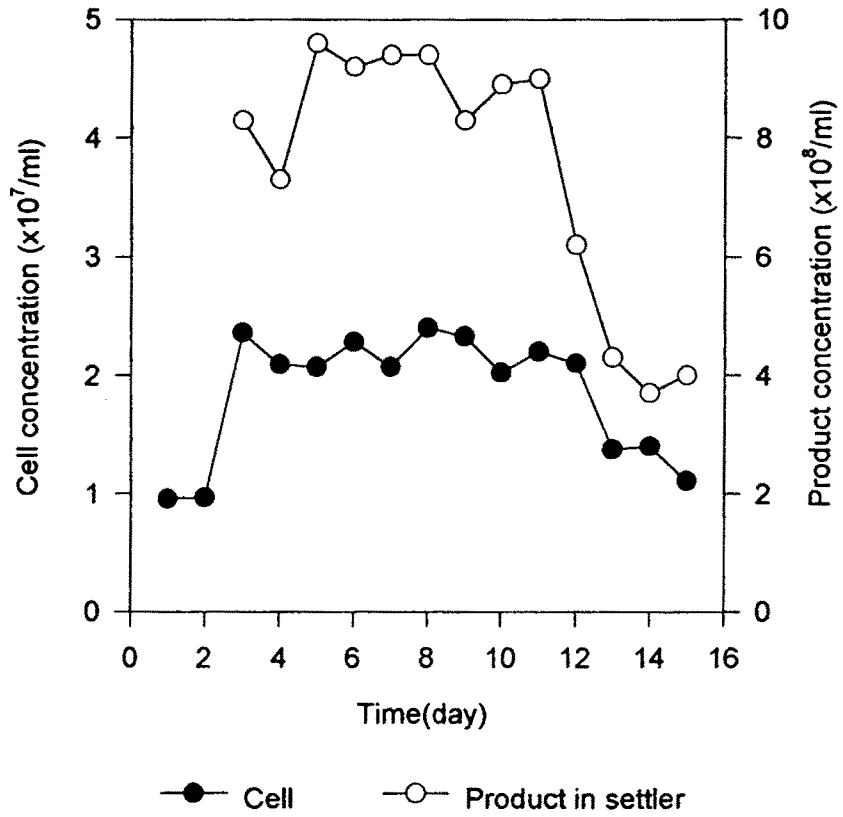


Fig. 5-14. Concentration changes of cell in photobioreactor and product in settler.

제 4 절 결 론

인공환경 조성을 통해 각 배양조의 객관적인 검증 작업을 행하였다. 선택의 기준은 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 μ_{max} 를 비교하여 비교적 높은 배양조를 택하는 것이었고 대형 크기로 확장시킬 때를 고려하여 scale-up시킬 배양조를 선택하였다.

선택된 배양조는 Spherical Surface Type Photobioreactor-II, Raceway Pond Type Photobioreactor, Water Wheel Type Photobioreactor였다. 이로부터 각각 반구형 폭포식 배양조, 사면 평판형 배양조, 물레방아형 배양조로 scale-up시켰다.

배양 시스템의 최적화를 위하여서는 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 미세 캡슐형태로 고정화시켜 고밀도 배양을 시도하였으며, 이를 통하여 일반 배양에 비하여 10배에 달하는 고농도의 *Chlorella vulgaris* 211-11b를 수확할 수 있었다. 또한 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 연속배양을 실현시키기 위해 침전조를 배양조에 부착시켰으며, 생산되는 *Chlorella vulgaris* 211-11b는 침전조에 침전하고 배양액 내에서는 그 농도가 낮은 상태에서 배양이 진행됨으로써 *Chlorella vulgaris* 211-11b의 집적화를 이룰 수 있었다.

제 6 장 배양공정의 자동화

제 1 절 서 설

단세포조류인 *Chlorella*는 해산어류 종묘배양장에서 치어의 먹이인 동물성 플랑크톤의 먹이로 이용되는 조류이다. *Chlorella*는 일반 식물과 같이 광합성, 즉 태양 에너지를 이용한 탄소원(CO₂)과 기타 무기염의 동화에 의하여 능률적으로 증식할 수 있으며, CO₂와 태양 에너지를 고도로 이용하는 autotrophic microorganism의 대표적인 예이다. *Chlorella*는 녹조류에 속하며, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella pyrenoidesa*, *Chlorella vulgaris* 등이 있다. 우리 나라에서는 현재 주로 옥외 배양에 의하여 *Chlorella*를 생산하고 있는데, 이 경우에는 기후조건과 같은 농업적인 요소에 크게 지배되며, 잡균, 원충(原虫) 등에 의한 오염이 심각한 문제로 대두되고 있다.

최근 양식어업이 급속도로 발달하면서 *Chlorella*의 수요는 급증하고 있다. 이외에도 어류에서 유래하는 인간에게 유익한 각종 기능성 물질 또는 생리활성 물질이 먹이사슬 상에서 보면 결국 대부분이 해양의 일차 생산자인 식물성 플랑크톤에서 유래한다는 사실에 입각하여 해양 단세포조류에 대한 관심은 날로 증대되고 있다. 이러한 관점에서 자연의 기후조건에 관계없이 단세포조류를 연중 무휴로 생산하기 위한 배양조의 개발과 배양 시스템의 자동화는 시급히 해결되어야 할 과제이다. 따라서 본 연구에서는 *Chlorella*를 대상으로 단세포조류 대량 배양조를 개발하고자 하였으며, 배양공정을 자동화시키고자 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 동물성 플랑크톤의 먹이조류인 *Chlorella*의 배양 시스템에서 생산성 증대를 위한 제어시스템과 온라인 모니터링 시스템을 구축을 시도하였다.

제 2 절 공정자동화를 위한 전체 구성도

1. 배양공정 자동화의 목적

동물성 플랑크톤의 먹이조류인 *Chlorella*는 식물성 플랑크톤이므로 광합성에 필요한 빛, 탄소원 및 배양액의 pH를 조절해 주는 CO₂의 공급, 그리고 적정 온도의 유지가 생존에 필수적이다. 그러나 본 연구에서 개발하는 배양조와 같이 제한된 공간의 배양조 내에서는 이러한 조건을 일정하게 유지시키는 것은 쉬운 일이 아니다. 또한 넓은 면적을 차지하는 재래식 노천배양조와 비교하여 배양공간이 협소한 배양조에서는 *Chlorella*가 갑작스런 외부환경의 변화에도 민감하게 반응할 수 있으므로 배양시 세밀한 주의가 요구된다. 그리고 본 연구에서의 배양조는 비록 공간은 협소하지만 단위면적당 생산량은 노천배양의 경우보다 수십배나 많으므로 배양조건을 항상 일정하게 유지시키기 위하여 각각의 배양인자를 배양상태에 따라 자동조절이 가능하게 하여야 한다. 그러므로 *Chlorella*의 배양에 필요한 모든 조건들을 배양상태에 따라 실시간적으로 수집·분석하여, 최적 배양조건으로 일정하게 유지시키는 것이 배양공정 자동화의 목적이다.

2. 기본 배양조 설비와 공정 자동화 구성

본 연구에서 개발하는 기본 배양조의 설비 및 공정 자동화를 위한 구성에 대해 살펴보면 다음과 같다. Fig.6-1은 가장 효율이 높은 배양조에 공정자동화 장치를 설치한 구성도를 보이고 있다.

여기서 *Chlorella*를 최적 조건에서 배양시키기 위하여 고안한 자동화 설비는 크게 sensor units, control unit, 그리고 열교환 장치로 나눌 수 있다. 먼저 sensor units는 배양액의 pH를 받아들이는 pH-probe, 그리고 배양상태를 측정하는 O.D.-probe로 구성되어 있다.

또한 control unit에는 pH-probe로부터 얻어진 값을 설정 pH값과 비교하여 solenoid valve를 개폐시키는 장치, O.D.-probe로부터의 값을 수치적으로 계산하여 배양상태를 나타내는 display장치, 온도 sensor로부터 측정한 온도값을 설정 온도값과 비교하여 heater와 cooler를 구동시키는 장치, 그리고 배양액의 순환속도를 제어하는 배양액 유량 조절장치로 구성되어 있다.

열교환 장치는 2중 stainless steel 통으로 구성되어 있는데, heater와 cooler가 바깥쪽 통에 장착되어 있어서, 배양액에 열 및 냉기를 직접적으로 가하지 않고 간접적으로 온

도를 조절하는 것이 특징이다. 이는 배양물의 갑작스러운 온도변화에 따른 손실을 막는데 그 목적이 있으며 열교환 장치의 용량은 총배양액의 16% 정도를 차지한다.

제 3 절 Test-bed형 공정자동화 시스템 구성

1. Test-bed형 시스템 구성 및 장치 개요

배양공정 자동화를 위한 Test-bed형 시스템은 각각의 probe들로부터 읽어 들인 신호를 분석하여 설정조건을 유지하도록 heater, cooler, solenoid valve 등을 ON/OFF시키도록 구성하였다. 그리고 모든 제어기를 하나의 control box에 집적시켜 조절이 용이하게 하였다.

*Chlorella*의 배양에 있어서 간접적으로 온도를 유지하는 것보다 직접적으로 온도를 조절하는 것이 빠른 시간에 온도를 변화시킬 수 있고 *Chlorella*의 증식에 크게 영향을 주지 않으므로, 배양조에 heater 및 cooling jacket을 직접 설치하였다. Test-bed형 배양조의 공정자동화 시스템의 구성도는 Fig.6-2에 나타내었다.

2. Test-bed형 배양조 시스템 설비

가. 입력부

(1) RTI-820

RTI-820은 IBM PC, PC/XT, PC AT의 확장슬롯에 부착하여 사용할 수 있는 analog/digital input/output board이다. 또한 16채널의 analog 신호 및 16 채널의 digital 신호를 입력받아 analog 값이나 digital 값으로 출력할 수 있어서 본 자동화시스템에 이용하였다. 여기서 입력되는 값이 analog 값일 때 입력되는 A/D 범위는 $\pm 5V$ 이며, analog로 출력되는 값은 0~5V, $\pm 5V$ 또는 0~20mA이다. 그리고 RTI-820의 기본 사양은 다음과

같다.

- ① I/O address selection of the RTI-820 in the computer's I/O address map
- ② Interrupt request line selection
- ③ Analog-to-digital converter data output coding selection
- ④ Analog input setting time
- ⑤ Method of initiating A/D conversions
- ⑥ Analog output range selection
- ⑦ Digital-to-analog converter data output coding selection

또한, RTI-820의 신호흐름은 다음과 같이 나타낼 수 있다. 데이터신호, 제어신호, address 신호, 그리고 interrupt 신호는 I/O backplane bus(P1)로 전해진다. 데이터 신호인 D0-D7의 8-bit bus 신호는 I/O backplane bus상의 bidirectional octal bus transceiver로 전해지는데 이 transceiver는 data를 저장하거나 backplane에서 유도되는 noise를 감소시키거나 data 흐름의 방향을 결정짓는다.

그리고 제어신호나 낮은 4-bit address(A0-A3) 값은 data의 저장을 위해 다른 octal bus transceiver로 보내진다. 제어나 address 신호는 decoding되기 위해서 2개의 programmable array logic(PAL) gate로 보내어 진다. PAL은 data bus 방향제어, digital-to-analog conversion, analog-to-digital conversion, 그리고 board 상에서의 모든 address를 decoding하는 기능을 가지고 있다.

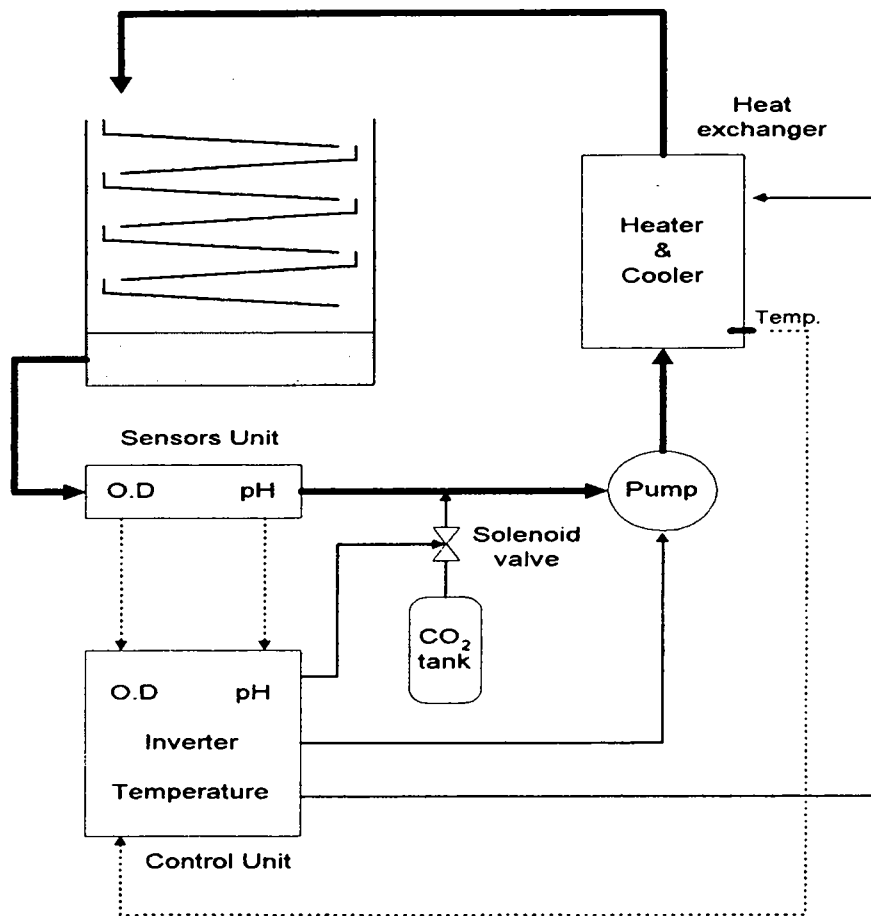


Fig. 6-1. Basic control system in bioreactor.

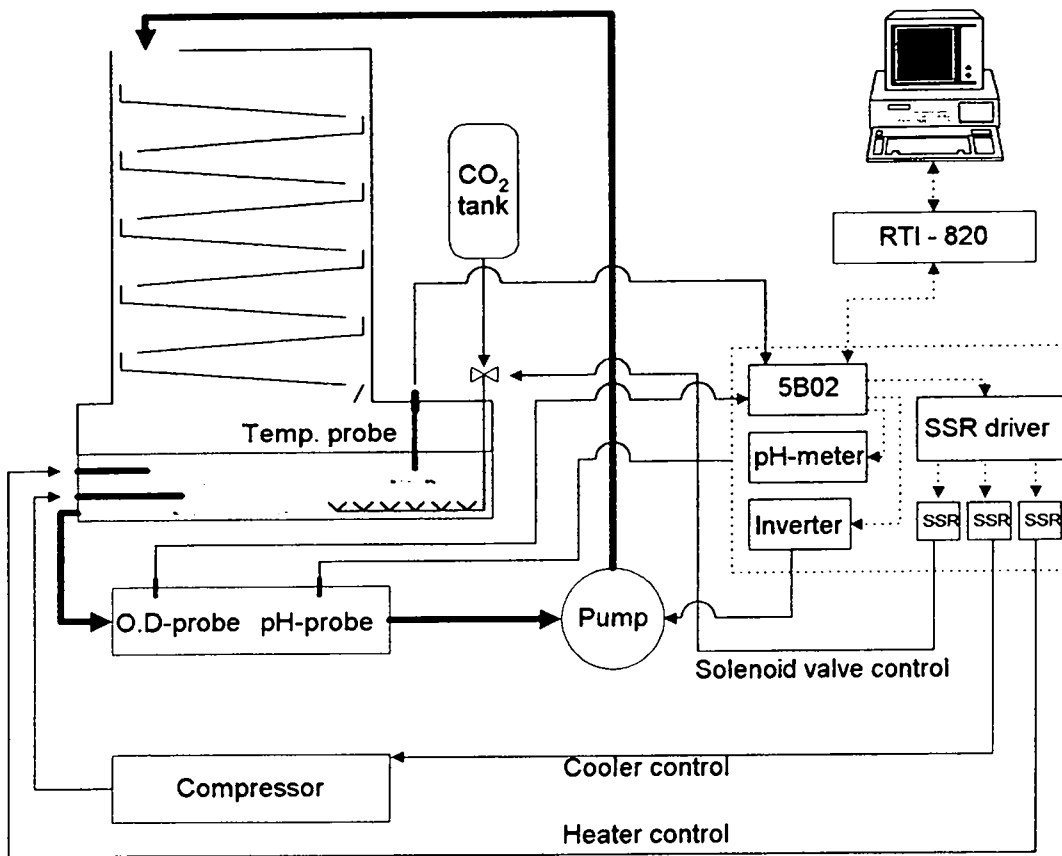


Fig. 6-2. Test-bed type control system.

상위의 6-bit address(A4-A9)와 Address Enable Signal(AEN)는 8-bit address comparator에 의하여 탐지·조정된다. 그리고 comparator는 address bus를 조정하는 기능을 가지고 있다.

(2) 5B02 Backplane

5B02 Backplane은 16-channel(input & output 포함)을 보유하고 있으며, input module에서는 internal series output switch, 그리고 output module에서는 track-and-hold를 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 측정과 제어 system을 모두 가지고 있는 5B02는 external multiplexer가 필요하지 않으며, 많은 output channel을 제어할 수 있는 digital-to-analog converter로 이용할 수 있다.

그리고 host data acquisition system으로부터의 digital output signal은 5B series의 module address를 정하는데 이용되고 input과 output을 지정할 수 있다. 그리고 5B02 backplane에 공급되는 전원은 매우 안정한 12V를 필요로 하며, fuse가 과전압을 방지할 수 있도록 설계되어 있다. 5B02 backplane의 사양은 Table 6-1과 같다. 그리고 5B02 backplane의 Diagram은 Fig.6-3과 같다.

(3) 5B30 Millivolt and Voltage Input Module

5B30 millivolt input module은 $\pm 5V$ 에서 $\pm 500mV$ 의 입력신호를 받아 $-5V$ 에서 $+5V$ 의 출력값이나 0에서 $+5V$ 의 출력값을 낸다. 본 자동화 시스템에서는 pH-meter에서 출력되는 값을 입력받아 제어하는데 이용하였다. 5B30의 block functional diagram은 Fig. 6-4와 같다.

Table 6-1. Specification of 5B02 backplane

| | |
|------------------------------|--|
| Channels | 16 |
| Physical size (with modules) | 3.5" × 17.4" × 3.2" (88.9mm × 442mm × 81.3mm) |
| Weight | 11.25 oz. (305g) |
| Address Selection Inputs | |
| Max logic "0" | 0.8 V |
| Min logic "1" | 2.0 V |
| Max logic "1" | 7.0 V |
| Power Supply | + 5 dc ± 5% |
| Power Consumption | 0.16W (32mA) TYP |

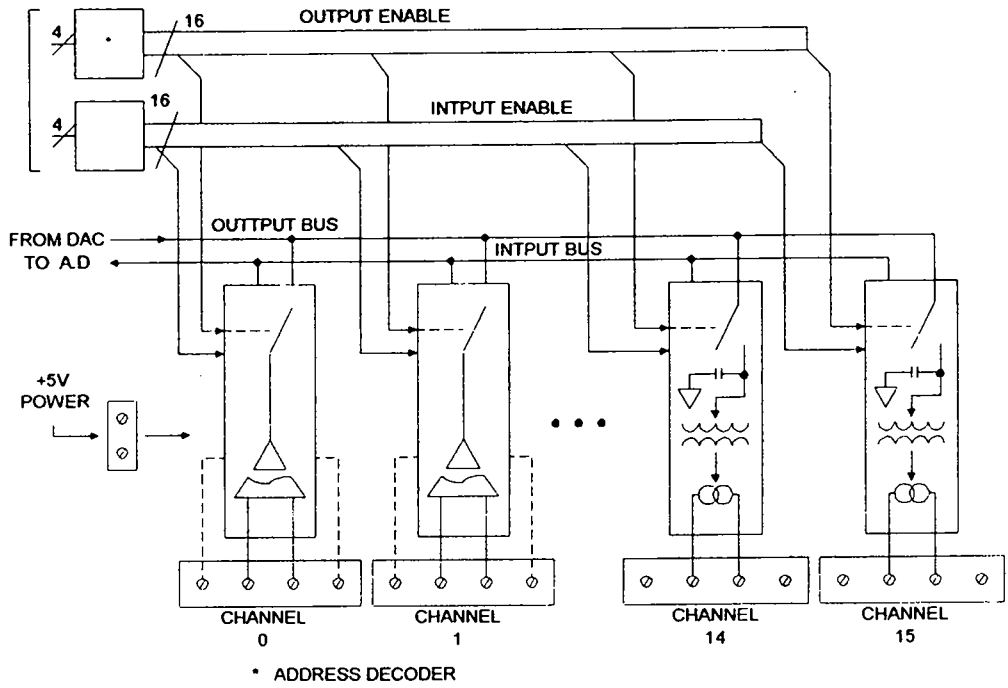


Fig. 6-3. Diagram of 5B02 backplane.

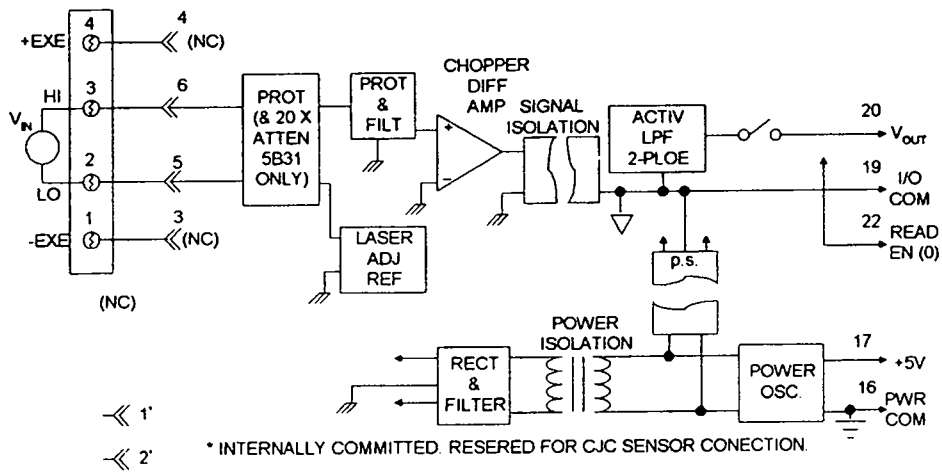


Fig. 6-4. Block functional diagram of 5B30.

(4) 5B37 Thermocouple Input Module

5B37 Thermocouple Input module은 온도 sensor type E에서 신호를 받아 0에서 +5 V의 출력값을 낸다. Cold 접합 보정회로는 열전대선의 접합부에서 발생하는 와류효과를 보정하여 screw terminals로 입력시킨다. 보정회로는 +5℃에서 +45℃까지의 외기 온도 범위에서는 $\pm 5\text{℃}$ 의 정확성을 가지고 있다. 5B37의 block functional diagram은 Fig. 6-5와 같다.

(5) O.D. INPUT MODULE

O.D. input module은 본 연구진이 직접 개발한 혼탁도 측정장치로서 절대적인 값이 아닌 상대적으로 혼탁도를 측정하는 module이다. 이때 혼탁도란 일반적인 optical density, 즉 일정한 파장으로 빛을 조사하여 그 때의 흡광도를 측정하는 것이 아니라, 본 연구목적에 알맞게 일정한 농도로 성장한 *Chlorella*의 혼탁도를 측정하여 가장 많이 배양되었을 때, 초기 농도 그리고 그 중간부분을 균등하게 희석하여 발광diode에서 보내지는 빛을 수광부에서 받아 그 때 발생하는 신호를 계산하여 display하게 제작되었다. O.D. input module의 회로는 Fig. 6-6과 같다. 또한 직접 제작한 O.D. 센서는 Photo 6-1에 나타내고 있다.

(6) pH Input module

pH meter로서는 Suntex사의 SP-701을 이용하였으며, pH의 정밀도는 0.01 pH로서 이 때의 출력전압은 1mV가 된다. 따라서 0-14 pH는 0~1400mV 로 출력이 되어, 이 전압값을 컴퓨터에서 받아들여 현재의 pH 값을 알 수 있게 된다. SP-701의 판넬 사양은 다음과 같다.

Rear Panel Description :

1. Power : plug base for DC 9V adaptor
2. Recorder output : plug base for 4mm pin signal output

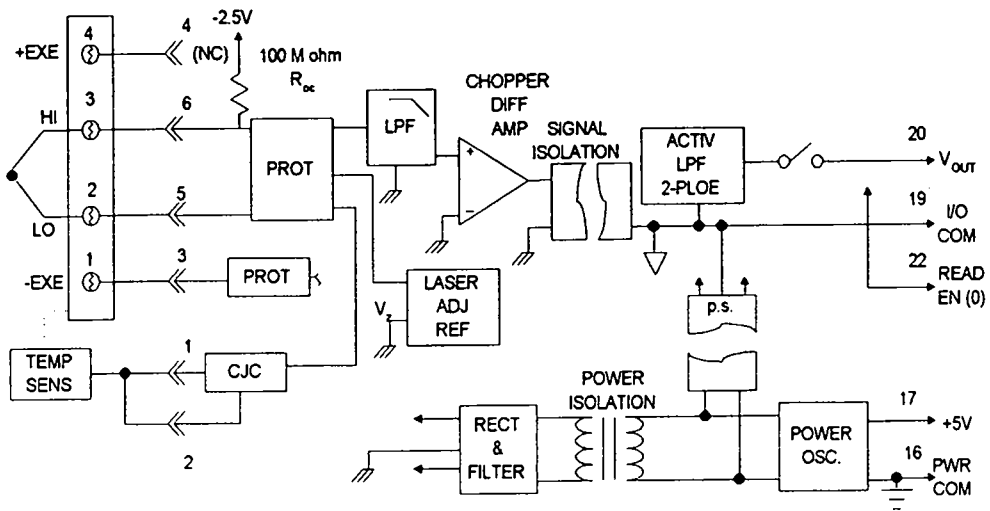


Fig. 6-5. Block functional diagram of 5B37.

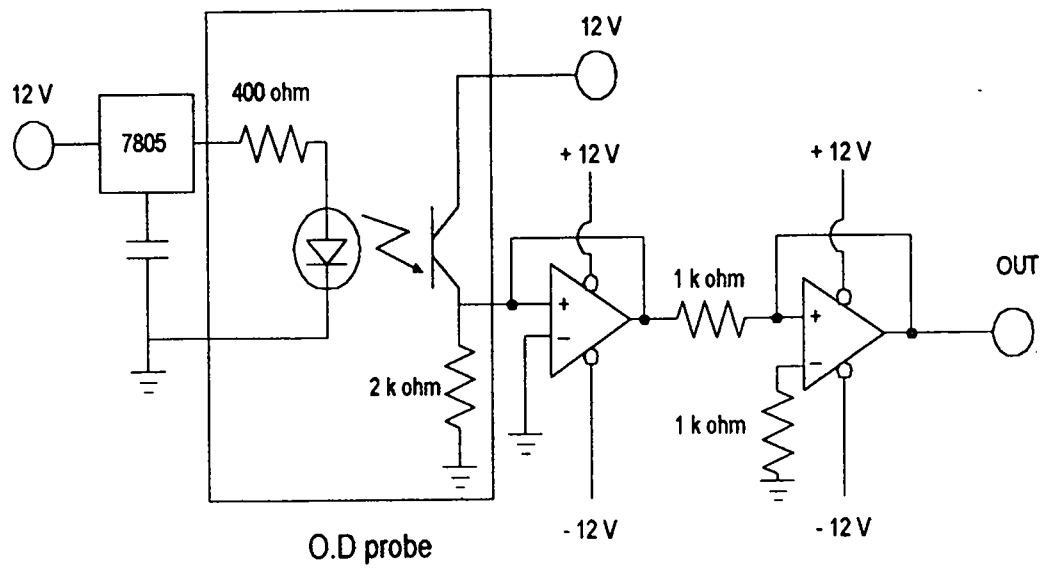


Fig. 6-6. Circuit of O.D. sensor input module.

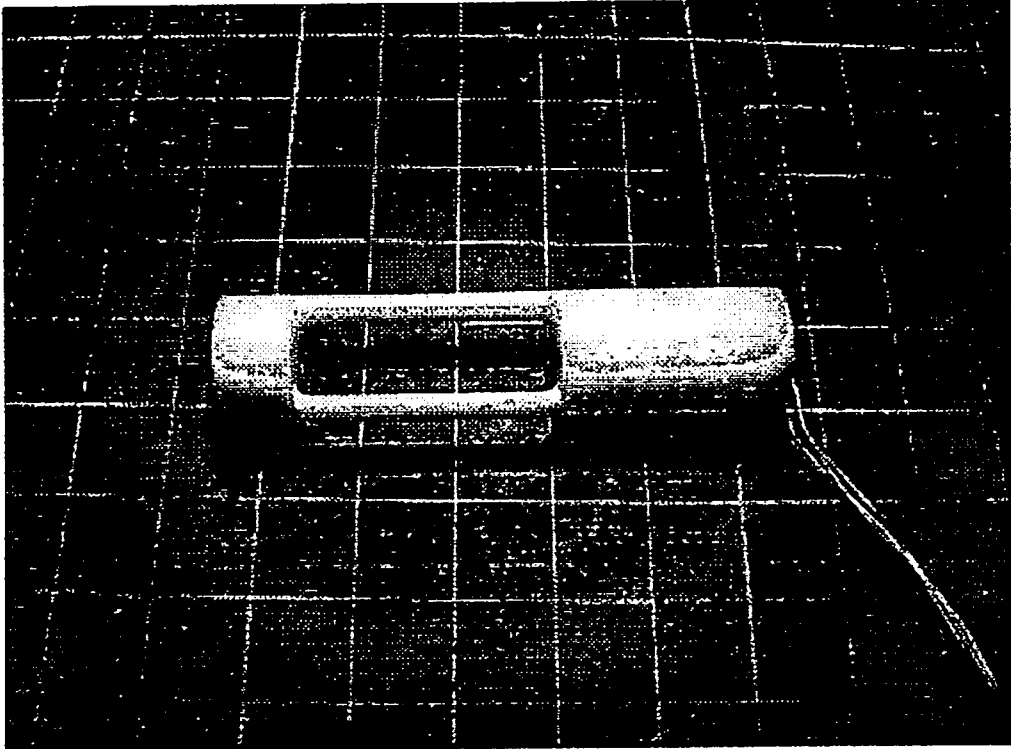


Photo 6-1. O. D. sensor.

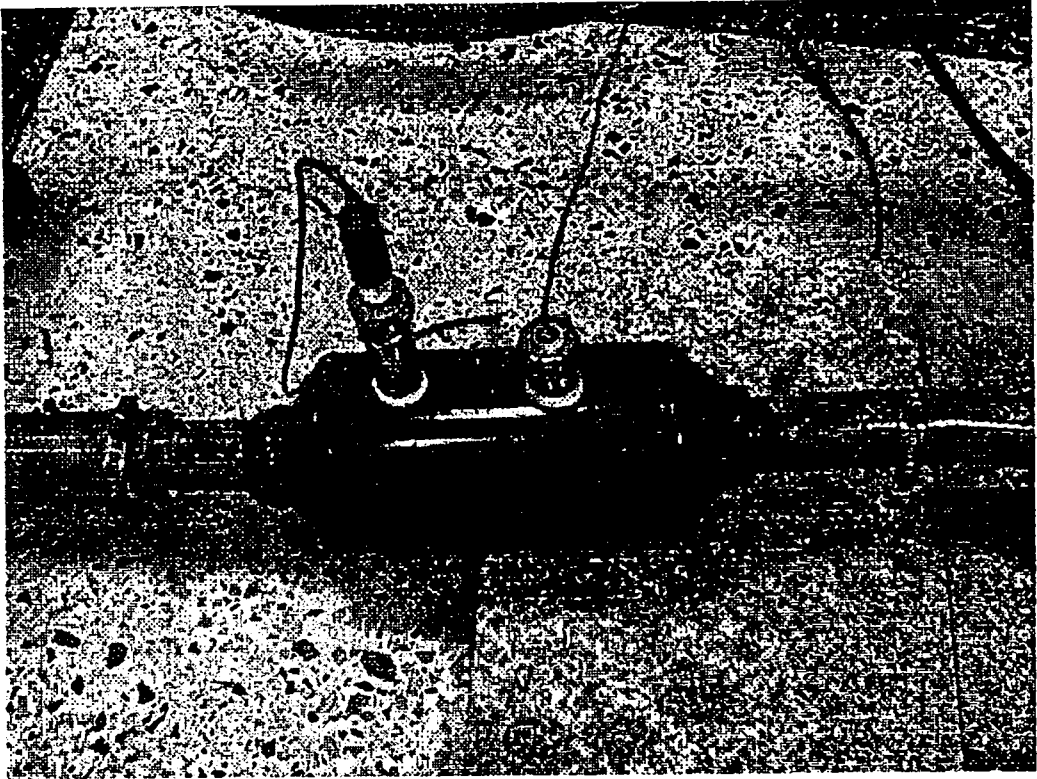


Photo 6-2. pH sensor and O.D. sensor in bioreactor system.

3. A.T.C : plug base for A.T.C. probe
4. Karl Fischer : plug base for 4mm pin K.f.
5. Ref. : plug base for 4mm pin reference electrode
6. Class : BNC plug base for pH metal or ion electrode

pH 전극과 제작한 O.D.센서는 배양조와 순환펌프 사이에 부착하였으며, Photo 6-2와 같이 나타낸다. 여기서 왼쪽이 pH 센서를, 오른쪽이 O.D. 센서를 가르키고 있다.

나. 출력부

(1) 5B39 Current Output Module

5B39 Current Output Module은 high level의 analog 신호를 입력받아서 직류형식으로 절연된 4-20mA 또는 0-20mA의 process current 신호를 출력한다. 그리고 $\pm 0.05\%$ 의 높은 정확성을 가지고 있다. 5B39의 functional block diagram은 Fig.6-7과 같다.

(2) LG Inverter starvert-iG

배양액의 유속을 조절하는 Inverter는 0~60Hz 까지의 주파수 범위를 가지고 있다. 작동은 프로그램상에서 입력값(0~100%)에 따라 배양액을 순환시킨다. 실행시 가속 패턴과 감속 패턴이 있으므로 목표주파수까지 도달하는데 일정한 시간이 소요되며 정지시도 마찬가지로이다.

다. Driver

SSR(Solid state relay) 구동회로는 ON/OFF 제어 방식에 필요한 기기로서 5B02 Backplane에서 출력되는 신호(0~5V)를 입력받아 220V인 출력값을 내여 heater, cooler 및 solenoid valve를 구동시키는데 이용되는 구동회로이다. SSR구동회로는 Fig.6-8과 같다.

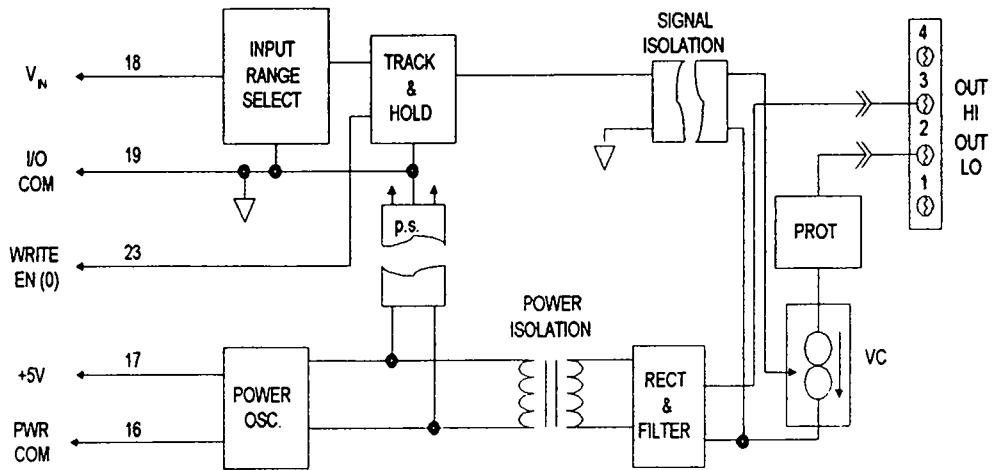


Fig. 6-7. Functional block diagram of 5B39.

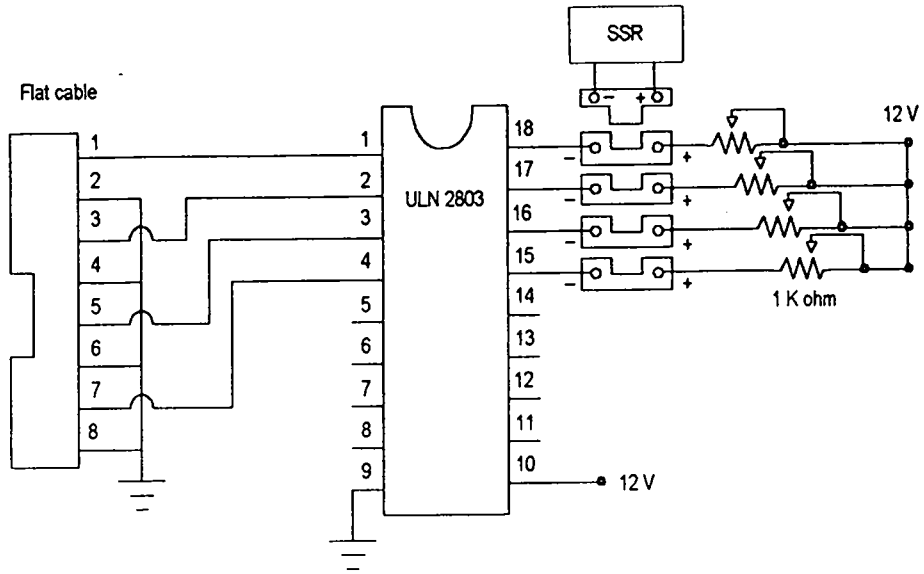


Fig. 6-8. Operating module of SSR.

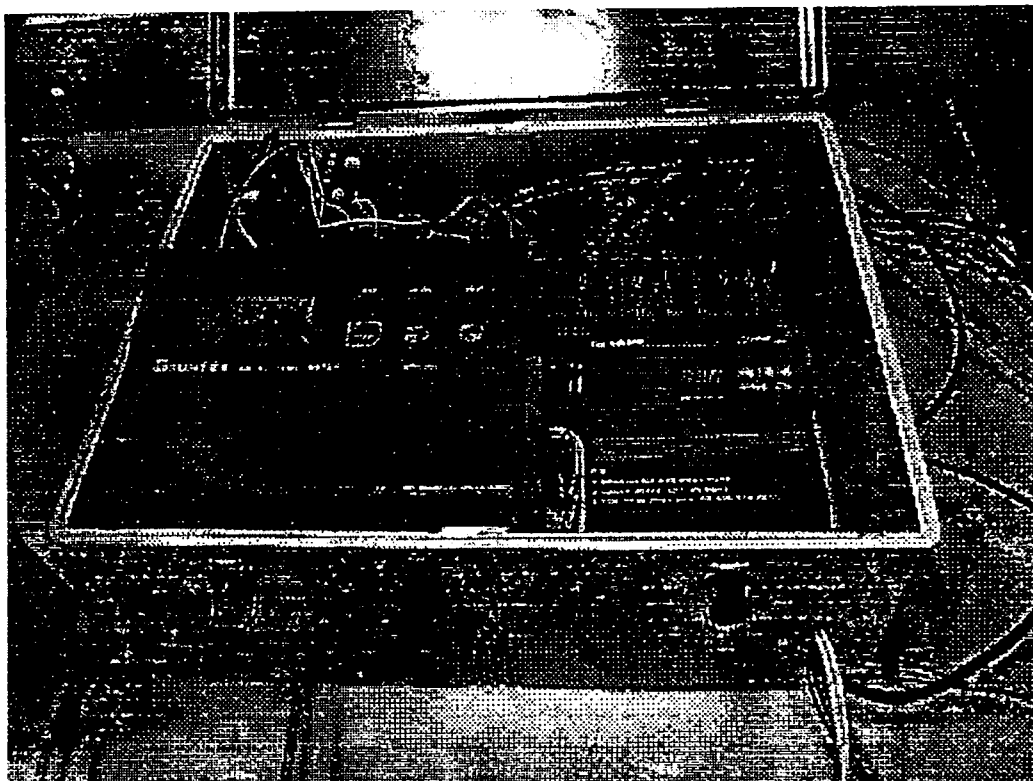


Photo 6-3. Control unit

라. 제어부

제어부에서는 컴퓨터에서 지령한 시그널을 입력받아 직접 구동부에 전달하는 기능과 각 부위의 센서로부터 입력받은 신호를 컴퓨터에 전달하는 부분으로서 위의 입력부, 출력부, 구동부를 포함하고 있다. Photo 6-3에서는 제작한 제어부를 보이고 있으며, pH meter, Inverter, SSR 구동회로를 보이고 있다.

3. PC와의 인터페이스 구성

컴퓨터를 이용한 제어기기 장치 구성시에는 컴퓨터와 주변장치를 연결하는 부분이 필요하며, 이러한 기능을 담당하는 부분을 인터페이스라 한다. 일반적으로 컴퓨터는 어드레스부, 데이터부, 제어부, 전원부로 크게 나눌 수 있으며, 지정한 어드레스에 지정한 데이터를 입출력 할 수 있게 설계되어 있다.

외부의 주변장치로서는 크게 A/D, D/A, D/I, D/O로 나눌 수 있으며, 각각 외부의 센서로부터의 입력 및 ON-OFF 입력을 받고 있으며, 드라이버의 출력으로서는 시그널 및 ON-OFF로서 출력하고 있다.

본 연구에서의 인터페이스는 Fig. 6-9와 같이 구성된 RTI-820 Card를 이용하였으며, 12bit의 A/D, D/A 기능을 가지고 있으며, 24bits의 D/O 및 16bits의 D/I의 기능을 내장하고 있다. SW1에서는 I/O 어드레스를 지정하는 스위치로서 RTI-820 Card의 고유 어드레스를 지정하여야 한다. 또한 D/A를 담당하고 있는 프로세서는 8741 slave processor로서 8bits one-chip micro processor이다. 위 프로세서는 데이터 처리 시 4bits 씩 처리를 행하고 있으며, A/D 변환부에는 high impedance에도 신호변환을 행할 수 있는 변환장치가 내장되어 있다.

4. Man-Machine 인터페이스 구성

Man-Machine 인터페이스는 RTI-820에서 입력되는 신호를 프로그램상에서 작동시켜 배양조건을 제어하는 것이다. 이러한 인터페이스의 구성은 제어해야 하는 조건에 맞게

작성되었다. 제어방식은 모두 ON/OFF으로 SSR을 구동하게 하여 solenoid valve, heater 그리고 cooler를 동작시킨다. 그리고 자체 개발한 혼탁도 sensor에서 입력되는 신호를 모니터에 display하여 *Chlorella*의 배양 정도를 눈으로 확인할 수 있게 하였다. 수광부와 발광부로 구성된 혼탁도 sensor는 본 제작진이 직접 개발한 회로를 거쳐서 noise 등을 제거하고 오차는 0.8% 이내로 감소시켰다.

혼탁도 sensor로 측정되는 *Chlorella*의 증식 정도는 절대적인 수치가 아니다. 혼탁도 sensor를 통해 display되는 수치의 계산은 먼저 일정한 농도로 농축시킨 *Chlorella*를 이용하여 이 때의 전압을 설정하고 점점 희석하면서 그 때의 값들을 조합하여 희석단계에 따른 전압을 변환하여 display되게 하였다. 따라서 어느 정도의 수치가 display되면 *Chlorella*의 수는 얼마인가를 알 수 있게 하였다. 배양일수는 최대 50일 이내로 setting이 가능하고 온도는 최고 200℃ 최하 10℃로 조절할 수 있게 구성하였다. 그리고 배양액의 순환속도는 프로그램 실행시 1%에서 100%까지 입력할 수 있어 최고 40 l/min의 배양액을 순환시킬 수 있다.

화면상에 설정 값과 현재 조절되는 값이 동시에 display되므로 오차범위도 눈으로 확인할 수 있게 하였고, 프로그램에서 미리 정한 혼탁도 data를 저장하여 edit 명령어로 시간에 따른 data값 즉 배양 정도를 저장하게 하여 다른 software에서 다시 배양곡선을 재현할 수 있게 하였다. 그리고 프로그램 실행 시 화면은 각각 처음 화면, 둘째 화면 그리고 배양중의 화면으로 구성되어 있는데 각각의 화면은 다음과 같다(Fig. 6-10~Fig. 6-12).

Fig.6-10에 나타난 처음 화면에는 연구책임자의 소속 및 성명 그리고 실행 프로그램의 제목이 출력된다. Fig. 6-11의 둘째 화면에는 배양조건을 설정할 수 있도록 직접 keyboard를 이용하여 설정한다. 배양조건으로 배지의 순환속도(0~100%), pH 및 배양액의 온도를 설정할 수 있다. 마지막으로 Fig. 6-12의 배양중 화면에는 배양액의 혼탁도, 현재 pH 그리고 현재의 온도를 display하여 설정 배양조건과 비교할 수 있게 하였다. Graph에서는 총 배양일수 및 혼탁도를 나타내고 있으며, 저장파일에는 혼탁도의 수치를 저장한다.

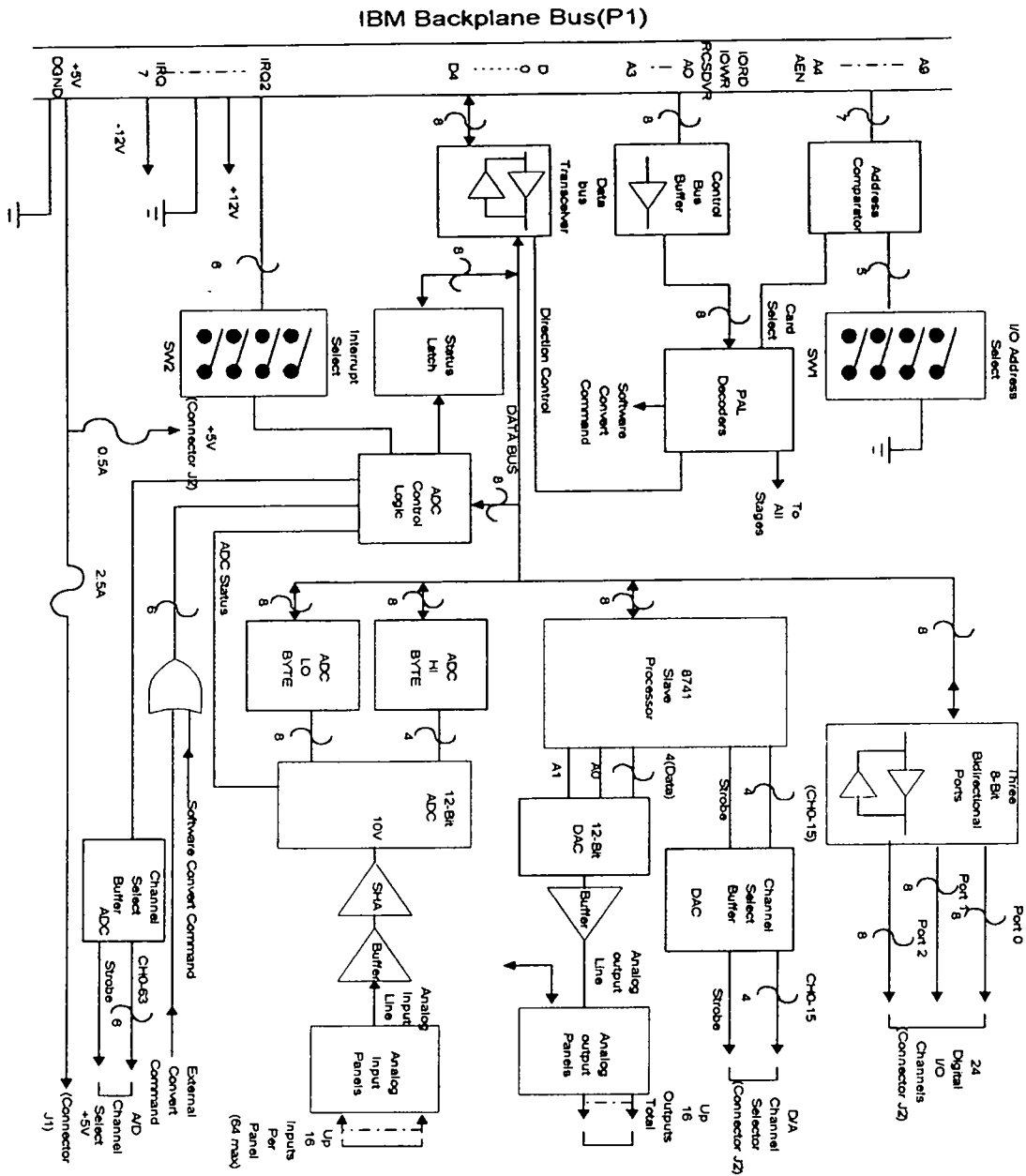


Fig. 6-9. Interfacing between PC RTI-820 card.

5. 제어 알고리즘

가. 온도 제어 알고리즘

배양액의 온도를 온도 probe로부터 입력받아 설정온도와 비교하여 그 값(D)이 0보다 크면 cooler를 구동시키는 SSR에 전원을 설정시간만큼 공급하고 D값이 0보다 작으면 heater를 구동시키는 SSR에 전원을 공급하여 배양액의 온도를 설정 온도로 조절시키는 알고리즘이다. 먼저 operating time을 입력받아 설정시간(I)을 계산하여 heater나 cooler를 ON시킨다. Heater의 동작시간과 설정구동시간을 계산하여 operating time과 같거나 크면 heater 및 cooler를 OFF시키는 동작을 행하게 된다. 온도 제어 알고리즘의 flow chart는 Fig. 6-13에 나타내었다.

나. pH 제어 알고리즘

배양액의 pH를 pH-probe로부터 입력받아 설정 pH값과 비교하여 그 값(A)이 7보다 작으면 data output을 실행하게되고, 그 값이 7보다 크면 operating time을 입력받아 설정 pH(I)를 계산하여 SSR을 구동시켜 solenoid valve를 ON시킨다. Solenoid valve의 동작시간과 설정구동시간을 계산하여 operating time과 같거나 크면 solenoid valve를 OFF시키는 동작을 행한다. pH 제어 알고리즘의 flow chart는 Fig. 6-14에 나타내었다.

다. 유속 제어 알고리즘

원하는 배양액의 유속을 프로그램 실행시 입력한다(0~100%). 입력값은 inverter의 입력 device에서 처리되어 Digital/Analog converter값으로 변환된다(Hz). 변환된 값은 inverter를 구동시켜 주파수의 변화에 따라 motor가 작동하게된다(0~1750rpm). 유속 제어 알고리즘의 flow chart는 Fig. 6-15에 나타내었다.

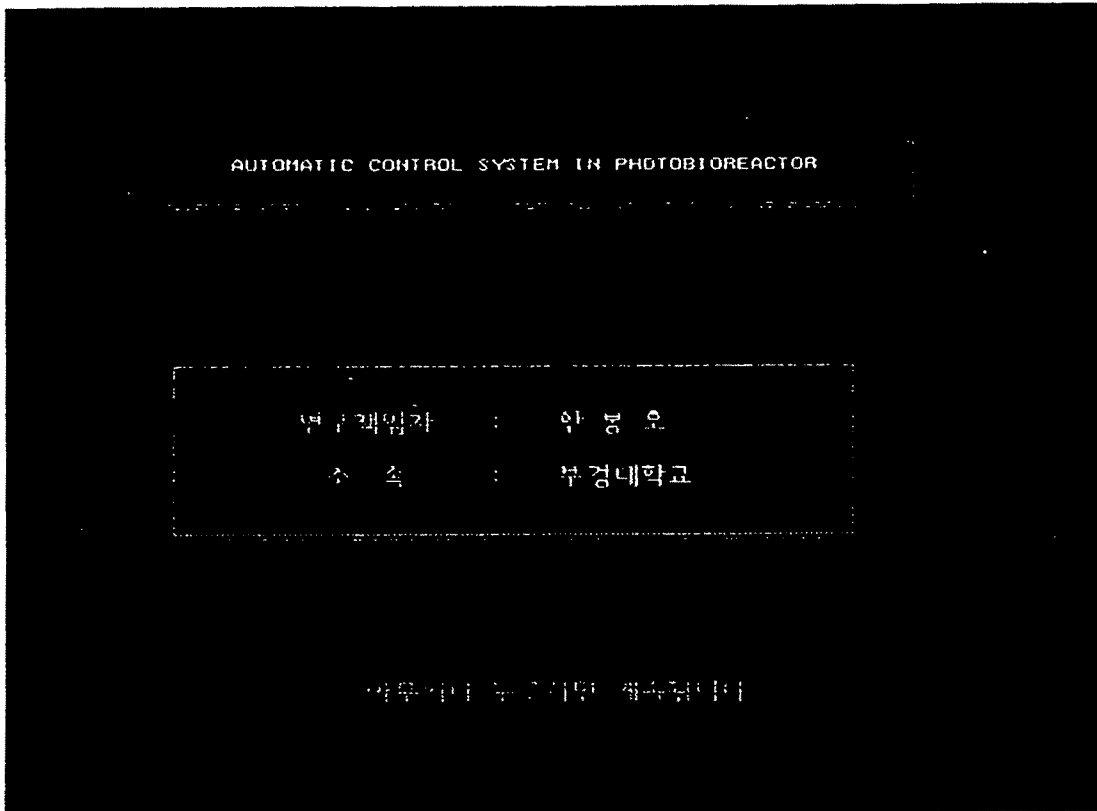


Fig. 6-10. First screen of Operating system.

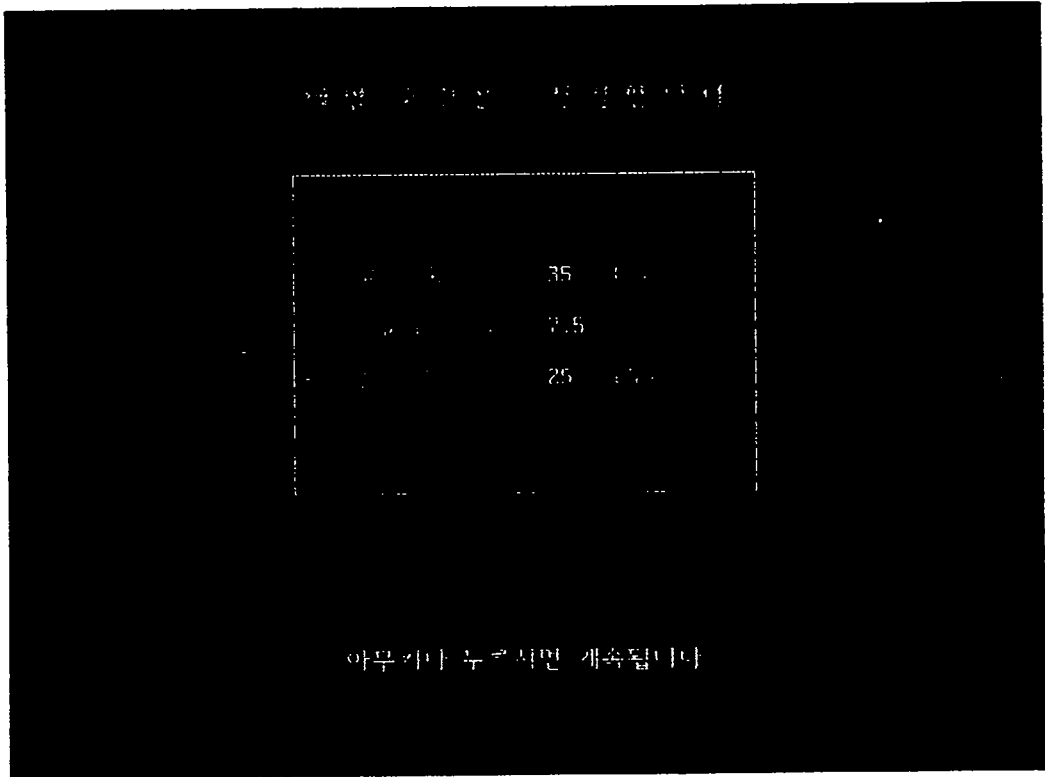


Fig. 6-11. Second screen of operating system.

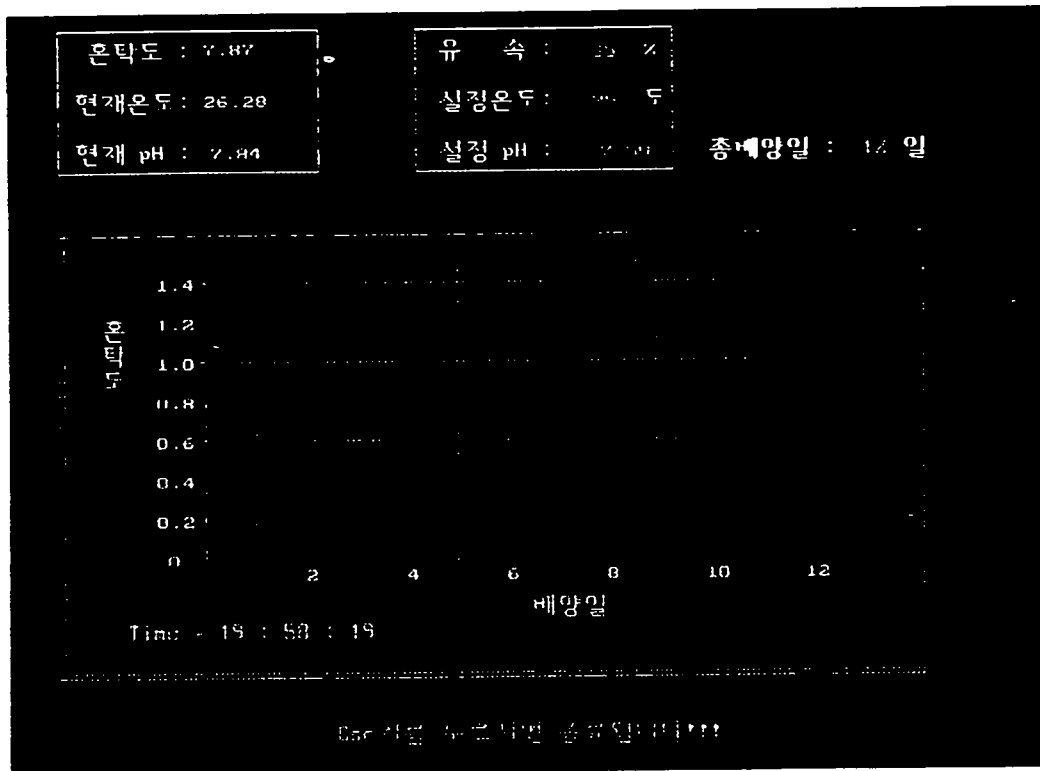


Fig. 6-12. Measuring screen of operating system.

제 4 절 시작품형 공정자동화 시스템구성

1. 시스템 구성장치 개요

시작품형 공정자동화 시스템은 computer를 이용하여 자체 제작한 프로그램상에서 모든 기기를 구동시켜 제어하는 Test-bed형 자동화 시스템과 비교하여 여러 가지의 차이점을 지니고 있다.

먼저 Test-bed형 시스템은 연구실 차원에서 여러 가지 배양조건을 비교하여 배양 결과를 도출하였다. 또한 일차적인 Test를 많이 실시했으므로 시스템의 구조도 여러 번 바뀌었다. 동작되는 SSR이나 magnetic switch를 구동시키는 driver도 직접 제작하였으므로 제품형태로 출하되는 기기보다는 정밀도는 높지만 버그 발생으로 인한 시행착오율이 높다고 볼 수 있다. 따라서 본 연구과제의 목적에 맞게 현장적용의 실시를 위해 일반 어민에게는 보다 쉽게 조작할 수 있고 내구성도 강한 시스템이 필요하였다. 이와 같은 목적에 적합하고 보다 안정적인 동작을 위하여 시작품형 공정자동화 시스템을 구성하게 되었다.

2. 시스템 구성설비

가. 입력부

(1) pt-100 온도 sensor input module (LH-900)

LH-900(LG 하니웰, LTD)은 pt-100 Ω 열전대에서 출력되는 신호를 입력받아 2개의 출력부에서 Heater 및 Cooler를 구동시킨다. 그리고 일반적인 PV 입력부, 제어출력부 그리고 표시설정부의 특징은 다음과 같다.

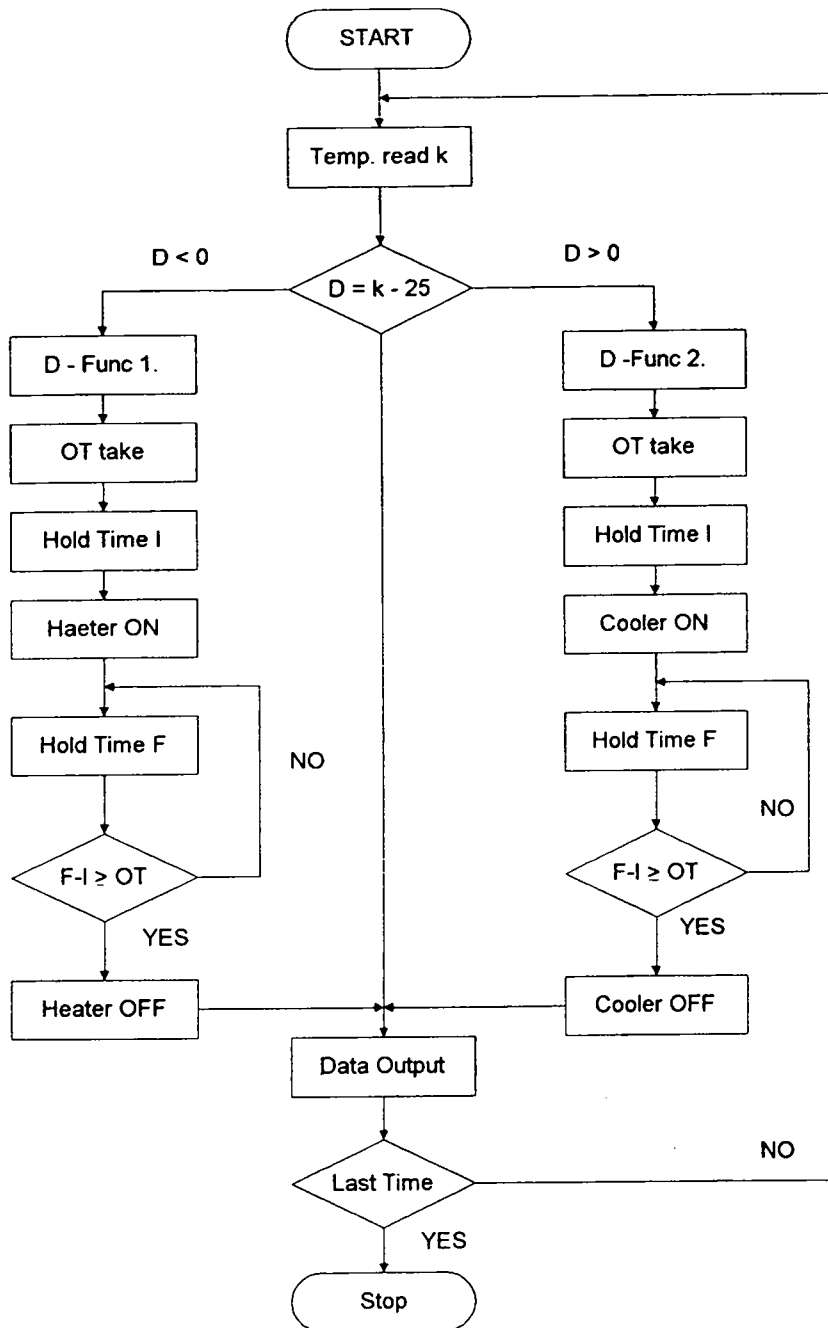


Fig. 6-13. Flowchart of control routine on temperature

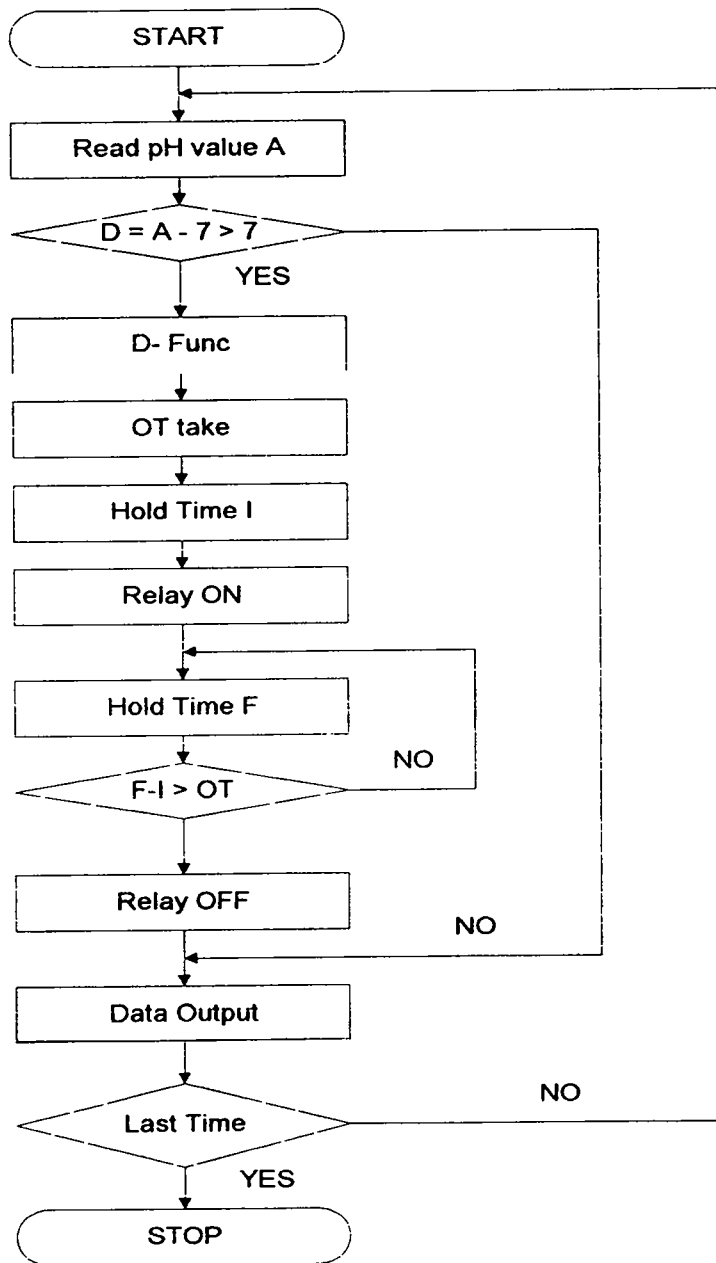


Fig. 6-14. Flowchart of control routine on pH.

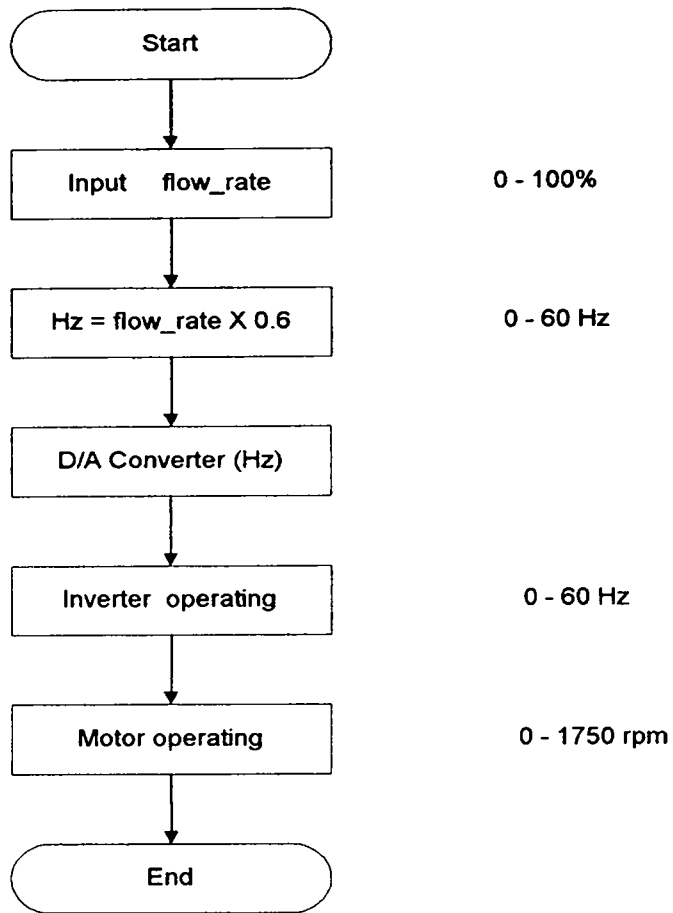


Fig. 6-15. Flowchart of control routine on motor speed

PV 입력부

측온저항체 : pt 100 Ω (-199.9 - 400.0 $^{\circ}$ C)

입력 샘플링 주기 : 0.5초

입력 바이어스 : -100~100U

입력 임피던스 : 열전대 1M Ω 이상

BURN OUT : 센서 단선시 및 PV입력 범위 초과시에 AL01 표시와 동시에 0% 출력

제어 출력부

제어동작 : PID동작

- 비례대 (P) : 0.0-999.9% (P=0 일 때 ON-OFF 제어)
- 적분시간 (I) : 0-3600초 (I=0 일 때 I 동작 없음)
- 미분시간 (D) : 0-3600초 (D=0 일 때 D 동작 없음)
- 비례주기 (T) : 1-100초 (릴레이, 전압출력시)

정동작 · 역동작 절환가능

제어 출력 : 릴레이 출력 (릴레이 접점(SPST), 250Vac 5A(저항성 부하))

전류출력 : DC4-20mA (허용부하저항 : 600 Ω)

전압출력 : DC0/24V \pm 10%(SSR구동출력), 내부저항 1.5 \pm 10%

경보출력 : RELAY 접점 출력 (ON-OFF SPST 릴레이)

- EV1, EV2

- 출력 정격 : 250Vac 5A (저항성 부하)

허용 배선 저항 : 열전대 입력 : 200 Ω 이하

측온 저항체 입력 : 4 Ω 이하

경보동작 : PV입력치 경보 (상한경보, 하한경보, 상 · 하한경보)

편차경보, 절대값 편차경보

히스테리시스폭 0-100 $^{\circ}$ C 조절가능

표시 설정부

표시방식 : 4자리 2단의 7SEGMENT LED

정전대책 : E²PROM

표시정도 : $\pm 0.5\%$ FS ± 1 DIGIT

표시내용 : PV(현재온도), SP(설정온도)

EVENT 발생 경보 : EV, EV2

AUTO TUNING중 표시 : AT

출력표시 : OUT

- 설정부

설정 MODE변환키

설정 자리 이동키

설정치 증가키

설정치 감소키

(2) O.D. input module

O.D. input module은 Test-bed형 자동화 시스템의 module과 원리는 동일하나 O.D. probe를 플라스틱 종류인 아스카탈을 재료로하여 제작하였다. O.D. input module의 구성은 Fig.6-16에 나타내었다.

(3) pH input module (pH-6000)

pH-6000(Dongil Instrument Ltd)은 직접 sensor에서 신호를 받아 직독할 수 있는 panel 취부용 digital pH(ORP) 지시조절계이다. 계기입력단에는 고입력 임피던스의 IC를 채택하여 sensor 특성에 맞는 조건을 갖추므로 높은 신뢰성과 안정성으로 연속적인 측정이 가능하며 또한 출력신호는 computer와의 인터페이스를 위하여 isolating signal로 되어있다. 본 배양에서 사용되는 sensor는 Model GR-1 type이다. 그리고 일반사양은 다음과 같다.

Range : 0 ~ 14 pH ($\pm 700mV$)

Accuracy : $\pm 0.35\%$ Full Scale

Ambient temp. : -5 ~ 45°C

Control set : Electronic V. R Setting

Input resist. : More than $10^{12}\Omega$

Output : DC 4 - 20mA(R. L 0-500 Ω), DC 1-5V

Indication : Digital display 3 digits

Relay contact capacity : Inductance load AC 250V 1.6A

Resistance load AC 250V 4.0A

Power source : AC 110/220V \pm 10% 50/60 Hz

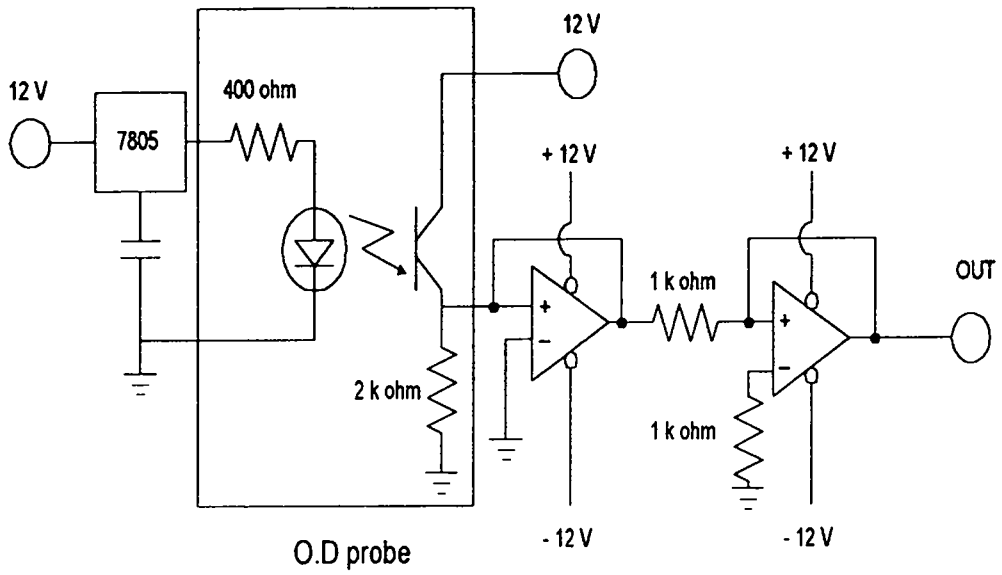


Fig. 6-16. Circuit of O.D. sensor input module.

나. 출력부

(1) O. D. display module

Test-bed형 배양조 시스템에서는 배양되는 정도를 computer monitor 상에서 display 했으나 시작품형 공정자동화 시스템에서는 graph로 나타내는 것이 아니라 직접적으로 숫자로 나타나게 하였다. 이때 사용된 기기는 S-1100(Sejin electronic gauge Co., Ltd.) 로 일반사양은 다음과 같다.

INPUT : THERMO COUPLE, RESISTANCE BULBS, mV, mA, V

INDICATING ACCURACY : $\pm 0.5\%$ F · S

RESPONSE TIME : APPROX 1.5m SEC

AMBIENT TEMP : -10~55℃

POWER SUPPLY : AC 110/220 60Hz ($\pm 10\%$) , DC 24V (Option)

EXTERNAL RESISTANCE : THERMO COUPLE 100 Ohm

RESISTANCE BULB 10 Ohm

RELAY CONTACT RATING : 250V AC 1A

OUTPUT : DC 4-20 mA (Option)

1-3 V DC (Option)

WEIGHT : 430g

다. 제어부

배양조 시스템에서 *Chlorella*가 증식하기 위해서는 광합성에 필요한 빛, 탄소원 및 적정온도가 필수적이며, 더욱이 고밀도 배양을 위해서는 이들 요소가 정확히 제어되어야 한다.

배양조 시스템에 있어서 *Chlorella*의 증식과 빛과의 관계, 탄소량과의 관계, 온도와의 관계에 대해서는 상호 복합적인 관계가 존재한다. 즉, 제어의 관점에서 보면 *Chlorella*의 증식에 있어서 빛, 탄소량, 온도 등은 배양조 시스템의 각각의 변수가 되며, 이들 변

수에 의해 성장이 좌우된다.

그러나, *Chlorella*의 증식과 이들 변수와의 관계는 명백하게 밝혀지지 않았다. 왜냐하면, 이들 변수에 대해 *Chlorella* 증식은 비선형 또는 편미분 방정식으로 표현되기 때문이다. 다만, 실험적인 방법에 의해서만 최적의 값을 추정할 수 있을 뿐이다. 보다 정밀한 제어를 행하기 위해서는 근사적인 방법으로 선형화하여 제어하는 방법을 고려할 수 있으나, 이 또한 반복적인 실험을 통해서 얻을 수 있다. 그러나, 제어하는 정밀도가 그다지 높지 않다면, *Chlorella* 증식의 성장과 각각의 변수가 상호 독립적으로 고려할 수 있고, 이것은 단순한 일차계로 들 수 있다.

다음과 같은 일차계 시스템을 고려하자.

$$G(s) = \frac{1}{\tau s + 1}$$

여기서 τ 는 시스템의 시정수로서 정상치의 63.2%에 이르는데 필요한 시간이다. 즉, *Chlorella*가 성장하면서, 필요로 하는 탄소원 및 온도변화가 시간에 대해 지수적으로 변한다고 할 때, 제어의 목표는 이와 같이 변화하는 탄소원 및 온도를 항상 일정한 수준으로 유지하는 것이라 할 수 있다. 그렇다면, 여기서 *Chlorella*의 성장과 필요로 하는 탄소원 및 온도의 변화에 대해 각각의 시정수를 알 수 있다면, 간단하게 제어를 행할 수 있게 된다.

광합성에 필요한 빛은 현재의 광량을 측정하여 모자라는 광량에 대해서는 전등을 이용하여 일정한 광량이 되도록 개루프 제어를 행할 수 있다. 또한, 유속제어의 경우에 있어서도 펌프의 속도를 일정하게 제어를 행하면, 토출되는 유속이 간단하게 제어될 수 있다. 따라서, 제어상 어려움이 있는 부분은 탄소원 및 온도제어라 할 수 있다. 이러한 요소에 대해서는 순간 순간 변화하는 량에 대해서 현재의 량을 측정하여 제어를 행하는 폐루프제어를 행해야 한다. 또한 탄소량의 변화 및 온도 변화는 외부의 조건에 의해서도 변화가 심하며, 이러한 외부의 조건은 제어상에서 측정 불가능한 요소로서 존재한다. 따라서, 외부의 조건의 변동에 관계없이 일정한 탄소량 및 온도를 제어하기 위해서는 외부의 변동에 대해 빠르게 변화를 행할 수 있는 제어기 설계가 필요하다.

본 연구에서는 온도 및 탄소량의 제어에 이용되고 있는 제어기로서 PID 제어루틴을 이용하기로 한다. 즉 현재의 오차에 대해 비례적으로, 적분적으로, 미분적으로 오차를

줄이게 된다. 일반적으로 비례요소는 현재의 오차를 빠르게 상쇄시키는 역할을 하며, 적분요소는 정상상태오차를 없애 주는 역할을 하며, 미분 요소는 급격히 변화하는 요소를 빠르게 없애는 역할을 한다. 또한 PID제인의 선정에 있어서는 주파수적인 성분을 고려해야함은 물론이다.

3. PID알고리즘을 이용한 pH 제어 알고리즘

PID-600은 DIN 96을 채용한 compact size로 다음과 같은 특징을 가지고 있다. 입·출력은 photo isolation이 되어 있으며 sensor 계기부와 조작단은 전기적으로 절연되어 있다. 그리고 제어 극성의 선택 절환이 가능하고 미분, 적분 동작 ON/OFF S/W 장비를 갖추고 있어 pH 제어에 필요한 기능을 가지고 있다. 또한 cascadе 제어용 결합 입력 단자를 구비하고 있고 내부 메카니즘과 case가 분리되어 계기의 정비가 용이한 특징을 가지고 있다. 기본 사양은 다음과 같다.

입력 신호 DC 4-20mA (입력 저항 250 Ω)

출력 신호 DC 4-20mA (부하 저항 500 Ω MAX)

입출력 절연 I/O Isolation

Display Digital 2 1/2 DIGIT (적색 LED)

1) 목표치 : 0-14.0 pH (최소 분해능 0.1 pH)

2) 출 력 : 0-100% (최소 분해능 1%)

계기의 회로 구성은 Fig.6-17과 같다. 제어계에는 반드시 지연 시간이 존재하므로, pH를 곧바로 새로운 목표치로 제어시키는 것은 곤란하다. 일반적으로 응답을 빠르게 하려면 제어계는 오버슈트(overshoot)나 헌팅(hunting)을 생기게 하고, 그것을 없애려고 하면 응답이 느려진다. 용도에 따라서는 오버슈트가 생겨도 빨리 안정된 제어를 하고 싶은 경우와 시간이 걸려도 오버슈트를 없애고 싶은 경우가 생긴다. 결국, 최적제어의 경가는 용도, 목적에 따라서 다르다고 말할 수 있지만, 평균적으로 이 두 가지를 혼합한

경우가 가장 적합하다고 하겠다.

본 연구의 배양조 자동화 공정에는 PID 동작을 이용하여 pH를 제어하였다. PID 동작은 비례동작, 적분동작, 미분동작을 합친 것으로 지연시간을 가진 제어대상에도 뛰어난 제어결과를 가져온다. 그것은 비례동작에서 헌팅이 없는 부드러운 제어를 하고, 적분동작에서 오프셋을 자동적으로 수정하고, 미분동작에서 외란에 대한 응답을 빨리하는 것이 가능하기 때문이다. 스텝응답법에 의해 측정된 PID 정수는 25% 감쇠를 최적으로하는 조정법이고 최적조정법의 최대 공약수를 취하고 있습니다. 따라서 대부분의 경우 측정된 PID정수로는 부족한 경우도 있다. 그때는 PID재조정이 필요한데 안정이 될 때까지 다소 시간(정정시간)을 필요로 해도 문제는 없지만, 오버슈트가 발생해 곤란한 경우에는 비례대를 크게 한다.

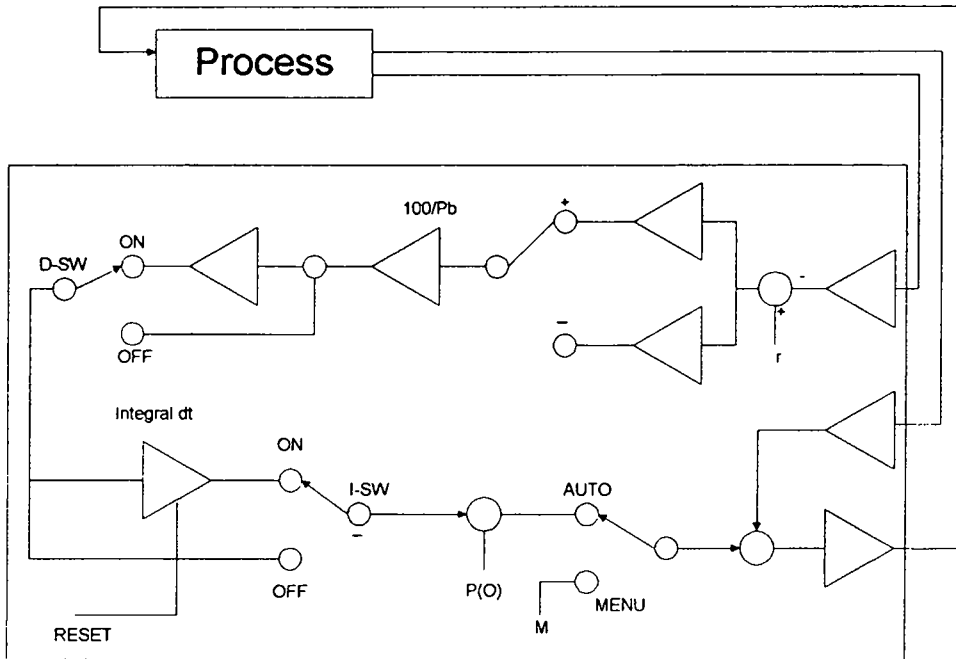


Fig. 6-17. Functional diagram of PID600.

제 5 절 공정자동화 결과 및 고찰

본 절에서는 배양장 시스템에 대해서 행한 제어결과에 대해 논하기로 한다. 실험상 제어를 행한 기간은 3일로 하였으며, 유속은 35%, pH는 7.5 온도는 25도에 세팅하였다. 실험결과는 Fig. 6-18~Fig. 6-20과 같다. 여기서, Fig. 6-18은 pH의 제어결과를 나타내고 있으며, 7.5 범위 내에서 잘 수렴하고 있는 것을 보인다. Fig. 6-19는 온도의 제어결과를 나타내고 있으며, 주변온도가 변하더라도 25 내에서 수렴하는 것을 보인다. 이외의 유속 및 조도의 제어는 개루프적으로 행하였으므로 항상 일정하여, 그래프로는 나타내지 않았다. 제어를 행한 결과 *Chlorella*의 성장곡선을 Fig. 6-20과 같이 나타낸다.

제 6 절 결 론

식물성 플랑크톤인 *Chlorella*를 배양하는 데에는 빛, 온도 그리고 최적 pH 등이 필요하다. 이에 배양공정을 자동적으로 조절하기 위하여 Test-bed형 자동화 시스템을 개발하여 적용시켰고, 배양상태 및 시스템오류 등을 측정하여 시작품형 공정자동화 시스템을 구성하게 되었다. 시작품형 공정자동화 시스템은 본 연구목적인 현장의 어민에게 보급되어 적용되는 것이므로 내구성이 뛰어나고 조작성이 간편하여 연구목적에 적합하였다. 그리고 이번 자동화 시스템개발을 매개체로 하여 일반적으로 낙후되어있는 수산양식분야에도 자동화 시스템을 적용하여 보다 효율적이고 높은 수율을 얻을 수 있도록 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

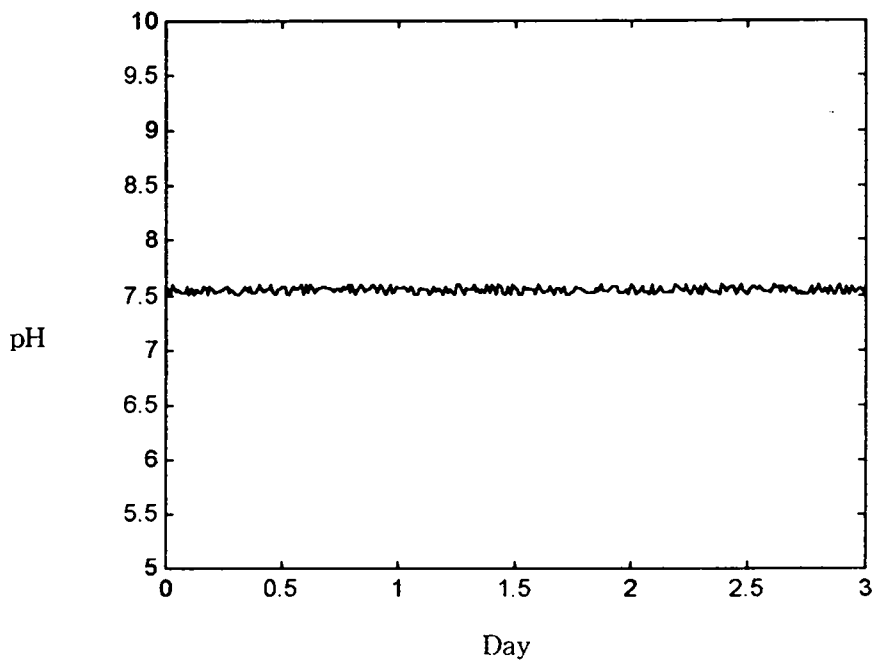


Fig. 6-18. The result of pH control.

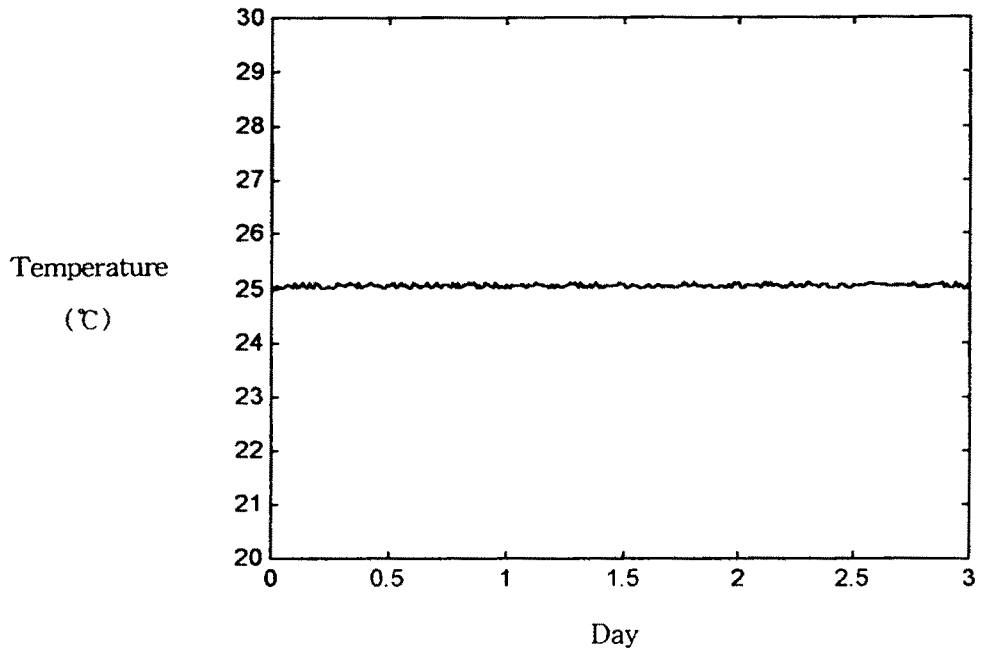


Fig. 6-19. The result of temperature control.

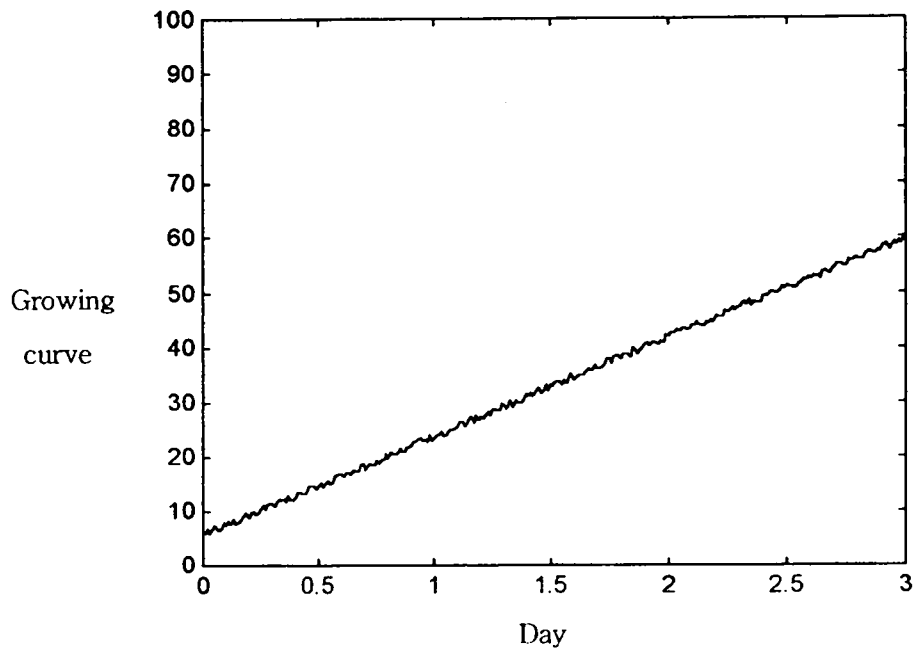


Fig. 6-20. The growing curve of *Chlorella*.

제 7 장 *Chlorella* 보존방법, 해수의 멸균 및 배양조의 현장 적용성

제 1 절 서 설

해산어류 중요 배양장에서 동물성 플랑크톤 또는 치어의 사료인 *Chlorella*를 직접 대량 배양하여 생산하는 경우에는, 수확한 *Chlorella*가 배양액과 함께 생산됨으로 원심분리와 같은 분리공정을 거쳐 $10^{10}/ml$ 정도의 고농도로 농축시킨 *Chlorella*를 보관하여 두고 동물성 플랑크톤 및 치어의 먹이사료로 공급하는 것이 보통이다.

일반적으로 어민들은 외국에서 수입한 농축 *Chlorella*를 보관하였다가 필요한 시기에 이용하고 있다. 이러한 이유로 고농도 농축 *Chlorella*의 보관에 가장 많이 사용하는 방법이 저온에서의 보존이다. 그러나 기존의 고농도 농축제품은 보관이 용이하지만, 어민들이 생산한 *Chlorella*의 경우는 별도의 농축과정을 거쳐야 하고 또한 이 때 오염의 위험도 있으므로 대량으로 보관하고 있지는 않으며, 동결상태로 보관하였다가 필요한 때에 해동하여 사료로 쓰고 있는 것이 일반적이다.

그런데 우리 나라에서의 현재의 *Chlorella* 생산 방법으로는 생산량이 자연의 일기 조건에 절대적으로 좌우되기 때문에 실제 수요량의 상당 부분이 수입품에 의존하고 있는 실정이다. 그리고 치어양식에서는 매일 일정 양의 *Chlorella*를 필요로 하지만 일반적으로 어민들이 행하고 있는 *Chlorella* 배양은 회분배양이어서 배양한 *Chlorella*를 일정기간 저장한 후에 사용하게 된다. 그리고 양식어류의 성장상태 즉, 상품성은 사료의 품질과 밀접한 관계가 있으므로 *Chlorella*의 보관상태는 양식어업에서 매우 중요한 요인이 된다. 따라서 수요를 충족시키면서 품질이 좋은 *Chlorella*를 공급하기 위해서는 대량배양 후에 알맞는 방법으로 농축하여 저장해 두어야 한다.

이와는 별도로 최근 수산식품이 성인병 예방식품 또는 장수식품으로 알려지면서 양식어업이 비약적으로 발전하고 있으며, 생선회의 소비량도 급격하게 늘고 있다. 횡감용 어류는 질병이 없어야 하며, 어류가 생활하는 양식장 또는 횡집수조는 식중독 원인균으로 오염되어 있지 않아야 한다.

그런데 거의 연례적으로 발생하고 있는 생선회로 인한 식중독의 경우, *Vibrio* spp.가 으뜸 원인균으로 지적되고 있다. *Vibrio* spp.에는 현재 30 여종이 알려져 있으며, 그 중에서 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvalis*, *Vibrio hollisae* 등의 12종이 인간의 건강과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Ballows *et al.*, 1991; 유, 1993; 장 등, 1996).

그리고 우리 나라 동서남 해안의 주요 어항인 군산, 충무, 포항 및 부산 지역에서 1992년 4월부터 11월까지 206개 해안에서 해수를 채취하여 조사한 결과를 보면, 병원성 *Vibrio* spp.의 검출율이 44%이며, 수온이 높은 7월에서 9월 사이에는 검출율이 76%에 이르렀다고 한다(유, 1993). 또한 근년에 들어서는 서해안 지역의 양식장에서 어류에 질병을 일으키는 *Vibrio aguilorum*과 같은 *Vibrio* 이외에 바이러스(virus)가 창궐하여 어류양식 어민들에게 막대한 피해를 주고 있다.

이와 같이 어류에 질병을 일으키는 바이러스나 미생물 또는 인간에게 유해한 병원성 *Vibrio* spp.로 오염된 해수가 해산어류 종묘배양장, 양식어장 또는 횃집수조에 공급되는 경우에는 어민들의 피해가 엄청난 규모에 이르게 된다. 이와 관련하여 해산어류 양식어민들은 치어양식에 필수적 기초 사료인 *Chlorella*의 보존방법도 중요하지만, 양식어류에 감염됨으로써 어류에 질병을 일으키거나 기형을 만들어 상품성을 떨어뜨리는 해수 중의 바이러스 또는 병원성 세균의 살멸을 위한 방법의 개발에 오히려 더 큰 관심을 나타내고 있는 실정이다.

그런데 최근 식품산업 분야에서는 해질을 함유하거나 미립자를 포함하고 있는 액상 식품에 대한 옴가열(ohmic heating)법을 이용한 열처리에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식품에 대한 ohmic heating은 1910년대(1911~1920)에 영국 Liverpool 대학의 Beatty와 Lewis가 우유의 저온 살균(pasteurization)에 최초로 적용하였다. 이들은 우유 흐름의 방향과 평행하게 교류 및 직류 전류를 공급하였을 때 우유 성분에 뚜렷한 변화가 있음을 확인하고, 교류 전류가 우유의 열처리에 효과적임을 확인하였다. 이와 거의 같은 시기인 1929년 경에 미국의 Pittsburgh에서는 전극판을 우유의 흐름과 직각이 되게 설치한 ohmic heating 장치의 경우에 전극판 (electrode) 사이의 간격을 짧게 하면, 전압이 낮아도 훌륭한 가열 효과를 얻을 수 있음이 확인되었다.

이와 같이 ohmic heating을 액상 식품에 적용하면서, 식품 산업에서의 다양한 응용 가능성을 제시하였음에도 불구하고, 초기의 연구 이외에 더 이상의 연구는 진행되지 않

았다. 그 이유는 판형 또는 관형 열교환 장치를 이용한 열처리 기술이 급속하게 발전하고, 이어서 고온 처리(UHT-process: Ultra High Temperature process 또는 HTST-process : High Temperature Short Time-process) 기술 등이 발달하면서 이들 기술이 식품에 집중적으로 응용되었기 때문이다.

그러나 점도가 높은 식품을 연속적으로 열처리하거나 또는 고형물 미립자를 함유한 액상 식품을 열처리하고자 하는 경우에는 이들 열처리 기술도 그 적용에 한계를 들어내게 되었다. 그러므로 이러한 식품을 전기적으로 직접 처리하고자 하는 발상이 새롭게 대두되면서, 최근에는 ohmic heating에 대한 연구가 새삼스럽게 진행되고 있다.

식품에 전기 에너지를 공급하면, 식품 자체는 전도체가 아니므로 전기 에너지가 전기 저항열로 전환되어 식품 내부에서 발열이 일어나고, 온도가 급격하게 상승하는 것이 저항 가열의 원리이다. 그런데 음가열에서 가열속도를 좌우하는 주된 인자는 전기전도도이며, 전기전도도는 전해질의 농도에 크게 영향을 받는다(Halden *et al.*, 1990; Sastry and Palania-ppan, 1992; Wang and Sastry, 1993). 그리고 미립자 액상식품의 경우 전해질의 농도가 $0.01\text{g}/\text{cm}^3$ 즉, 1% 이상이면 ohmic heating 효과가 확실하다고 한다(Wang and Sastry, 1993).

한편 해산어류 종묘배양장 또는 해산어류 양식장에 공급되는 해수는 일종의 무기전해질의 수용액으로서 우리 나라 연안의 염분농도는 32‰(3.2%) 정도, 육지로부터 멀리 떨어진 외해의 염분농도는 3.4% 정도이며, 전세계 해양에서 평균 염분농도는 약 3.5%이다. 염분농도가 3.5%인 해수 중의 주요 이온의 농도는, Table 1에 나타낸 바와 같이, Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} 등을 포함하여 3.49878%에 이른다(조 등, 1979). 그러므로 해수를 ohmic heating 처리하면 온도 상승이 매우 빠를 것임을 추측할 수 있다.

Table 1. Content of some electrolytic ions in 1 kg of sea water containing 35g of NaCl

| Ions | Contents(g) | Ions | Contents(g) | Ions | Contents(g) |
|------------------|-------------|---|-------------|-------------------------------|-------------|
| Br ⁻ | 0.067 | H ₂ BO ₃ ⁻ | 0.0045 | Na ⁺ | 10.71 |
| Ca ²⁺ | 0.413 | HCO ₃ ⁻ | 0.140 | SO ₄ ²⁻ | 2.70 |
| Cl ⁻ | 19.27 | K ⁺ | 0.385 | Sr ²⁺ | 0.007 |
| F ⁻ | 0.0013 | Mg ²⁺ | 1.29 | | |

* Total content : 34.9878g

따라서 본 연구에서는 해수 중의 어류 병원성 *Vibrio* spp.의 저온살균을 위하여 해수를 ohmic heating 처리하고 사멸효과를 검토하였다. 그리고 대량배양 후의 *Chlorella*의 보존방법으로는 *Chlorella*의 장기간 저장을 위해 이용되고 있는 항생제 투여와 같은 방법 이외의 방법을 찾고자 하였다.

또한, 본 연구에서 최종적으로 형태를 확정하고 규모를 확대하여 제작한 단세포조류 배양조를 실제 어민들이 사용하는 경우에 기존의 어민들이 이용하고 있는 연못형 배양조와 비교하여 성능면에서 어느 정도 앞서는 가를 확인하기 위하여 제작한 배양조를 현장에 공급하고 어민들이 직접 사용할 수 있도록 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. *Chlorella*의 보존 방법

가. 저온보존법

농축 *Chlorella*를 4℃에 저장하는 냉장법, 25℃에 저장하는 상온저장법, 그리고 동결시킨 후 -5℃에 저장하는 동결저장법을 비교하였다. 이 때, *Chlorella*의 신선도는 50일

동안 저장하면서 D.O. meter를 사용하여 일정한 간격으로 용존산소량을 측정하여 확인하였다. 즉, *Chlorella* 배양액을 폭기시켜 용존산소량을 포화상태로 만든 후 일정 기간 저장하면서 *Chlorella* 이외에 다른 미생물이 생육하면 용존산소량이 감소하는 원리로 산포도를 측정하였다. 이 때, *Chlorella*의 생육을 막기 위하여서는 D.O. 병을 알루미늄 호일로 감싸서 빛의 공급을 차단하였다. 그리고 일정 기간 저장 후의 *Chlorella*는 동물성 플랑크톤인 *Brachionus plicatilis*에 공급하여 섭취여부를 농도의 변화를 기준으로 검토하였다.

나. 분말화 보존법

*Chlorella*를 상온에 보존하는 방법으로서 농축액을 분말화시켜 보존하면서 저장 안정성을 검토하였다. 분말화에는 진공동결건조법과 분무건조법을 이용하였다. 진공동결건조법에서는 *Chlorella* 농축액을 동결시킨 후 동결상태의 얼음을 승화시킨 다음, 갈아서 분말화하였다. 그리고 분무건조법에서는 *Chlorella* 농축액을 $102.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 에서 분무건조시켰으며, 이들 분말 *Chlorella*를 저장하여 두고 *Brachionus plicatilis*에 공급하면서 섭취여부를 농도의 변화를 기준으로 검토하였다.

다. 음가열법

일반 가정용 저주파 교류 전류를 이용하는 음가열 장치를 제작하고 이를 이용하여 온도 $65 \sim 75^\circ\text{C}$, 열전계장도 800V/m 에서 *Chlorella* 농축액을 열처리한 저장 안정성을 검토하였다.

2. 해수의 멸균

가. 음가열 장치의 제작

연구에 사용한 육면체형 static ohmic heating system의 개략도는 Fig. 7-1에 나타내

었다. Kim *et al.*(1996)의 방법에 따라 5.5×12.5cm의 티타늄 전극판을 10cm 간격으로 마주보게 설치하고, 다른 양면과 바닥은 유리판을 설치하여 사용하였다. Ohmic heater는 전체를 나무와 polypropylen으로 보호하여 누전과 방열이 일어나지 않도록 하였다. Ohmic heater의 각 부위의 온도는 An *et al.*(1992) 및 Cho *et al.*(1992)의 방법에 따라 제작한 T-type copper-constantan 열전쌍을 이용하여 측정하였다.

원통형 Ohmic heater는 길이 10cm, 지름이 7cm인 원기둥의 양쪽에 직경 3.5mm의 작은 구멍을 많이 뚫은 티타늄판을 전극으로 설치하여 사용하였다.

온도 감지 센서와 히터 및 펌프의 구동을 위한 증폭기(amplifier)는 IC(integrated circuit) 모듈과 6B50-2 및 6B-11 등의 A/D- 및 D/A-변환기(converter)로 구성하였다. 그리고 전체 가열 시스템은 Fig. 7-2 및 Fig. 7-3의 프로그램에 의하여 자동 운전되도록 하였다.

Ohmic heater 내에서의 온도 조절, 시료액의 공급 및 데이터 수집 등을 모두 자동화하였고, 온도는 PWM(pulse width modulation) 방식으로 제어되도록 하였으며(An *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1992), 전압은 변압기(transformer)로 조절하였다.

나. *Vibrio anguillarum*의 ohmic heating 처리

어류 병원균인 *Vibrio anguillarum*(*V. anguillarum*)을 25±2℃의 TSB 배지에서 48시간 배양한 후, 멸균한 해수에 초기농도 7.6×10⁸/ml가 되게 접종하여 ohmic heating에 사용하였다.

이 때, 해수로는 부산광역시 기장군 시랑리의 국립수산진흥원이 위치한 비교적 맑은 해역에서 채취하여 전해질 이온의 농도가 변하지 않도록 121.1℃에 15분간 멸균하여 사용하였다. Ohmic heating 후의 *V. anguillarum*의 생존 농도는 A.P.H.A.(1984)법에 따라 25±2℃에서 48시간 배양한 후, 집락을 계수하여 나타내었다.

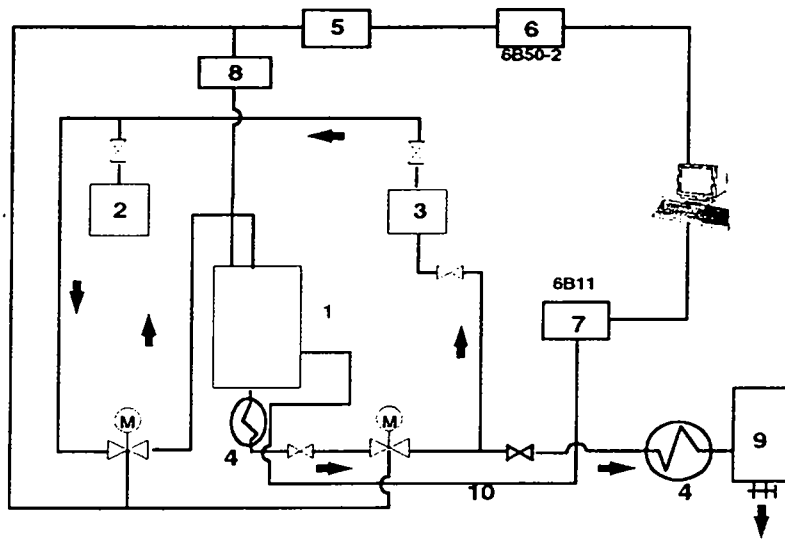


Fig. 7-1. Schematic representation of ohmic heating system

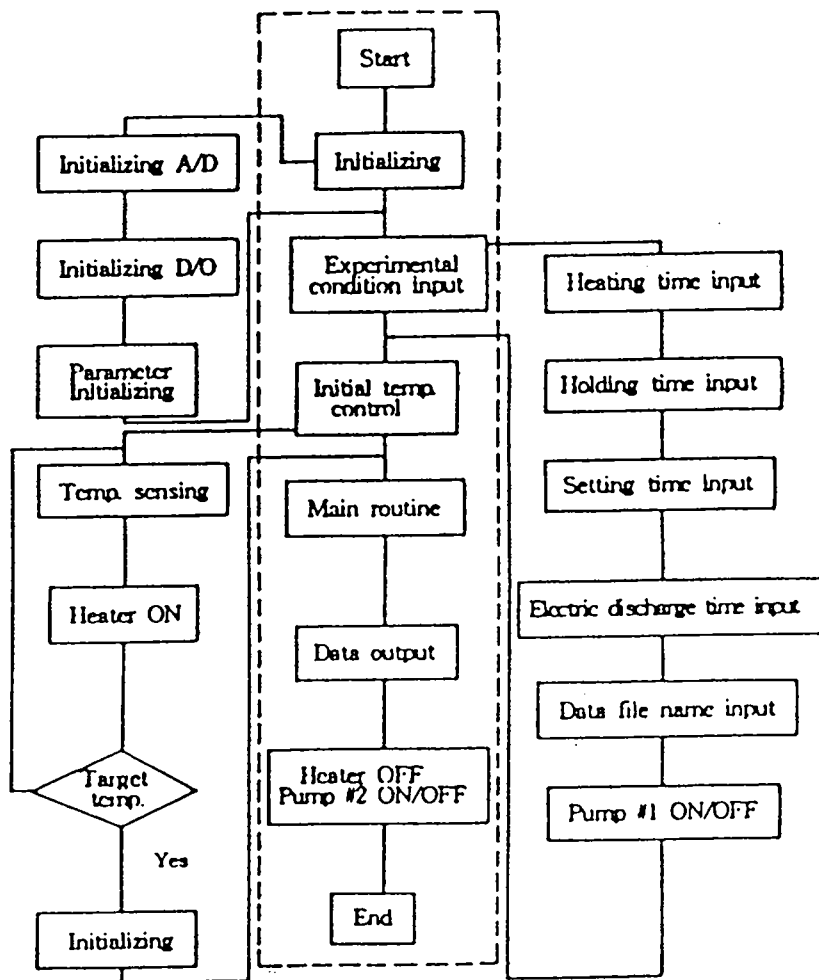


Fig. 7-2. Flow chart of controller operating program.

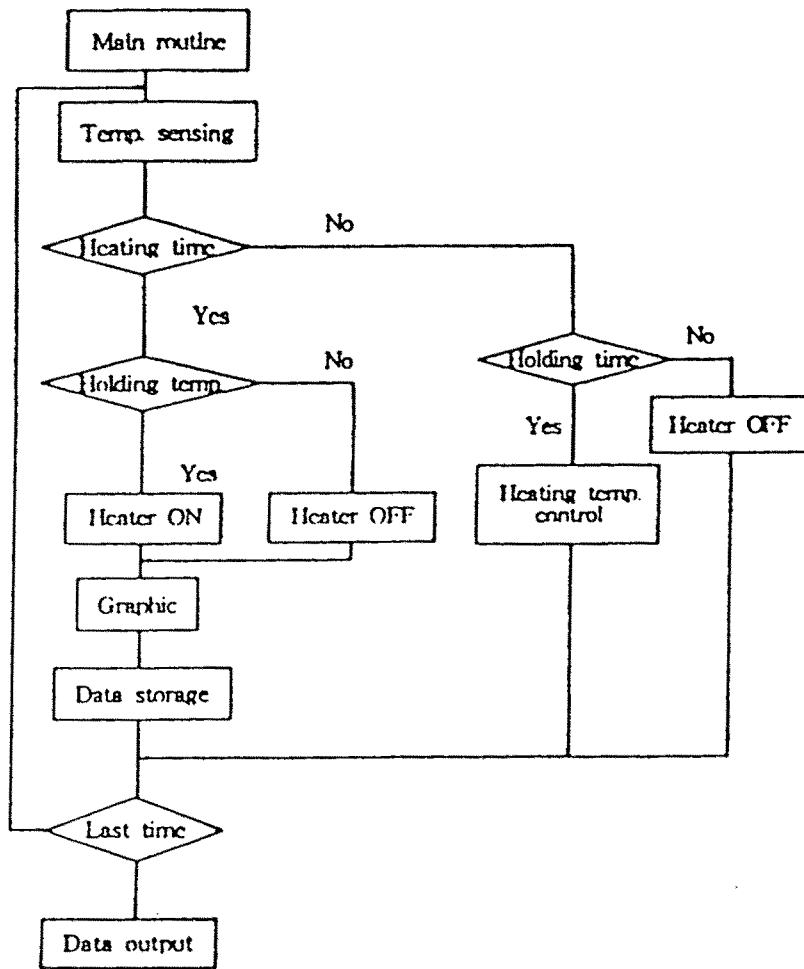


Fig. 7-3. Flow chart of sub-routine program in Fig. 6-2.

3. 경사 평판형 배양조의 현장 적용성

본 연구과제의 개발한 경사 평판형 배양조를 전라남도 여천군에 위치한 “진남배양장”에 공급하고 현장 작용성을 검토하였다. 배양조의 분해, 조립 및 세척 용이성, *Chlorella*의 배양성능 등 현장에서의 적합성을 고려하여 사면 평판형 배양조(Slanting Plate Type Photobioreactor, SPT-PBR)를 현장에 보급하였으며, 현장에서 사용하고 있는 기존의 연못형 배양조(Open Pond Type Photobioreactor, OPT-PBR), 해수, *Chlorella*, 그리고 시비용 배지를 그대로 이용하면서 두 배양조의 성능을 비교하였다.

그리고 현재 충청남도 서산에 위치한 “해인수산”에서도 사면 평판형 배양조를 이용하여 현장적용 실험중이다.

가. 현장 적용 기간

진남배양장 : 1997년 8월 4일 ~ 현재 (전라남도 여천군)

해인수산 : 1997년 9월 27일 ~ 현재 (충청남도 서산군)

나. *Chloella*의 배양과정

먼저 진남배양장의 연못형 배양조에서 *Chlorella*를 여과하여 사면 평판형 배양조에 접종시켜 배양하였다. 그리고 연속배양이 가능한 농도까지 배양한 후 배양액을 회수하고, 회수한 만큼의 바닷물을 배양조에 여과, 보충한 다음 *Chlorella* 배양액을 시비하여 배양시키면서, *Chlorella*가 최고 농도에 이를 때까지의 시간 및 성장률을 조사하여 생산량을 산출하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. *Chlorella*의 보존 방법

가. *Chlorella*의 냉장 및 동결보존

저온보존법은 각종 변질의 유발 원인이 되는 미생물 및 효소의 활성, 저장물 성분간의 화학반응 등을 억제시킴으로써 품질변화를 최소화시키는 방법이다. 이 방법은 *Chlorella*를 천연 상태에 가깝게 보존할 수 있다는 점에서 다른 저장법에 비하여 우수한 방법이며, 특히 *Chlorella*를 단기간 보관할 때에 유리한 방법이다.

본 연구에서의 농축 *Chlorella*액의 초기 용존산소량은 6.2였고, 45일 후의 용존산소량은 4℃에 냉장보관한 것의 용존산소량이 4.1로서 가장 많아서 미생물에 의한 오염이 제일 적은 것으로 판단되었다. 그 다음으로는 동결상태로 보관한 것의 용존산소량이 2.0으로서 오히려 4℃에 냉장보관한 경우보다 용존산소량이 적었다. 온도조절을 하지 않고 상온에 보관한 농축 *Chlorella*액의 용존산소량은 0.6, 그리고 25℃에 보관한 것은 그 양이 0.4였다. 이러한 용존산소량의 변화는 *Chlorella*를 동결상태로 보장하는 것보다는 저온에서 냉장저장하는 것이 오히려 저장상태가 가장 합리적임을 의미하는 것이지만, 동시에 저온보존법이 장기간 저장 중인 *Chlorella*의 품질변화를 완벽하게 막을 수 있는 방법은 아님을 입증하는 결과이기도 하다.

저장 후의 *Chlorella*를 건조시킨 후 분말상태로 만들어 *Brachionus plicatilis*에 공급한 결과, 분말상태의 *Chlorella*도 *Brachionus plicatilis*가 먹이로 섭취함을 확인할 수 있었다. 그러므로 농축 *Chlorella*액의 보관 중에 발생하는 변질을 방지하기 위하여 항생제를 사용하는 경우도 있으나, *Chlorella*액을 분말화한다면 특별한 항생제의 투여 없이도 장기간 보관이 가능한 방법이 될 수 있음을 확인하였다.

나. *Chlorella*의 분말화 보존

농축 *Chlorella*를 분말화하면 부피가 대폭 작아져서 보존이 용이할 뿐만 아니라 분말 자체의 수분함량이 적어 수분활성이 낮기 때문에 미생물의 생육이나 각종 변질을 일으킬 수 있는 요인의 반응성이 억제되어 상온에서의 장기간의 저장이 가능하게 된다.

본 연구에서 농축 *Chlorella*를 진공동결건조시킨 후에 분말화하여 사료로 공급하였을 때, *Brachionus plicatilis*가 이를 먹이로 섭취함을 확인할 수 있었다. 또한 $102.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 에서 분무건조시킨 후 이를 *Brachionus plicatilis*에 사료로 공급하였을 때에도 이를 섭취함을 확인할 수 있었다.

다. *Chlorella*의 음가열 처리

해수는 일종의 무기전해질의 수용액으로서 평균 염분농도는 약 3.5%이다. 이 염분은 음가열시에 전해질로 작용하여 해수의 온도를 순간적으로 급격하게 상승시킬 수 있어서, *Chlorella* 배양액을 음가열 처리하였다. 그러나 식물성 세포의 세포벽을 손상시키는 온도대에서 열처리 하여도 예상처럼 순간적으로 불활성화되지는 않았다. 그리고 충분한 불활성화를 위하여 장시간(10분 정도) 열처리하였을 때에는 *Chlorella*가 검게 변색되는 현상이 확인되었다. 이를 방지하기 위하여 배양액의 pH를 알칼리 영역으로 조절하면, 초기에는 변색되지 않으나, 음가열 처리 시간이 길어지면 역시 검게 변색됨이 확인되었다. 따라서 현재의 ohmic heating system을 *Chlorella*의 순간적 불활성화에 이용할 수 없음이 확인되었다. 이의 개선을 위하여서는 현재의 ohmic heating system의 주파수를 고주파로 변경시켜야 음가열 처리에 의한 *Chlorella*의 순간적 불활성화가 가능하리라 예측되며, 이를 위한 연구가 지속되어야 할 것이다.

2. 해수의 멸균

가. 해수의 가열 속도

바닷물을 ohmic heating 처리하였을 때, 일정한 전계강도에서 운전온도 $T(^{\circ}\text{C})$ 에 도달하는 시간 $t(\text{sec})$ 를 Fig. 7-4에 나타내었다.

Ohmic heater에 공급하는 전류의 전압이 높을수록 해수가 운전온도 T 에 도달하는 시간 t 가 단축되었다. Ohmic heating system으로 열처리하는 액상 미립자 식품의 가열속도를 좌우하는 주된 인자는 전기전도도 $k(\text{S/m})$ 이며, 전기전도도는 전해질의 농도에 크

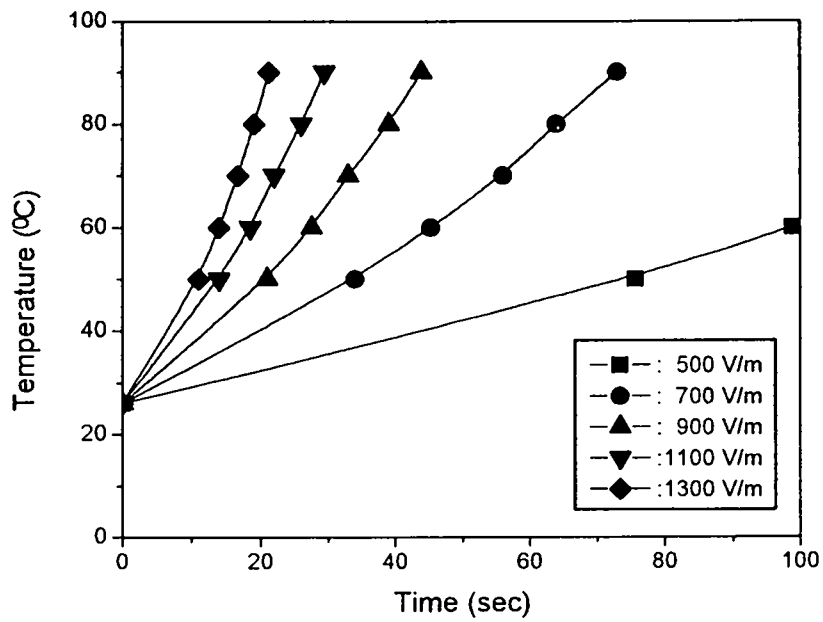


Fig. 7-4. Time-temperature profiles of sea water during ohmic heating at 60Hz .

계 영향을 받는다(Halden *et al.*, 1990; Sastry and Palaniappan, 1992; Wang and Sastry, 1993). 그리고 ohmic heating시의 일의 양 $P(W/m^3)$ 는 전류밀도 $J(A/m^2)$, 전계강도 $E(V/m)$ 및 전기전도도로부터 식 (7-1)과 같이 나타내어진다(Kessler, 1996).

$$P = E^2 \cdot k = J^2/k \quad (7-1)$$

즉, 일정 온도에서 전기전도도가 일정할 때, 전류밀도가 커지면 전계강도가 커진다. 또한, 액상 미립자 식품의 전기전도도는, $20^\circ\text{C} \leq T \leq 90^\circ\text{C}$ 의 범위에서, 식 (7-2)에서와 같이 전류밀도에 따라 직선적으로 증가한다(Reitler, 1990). 여기서 k_0 와 b_0 는 0°C 에서의 전기전도도와 온도계수(-)이다.

$$k = k_0 \cdot (1 + b_0 \cdot J) \quad (7-2)$$

식 (7-1)과 (7-2)로부터

$$k = k_0/(1 - k_0 \cdot b_0 \cdot E) \quad (7-3)$$

그러므로 전압을 높였을 때는 전계강도가 커짐에 따라 해수의 전기전도도가 커지기 때문에 온도가 급격하게 상승한 것으로 생각되었다.

온도 $50^\circ\text{C} \leq T \leq 80^\circ\text{C}$, 전계강도 $500\text{V/m} \leq E \leq 1,300\text{V/m}$ 의 범위에서 해수가 운전온도에 도달하는 시간은 Fig. 7-4의 결과로부터 식 (7-4)와 같이 나타낼 수 있었다. 그리고 식 (7-4)로부터의 추정 시간 t_{pr} 을 실측 시간 t_{ex} 와 비교하였을 때, Fig. 7-5에서와 같이 t_{pr} 은 t_{ex} 와 잘 일치하였다.

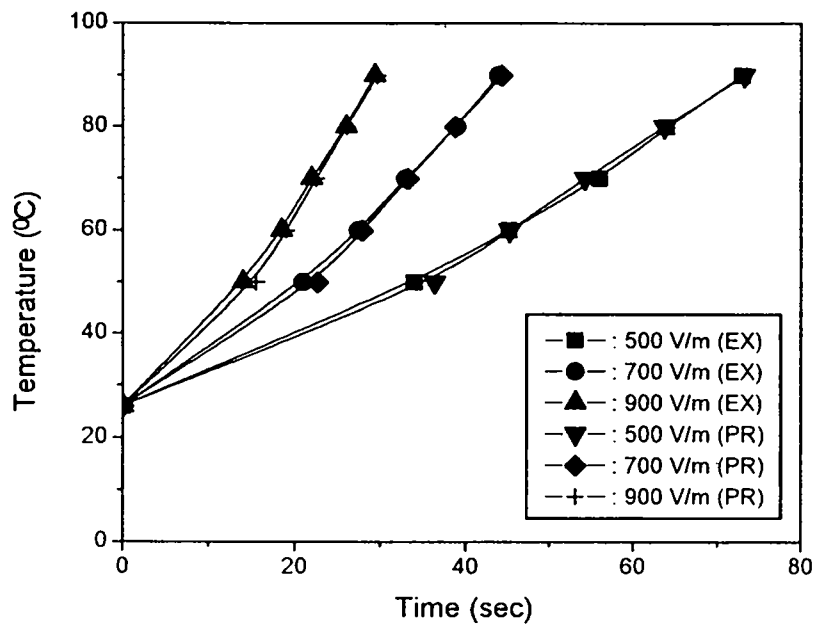


Fig. 7-5. Experimental and predicted time-temperature profiles of sea water.

$$\text{Log } t_{pr} = - (0.4048 \cdot \log T + 1.2022) \cdot \log E + (2.3388 \cdot \log T + 2.9651) \quad (7-4)$$

나. *Vibrio anguillarum*의 사멸

본 연구에서 해수를 ohmic heating 처리하였을 때의 *V. anguillarum*의 사멸곡선을 Fig. 7-6에 나타내었다. 일반적으로 식품 중의 *Vibrio* spp.는 내열성이 그리 크지 않으며, *Vibrio parahaemolyticus*는 60℃에서 5min, 55℃에서 10min의 열처리로 사멸한다고 알려져 있다. 주파수 60Hz, 전계강도 800V/m에서 해수 중의 *V. anguillarum*의 농도는 운전온도 60℃에서는 급격한 감소를 보이지 않았다. 그러나 운전온도 70℃에 도달하는 42sec 동안에 초기 농도의 $10^{-3.9}$ 으로, 그리고 80℃에 도달하는 49sec 동안에는 $10^{-5.6}$ 으로 급격하게 감소하였다.

충무 지역의 서호내만의 패류 양식장 부근에서 1995년 7월부터 10월 사이에 패류, 동물성 플랑크톤인 copepod 및 표층의 해수를 채취하여 조사한 장 등(1996)의 결과에 따르면, 병원성 *Vibrio* spp.의 최대 농도가 패류 1g당 7.2×10^2 , copepod 1개체당 7.3×10^2 , 그리고 표층 해수의 경우에는 1ml당 3.0×10^2 라고 한다.

이러한 해수를 Fig. 7-6의 결과를 이용하여 전계강도 800V/m에서 ohmic heating 처리하면 70℃까지 온도를 상승시키는 42초 동안에 해수중의 *V. anguillarum*의 농도를 3.0×10^2 /ml에서 $10^{-3.9}$ 에 해당하는 7.5×10^6 /ml까지, 그리고 80℃에 도달하는 49초 동안에는 $10^{-5.6}$ 에 해당하는 7.5×10^6 /ml까지 감소시키게 된다. 이 때, 전계강도를 높이면 해수의 온도상승속도 및 *Vibrio* spp.의 사멸속도가 더욱 빨라지게 된다.

그러므로 이와 같은 방법으로 ohmic heating 처리한 해수를 냉각기를 통과시켜 종묘배양장 또는 양어장에 공급하되, 해수를 순환시키며 연속적으로 ohmic heating 처리함으로써 해수 중의 어류 병원성의 *Vibrio* spp.를 충분히 사멸시킬 수 있다고 믿어진다.

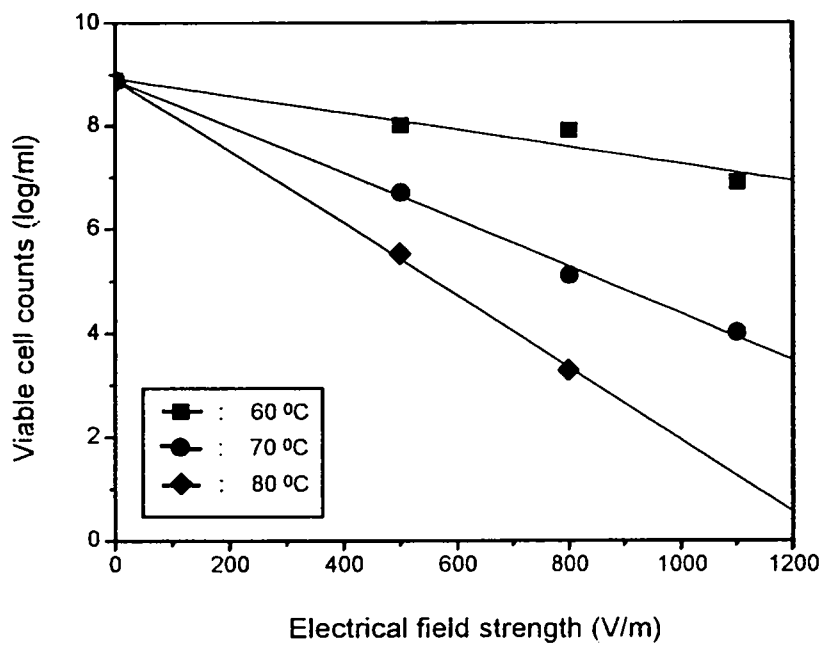


Fig. 7-6. Survival curves of *V. anguillarum* during static ohmic heating at 60Hz and 800V/m.

3. 배양조의 현장 적용성

기존의 연못형 배양조(Photo 7-1)에서는 *Chlorella*의 최고 농도가 10^7 cell/ml 였고, 사면 평판형 배양조(SPT-PBR, Photo 7-2)에서는 10^8 cell/ml 여서, 사면 평판형 배양조가 연못형 배양조에 비하여 *Chlorella*의 농도를 약 10배 정도 높일 수 있었다.

배양액의 회수방법을 비교하면, $60\text{m}^3(60\text{M}/\text{T})$ 규모의 연못형 배양조에서는 *Chlorella*가 최고농도에 이르기까지 3일이 소요되었으므로, 3일에 한번 배양액을 회수하였으며, 이 때의 회수 총량은 $40\text{m}^3(40\text{M}/\text{T})$ 이었다. 그러나 $0.5\text{m}^3(0.5\text{M}/\text{T})$ 규모로 제작한 사면 평판형 배양조의 경우에는 *Chlorella*가 하루만에 최고농도에 이르렀으며, 매일 $0.25\text{M}/\text{T}$ 의 배양액을 회수할 수 있었다. 이와 같은 배양결과를 Table 7-1 에 간략하게 나타내었다.

배양조 단위 체적당 하루에 생산되는 *Chlorella*의 양은 0.5m^3 규모의 경사 평면형 배양조의 경우 $5.00 \times 10^{13} \text{ cells/day}/\text{m}^3$ 이며, 이는 전남배양장의 60m^3 규모의 연못형 배양조의 생산량 $2.22 \times 10^{12} \text{ cells/day}/\text{m}^3$ 의 22.5배에 이른다.

이상의 배양결과 비교에서 알 수 있듯이, 경사 평면형 배양조는 체적이 연못형 배양조의 1/120이면서도, 1일 1m^3 당의 *Chlorella* 생산량은 연못형 배양조의 22.5배여서 적은 면적에서 대량배양이 가능하였다.

그리고 경사 평면형 배양조는 밀폐형 배양조이기 때문에 연못형 배양조와는 달리 각종 미생물에 의한 오염이 방지되었으며, 배양액의 증발도 방지되는 이점이 있음이 확인되었다.

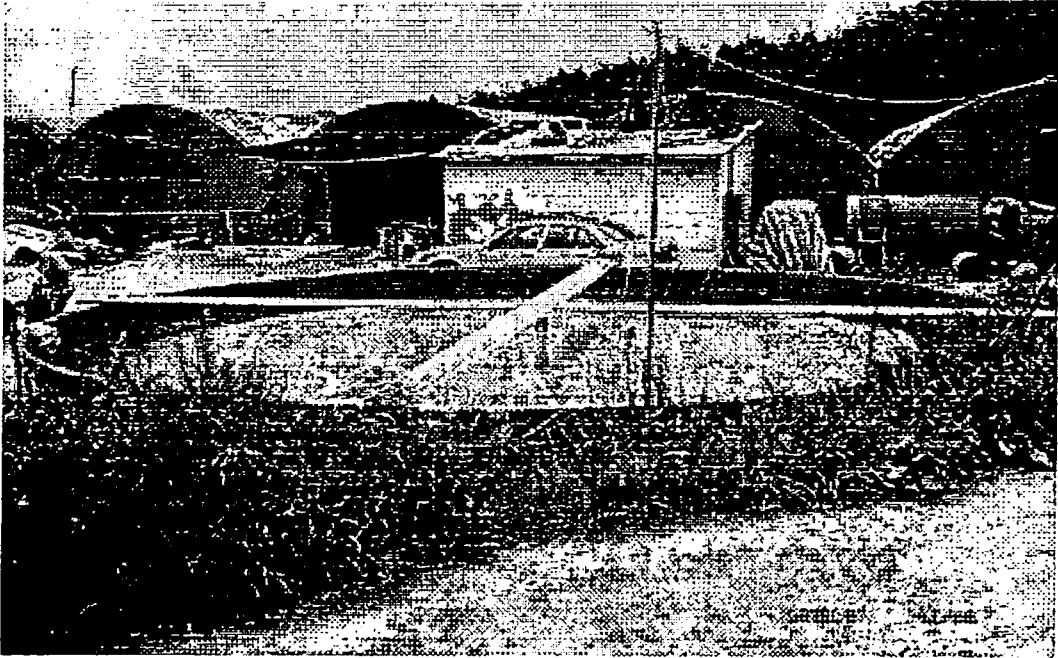


Photo 7-1. Open Pond Type Photobioreactor in Jin-Nam aquaculture.

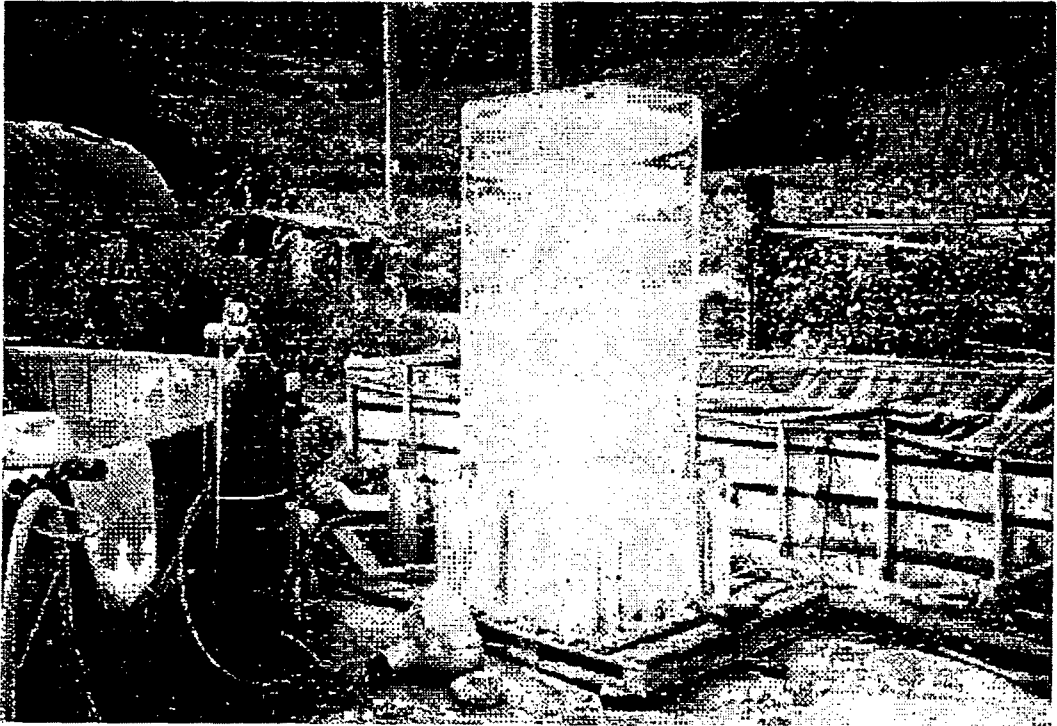


Photo 7-2. Slanting Plate Type Photobioreactor.

Table 7-1. Comparison of the magnitude and cell concentration of *Chlorella* sp. between the Open Pond Type and Slanting Plate Type Photobioreactor

| Reactors | Open Pond Type Photobioreactor (연못형 배양조) | Slanting Plate Type Photobioreactor (경사 평면형 배양조) |
|--|---|---|
| Total culture volume | 60 m' | 0.5 m' |
| Maximum cell concentration | 10 ⁷ cells / ml (10 ¹³ cells / m') | 10 ⁸ cells / ml (10 ¹⁴ cells / m') |
| Reproduction time | 3 days | 1 day |
| Discharged culture volume | 13.33 m'/day | 0.25 m'/day |
| Produced cell concentration | 1.33 × 10 ¹⁴ cells/day | 2.5 × 10 ¹³ cells/day |
| Produced cell concentration per unit time and volume | 2.22 × 10 ¹² cells/day/m' | 5.00 × 10 ¹³ cells/day/m' |

제 4 절 결 론

농축 *Chlorella*의 장기간 보관을 위하여 4℃에서의 냉장저장, 동결저장 및 25℃에서의 상온저장법을 45일 동안 비교하였을 때, 동결저장보다 오히려 4℃에서의 냉장저장한 것이 신선도가 가장 우수하였으며, 동물성 *Brachionus plicatilis*에 직접 사료로 제공하였을 때 섭취함을 확인하였다. 이 경우에는 *Chlorella*가 스스로 chlorellin이라는 항균물질을 생성하여 오염 미생물에 대해서 내성이 매우 강하기 때문에 단기간 저장으로 인한

품질변화는 거의 없었다고 생각되었다. 또한, 진공동결건조 또는 분무건조법으로 *Chlorella*를 분말화한 후 진공포장하여 3개월간 저장한 것도 *Brachionus plicatilis*가 사료로 섭취함을 확인하였으며, 분말화한 것은 상온에서의 장기간 저장이 가능하였다.

육상의 해산어류 종묘배양장 및 양식장에 공급되는 해수가 어류 병원균으로 오염되어 있을 경우에는 어민들의 피해가 막심하지만, 본 연구의 결과에 따라 가정용 저주파 교류 전류를 사용하는 ohmic heating system으로 800V/m에서 80℃로 해수를 음가열 처리함으로써 49초 이내에 이러한 피해를 완벽하게 방지할 수 있다고 판단된다.

그리고 본 연구에서 개발한 경사 평면형 배양조는 체적이 연못형 배양조의 1/120이면서도, 1일 1m²당의 *Chlorella* 생산량은 연못형 배양조의 22.5배여서 적은 면적에서 대량 배양이 가능하였다. 또한 기존의 연못형 *Chlorella* 배양장을 어류 양식장으로 사용하고 본 연구에서 개발한 경사 평면형 배양조를 *Chlorella*의 배양장에 사용한다면, 배양조 자체가 완전 자동화되어 있어서 작은 면적에서 연중 무휴로 *Chlorella* 를 배양할 수 있음을 확인하였다.

참고 문헌

- Aaronson, S., DeAngelis, B., Frank, O. & Baker, H. (1971). Secretion of vitamins and amino acids into the environment by *Ochromonas danica*. *Journal of Phycology*, 7, pp. 215-218.
- A. H. Jazwinski, (1970). Stochastic processes and filtering theory, Academic, New York.
- Abezt, P. (1980). Seaweed extracts : have they a place in Austriaian agriculture or horticulture? *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 46, pp. 23-29.
- An, H. W., H. D. Cho, B. H. Han and S. B. Kim. (1992). A control system for automization of food processing process. *J. Kor. Fisch. Soc.*, 25(6), pp. 511-519.
- A.P.H.A (1984). Compendium of methods for the microbiological experiment of foods. Am. Pub. Health Assoc., Inc., New York, p. 17.
- Aubert, M., Aubert, J. & Gauthier, M. (1979). Antibiotic substances from marine flora. In *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, ed. H. A. Hoppe, T. Levring, & Y. Tanaka, pp. 267-91. Berlin : Waller de Gruyter.
- Ballows, A., W.J. Hausler. Jr., K.L. Herrmann and H.J. Shadomy. (1991). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM, pp. 384-395.
- Bauernfeind, J. C. (1976). Canthaxanthin : a pigment for salmonids. *Progress in Fish Culture*, 38, pp. 180-183.
- Balloni, W., Florenzano, G. & Favilli, F. (1968). Etetto attivatore di estratti algali sulla crescita e l'attivita del microorganismi azotofissatori. *Ricerca Scientifica*, 38, pp. 994-995.
- Barker, H. A. (1935) The culture and physiology of the marine dinoflagellates, *Arch. Mikrobiol.*, 6, pp. 157-181

- Batra, P. P. & Tollin, G. (1964). Phototaxis in Euglena. I. Isolation of the eyespot granules and identification of the eyespot pigments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 79, pp. 371-378.
- Becker, E.W. (1981). Algae mass cultivation - production and utilization. *Process Biochemistry*, 8/9, pp. 10-14
- Benema, J.R. (1989). Microalgal biotechnology - products, processes and opportunities. OMEC Intern. Inc.
- Bristol-Roach, B. M. (1928) On the influence of light and glucose on the growth of a soil alga, *Ann. Bot.*, 42, pp. 317-345
- Burlew, J.S. (1953). Algal Culture from laboratory to pilot plant, Carnegie Institute of Washington Publication 600, Washington DC.
- Burlew, J. S.(1953b). Current status of large-scale culture of algae. In Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant, ed. J. S. Burlew, pp.3-23. Washington DC: Carnegie Institution.
- Carlucci, A. F. & Boves, P. M. (1970). Production and utilization of dissolved vitamins by marine phytoplankton. In Effects of the Ocean Environment on Microbial Activities, ed. R. R. Colwell & R. Y. Monta, pp. 449-56. Baltimore : University Park Press.
- Chang. R., 이명재외 5인 공저. (1994). *물리화학*. pp. 330-34. 형설출판사.
- Cho, H.D., B.H. Han, S.B. Kim and Y.G. Ok. (1992). Development of F_0 -value measuring system *J. Kor. Fish. Soc.*, 25(6), pp. 520-528.
- Davis, E. A., Dedrick, J., French, C. S., Milner, H. W., Myers, J., Smith, J. H. C & Spoer, H. A.(1953). Laboratory experiments on Chlorella culture at the Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology. In Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant, ed. J. S. Burlew, pp.105-53. Washington, DC : Carnegie Institution.

- D. Dochain and G. Bastin. (1984). Adaptive Identification and Control algorithms for Nonlinear Bacterial Growth Systems, *Automatica*, 20-5, pp. 621-634.
- D. G. Mou and C. L. Cooney. (1983). Growth Monitoring and Control Through Computer Aided On-line Mass Balancing in a Fed-Batch Penicillin Fermentation, *Biotech. Bioeng.*, 25, pp. 225-255.
- Doucha, J. (1991). The influence of dissolved oxygen concentration on the productivity of algae. Potsdam-Tebon joint project report.
- Dubinsky, Z., Berner, T. & Aaronson, S. (1978). Potential of large-scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 8, pp. 51-68.
- Emerson, R., and L. Green (1938) Effect of hydrogen-ion concentration on *Chlorella* photosynthesis, *Plant Physiol.*, 13, pp. 157-168
- Emodi, A. (1978). Carotenoids: properties and applications. *Food Technology*, 32, pp. 38-42
- Fingerhut, U., Webb, L. E. & Soeder, C. J. (1984). Increased yields of *Rhizobium japonicum* by an extract of the green alga, *Scenedesmus obliquus*(276-3a). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, pp. 358-360.
- Fogg, G. C. Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. II. In relation to carbon and nitrogen metabolism, *Ann. Bot. (n. s.)*, 13, pp. 241-259
- Furusawa, E. & Furusawa, S. (1985). Anticancer activity of a natural product, Vita-Natural, extracted from *Undaria pinnatifida* on interperitonally implanted Lewis lung carcinoma. *Oncology*, 42, pp. 361-369.
- G. Bastin and D. Dochain. (1986). On-line Estimation of Microbial Growth Processes, *Automatica*, 22, pp. 705-709.
- Gellenbeck, K. W. & Champman, D. J. (1983). Seaweed uses : the outlook for mariculture. *Endeavour*, NS, 7, pp. 31-37.

- Greig, M. E., and J. C. Hoogerheide (1941) The correlation of bacterial growth with oxygen consumption, *Jour. Bact.*, 41, pp. 549-556
- Gudin, C. and D. Chaumont. 1991. Cell Fragility - The key problem of microalgal mass production in closed photobioreactors. *Biores. Technol.*, 38, pp. 145-151.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryter. (1962). Studies of marine planktonic diatom, I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea*. *Gram. Can. J. Microbiol.*, 8, pp. 229-239.
- Guillard, R. R. L. & Wangersky, P. J. (1958). The production of extracellular carbohydrates by some flagellates. *Limnology and Oceanography*, 3, pp. 449-454.
- Haeder, D.P. (1993). Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems in - Tevini M UV-B radiation and ozone depletion - Effects on humans, animals, plants, microorganism, and materials. Lewis Publishers, Boca Raton, London, Tokyo, pp. 155-191.
- Hawker, J. S., Marschner, H. & Krauss, A. (1979). Starch synthesis in developing potato tubers. *Physiologia Plantarum*, 46, pp. 25-30.
- H. Shimizu, E. Sada, S. Shioya and K. Suga. (1989). Measurement of enzyme reaction rates using advanced PH control system, *Biotech. Bioeng.*, 33, pp. 794-803.
- Halden, K., A.A.P. de Alwis and P.J. Fryer. 1990. Changes in the electrical conductivity of foods during ohmic heating. *International J. Food Sci. Technol.*, 25, pp. 9-25.
- H. B. Verbruggen, G. Eelderink and P. M. Van den Broecke. (1985). Multiloop controlled fed-batch fermentation process using a self-tuning controller, *proc. of IFAC Modeling and Control of Biotech. processes*, Noordwijkerhout, pp. 121-126.

- Honert, T. H. van den (1929) Studies on limiting factors in carbon dioxide assimilation, *Proc. R. Acad. Sci. Amsterdam*, 32, pp. 1008-1021
- Izawa, S., Heath, R. L. & Hind, G. (1969). The role of chloride ion in photosynthesis. III. The effect of artificial electron donors upon electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 180, pp. 388-398.
- J. K. Li and A. E. Humphrey. (1992). Factors affecting culture fluorescence when monitoring bioreactors, *J. Ferment, Bioeng.*, 74, pp. 104-111.
- Jackson, P. S. (1981). A note on a possible association between plasma β -carotene levels and conception rate in a group of winter-housed dairy cattle. *Animal Production*, 32, pp. 109-111.
- K. Shimizu. (1993). An Overview on the Control System Design of Bioreactors, *Adv. Biochem. Eng., Bio-tech.*, 50, pp. 65-84.
- K. Schugerl. (1991). On-line Analysis of Broth", *Biotechnology*, 4, pp. 150-178.
- K. Schugrel, L. Brandes, T. Dullau, K. Holzhaure-Riger, S. Hotop, U. Hubner, X. Wu, and W. Zhou. (1993). Fermentation monitoring and control by on-line flow injection and liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 249, pp. 87-100.
- Kanazawa, T., Yuhara, T. & Sasa, T. (1958). Mass culture of unicellular algae using the open circulation method. *J. General and Appl. Microbiology*, 4, pp. 135-52.
- Kessler, H.G. (1996). Lebensmittel-und Bioverfahrenstechnik, Molkereitechnologie. TU München-Weihenstephan. pp. 346-352.
- K. Dairaku, E. Izumoto, H. Morikawa, S. Shioya and T. Takamatu. (1983). An Advanced Micro-Computer Coupled Control System in a Baker's Yeast Fed-Batch Culture Using a Tubing Method, *J. Ferment. Technol.*, 61, pp. 189-196.
- Kim, S.H., G.T. Kim, J.Y. Park, M.G. Cho and B.H. Han. (1996). A study on the ohmic heating of viscous food. *Foods and Biotechnol.*, 5(4), pp. 274-279.

- Krinsky, N. E. (1976). In *The Survival of Vegetative Microbes*, Symposia of the Society for General Microbiology, vol. 26, ed. T. G. R. Gray & J. R. Postgate, pp. 209-39. Cambridge : Cambridge University Press.
- Krauss, R. W. (1958). Physiology of the fresh-water algae. *Annual Review of Plant Physiology*, 68, pp. 207-44.
- Kremer, B. P. (1980). Taxonomic implications of algal photoassimilate patterns. *British Phycological Journal*, 15, pp. 399-409.
- Lee, Y.K. (1992). The productivity of outdoor algal cultures in a closed tubular photobioreactor. proc. 1st Asia-Pacific Conference, Kuala Lumpur.
- Lwoff, M. & Lwoff, A. (1930). Determination experimentale de la synthese massive de pigment carotinoide par le flagelle *Haematococcus pluvialis* Flot. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de la Societe Biologie*, Paris, 105, pp. 454-456.
- Metzler, D. E. (1977). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. New York: Academic Press.
- Maerkl, H. (1992). Cultivation of *Escherichia* to high cell densities in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, pp. 48-52.
- Mason, M. M. (1935) A comparison of the maximal growth rates of various bacteria under optimal conditions, *Jour. Bact.*, 29, pp. 103-110
- Matsunaga, T.H. H. Takeyama. (1991). Glutamate production from CO₂ by marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. using a novel photobioreactor employing light-diffusing optical fibers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29, pp.157-167.
- Matsunaga, T. (1993). An optical fiber photobioreactor for enhanced production of the marine algae *Isochrysis* aff. *galbana* T-Iso (Utex LB 2307) rich in docosahexaenoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, pp. 456-459.
- Moorehouse, A. L. (1961). Dried algae meal as a source of xanthophyll for egg

- yolk pigmentation. *Poultry Science*, 145, pp. 586-587.
- Myers, J. (1946) Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. III. Influence of light intensity on cellular characteristics of *Chlorella* *Jour. Gen. Physiol.* 29, pp. 419-427
- Myers, J. (1946) Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. IV. Influence of light intensity on photosynthetic characteristics of *Chlorella* *Jour. Gen. Physiol.* 29, pp. 429-440
- Myers, J. (1947) Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. V. Influence of the composition of the nutrient medium *Jour. Gen. Physiol.* 22, pp. 590-597
- Myers, J., J. N. Phillips, Jr., and F.-R. Graham (1951) On the mass culture of algae *Plant Physiol.* 24, pp. 111-119
- Nelson, W. R. & Van Staden, J. (1985). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid in seaweed concentrates. *Botanica Marina*, 28, pp. 415-417.
- Nicholls, B. W. & Appleby, R. S. (1969). The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. *Phytochemistry*, 8, pp. 1907-1915.
- Östelind, S. (1948) Growth conditions of the alga *Scenedesmus quadricauda* with special reference to the inorganic carbon sources, *Symbolae Bot. Upsal.* 10 (no. 3), 1-141
- Pearsall, W. H., and R. P. Bengry (1940) Growth of *Chlorella* in darkness and in glucose solution, *Ann. Bot. (n. s.)* 4, pp. 365-377
- Pearsall, W. H., and L. Loose (1937) Growth of *Chlorella vulgaris* in pure culture, *Proc. Roy. Soc. London B121*, pp. 451-501
- Persival, E. & Foyle, A. J. (1979). The extracellular polysaccharide of *Porphyridium aeruginosum*. *Carbohydrate Research*, 72, pp. 165-76.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. & Sporn, M. B. (1981). Can dietary

- beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290, pp. 201-208.
- Phelps, A. (1936) growth of protozoa in pure culture, *Four. Exp. Zool.*, 72, pp. 479-496
- Pratt, R. (1944) Studies on *Chlorella vulgaris*. IV. influence on growth of *Chlorella* of continuous removal of chlorellin from the culture solution, *Amer. Jour. Bot.* 31, pp. 418-421
- Pulz, O. (1991). Einrichtung zur Kultivation photoautotropher Mikroorganismen. Patent Nr., 413.
- Pulz, O. (1992a). Open-air and semi-closed cultivation systems for the mass cultivation of microalgae, 1st Asia-Pacific Conference Algal Biotechnol., Kuala Lumpur.
- Pulz, O. (1992b). Cultivation techniques for microalgae in open and closed systems. Proceedings of the first European Workshop on microalgal biotechnology, pp. 61-66.
- R. A. Majewski and M. M. Domach. (1990). Simple Constrained-Optimization View of Acetate Overflow in *E. coli*, *Biotech. Bioeng.*, 35, pp. 732-739.
- Reitler, W. (1990). Konduktive Erwärmung von Lebensmitteln. Diss. TU München.
- Ramos de O.A., J.C. Roux and A. Fourcy. (1984). Cultures intensives de chlorelles sous rayonnement solaire dans divers systemes de cultivateurs plans. 2eme Colloque de l' Assoc. frac.
- Ramus, J. S. (1972). The production of extracellular polysaccharide by unicellular red alga *Porphyridium aeruginum*. *Journal of Phycology*, 8, pp. 97-111.
- R. J. Cardello and K. Y. San. (1988). The Design of Controllers for Batch Bioreactor, *Biotech. Bioeng.*, 32, pp. 519-526.
- R. M. Dekkers and M. Voetter. (1986). Adaptive control of fed-batch bakers yeast

- fermentation, in *Modeling and Control of Biotech. processes*, A. Halme, Pergamon Press, pp. 201-212.
- S. Sakamoto, M. Iijima, H. Matsuzawa and T. Ohta. (1994). Production of Thermophilic Protease by Glucose-Controlled Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia Coli*, *J. Ferment. Bioeng.*, 78, pp. 304-309.
- Sastry, S.K. and S. Palaniappan. (1992). Ohmic heating of liquid-particle mixtures. *Food Technol.*, 46(12), pp. 64-67.
- Schwarze, P. (1975). Ausscheidung von Rivoflavin durch *Chlorella vulgaris*. *Biochemie und Biophysik der Pflanzen*, 167, pp. 291-93.
- Spoehr, H. A. (1951) *Chlorella* as a source of food, *Proc. Amer. Phil. Soc.* 95, pp. 62-67
- Spoehr, H. A., J. H. C. Smith, H. H. Strain, H. W. Milner, and G. J. Hardin (1949) Fatty acid antibacterials from plants *Carnegie Inst. Wash. Pub.*, 586
- Strain, H. H. (1950) Cellular opacity and the activity of chloroplast pigments in photosynthesis, *Science*, 112, pp. 161-164
- Stryer, L. (1987). *Biochemie*. Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden, 330.
- Takano, H. (1992). CO₂ removal by high density culture of marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp.. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34/35, pp. 449-458.
- T. Yano, T. Endo, T. Tuji and Y. Nichizawa. (1991). Fed-Batch Culture with a Modified DO-Stat Method, *J. Ferment. Bioeng.*, 71, pp. 35-38.
- T. Takamatsu, S. Shioya, Y. Odaka and M. Kanda. (1985). Profile Control Scheme in a Baker's Yeast Fed-Batch Culture, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, pp. 1675-1686.
- Tindall, D. R., Yopp, J. H., Schmid, W. E. & Miller, D. M. (1977). Protein and amino acid composition of the obligate halophile *Aphanothece halophytica*(Cyanophyta). *Journal of Phycology*, 13, pp. 127-33.
- Tredici, M.R. and R. Materassi. (1992). From open ponds to vertical alveolar

- panels - The Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, 4, pp. 221-231.
- Tredici, M. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and Cyanobacteria. *Biores. Technol.*, 38, pp. 153-159.
- Vonshak, A. (1987). Biological limitations in developing the biotechnolgy for algal mass cultivation. *Sciences de l'eau* 6, pp. 99-103.
- Vonshak, A. and R. Guy. (1992). Phoroadaption, photoinhibition and productivity in the blue-green algae *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant, Cell and Environm.*, 15, pp. 613-615.
- Wang, W.C. and S.K. Sastry. (1993). Salt diffusion into vegetable tissue as a pretreatment for ohmic heating - Electrical conductivity profile and vaccum infusion studies. *J. Food Eng.*, 20, pp. 299~309.
- Weissman, J.C., R.P. Goebel, J.R. Beneman. (1987). Photobioreactor design- Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, pp. 336-344.
- Winokur, M. (1948) Growth relationships of *Chlorella* species, *Amer. Four. Bot.* 35, pp. 118-129
- W. T. Wu, K. C. Chen, and H. W. Chiou. (1980). On-line Optimal Control for Fed-Batch Culture of Baker's Yeast Production, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, pp. 56-760.
- Wyn Jones, R. G. & Pollard, A. (1983). Proteins enzymes and inorganic ions. *In Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, vol. 15B, ed. A. Lauchli, & R. L. Bialeski, pp. 528-62. Berlin: Springer Verlag.
- 유홍식. (1993). 해수에서의 병원성 비브리오균의 오염실태와 plankton과의 관계. 석사 학위논문. 부경대학교 대학원.
- 장동석 · 김창훈 · 유홍식 · 김신희 · 정은탁 · 신일식. (1996). 병원성 비브리오균과 동물성 플랑크톤과의 관계에 관한 연구. *한국수산학회지*. 29(5), 557~566.
- 조규대 · 이재철 · 허성희. (1993). 해양학개론. *태화출판사*. pp. 85~96.