



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

2015년 2월
석사학위논문

고농도 미세조류 배양을 위한 이산화탄소
고정화 및 평판형광생물반응기
배양제어시스템 개발

조선대학교 대학원

기계공학과

김민수

고농도 미세조류 배양을 위한 이산화탄소
고정화 및 평판형광생물반응기
배양제어시스템 개발

Development of carbon dioxide fixation and flat
panel photobioreactor culture control system for
microalgae culture of high cell density

2015年 2月 25日

조선대학교 대학원

기계공학과

김민수

고농도 미세조류 배양을 위한 이산화탄소
고정화 및 평판형광생물반응기
배양제어시스템 개발

지도교수 정 상 화

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함

2014年 10月

조선대학교 대학원

기 계 공 학 과

김 민 수

김민수의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이규태 印

위원 조선대학교 교수 박종락 印

위원 조선대학교 교수 정상화 印

2014年 11月

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
ABSTRACT	VII
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구배경	1
제 2 절 연구 동향	7
1. 광생물반응기의 개발 동향	7
가. 개방형 연못 시스템	7
나. 밀폐형 배양 시스템	8
제 3 절 연구내용	10
제 2 장 미세조류 배양 제어 시스템	11
제 1 절 미세조류 특성	11
1. <i>Chlorella</i> sp. 일반적 특성	11
2. 균주 및 배지	13
제 2 절 배양장치 구성	14
1. 회분식(batch)배양법	14
2. 연속식(continuous)배양법	16

제 3 절 미세조류 배양 주요변수	17
제 3 장 미세조류 배양 결과	18
제 1 절 광세기에 따른 성장	18
1. 광세기에 따른 세포 농도	18
2. 건조중량	23
제 2 절 성장에 따른 가스 소모량	26
1. 용존 산소(dissolved oxygen)	26
2. 용존 이산화탄소(dissolved carbon dioxide)	28
제 3 절 회분배양 성장곡선 모델링	29
1. <i>chlorella</i> sp. 성장곡선 모델링	29
2. 회귀 모델	34
제 4 절 on off 제어를 통한 연속 배양	39
1. <i>Chlorella</i> sp. 연속배양	39
2. 신호처리	43
제 4 장 이산화탄소 고정화	47
제 1 절 이산화탄소 고정화의 개요	47
제 2 절 미세조류 성장의 따른 이산화탄소 고정화	49
1. 고정화된 이산화탄소의 양	49
2. 고정화된 이산화탄소의 속도	50

제 5 장 결 론 51

참 고 문 헌 53

LIST OF TABLES

Table 1-1 Carbon dioxide emissions expected for each country	2
Table 1-2 Carbon dioxide processing method	2
Table 1-3 Main companies of microalgae investment and development trends	4
Table 2-1 Composition of TAB medium for <i>Chlorella</i> sp.	13
Table 3-1 Refraction index for different plastic material	21
Table 3-2 Unit of Turbidity	32
Table 3-3 Turbidity Units Conversion Table	33
Table 3-4 Unstructured and unsegregated sigmoidal regression model for biological growth curve	34
Table 3-5 Growth parameters of <i>Chlorella</i> sp. on the basis of model equation	38

LIST OF FIGURES

Fig. 1-1 World biofuel demand(Million TOD)	5
Fig. 1-2 Open pond system	7
Fig. 1-3 Tubular type photobioreactor	8
Fig. 1-4 Flat panel type photobioreactor	9
Fig. 1-5 Research progress	10
Fig. 2-1 Growth of <i>Chlorella</i> sp.	12
Fig. 2-2 Representative material production biological process	14
Fig. 2-3 Final cell concentration and the initial concentration of the medium in batch culture process relationships	15
Fig. 2-4 Schematic diagram of continuous culture system	16
Fig. 2-5 Parameters for the cultivation of microalgal in the photobioreactor	17
Fig. 3-1 Solar altitude tracking device	19
Fig. 3-2 light guide plate	21
Fig. 3-3 optical density of each illumination	22
Fig. 3-4 dry cell weight filtering (A) $100\mu E/m^2/s$, (B) $50\mu E/m^2/s$, (C) $0\mu E/m^2/s$	24
Fig. 3-5 Dry cell weight of each illumination	25
Fig. 3-6 Real-time measurement of the dissolved oxygen	27
Fig. 3-7 Real-time measurement of the dissolved carbon dioxide	28

Fig. 3-8 Typical growth curve of *Chlorella* sp. 29

Fig. 3-9 Dry cell weight conversion according to optical density 30

Fig. 3-10 Real-time turbidity change according to time in the growth curve 33

Fig. 3-11 Growth curve of *Chlorella* sp. fitted with (A)Logistic, (B)Gompertz,
(C)Baranyi models for OD Values 36

Fig. 3-12 Growth curve of *Chlorella* sp. fitted with (A)Logistic, (B)Gompertz,
(C)Baranyi models turbidity 37

Fig. 3-13 Block diagram of turbidostat control system 40

Fig. 3-14 On-off control program for continuous culture 41

Fig. 3-15 Flow chart of on-off control program 42

Fig. 3-16 Growth curve of *Chlorella* sp. for on-off control dilution rate in
 1.0day^{-1} 44

Fig. 3-17 Operation pump for on-off control dilution rate in 1.0day^{-1} 44

Fig. 3-18 On-off control for continuous turbidostat culture of *Chlorella* sp. 46

Fig. 4-1 Schematic of biological production from carbon dioxide by
microalgae 47

Fig. 4-2 Accumulated amount of fixed CO_2 (A), CO_2 fixation velocity
 R_{CO_2} (B) and CO_2 fixation efficiency (C) of *Spirulina platensis*
NIES 39 under the different conditions 48

Fig. 4-3 Amount of carbon dioxide fixation 49

Fig. 4-4 Rate of carbon dioxide fixation 50

ABSTRACT

Development of carbon dioxide fixation and flat panel photobioreactor culture control system for microalgae culture of high cell density

Kim Min Su

Advisor : Prof. Jeong, Sang-Hwa, Ph.D.

Department of Mechanical Engineering,

Graduate School of Chosun University

In recent years, since use of indiscriminate fossil fuel has caused serious environmental pollution such as shortage of energy and global warming, new renewable energy should be requested immediately. New renewable energy using microalgae makes carbon dioxide reduce and biofuel production be possible. It makes all kinds of functional food as by-product. Microalgae are known to store large amount of lipid up to 50% of dry mass. Especially, production of biodiesel based on microalgae biomass is one of the cost-effective approaches, because microalgae can be cultivated with water and carbon dioxide.

In this study, microalgae cultivation control system was developed to evaluate the amount and rate of carbon dioxide fixation. *Chlorella* sp. was selected because of containing the CGF. The proper setting of the photoperiod makes the growth of microalgae increase. Light transmission efficiency is very effective

when applying to the flat panel photobioreactor. The light was illuminated to 24:0 by using light guide plate, and the efficiency was the best at $100\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

The cell growth was measured by indirect measuring method using a single substrate concentration OUR(Oxygen Uptake Rate). Dissolved oxygen and dissolved carbon dioxide were compared by dividing each exponential growth phase and lag phase.

Growth curve was approximated by Gompertz model, Logistic model, and baranyi model from microbial growth prediction model for the continuous culture. Baranyi model was suitable to predict the growth curve of *Chlorella* sp. because it has the highest R-squared. On-off control system was used to culture continuously *chlorella* sp. Process was controlled by using real-time turbidity measurement by cell density. Since there are cell nonhomogeneously, fluctuation of measure signal is generated. Therefore, Signal was sampled by using box averaging. Error signals was removed to obtain the suitable transition of measured data using gradient vector. Sensor noise was reduced by using the Savitzky-Golay signal smoothing.

Photosynthesis synthesized the cell components using carbon dioxide as a carbon source, and the fixation ratios of the rate of increase of the biomass and the carbon dioxide are proportional. The amount of carbon dioxide fixation from microalgae growth was obtained at a value of $3.569\text{g}\cdot\text{CO}_2/\text{L}$ by the dry weight in the batch culture. Carbon dioxide fixation rate was obtained by differentiating the amount of carbon dioxide to obtain a value of the $0.102\text{g}\cdot\text{CO}_2/\text{L}/\text{day}$.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경

지난 20 세기 동안의 급격한 산업 발전에 의해 인류의 생활수준이 높아지면서 지구 환경 보전에 대한 관심이 전 세계 적으로 높아지고 있다. 특히, 지구 온난화 현상은 지구상의 빙하의 양을 감소시켜 해수면 상승을 초래하고, 수온의 상승으로 엘니뇨 현상과 같은 이상 기후의 발생을 증가시키고 있다. 이러한 지구 온난화의 주 원인은 지구 복사 평형을 깨뜨리는 온실 가스(Greenhouse effect gas)의 대기 중 농도가 적정치 이상으로 증가하여 지구의 기온이 증가하는 온실 효과이다. 대표적인 온실 가스로는 이산화탄소, 메탄, 이산화질소, 염불화탄소 등이 있으며, 이들 중 이산화탄소의 경우 온실 효과에 대한 기여도가 50% 이상인 것으로 알려져 있다^[1].

산업혁명 이후 이산화탄소 배출량은 꾸준히 증가하여 90년대에 들어서는 대기중 이산화탄소의 농도가 산업화 이전보다 25%나 증가하였고, 향후 지속적으로 배출량이 증가할 것으로 예상되고 있다(Table 1-1). 이런 문제의 심각성으로 인해 1987년 세계 기상기구와 유엔환경계획이 기후변화 정부간패널을 설치함으로써 기후변화에 대처하기 위한 국제적인 노력이 시작되었고, 1997년 12월의 교토 회의에서 선진국들에 대한 구체적인 감축목표가 설정되는 등 배출량 감축 활동이 구체화되고 있어 이산화탄소 처리 기술의 개발이 필요로 되고 있다. 연구되고 있는 이산화탄소의 주요 처리 방법은 Table 1-2와 같다. 이 중 생물학적 고정화는 녹색 식물 및 조류 등에서 일어나는 광합성을 통해 이산화탄소를 바이오매스로 전환시켜 고정화하는 기술로서, 일반적인 광합성 생물체에 비해 빠른 성장 속도를 가진 광합성 미생물들이 사용되고 있다^[2-4]. 생물학적 고정화는 흡수제를 이용한 흡수법이나 촉매 등을 이용한 화학적 전환 등에 비하여 낮은 효율을 보이지만, 상온, 상압 하에서 이루어지는 반응이므로 고온이나 극저온, 고압 또는 진공 등이 필요한 기술에 비해 고정이 간단하여 고정 설계 및 운전비용이 절감된다. 또한 배출 가스에 직접 적용할 수사 있어 분리, 회수 및 농축 등의 배출 가스 전처리 비용이 필요하지 않으며, 고정화의 최종산물인 바이오매스를 다양한 방법으로 재활용하여 경제적 이윤의 창출이 가능한 장점을 가지고 있다.

Table 1-1 Carbon dioxide emissions expected for each country^[2]

Unit : million TC

	2000	2010	2020	Rate of increase(%)		
				1991-2000	2001-2010	2011-2020
Korea	145	200	249	3.0	3.3	2.3
Advanced nation	3,936	4,717	5,435	0.2	1.8	1.4
U.S.A	1,525	1,776	2,033	1.2	1.5	1.3
Developing country	2,713	4,171	5,986	4.6	4.3	3.6

 Table 1-2. Carbon dioxide processing method^[3]

Recovering method of isolation	Fixation method
1) Absorption method : Separated and recovered by integrating the absorbent and the gas mixture 2) Adsorption : Selectively adsorbed by the temperature and pressure difference 3) Membrane absorption method : Membrane using absorption	1) Deep waters insert : Absorption and storage into a deep waters 2) Chemical fixation method : Chemical conversion using a catalyst 3) Biological fixation : Conversion of biomass using a photosynthetic microbial

미세조류는 광합성을 하는 수중 단세포 생물로 일반적으로 식물성 플랑크톤이라고 불린다. 현재 미세조류를 산업적으로 활용하기 위한 노력이 미국을 중심으로 활발히 진행되고 있다. 미국 전역에서 100개 이상의 관련 기업과 연구관이 활동하고 있으며, 에너지부 등 정부 차원의 지원 역시 활발하다. 또한 엑손모빌, BP, 바스프, 릴라이언스 등 세계 주요 기업들의 기술 확보 노력이 진행되고 있는 것을 Table 1-3 과 같이 볼 수 있다. 미세조류의 잠재성이 막대한 만큼 향후 다음의 3대 분야를 중심으로 활용이 확대될 전망이다. ① 에너지 분야 : 미세조류는 모든 바이오디젤 생산 작물 중 오일 생산성이 가장 우수하다. 또한 식량자원의 에너지화라는 비판에서 자유로운 생명자원으로, 석유계 디젤과 유사한 물성을 가진 바이오 연료를 생산할 수 있다. ② 화학 분야 : 미세조류는 다양한 유용물질을 생산할 수 있는 장점이 있으며, 현재 식품 분야를 중심으로 산업화되어 있지만, 향후 바이오케미컬 및 바이오플라스틱 분야로 산업화가 확대될 전망이다. 최근 미세조류 관련 기업들은 화학 분야에 대한 연구를 확대하고 있으며, 화장품이나 플라스틱 제품 등을 개발하며 화학 산업으로의 진출 노력을 경주하고 있다. ③ 환경 분야 : 미세조류는 자기 무게 2대 정도의 이산화탄소를 흡수하며, 특정한 토양이나 수질을 가리지 않고 배양이 가능하다. 이에 미세조류 관련 기업들은 미세조류를 이산화탄소 저감 및 공장폐수 정화 사업에 활용하려는 시도를 확대하고 있다^[5].

Table 1-3 Main companies of microalgae investment and development trends^[6]

Org	County	Year	Joint corporation	main contents
Exxonmobil	U.S.A	2009	Synthetic Genomics	Biofuels development (5 years \$600 million investment)
BP	U.K	2009	Matek	Biofuels development
Basf	Germany	2010	Solricks	Development of fine chemicals
Unilever	U.K	2010	Solazyme	Soap, hygiene products development
Hitachi plant	Japan	2010	Euglena	Development of microalgae jet fuel
Monsanto	U.S.A	2011	sapphireenergy	Useful microalgae gene discovery

국내에서도 미세조류에 대한 관심은 2000년대 초반부터 시작되었다. 지식경제부는 신재생에너지의 30% 정도를 바이오에너지가 될 것이라고 예상하며 대표적인 미래 청정에너지원으로 바이오매스(Biomass)를 주목했다. 특히 1,2세대 바이오 에너지의 문제점을 극복하기 위해 ‘해조류 바이오 에탄올’을 손꼽았다. 미세조류를 이용한 바이오매스는 빠른 성장을 이용한 육상곡물보다 100배 이상의 연료 생산이 가능하며, 특히 우리나라는 대형해조류 양식기술이 뛰어나고 적절한 환경이 조성되어 있어 유리한 기술로 평가되고 있다^[7]. 와편모조류에서 amphidinol을 추출하거나, 녹조류로부터 에탄올을 추출하기도 하고, 미세조류 껍데기를 발효시켜 에탄올을 얻기도 한다. 또한 구조류(diatoms)는 가라앉는 것을 방지하기 위해 세포내 기름성분이 많은데 이를 바이오디젤 연구에 이용하고 있다. 국제에너지기구(IEA)에 의하면, 세계 바이오 연료 수요는 2006년에서 2030년 사이 연평균 6.8%의 성장세를 보일 것으로 예측하고 있다. 2015년에는 2006년 대비 수요 규모가 3배나 확대되며, 2030년에는 Fig. 1-1과 같이 세계 수요가 1억 톤을 돌파할 것으로도 예측하고 있다. 3세대 바이오매스는 1세대 2세대와 달리 바이오에탄올로 전환이 용이하며, 전처리 공정이 필요 없는 장점이 있다. 한편 미세조류는 성장속도가 빠르고 지질 성분을 다량 함유하고 있어 바이오디젤을 생산할 수 있는 자원으로 평가받고 있다. 특히 미세조류는 식물보다 태양에너지 이용 효율이 약 25배, 이산화탄소 고정능력도 15배가량 높다. 또한 성장속도가 빨라 식물에 비하여 5-10배의 바이오매스 생산성이 높고, 배양조건에 따라 지질을 체내에 최대 70%까지 축적이 가능하다. 따라서 미세조류를 이용한 단위면적당 지질 생산량은 식물에 비하여 50-100배 이상 높다.

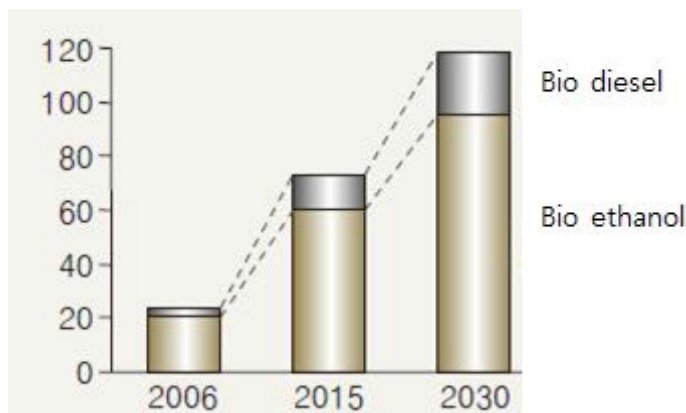


Fig. 1-1 World biofuel demand(Million TOE)^[8]

TOE : Ton of oil Equivalent

미세조류를 바이오매스로 활용하기 위해선 대량배양이 요구된다. 미세조류 배양을 위한 시스템은 크게 개방형 연못시스템과 밀폐형 광생물반응기 시스템이 있다. 각 국가의 부지가 넓고 일조량이 풍부한 나라의 경우, 옥외배양을 하고 있으나 빛에너지의 전달이 원활하지 않아 성장속도가 느리고, 다른 세균에 의한 오염에 대한 문제에 취약하다는 단점이 있어 이를 보완하기 위해 작은 부지와 고농도 생산이 가능한 밀폐형 광생물반응기의 개발 필요성이 대두되고 있다. 배양법은 크게 회분배양(batch culture), 연속배양(continuous culture), 유가식배양(fed-batch culture)등으로 나눌 수 있다. 이중 연속배양은 배양조건이 항상 일정하게 유지되고 적은 노동력으로 높은 생산성을 얻을 수 있으며, 제어를 통하여 제품의 균질성을 높일 수 있다. 따라서 본 논문에서는 고농도로 대량 생산할 수 있는 평판형광생물반응기에서 모니터링 시스템 및 제어시스템을 개발하여 광 세기에 따른 성장과 성장에 따른 용존 산소와 용존 이산화탄소의 가스 소모량에 대해 알아보고, 이산화탄소 고정화의 미치는 양과 속도를 계산하고, 회분식 배양에서 성장곡선 모델링을 통해 회귀 모델을 계산하여 연속식 배양에서 Savitzky-Golay필터를 사용하여 노이즈를 제거함으로 신호가 평활하게 되는 기법을 적용시켜 측정하였다.

제 2 절 연구 동향

1. 광생물반응기의 개발 동향

가. 개방형 연못 시스템 (Open pond system)

개방형 연못 시스템은 1950년대에 독일과 일본에서 어류양식을 위한 모델로 처음 개발되었고, 이 후 미국에서 가장 광범위한 노하우를 축적하게 되었다. 이 개방형 연못 시스템의 크기는 국외의 경우, ha급까지 scale-up되어 있다. 자연 상태에서 영양원 공급이 풍부한 개방된 연못 등에서 배양하는 것으로, 초기 설비투자과 운전비용이 저렴하고 유지 및 보수가 용이한 장점을 가지고 있다. 그러나 상대적으로 저가에 설비가 가능하지만 자연광을 이용함으로 배양장치 내부로 효과적인 빛 전달이 이루어지지 않아 미세조류의 성장속도가 느리며 성장수율이 낮고, 외부오염에 대해 취약성을 가지고 있으며, 실제 생산 능력은 밀폐형 배양 시스템에 미치지 못한다^[9].

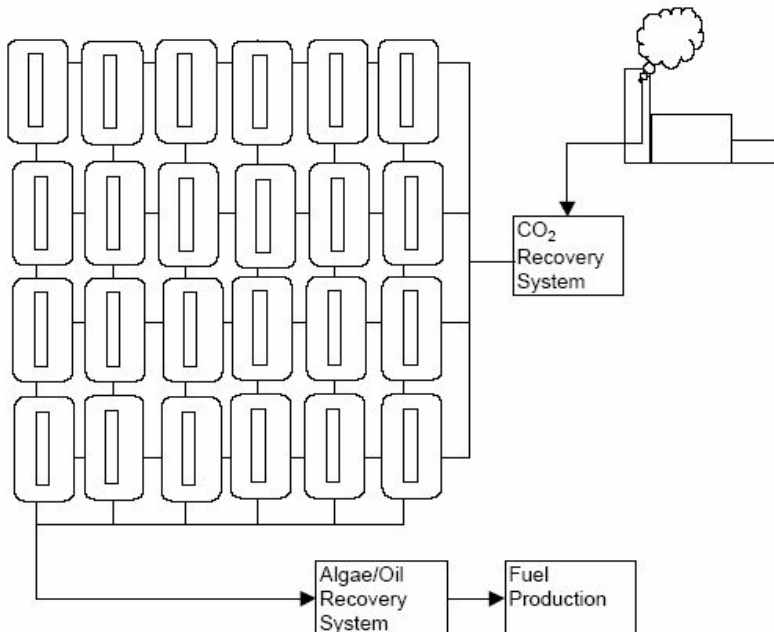


Fig. 1-2 Open pond system^[10]

나. 밀폐형 배양 시스템 (Closed culture system)

밀폐형 배양 시스템은 크게 관형, 평판형, 수직원추형의 형태가 있다. 관형 광생물반응기(tubular photobioreactor)는 밀폐형 배양 시스템 중 가장 많이 쓰이는 형태 중의 하나로 유리 또는 플라스틱 재질을 주로 사용한다. 교반성이 우수하고 오염에 대한 문제가 적으며 기체 전달의 용이성, 공간적 설치의 용이성 등 여러 장점이 있다. 하지만 대량배양을 위한 scale-up을 할 때 관의 직경이 커질수록 부피에 대한 표면채광면적이 상대적으로 떨어지는 단점을 가지고 있어 효과적인 교반 시스템 또는 광원 시스템을 추가적으로 구비해야 하며, 관의 길이는 제한을 받을 수밖에 없다^[11]. 수직 원추형 광생물반응기(vertical columns PBRs)는 수직으로 관을 설치하는 것이 태양광을 효율적으로 이용하기 어렵다는 단점이 있지만 유리관이나 합성수지관이 사용되어 가격이 저렴하고 제작이 간편하므로 많은 연구가 진행되었다. 공기부양(air-lift)효과를 수반하는 버블칼럼(bubble column) 광생물반응기 형태로 개발되고 있으며, 관형과 마찬가지로 대형으로 제작 할 경우 표면채광면적이 떨어진다는 근본적인 단점을 가지고 있다^[12-13].



Fig. 1-3 Tubular type photobioreactor^[14]

평판형광생물반응기(flat-panel photobioreactor)는 1953년 Milner에 의해 개발되었고 최근 가장 일반적인 형태로 자리 잡고 있는 광생물반응기이다. 빛의 공급을 원활히 하기 위해선 반응기의 단위체적당 표면적(S/V ratio)비가 높아야 하는데 평판형은 이를 가장 쉽고 간편하게 높일 수가 있어서 이러 점에서 평판형 광생물반응기의 개발이 가장 활발히 이루어지고 있다^[15-17].

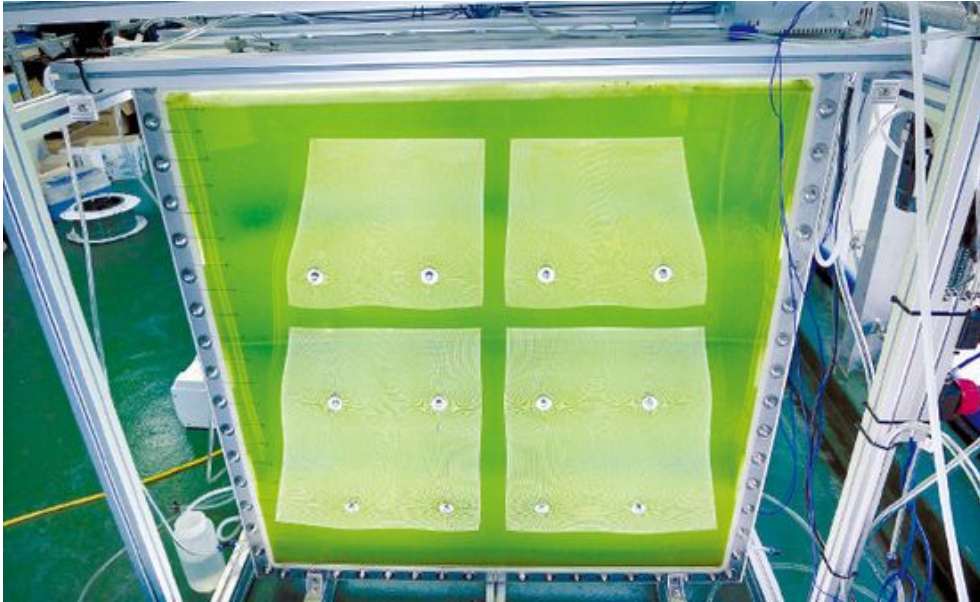


Fig. 1-4 Flat panel type photobioreactor

제 3 절 연구 내용

본 논문에서는 고농도로 성장하는 미세조류의 배양방법 중 회분식 배양과 연속배양을 통해 모니터링 시스템과 on-off 제어 시스템 구축을 하였다. 미세조류 선정은 고농도로 성장하기 적합하고 생산성이 높은 미세조류로 배양하였으며 연속배양을 하기 위해 회분배양에서 성장조건을 최적화 하여 성장곡선 모델링을 하여 회귀분석을 하였다. 50L급 평판형광생물반응기를 이용하여 on-off제어를 통해 연속배양을 하여 신호처리 필터링 기법을 적용시키고, 고농도 성장하는 미세조류의 용존산소량과 용존 이산화탄소량을 측정하였고, 이산화탄소 고정화에 따른 양과 속도를 구하였다.

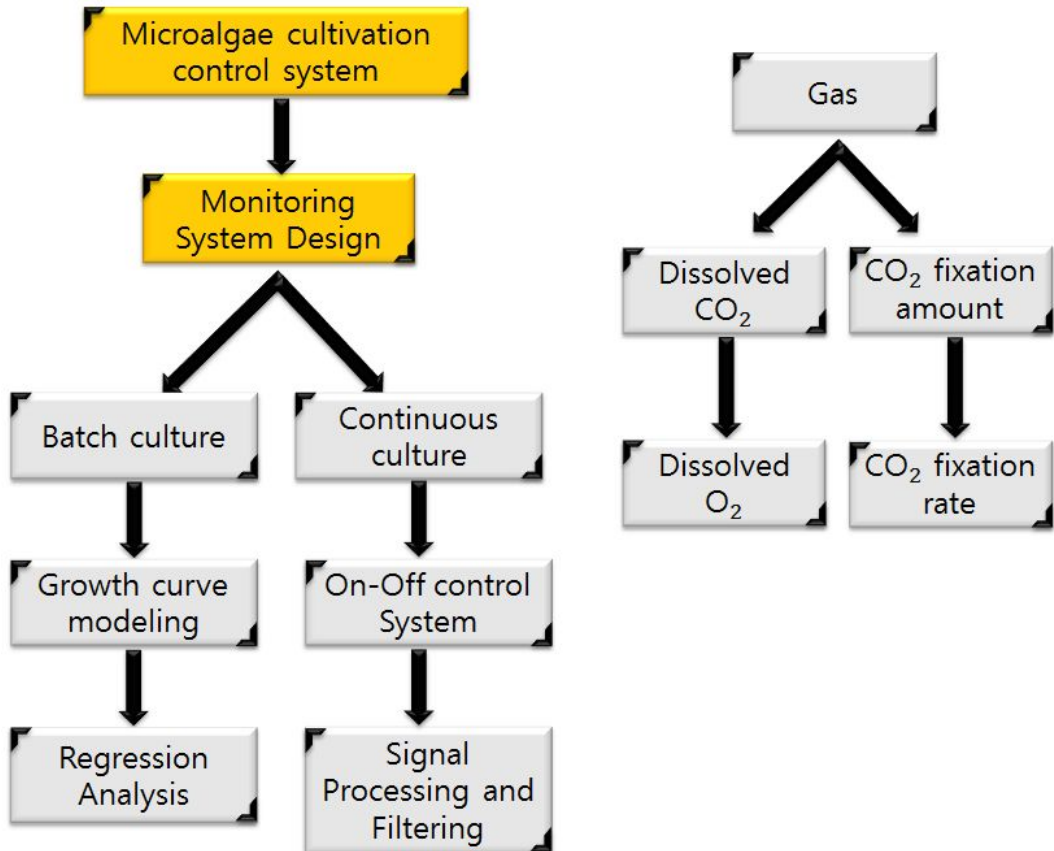


Fig. 1-5 Research progress

제 2 장 미세조류 배양 제어 시스템

제 1 절 미세조류 특성

1. *Chlorella* sp. 일반적 특성

미세조류의 산업적 이용에 대한 연구는 1940년대 2차 세계 대전 중 독일에서 식물성 지방을 생산하기 위하여 본격적으로 시작되었으며, 그 후 녹조류인 클로렐라로부터 지방과 단백질을 생산하기 위한 연구가 활발하게 이루어졌다^[18]. 담수 식물이자 미세 녹조류인 클로렐라는 현재 사료첨가제, 양어사료, 식품첨가물, 화장품 원료, 유산균 발효촉진제, 수처리제 등으로 널리 사용되며 영양학적 우수성이 확인되었다^[19-20]. 이 외에도 환경 호르몬인 다이옥신의 체외 배출, 체내 중금속의 축적억제 및 배설, 환경독성 물질의 생물학적 분해, 폐수에 존재하는 수은의 축적, 동맥경화 및 간장 장애의 억제, 항암 활성 면역기능 강화^[21-22], 세포의 부활작용과 식품의 풍미향상 및 보습효과 등이 가능성이 있다. 클로렐라에는 유산균 성장 촉진 물질로서 CGF(*Chlorella* growth factor)라는 물질이 포함되어 있으며, 이것은 클로렐라 추출물 안에 포함되어 있는 핵산 관련 물질이다. 분자량 5,000-10,000의 황을 함유한 클레오펙타이드(cleopeptide)로서 260nm의 파장에서 최대 흡수치를 갖는 물질로 정의된다. CGF는 클로렐라 추출물의 일군을 의미하는 것으로 단일물질은 아니다. 클로렐라 추출물은 클로렐라 열수 추출물로, 클로렐라 원말을 열수(90℃ 이상)에서 가열하여 유효 성분을 추출한 후 원심분리 등의 방법으로 클로렐라 균체의 불용성 물질(cell debris)을 제거하고, 이를 농축 또는 분말 건조한 것이다. 클로렐라 추출물은 아미노산, 단백질, 펩타이드, 당류, 비타민, 미네랄 및 CGF 등을 함유 하고 있다^[23]. 클로렐라 생산용 종주는 고 엽록소, 고 단백질, 고 CGF의 특성을 갖는 것을 자연적으로 분리 선발하지만 이 특성은 퇴화하기 쉬운 경향이 있다. 따라서 보통 순수 균체 분리 후 배양실험에 의한 특성 확인과 개량을 통하여 특성을 안정화 할 필요가 있다. 따라서 클로렐라의 종주 개량은 아미노산, 향생물질과 같이 물질 생산 능력만을 높이기 위한 개량처럼 단순한 것이 아니다.

클로렐라는 단세포 생물로 분류학상 *Chlorophyceae* 강, *Chlorococcum* 목, *Chlorella* 속으로 종(species)으로는 *vulgaris*, *pyrenoidosa*와 *ellipsoidea*가 널리 알려져 있다. 이들은 보통 연못이나 호수 등의 담수에서 생육하며, 직경 2-10 μ m의 구형 단세포(single cell) 조류로 하나의 세포는 현미경을 통해 관찰할 수 있다. 세포는 엽록소(chlorophyll a와 b)를 다량 함유하고 있으며, 세포 표면은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 세포막으로 이루어져 있다. 생식은 무성생식으로 증식하고 Fig. 2-1에서 보는 바와 같이 클로렐라의 모세포(mother cell)가 성장하면 체내에 2개 이상의 낭세포(daughter cell)가 생성된다. 이것이 성숙되면서 모세포막이 파괴되어 낭세포가 하나의 개체로 새로운 생활을 시작한다. 클로렐라는 10-30시간에 1회씩 4개의 낭세포로 분열하여 증식을 계속하므로 하루에 4-16배로 증식한다.

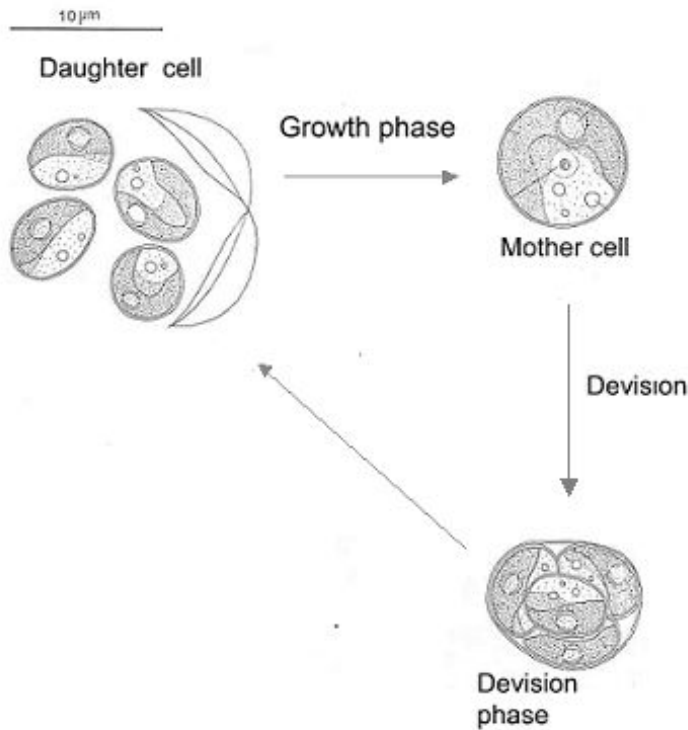


Fig. 2-1 Growth of *chlorella* sp.^[23]

2. 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주는 조선대학교 김시욱 교수 연구팀으로부터 분양받은 *Chlorella* sp.를 균주로 사용하였다. 배양에 사용된 배양액은 TAP media를 사용하였으며, 배지 조성은 Table. 2-1과 같다. 배지는 고압 멸균기(Auto clamp)를 이용하여 121℃에서 20분 동안 멸균하여 냉각 후 사용하였다.

Table 2-1 Composition of TAB medium for *Chlorella* sp.

Components	Amount(g/L)
50X FBS	
NH ₄ Cl	40
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10
400X KPO₄ mix	
1M K ₂ HPO ₄	43.2
1M KH ₂ PO ₄	22.32
200X tris mineral	
EDTA·2H ₂ O	10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.4
H ₃ BO ₃	2.28
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.02
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.22
Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O	0.52
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.32
glacial acet(acid)	20ml
Tris	2.42

제 2 절 배양장치 구성

1. 회분식(batch)배양법

회분배양은 가장 널리 이용되는 방법이며, 배양공정의 한 예가 Fig. 2-2이다. 그림에서는 진탕 플라스크와 종균배양기로 구성된 2단식 전 배양(seed culture 또는 pre culture for main culture 또는 fermentation)으로 본 배양에 필요한 접종 세포량을 성장 시키는 과정이며, 일반적으로 전배양은 본 배양의 양을 기준으로 보면 약 10배 정도 크기가 확대된다. 그러므로 본 배양의 규모(working volume of main reaction)에 따라 전배양의 크기와 단계가 결정된다. 회분배양의 기본적인 특징은 목적물질(배양세포이거나 대사물질)을 생산하는 데 필요한 기질 또는 배지 전체를 처음부터 배양기에 넣고 배양을 시작하므로 일단 배양이 시작되면 배양시간에 따라 기질은 점차 감소되며, 접종 세포량은 증가되고, 세포 안이나 배양액에 생산물이 점차 축적된다. Fig. 2-3은 회분배양 과정에서 최종 세포농도와 초기 배지농도의 관계를 타나내었다. 1에서는 유효배지 농도만큼 자유롭게 성장하지만 2에서는 저해물질 축적 또는 영양분 고갈로 성장이 제한된다.

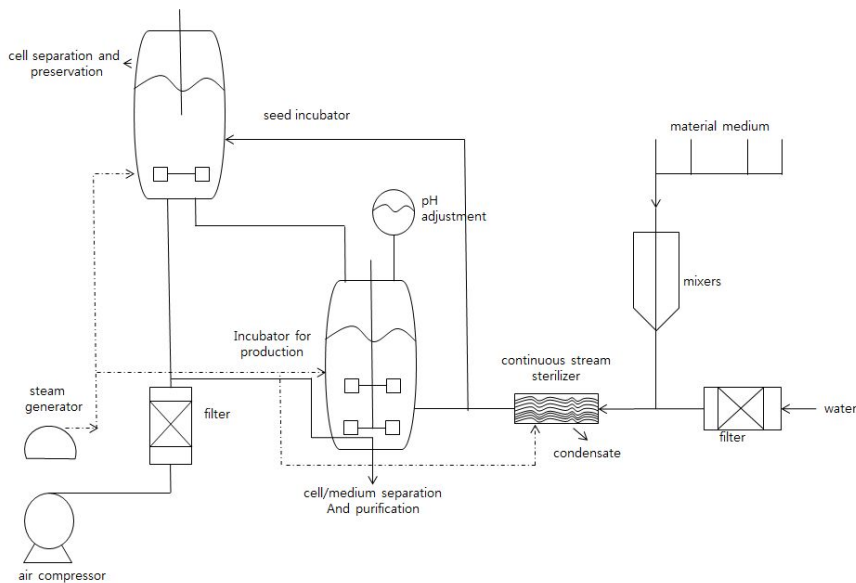


Fig. 2-2 Representative material production biological process

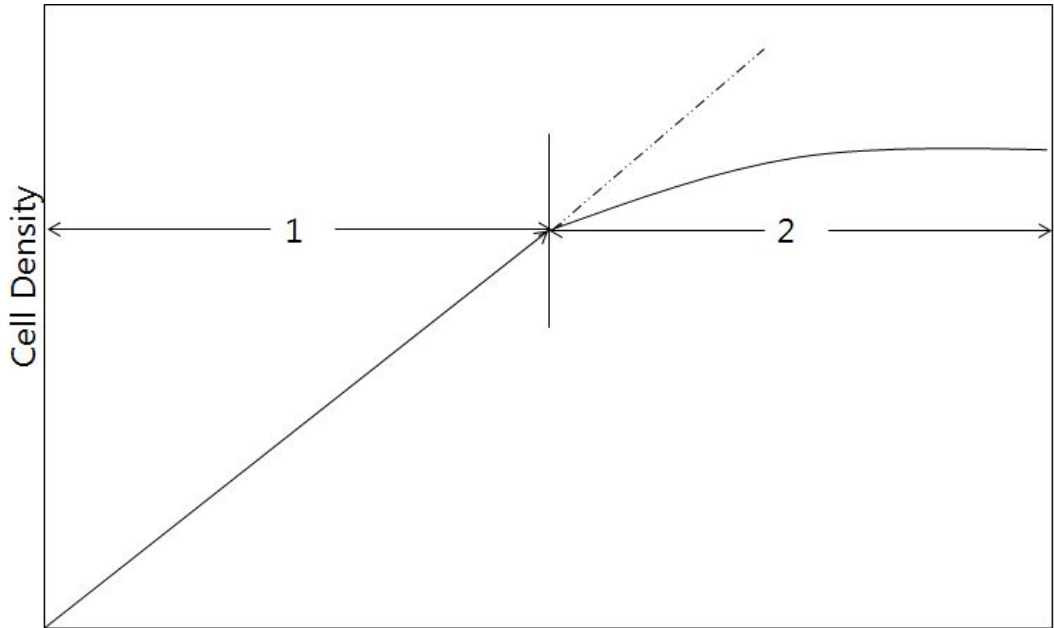


Fig. 2-3 Final cell concentration and the initial concentration of the medium in batch culture process relationships

2. 연속식(Continuous)배양법

연속배양은 배양기에 새 배지를 일정한 속도로 연속적으로 공급하고, 대신 공급속도와 같은 속도로 배양액을 연속적으로 배양기 밖으로 배출시키는 방식이므로 배양기 안의 전체 액량(working volume)을 항상 일정하게 유지하는 배양방식이다. 즉, 회분배양은 초기 기질농도가 완전히 소비되면 배양이 더 이상 진행되지 않지만, 연속배양은 이론적으로 배양을 무한정 지속시킬 수 있다. 일반적으로 회분배양에서는 세포가 성장하면서 기질이 소비되며, 대사생성물이 축적되고, 세포 성장환경은 배양시간과 함께 끊임없이 변화된다. 그러나 연속배양에서는 이론적으로 회분배양에서 나타나는 여러 가지 인자들이 항상 일정하게 유지되는 상태, 즉 정상상태(steady state)가 계속되므로 공급되는 기질의 양과 세포가 소비하면서 성장하는 세포량과 배출량 사이에 일정한 비례관계가 성립하며, 이 상태가 계속 유지된다. 그림 Fig. 2-4는 연속배양의 계략도를 나타낸 것이다.

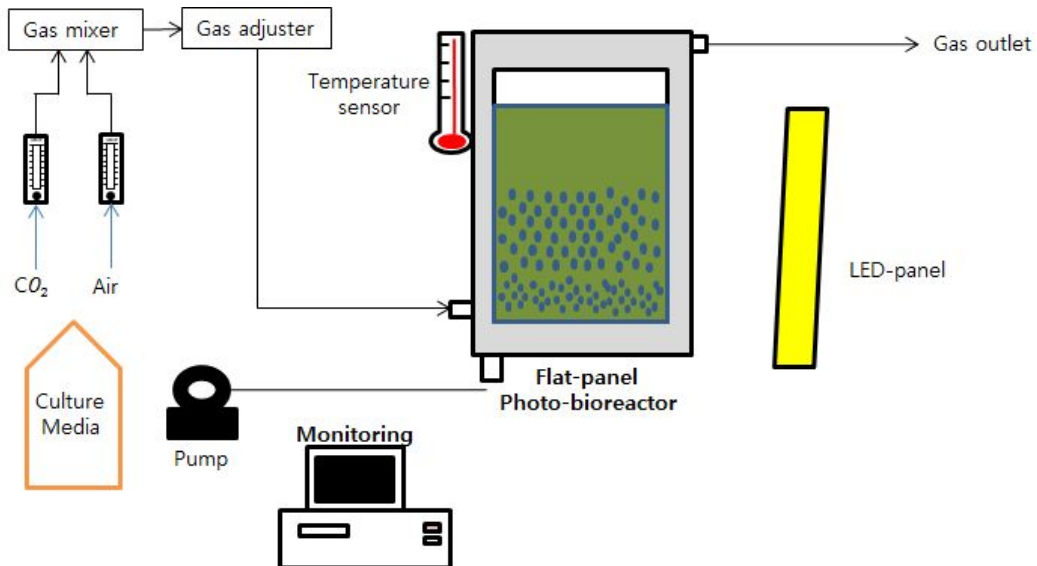


Fig. 2-4 Schematic diagram of continuous culture system

제 3 절 미세조류 배양 주요변수

미세조류가 성장에는 크게 빛(광원 및 전달과 분포), 기체(이산화탄소와 산소) 전달, 영양분의 유지가 필요하며^[25], 2차 대사물의 축적이나 상호 간섭 등 생물적, 공간적 제한 요소들도 고려되어야 한다^[26]. 광생물반응기(photobioreactor)에서 미세조류를 배양할 때 고려할 3가지 주요변수는 Fig. 2-5 과 같이 광전달(light transfer), 반응기의 내부 매체들의 유체역학적특성(fluid dynamics) 및 대사 반응(metabolic reaction)이다^[27]. 따라서 본 연구에서는 50L급 평판형광생물반응기(flat pannel photobioreactor)에서 미세조류 배양 주요변수를 고려하여 실험을 진행 하였다.

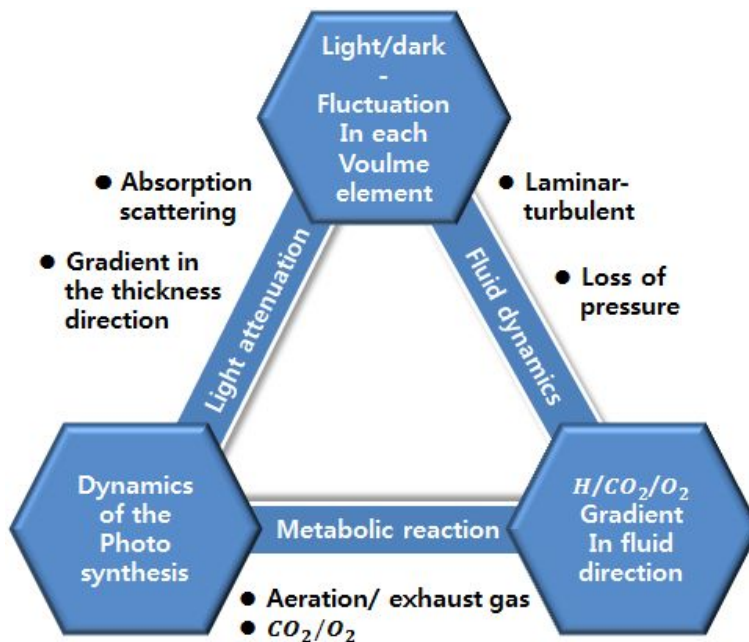


Fig. 2-5 Parameters for the cultivation of microalgal in the photobioreactor^[27]

제 3 장 미세조류 배양 결과

제 1 절 광세기에 따른 성장

1. 광세기에 따른 세포 농도

미세조류의 성장은 종에 따라 다양한데 일반적으로 광합성에 의한 성장 및 증식에서 빛의 강도는 매우 중요한 성장 및 증식요소이다. 광주기의 적절한 설정은 미세조류의 증식을 증대시킬 수 있는 방법이다. 빛은 미세조류의 신진대사율에 직접적인 영향을 미치기 때문에 미세조류를 이용한 영양염류 제거 효율에 영향을 미치는 가장 중요한 물리적 영향 인자이다. 즉, 미세조류는 빛의 영향에 따라 미세조류의 바이오매스 성분, 신진대사의 반응속도에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^[28-29]. 빛은 미세조류에 의하여 쉽게 흡수 또는 산란되어 빛을 미세조류의 배양액 내부까지 효과적으로 공급하기가 까다롭기 때문에 각종 광생물반응기는 빛을 효율적으로 전달 하는데 초점을 두고 개발되어 왔다^[30-34]. 자연 광원을 사용할 경우 광전달 부품/요소는 빛을 집광하여 균일 강도의 빛을 광생물반응기로 전달하는 역할을 한다. 집광기를 사용할 경우 태양광과 집광면이 수직을 유지하도록 Fig. 3-1처럼 실시간 태양 고도 추적 장치(Tracker)를 사용하여야 한다^[35-36].

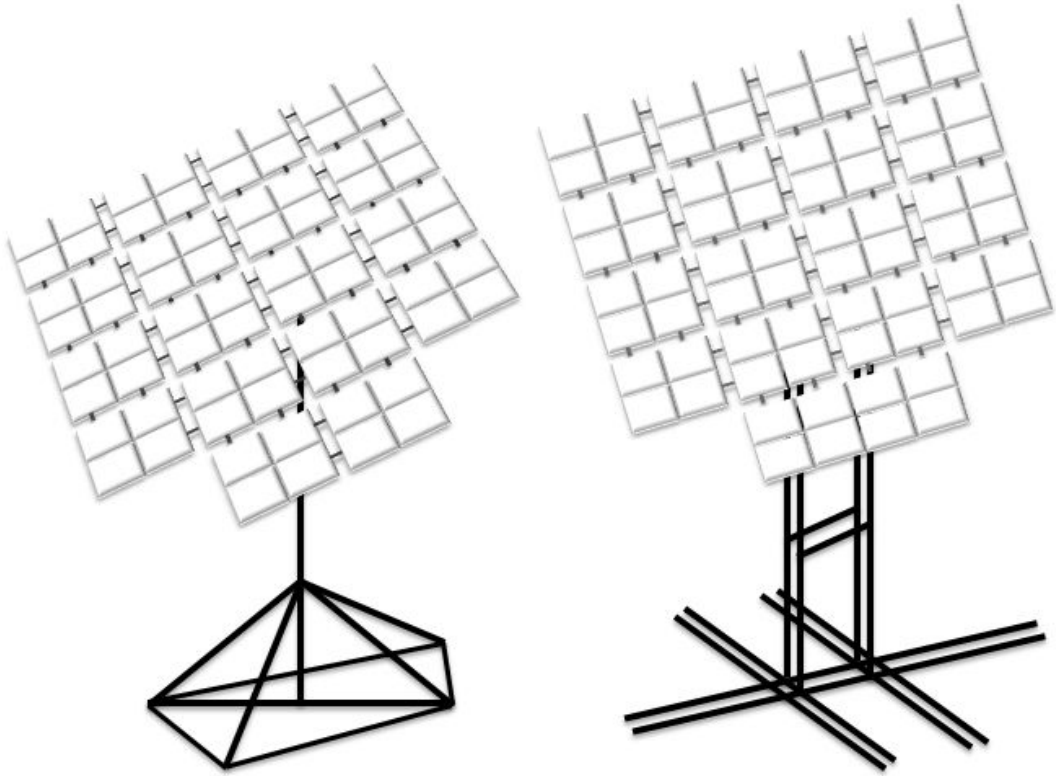


Fig. 3-1 Solar altitude tracking device

집광시스템과 도광판을 사용할 경우 태양광을 광생물반응기로 21%까지 전달할 수 있다^[37]. 특히 평판형광생물반응기에 적용될 때, 광 전달 효율이 극대화 된다. 도광판을 사용할 경우, 도광판의 굴절률(Refraction index)이 매우 중요한 변수이다. 도광판으로 집광된 태양광을 전달시키기 위해서는 도광판 굴절률이 1.415 이상이 되어야 한다^[38]. 도광판 재질로는 PMMA(Poly methylmethacrylate)가 적합한 것으로 보고되고 있다. Table 3-1은 플라스틱 재료와 유리의 굴절률이다^[39]. Fig. 3-2 은 본 실험에서 사용된 도광판으로 24:0(L/D cycle)로 빛을 조사하였으며 빛의 세기는 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, $0 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 공급하여 실험을 진행 하였다. Fig. 3-3은 광세기에 따른 광학밀도를 측정된 값이다. $0 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 광 조사를 하지 않았을 경우 미세조류가 광합성을 하지 못하기 때문에 성장하지 않는 것을 볼 수 있다.

Table 3-1 Refraction index for different plastic material^[37-38]

Material	PMMA	PC	ABS	PS	PVC	Glass
Refraction	1.47	1.54	1.52	1.57	1.53	1.49
index(n)	-1.52	-1.59		-1.60	-1.56	-1.50



Fig. 3-2 light guide plate

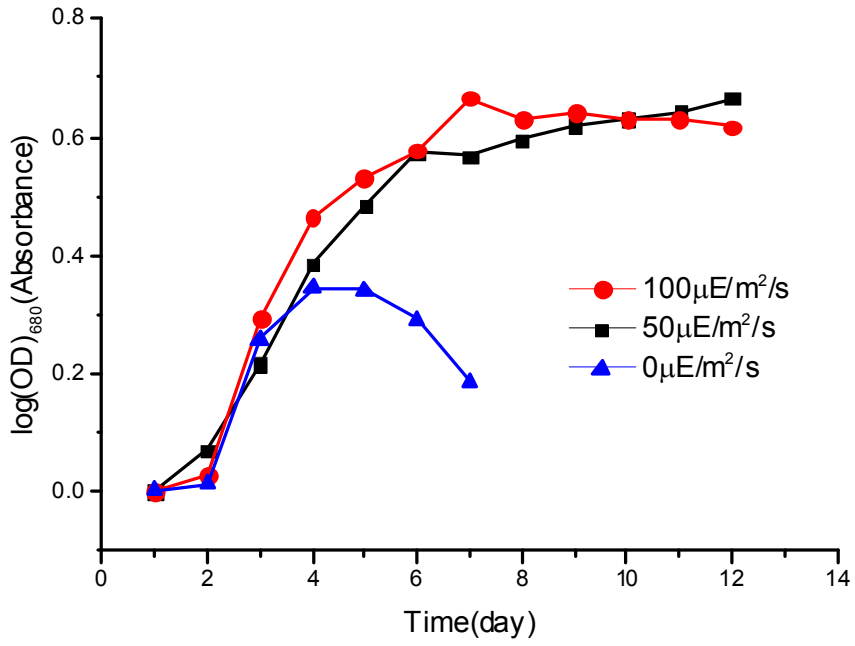
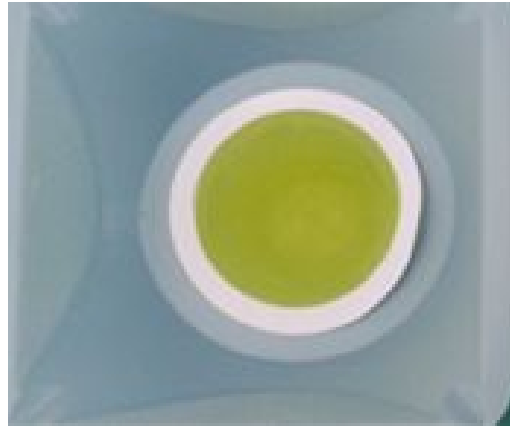


Fig. 3-3 optical density of the illumination

2. 건조중량

건조중량은 배양액 10 ml를 채취하여 0.45 μm 크기의 멤브레인 필터로 필터링하였고, 60°C에서 24시간 건조한 후 중량을 측정하였다. Fig. 3-4 (C)와 같이 빛을 조사하지 않았을 경우 (A), (B)와 다르게 광합성 작용을 하지 않으므로 녹색조류인 색이 나오지 않는 것을 보인다. Fig. 3-5는 광세기에 따른 건조중량을 나타내었다. 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 일 때 건조중량이 2.05 g/L로 가장 높게 나왔고, 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 일 때 1.37 g/L로 비교적 잘 나왔지만, 빛을 조사하지 않은 경우 0.48 g/L의 건조중량을 얻었지만 Fig. 3-4 (C)에서 보는바와 같이 미세조류 성장으로 인한 건조중량의 값이 아닌 것을 알 수 있다.



(A)



(B)



(C)

Fig. 3-4 Dry cell weight filtering (A) $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, (B) $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, (C) $0 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

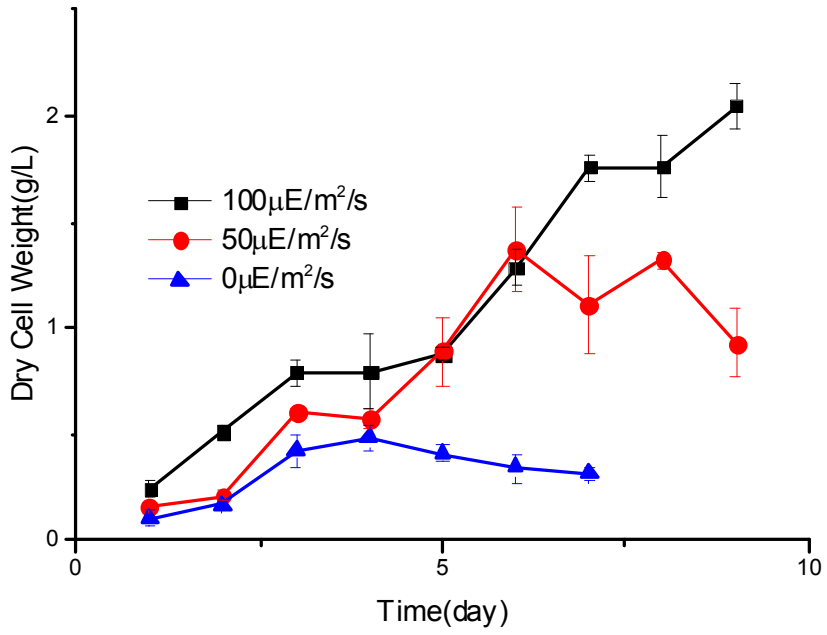


Fig. 3-5 Dry cell weight of each the illumination

제 2 절 성장에 따른 가스 소모량

1. 용존 산소(dissolved oxygen)

미생물의 대사활동 및 다른 현상이 동시에 일어나기 때문에 전체 물질 전달 속도를 측정하기가 쉽지 않다. 생물 반응기 등의 유형에 따라서 OTR(Oxygen Transfer Rate)는 기체 및 액체의 물리적 특성, 운전 조건, 생물 반응기의 기하학적 매개변수에 의해 또는 세포에 의해 산소의 소비, 바이오매스의 존재에 의해 영향을 받는다. 산소의 세포는 일반적인 성분이며, 주요 영양소인 물과 함께 배양세포에 항상 많은 양이 공급되고, 대부분의 배양세포는 분자상태의 산소(molecular state oxygen, O_2)를 섭취한다. 헨리 법칙에 따르면 온도가 일정할 때 용매에 대한 기체의 용해도는 그 용매와 접하고 있는 기체의 분압에 비례한다. 헨리법칙을 이용하면 헨리상수(K) 하나로 기체의 용해도를 간단히 나타낼 수 있다. 그러나 헨리법칙은 용매와 용질 사이의 상호작용이 크거나 기체 압력이 매우 높으면 적용되지 못한다. 또 염분 농도에 따라 기체의 용해도가 달라지는 현상이나 용해도의 온도 의존성 등을 나타내지 못하는 한계가 있다.

$$C_t = P_t / K_t \quad (3-1)$$

식(3-1)에서 C_t 는 물에 녹아있는 기체의 농도(ppm), P_t 는 기상에서 i 성분의 분압(bar), K_t 는 헨리 상수(bar/ppm)이다. 25℃에서 O_2 의 K_t 값은 $2.46 \cdot 10^{-2}$ (bar/ppm)이 나 온다^[40]. 본 실험에서는 단일 기질농도를 측정하는 간접측정법을 이용하였다. 단일 기질 농도인 OUR(Oxygen uptake rate)를 이용한 간접 측정방법을 통해 세포 성장을 측정하였다^[41-45]. Fig. 3-6처럼 실시간으로 측정하여 신호가 용이 하지는 않지만, 지수성장기 기간에서는 광합성이 활발하여 용존 산소량이 많이 지는 것을 볼 수 있지만 점차 시간이 지날수록 자연기에 접어들어 용존 산소량이 감소하는 것을 볼 수 있다.

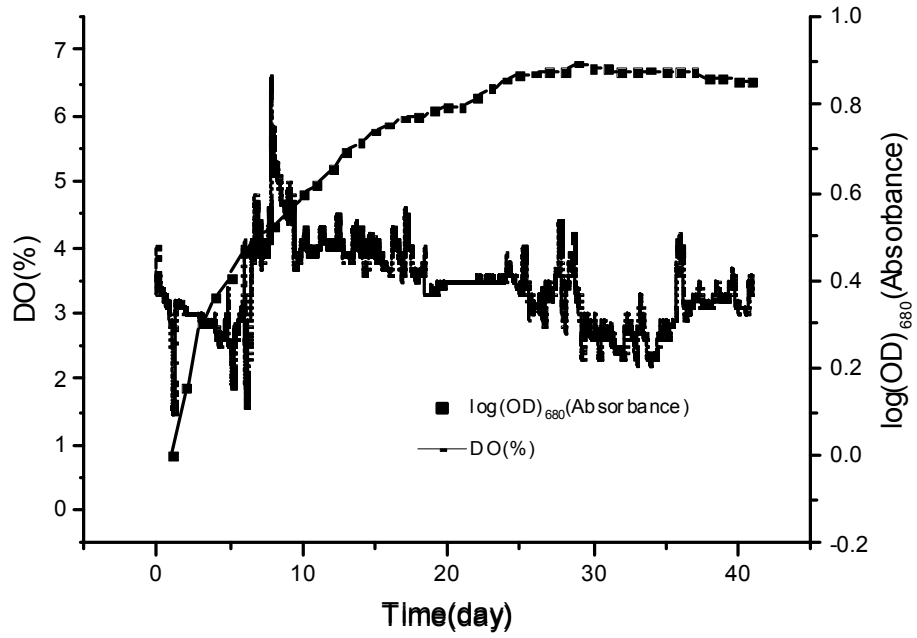


Fig. 3-6 Real-time measurement of the dissolved oxygen

2. 용존 이산화탄소(dissolved carbon dioxide)

생물학적으로 이산화탄소를 고정하는 방법은 식물이 지니는 광합성 작용을 이용한 것이다. 미세조류는 기체 상태의 이산화탄소나 용해된 중 탄산을 탄소 원으로, 그리고 가시광선 영역의 광 에너지를 에너지원으로 하는 광 독립 영양적 대사를 기본으로 한다^[46]. Fig. 3-7은 미세조류가 성장하면서 용존 이산화탄소를 실시간으로 측정한 그래프이다. A구간에서 미세조류가 성장하면서 이산화탄소를 흡수하기 때문에 지수성장기에는 용존 되는 양이 적고 B구간에는 지연기에 들어가면서 이산화탄소를 많이 흡수를 하지 않기 때문에 용존 되는 양이 많아지는 것을 볼 수 있다.

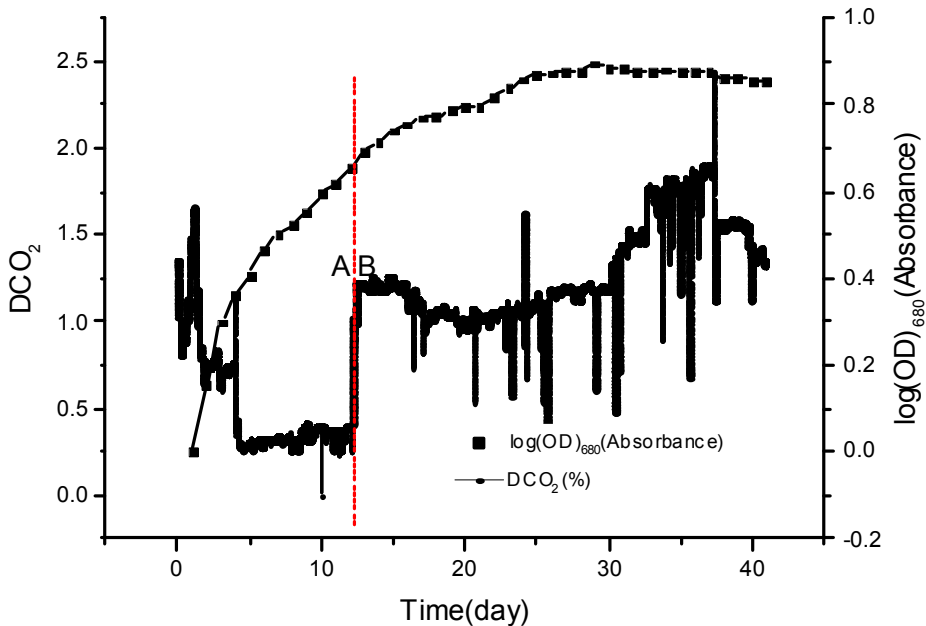


Fig. 3-7 Real-time measurement of the dissolved carbon dioxide

제 3 절 회분배양 성장곡선 모델링

1. *Chlorella* sp. 성장곡선 모델링

50L 평판형광생물반응기에서 *Chlorella* sp.를 35일 동안 회분 배양하고, 세포 농도와 광학밀도를 측정하여 Fig 3-8 에 나타내었다. 조류가 지수적으로 성장하기 때문에 log를 취하여 나타내었다.

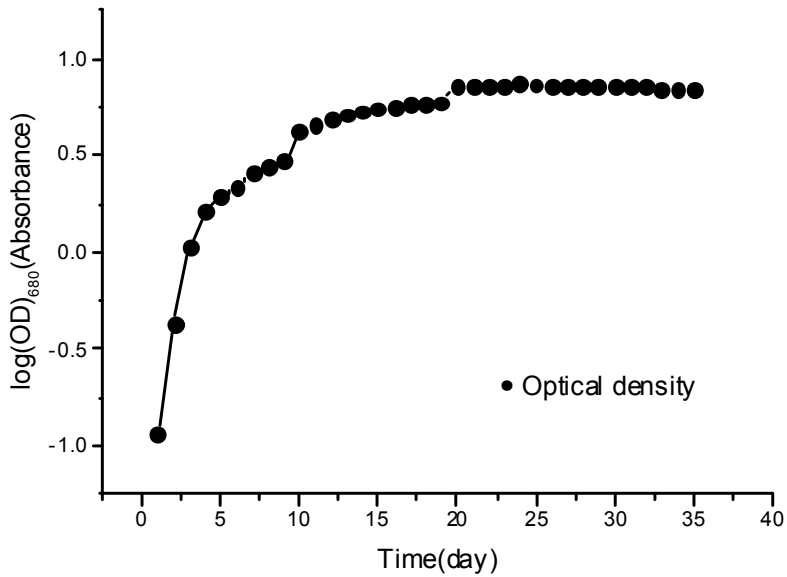


Fig. 3-8 Typical growth curve of *Chlorella* sp.

최대 광학밀도는 7.477 이 측정되었다. 탁도법은 세포가 차지하는 체적의 양을 구하는 방법으로 탁도와 건조중량의 상관성을 이용하여 배양중인 바이오매스 농도(biomass concentration)를 판정할 수 있다^[47]. 일반적으로 높은 농도에서 빛의 투과율이 떨어져 흡광도가 낮아지므로 OD 0.3이상에서 비선형 특성을 보인다. 따라서 광학밀도와 건조중량의 관계를 Fig. 3-9과 같이 3차 방정식을 이용하여 근사화 하였다^[48-50]. 오차가 큰 측정 데이터는 격리 처리 하였고 OD 7.22에서 2.3 g/L의 바이오매스 농도가 측정 되었다.

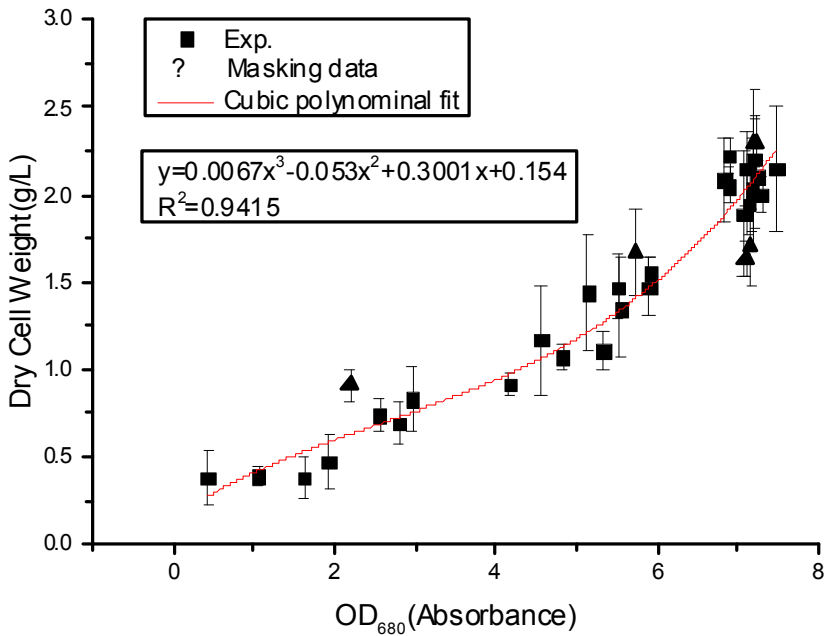


Fig. 3-9 Dry cell weight conversion according to optical density

탁도는 물의 흐린 정도를 정량적으로 나타낸 지표로서 현재 학계에서 사용되고 있는 탁도의 단위는 Table. 3-2와 같으며, 탁도 단위들의 환산표는 Table. 3-3에 나타내었다^[51]. 또한 순수 용액에는 미립자가 없으나, 이상적인 순수 용액은 없고 정제수가 약 0.023 NTU에 해당된다. 따라서 *Chlorella* sp. 회분배양에서 탁도는 NTU로 측정하였으나, 광세기가 평판형광생물반응기에 투과율이 높기 때문에 초기 탁도 측정값이 (-)로 시작하였고, 시간에 따른 탁도 값을 Fig. 3-10 에 나타내었다.

Table 3-2 Unit of Turbidity^[51]

Unit	Property
NTU (Nephelometric Turbidity Unit)	Using nephelometer refers to a measure of turbidity. Measurement of scattered light to indicate the relationship between the scattered light and the turbidity is made at the incident light 90 degrees
PPM (Parts Per Million)	Kaolin standard turbidity : Use a very small amount in units of ppm. Turning standardized as kaolin photoelectric spectrophotometer, and the measurement unit for measuring a photoelectric photometer
FTU (Formazin Turbidity Unit)	Using an infrared light source employed in nephelometer turbidity units formazin is measured for turbidity
FAU (Formazine Atenuation Units)	formazin in the amount of light attenuation in the number of units used mainly by the value measured at 0° scattering angle is due to ISO 7027
FNU (Formazine Nephelometric Units)	In water treatment as a value measured at 90° angle scattering primarily in formazine nephelometric units used by the ISO 7027
ASBC (American Society of Brewing Chemist)	American association of brewing chemists unit
JTU (Jackson Turbidity Unit)	When measured in jackson turbidity units using a system of units. Graduation in mass-cylinder to put on hold a candle tucked the liquid on the scale mass-cylinder flame look utilizes the principles varies depending on the turbidity
EBC (European Brewery Convention)	Association of European brewery unit

Table 3-3 Turbidity Units Conversion Table^[51]

Content	1 FNU, 1 NTU, 1 FTU	1 ASBC	1 EBC
FTU, NTU, FTU	1	0.057	4
ASBC	17.5	1	70
EBC	0.25	0.014	1

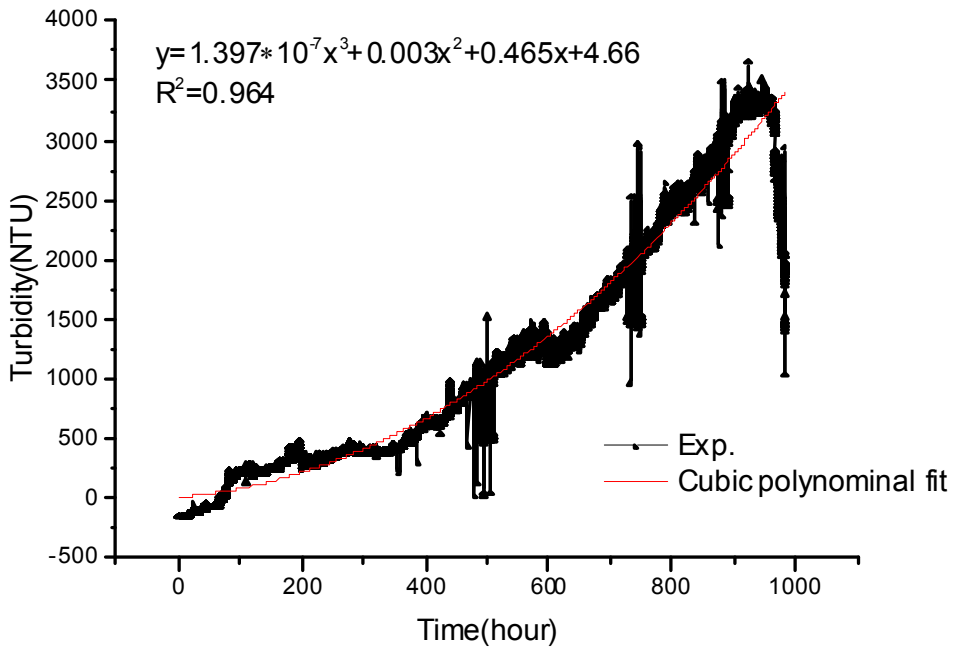


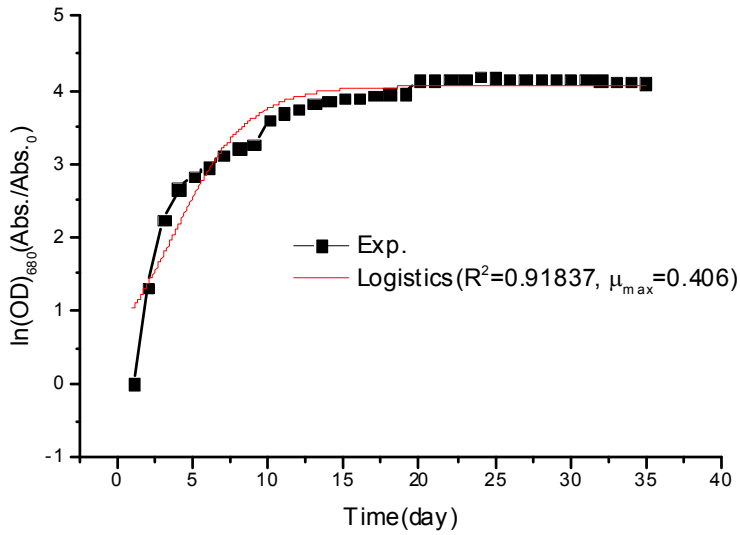
Fig. 3-10 Real-time turbidity change according to time in the growth curve

2. 회귀 모델

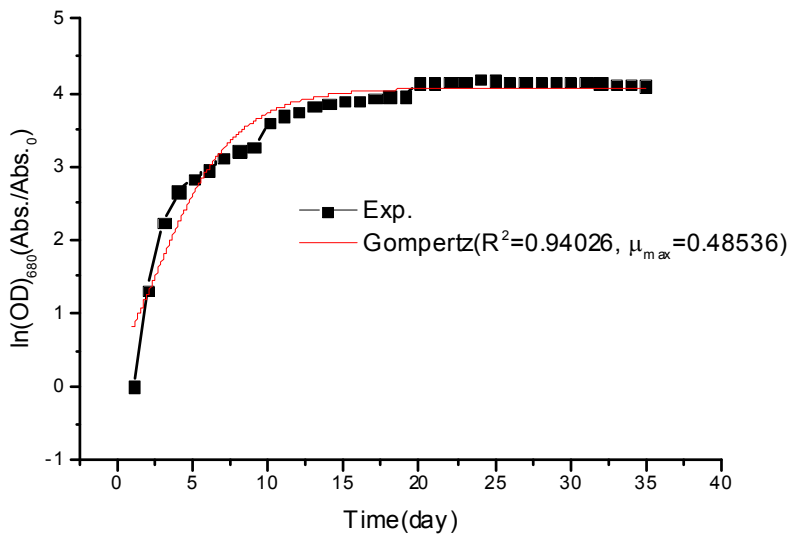
비구조(unstructured) 비분별(unsegregated) 모델을 사용하여 비성장속도(Specific growth rate)를 예측하였다. 비성장속도를 예측하기 위해 Table. 3-4 와 같이 Logistic, Gompertz, Baranyi model을 사용하여 성장모델을 근사화 하였다. 일반적으로 S 자형 (sigmoidal shape)성장 곡선은 수학적 파라미터(a, b, c, ...)를 포함하고 있기 때문에 생물학적 의미를 갖는 파라미터(A, μ_m , and λ)로 수정하여 회귀분석 하였다^[52-54]. 균주는 24:0의 광주기에서 배양하였으며 측정된 탁도와 OD값을 가지고 아래의 모델방정식으로 성장곡선을 근사화 하였고 각각 Fig. 3-11, Fig. 3-12에 나타내었다.

Table. 3-4 Unstructured and unsegregated sigmoidal regression model for biological growth curve

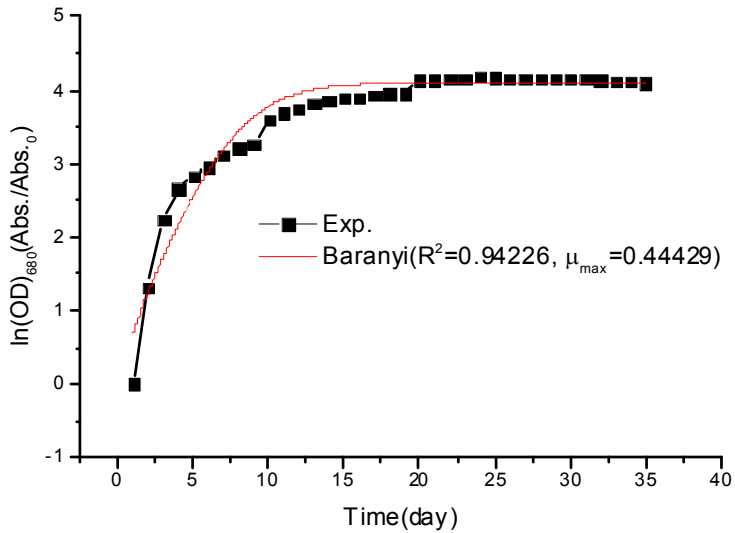
Model	Equation (mathematical parameter)	Modified equation (Biological parameter)
Logistic	$y = \frac{a}{1 + e^{(b-cx)}}$	$y = \frac{A}{1 + e^{\left(\frac{4\mu_m}{A}(\lambda-t)+2\right)}}$
Gompertz	$y = ae^{-e^{-(b-cx)}}$	$y = Ae^{-e^{\left(\frac{\mu_m e}{A}(\lambda-t)+1\right)}}$
Baranyi	$y = \mu_{\max}A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^A}\right)$ $A(t) = t + \frac{\ln[e^{-\mu_{\max}t}(1 - e^{-\mu_{\max}\lambda}) - e^{-\mu_{\max}\lambda}]}{\mu_{\max}}$	



(A)

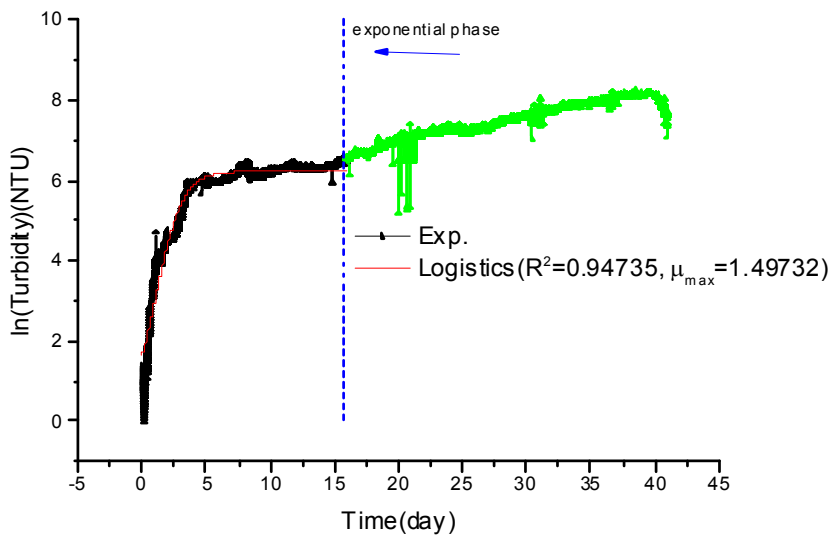


(B)

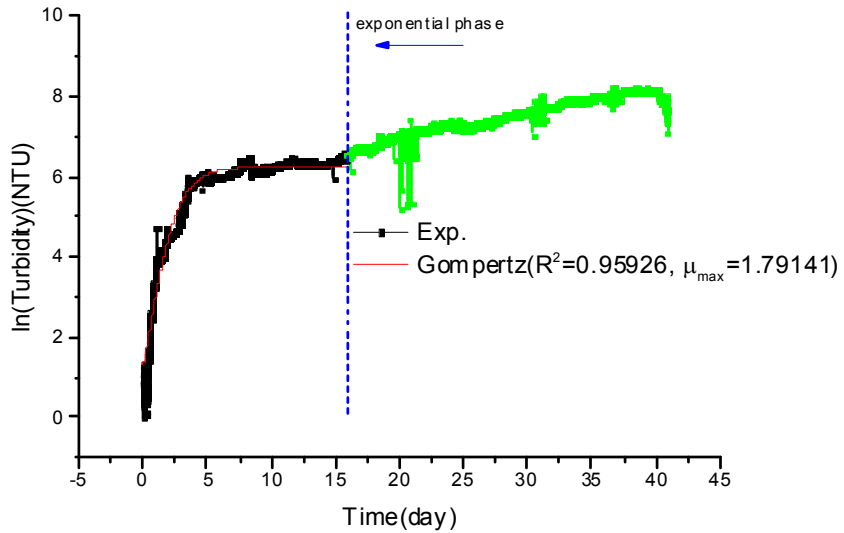


(C)

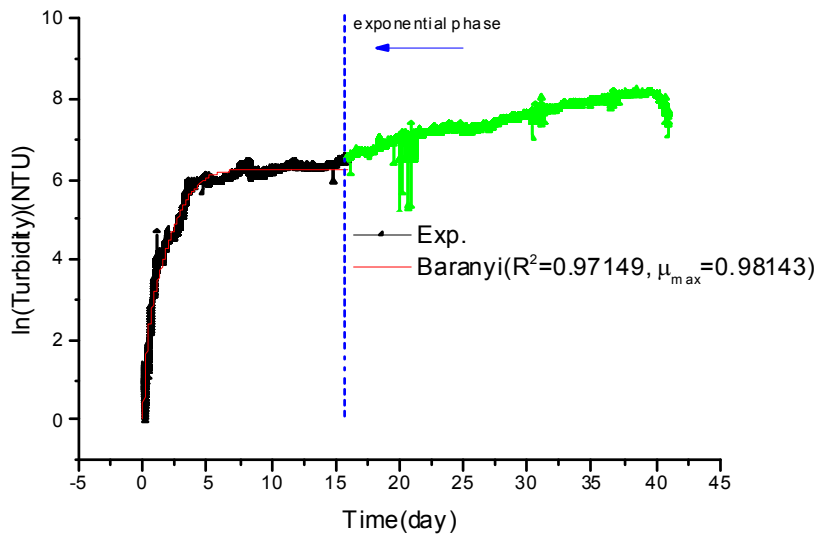
Fig. 3-11 Growth curve of *Chlorella* sp. fitted with (A)Logistic, (B)Gompertz, (C)Baranyi models for OD Values



(A)



(B)



(C)

Fig. 3-12 Growth curve of *Chlorella* sp. fitted with (A)Logistic, (B)Gompertz, (C)Baranyi models for turbidity

모델방정식에 의해 도출한 값들은 Table 3-5에 나타내었다. 모델식의 적합성을 나타내는 결정계수 값은 Baranyi 모델이 각각 0.9423, 0.9715 으로 가장 높아서 *Chlorella* sp. 의 성장을 예측하기에 더 적합하다고 판단하였다. 실제 회분배양 Baranyi 모델에서 도출한 값들을 적용하였다.

Table 3-5 Growth parameters of *Chlorella* sp. on the basis of model equation

Measurement data	Model	A (maximal value)	SGR ($\mu_{\max}, \text{day}^{-1}$)	lag time (λ, day)	Adj. R-square
OD	Logistic	4.047	0.406	1.3	0.9183
	Gompertz	4.059	0.485	0.62	0.9403
	Baranyi	4.099	0.444	1.35	0.9423
Turbidity	Logistic	6.227	1.497	1.022	0.9474
	Gompertz	6.243	1.791	0.723	0.9592
	Baranyi	6.255	0.981	2.842	0.9715

제 4 절 on off 제어를 통한 연속 배양

1. *Chlorella* sp. 연속배양

연속배양법은 크게 키모스탯(chemostat)과 터비도스탯(turbidostat)으로 나뉜다. 키모스탯은 생육제한 영양원의 공급 속도를 일정하게 함으로써 균체증식속도를 최대로 하여 정상상태를 유지하는 방법이다. 배출된 배지에는 미생물들과 함께 미생물들이 만들어낸 산물들이 포함되어 정제하여 유용물질을 만들 수 있다. 그러나 효율을 높이기 위해서는 가급적 성장 속도와 대사 속도가 빠른 미생물을 이용해야 하며, 배양액의 실시간 출입으로 인한 오염 위험이 크다. 터비도스탯은 균체농도를 연속적으로 측정하고 균체 농도를 일정하게 조절함으로써 정상상태를 유지하는 방법이다. 터비도스탯은 세포 농도와 용액(solution)에 첨가되는 기질(substrate)의 양에 관한 일차 미분 방정식으로 모델링할 수 있다. 회분식 성장곡선은 S 자 형태를 취한다. Monod 식을 성장식과 기질소비에 근거한 세포수율에 관한 식과 결합하여 식 (3-2)과 같이 예측할 수 있다^[55]. 여기서 x 생물농도, P 생산성, s 기질의 농도, D 희석률이며, Y 기질에 대한수율, A 최대 개체, $\mu(s)$ 비성장속도, λ 지체 시간을 나타낸 것이다.

$$x = \mu(s)x - Dx$$

$$s = \frac{-\mu(s)x}{Y} + D(S_0(t) - s) \quad (3-2)$$

$$P = Dx$$

단위시간에 대한 세포 농도의 변화량은 유출량과 생육량의 관계를 통해 구할 수 있다. 정상상태에서는 희석률과 비성장속도가 동일하다고 가정한다. Fig. 3-13 는 터비도스탯 블록선도를 나타낸 것이다. 실시간 측정이 가능한 탁도법을 이용하여 세포농도를 추정하여 제어를 수행하였다. 연속배양을 하기 위하여 LabVIEW 프로그램을 이용하여 on off 제어 프로그래밍을 Fig. 3-14 와 같이 개발하였고, Fig. 3-15 에 프로그램의 흐름도를 나타내었다.

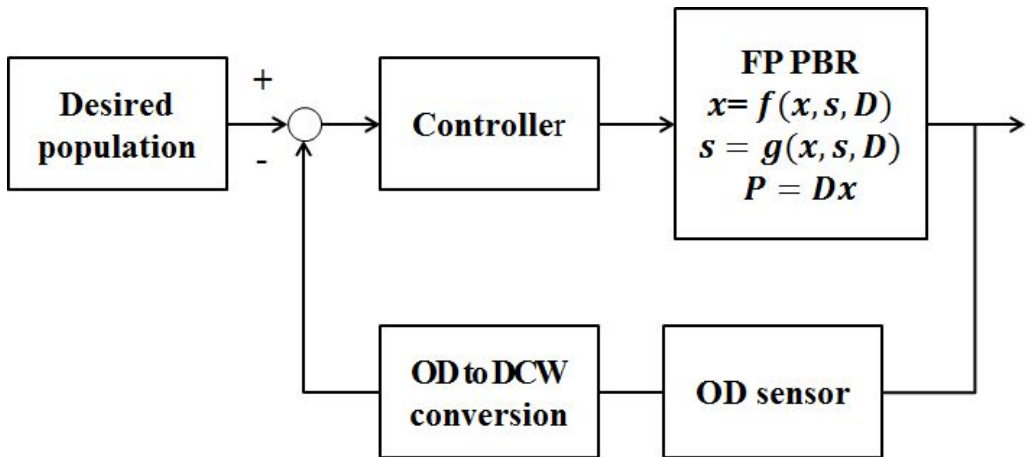


Fig. 3-13 Block diagram of turbidostat control system

On-Off Control System



Fig. 3-14 On-off control program for continuous culture

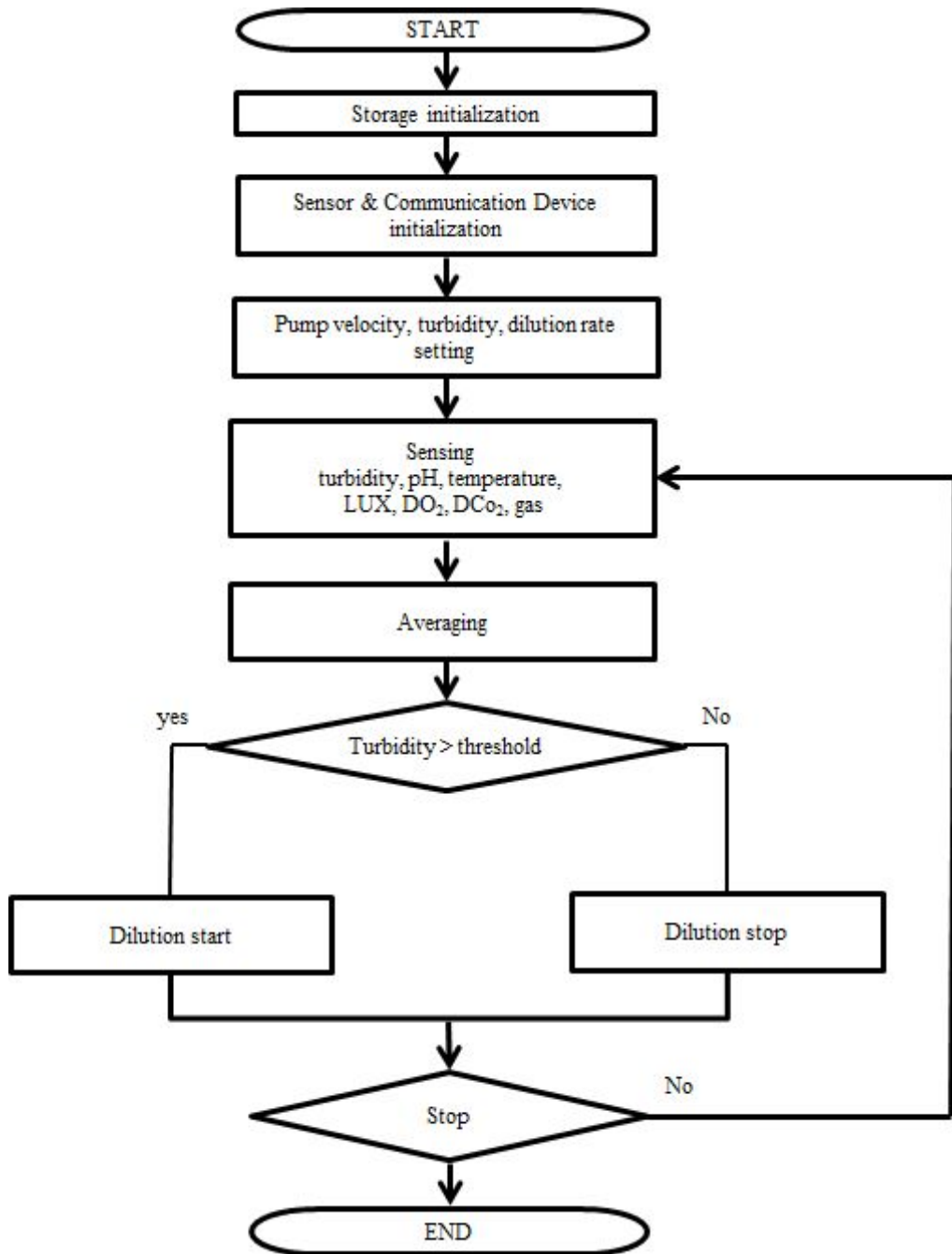


Fig. 3-15 Flow chart of on-off control program

2. 신호 처리

연속배양 on off 시스템은 탁도 값을 측정하여 제어되므로 탁도 값에서 오차범위 ± 5 를 기준으로 하였고, 펌프속도는 회분식 배양에서 Baranyi 성장 모델을 통해 예측된 최대 비성장속도 1.0day^{-1} 가 되도록 12.2 RPM으로 설정하였다. 24시간 배양한 성장곡선과 회석속도는 각각 Fig.3-16, Fig. 3-17에 나타내었다. 그래프에서 보면 탁도 값 1480(NTU)이상이 되면 펌프가 작동하고 1480 (NTU)가 되면 펌프가 중지되는 것을 볼 수 있다. 광학밀도는 평균 2.248이 측정되었으며, 건조중량은 평균 1.12g/L/day 가 측정되었다.

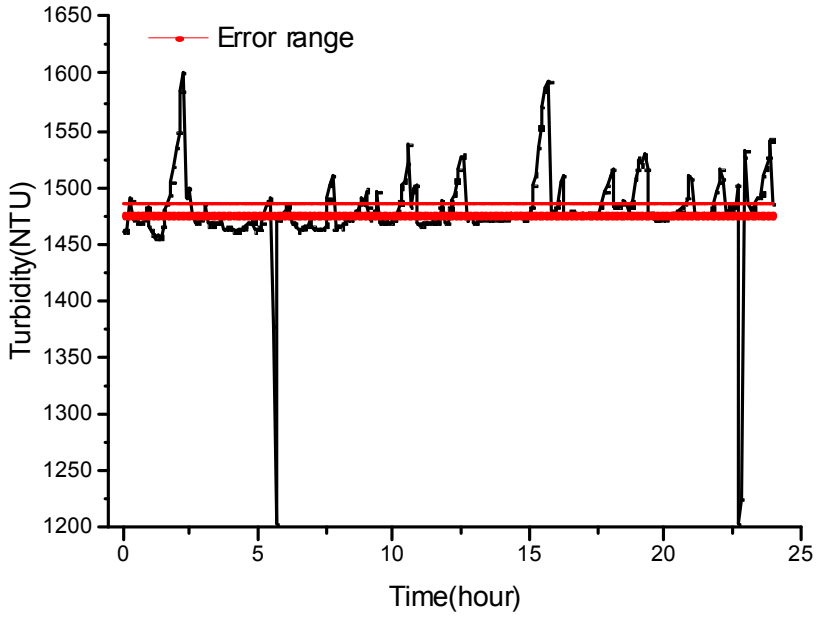


Fig. 3-16 Growth curve of *Chlorella* sp. for on-off control dilution rate in 1.0day^{-1}



Fig. 3-17 Operation pump for on-off control dilution rate in 1.0day^{-1}

배양액내에 세포가 균질하지 못하게 존재하기 때문에 측정 신호의 변동(fluctuation)이 발생한다. Savitzky-Golay 신호 평활법을 이용하여 센서 신호 노이즈를 감소하는 방법을 적용 하였다. Savitzky-Golay 필터(S-G FIR filter)는 노이즈의 제거에 적합한 평활화 필터의 한 종류이며 최소자승(least-squares) 필터 또는 Digital Smoothing Polynomial (DISPO) 필터라고도 불린다. 평활화에 이용되는 다른 저역 통과 필터들이 일반적으로 시간 영역으로부터 변환 된 주파수 영역에서 정의되는 것에 비해 Savitzky-Golay 필터는 시간 영역에서 설계되었으므로 필터의 적용이 용이하다는 장점을 갖는다^[56].

$$g_i = \sum_{n=-n_L}^{n_R} c_n f_{i+n} \quad (3-3)$$

식(3-3)은 시간 축에서 등간격 Δ 를 갖는 임의의 시간 $t_i \equiv t_0 + i\Delta$ 지점에서 계측한 데이터가 $f_i \equiv f(t_i)$ 일 경우 f_i 값을 나타낼 수 있는 기본적인 방식의 평활화이다. f_i 의 한 지점의 데이터 값과 그 주변 데이터 값의 선형적인 조합으로 이루어지는 g_i 로 나타난다. n_L 은 데이터 지점 i 의 좌측 과거의 값이며, n_R 은 데이터 지점 i 의 우측, 미래의 값이다. 그러므로 인과 관계의 영향을 받는 casual 필터에서라면 n_R 의 값은 0이 된다. 즉, g_i 를 결정하는 선형적인 조합은 이동 창(moving window), f_{i-n_L} 부터 f_{i-n_R} 에 속하는 값들로 이루어지게 되고 여기서 c_i 의 선택에 따라 처리 된 데이터의 특성은 달라진다.

Savitzky-Golay 필터는 데이터 특성을 잘 나타낼 수 있는 c_i 를 찾아 적용시키는데 선택된 각 지점 f_i 를 둘러싸는 이동 창 범위 내에서 포함되는 데이터는 총 $(n_L + n_R + 1)$ 개가 되고 이 데이터들에서 최소자승법을 통해 데이터 특성에 가장 근접하는 다항식을 구할 수 있으며 구해진 다항식을 이용하면 t_i 에서의 값 g_i 를 구하는 것이 가능하다. 이런 이유로 Savitzky-Golay 필터가 최소자승 필터 또는 DISPO 필터로 불리는 것이다.

필터의 출력 값은 설정 된 이동 창 중앙의 값이다. $i=0$ 이 되는 지점인 g_0 의 값을 의미한다. 원 데이터의 영역은 f_{-n_L}, \dots, f_{n_R} 이며 필터를 적용하기 위해 M 의 차원을 갖는 i 에 대한 다항식 $a_0 + a_1 i + \dots + a_M i^M$ 을 사용한다. 따라서 $i=0$ 이 되는 지점인 g_0 의 값은 a_0 가 되는 것을 알 수 있다. Savitzky-Golay 필터는 데이터에서 노이즈를 제거하면서도 극대나 극소 지점, 피크(peak) 지점의 특성 보존에서 높은 효율을 보인다는 것을 알

수 있다^[57]. Fig. 3-18은 Savizky-Golay 필터를 사용하여 나타낸 그래프이다. Savizky-Golay 필터를 사용함으로써 신호가 용이하게 나온다는 것을 확인 할 수 있다.

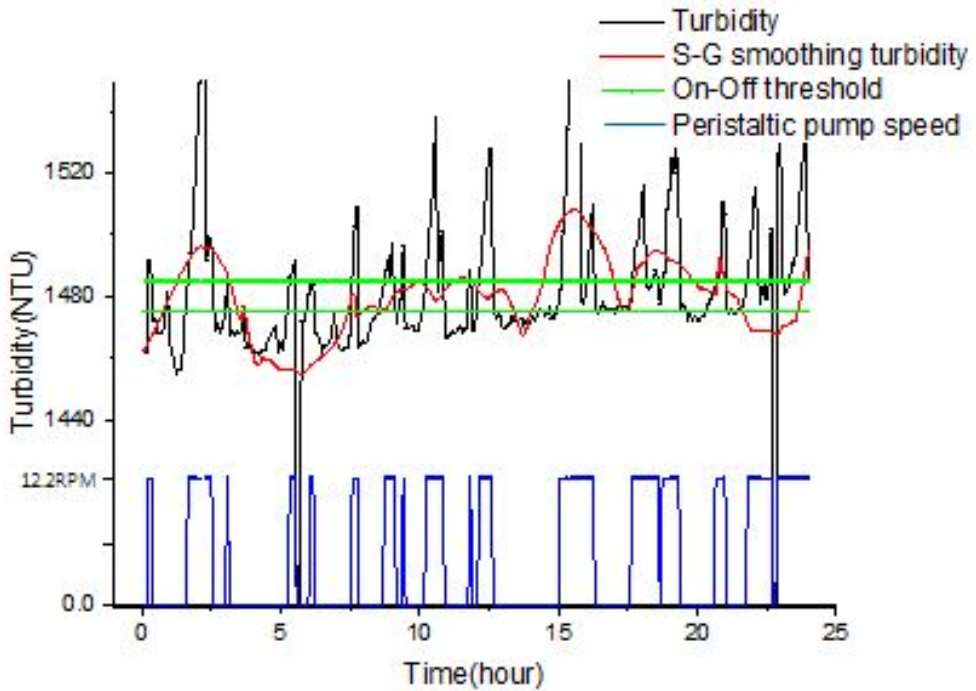


Fig. 3-18 On-Off control for continuous turbidostat culture of *Chlorella* sp.

제 4 장 이산화탄소 고정화

제 1 절 이산화탄소 고정화의 개요

산업 활동을 위축시키지 않으면서 이산화탄소의 배출량을 감소시키기 위해 여러 가지 이산화탄소 처리공정들이 연구되고 있다. 이산화탄소 고정화를 위한 생물학적 공정의 산업화에 있어서 가장 핵심이 되는 과제는 광합성을 통한 미생물의 고농도 대량배양기술의 확립이다. 각각의 광합성 생물체들은 광합성을 이용한 이산화탄소 고정화율이 다르며, 그 정도는 세포의 비성장속도(μ , specific growth rate)와 밀접한 관계가 있다. 즉, 광합성은 이산화탄소를 탄소원으로 이용하여 세포 내 구성성분을 합성하므로 바이오매스의 증가 속도와 이산화탄소의 고정화율은 비례하게 된다^[58]. 광합성 미생물은 빛을 필수 에너지원으로 이산화탄소를 기질로 유기물을 합성하는 특성을 갖고 있으며 유기물 생산성을 식물에 비해 4 - 20배 가량 높다. 광합성 미생물에 의해 생산되는 유기물은 다양한 유용 물질을 함유하고 있어 사용 균주에 따라 생물 의약, 생리 활성물질, 건강 보조 식품, 치어 양식용 사료 등 고부가가치 제품을 생산하는 공정에 활용이 가능하다는 장점이 있다^[59]. Fig. 4-1은 미세조류에 의한 이산화탄소로부터 생물제품 생산 개략도를 나타낸 것이다. 다음 Fig. 4-2은 균주 *Spirulina platensis* NIES 39로 13일 동안 이산화탄소의 양을 각각 다르게 하여 효율을 구한 것이다. Fig. 4-2과 같이 CO_2 5% 0.1vvm에서 이산화탄소 고정화의 효율이 가장 높게 나온 것을 확인 할 수 있다.

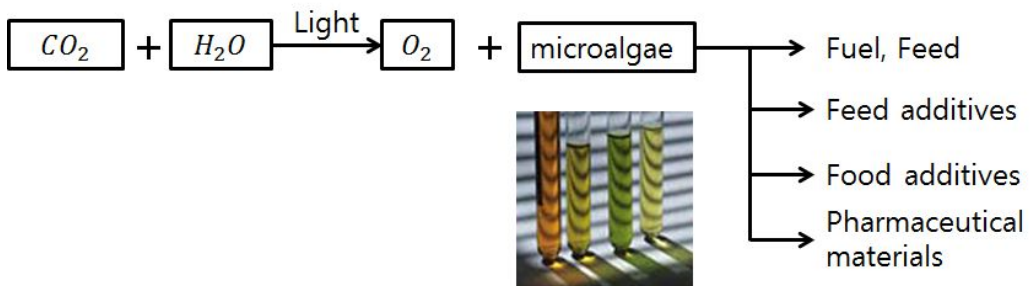
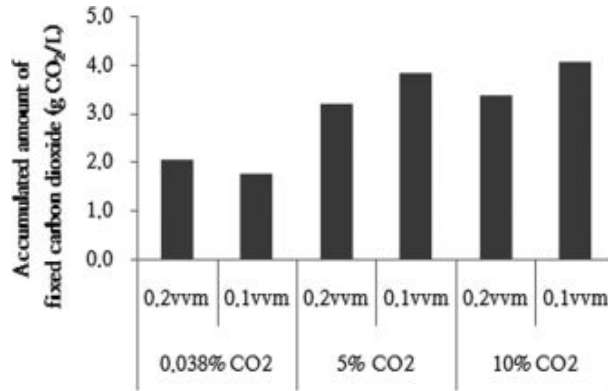
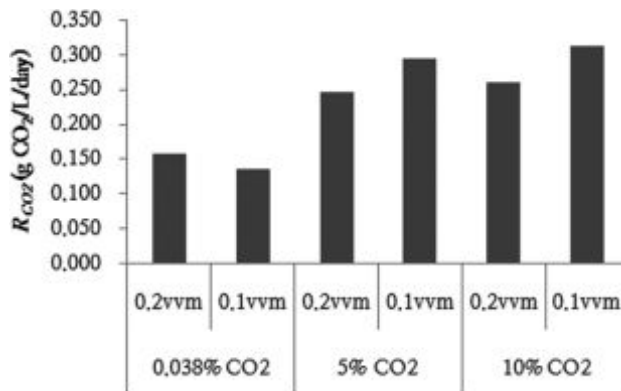


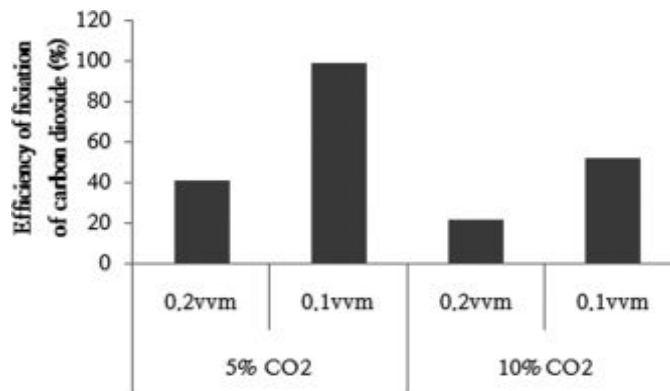
Fig. 4-1 Schematic of biological production from carbon dioxide by microalgae



(A)



(B)



(C)

Fig. 4-2 Accumulated amount of fixed CO₂ (A), CO₂ fixation velocity R_{CO_2} (B) and CO₂ fixation efficiency (C) of *Spirulina platensis* NIES 39 under the different conditions^[60]

제 2 절 미세조류 성장의 따른 이산화탄소 고정화

1. 고정화된 이산화탄소의 양

미세조류 성장으로부터 고정화된 이산화탄소 양(F_{CO_2} , $g \cdot CO_2/L$)은 특정시간에서의 조류농도(X , g/L) 및 초기 조류농도(X_0 , g/L), 조류의 탄소함량(C_c , $0.507g \text{ carbon}/g \text{ dry weight}$), 유출수내의 조류농도 및 이산화탄소의 분자량(M_{CO_2} , $44g/mol$)과 탄소의 원자량(M_C , $12g/mol$)의 비로부터 식(4-1)과 같이 계산할 수 있다.

$$F_{CO_2} = C_c(X - X_0) \frac{M_{CO_2}}{M_C} \quad (g \cdot CO_2/L) \quad (4-1)$$

이산화탄소 고정화된 양은 앞에서 언급한 회분배양에서 건조중량을 통해 식(4-1)을 적용하여 Fig. 4-3와 같이 나타내었다. 건조중량이 최대치에서 고정화된 이산화탄소의 양은 $3.569 g \cdot CO_2/L$ 의 값을 얻었다.

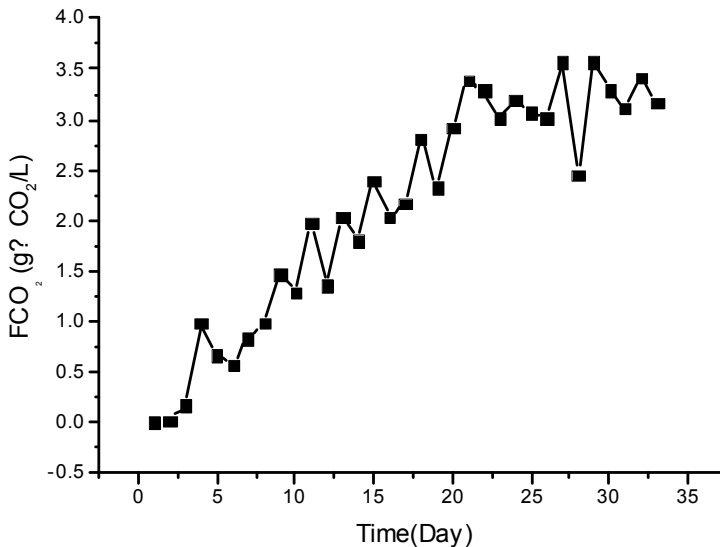


Fig. 4-3 Amount of carbon dioxide fixation

2. 고정화된 이산화탄소의 속도

이산화탄소의 고정화 속도(R_{CO_2} , $g \cdot CO_2/L/day$)는 배양도중 미세조류의 탄소함량을 일정하게 유지 된다는 가정 하에 식(4-1)을 미분하여 식(4-2)와 같이 표현할 수 있다 [2].

$$R_{CO_2} = \frac{dF_{CO_2}}{dt} = C_c \frac{M_{CO_2}}{M_c} \frac{dX}{dt} \quad (g \cdot CO_2/L/day) \quad (4-2)$$

식(4-2)로부터 이산화탄소의 최대치에서 고정화속도는 $0.102 g \cdot CO_2/L/day$ 의 값을 얻었고 각 구간에서의 이산화탄소 고정화속도를 Fig 4-4으로 나타내었다.

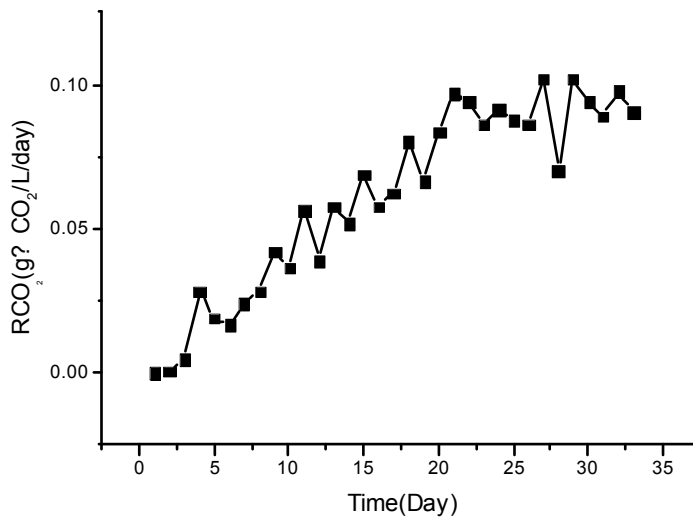


Fig. 4-4 Rate of carbon dioxide fixation

제 5 장 결 론

본 연구에서는 50L 평판형광생물반응기에서 고농도로 성장하는 *Chlorella* sp.를 회분식 배양하여 광세기에 따른 성장과 성장에 따른 용존 산소, 용존 이산화탄소를 실시간 모니터링하여 측정하고, 고정화된 이산화탄소의 양과 속도를 구하였다. 배지공급 속도를 일정하게 유지하고 온오프 제어를 통해 *Chlorella* sp.를 연속 배양하여 필터링 기법을 통한 신호처리를 하였다.

1. 광합성작용으로 인한 미세조류 성장은 도광관으로 24:0 (L/D cycle)로 빛을 조사한 결과 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조사 하였을 때 건조중량 2.05 g/L 로 가장 높았다.

2. 단일 기질농도인 OUR를 이용한 간접 측정방법을 통해 세포 성장에 따른 용존 산소를 측정한 결과 지수성장기 기간에는 광합성이 활발하기 때문에 용존산소량이 많아지는 것을 알 수 있었고, 지연기에 들어서면서 점차 감소하는 것을 파악 할 수 있었다.

용존 이산화탄소는 미세조류가 광합성작용으로 성장하면서 이산화탄소를 흡수하기 때문에 지수성장기 기간에 용존되는 양이 적어지는 것을 볼 수 있었고 지연기에 들어가면서 용존되는 양이 많아지는 것을 파악할 수 있었다.

3. *Chlorella* sp.를 회분 배양하여 성장곡선 모델링한 결과 Baranyi 모델에서 R-square 값이 광학밀도에서는 0.9423, 탁도에서는 0.9715로 가장 높게 나오는 것을 확인 할 수 있었다.

4. 탁도 센서의 신호를 Savitzky-Golay 평활법을 이용하여 필터링함으로써 펄프의 불필요한 동작을 제거 하였으며 조작 변수인 회석률의 변화량(dD)에 비해 제어 변수인 세포 농도(DCW)의 변화량(dx)이 적어, 세포 농도에 비해 회석률이 상대적으로 민감하게 반응 하였다.

본 연구에서는 평판형광생물반응기에서 고농도로 성장하는 미세조류를 배양 제어를 위한 시스템을 개발 하였다. 고농도로 성장하기 위한 이산화탄소 농도, 빛 세기, pH, 온도 등의 환경은 미세조류의 바이오매스 생산성과 지질 함량에 중요한 영향을 끼친다. 본 연구를 통하여 최적화된 미세조류 배양 시스템이 계속 발전되어가는 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 현재 이산화탄소 배출량 감축에 대한 처리 기술이 많이 연구되어 지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 미세조류 배양을 통해 이산화탄소 고정화에 대한 양과 속도를 구하였다. 향후 이산화탄소 감축을 위해 미세조류가 성장하면서 이산화탄소를 흡수하는 흡수율을 통해 감축되는 양에 대한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. 국제환경동향, “환경부,” 제10호, 1998
2. “지구온난화 대책 기술 I,” 첨단환경기술, 6월호, pp. 2-33, 1994
3. 이규완, “온실기체, 인산화탄소의 활용기술,” 첨단환경기술, Vol. 9, pp. 8-26, 1995
4. 이송호, “기후협약을 둘러싼 논의와 대책”
5. Hirata satoshi, Mashito Taya, Setuiji Tone, “Characterization of Chlorella cell cultures in batch and continuous operation under a photoautotrophic conditions,” J.Chem. Eng. Japan, Vol. 29, No. 6, pp. 953-959, 1996
6. Jo, S.J., “미래의 자원으로 각광받는 미세조류,” 삼성경제연구소 SERI 경영 노트 제 170호, 2012
7. Oh, J., Oh, J. S., “Future Resource of Microalgae,” 기술기사집2, Vol. 61, No. 2, pp. 85-90, 2013
8. 에너지경제연구원, 2009
9. Oswald, W. J., “Large scale algal culture systems(engineering aspects): in Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L.J. (Eds.), Micro-algal Biotechnology,” Cambridge University Press, pp. 357-410, 1988
10. Joel L. Cuello, Michael Mason and Michael Kazz, “Design of Scaleable Photobioreactors for Mass Production of Algae for Biofuel Production,” The University of Arizona.
11. Contreras, A., Garcia, F., Molina, E. and Merchuk, J.C., “nteraction between CO₂-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of phaeodactylum tricornutum in a concentric tube airlift photobioreactor,” Biotechnol. Bioeng., Vol. 60, No. 3, pp. 317-325, 1998
12. Martinez-Jeronimo, F. and Espinosa-Chavez, F., “A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags,” J. Appl. Pheol., Vol. 6, No. 4, pp. 423-425, 1994
13. Tredici, M. and Rodolfi, L., “Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms,” WIPO Patent Applicatino WO 2004/074423 A2, 2004

14. <http://sports.chosun.com/news/ntype.htm?id=201312270100240350014907&service date=20131227>
15. Contreras, A., Garcia, F., Molina, E. and Merchuk, J. C., "Interaction between CO₂-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 60, No. 3, pp. 317-325, 1998
16. Martinez-Jeronimo, F. and Espinosa-Chavez, F., "A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags," *J. Appl. Phcol.*, Vol. 6, No. 4, pp. 423-425, 1994
17. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2004074425>
18. Becker, E. W., J. Baddiley, N. H. Carey, I. J. Higgins and W. G. Potter, "Microalgae-biotechnology and microbiology, In *Cambridge Studies in Biotechnology*," Eds., Cambridge University Press, Cambridge, Vol. 10, pp. 293, 1994
- 19 Kim, S.-S., M.-K. Park, N.-S. Oh, D.-C. Kim, M.-S. Han, and M.-J. In., "Studies on quality characteristics and shelf-life of chlorella soybean (Tofu)," *Kor. J. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* Vol. 46, pp. 12-15, 2003
20. Park, M. -K., J. -M. Lee, C. -H. Park, and M. -J. In., "Quality characteristics of Sulgidduk containing *Chlorella* powder," *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* Vol. 31, pp. 225-229, 2002
21. Pore, R. S., "Detoxification chlordecone poisoned rats with *Chlorella* and *Chlorella* derived sporopollenin," *Drug Chem. Toxicol.* Vol. 7, pp. 57-71, 1984
22. Nagano, T., Y. Watanabe, T. Honma, Y. Suketa, and T. Yamamoto, "Asorption and excretion of cadmium by the rat administered cadmium-containing *Chlorella*," *Eisei Kagaku* Vol. 24, pp. 7182-7186, 1978
23. M, S, Kang., S, J, Sim., H, J, Chae., "Chlorella as a functional biomaterial," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 19, No. 1, pp. 1-11, 2004
24. Gladue, R. G. and J. E. Maxey, "Microalgal feeds for aquaculture," *J. Appl. Phcol.* Vol. 6, pp. 131-141, 1994
25. Javanmardian, M. and B. O. Palsson. "Design and operation of an algal

- photobioreactor system,” *Adv. Space Res.* Vol. 12 pp. 231-225, 1992
26. Pratt, R., “Studies on *Chlorella vulgaris*,” *Am. J. Bot.* Vol. 31 pp. 418-421, 1944
 27. Sastre, R. R., Csogor, Z., Perner-Nochta, I., Fleck-Schneider, P. and Posten, C., “Scale-down of Microalgae Cultivations in Tubular Photobioreactor A Conceptual Approach,” *Journal of Biotechnology*, Vol. 132, No. 2, pp. 127-133, 2007
 28. Grobbelaar, J. U., “Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures,” *J. Appl. Phyco.*, Vol. 12, pp. 201-206, 2000
 29. Choi, H. J., Lee, S. M., “Effect of Temperature, Light Intensity and pH on the Growth Rate of *Chlorella Vulgaris*,” *大韓環境工學會誌 論文-Original Paper*, pp. 511-515, 2011
 30. Pirk, S. J., Y. K. Lee, M. R. Walach, M. W. Pirt, H. H. M. Balyuzi, and M. J. Bazin, “A tubular photobioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide Design and performance,” *J. Chem. Tech Biotechnol.*, Vol. 33B, pp. 35-58
 31. Roubicek, R. V., K. H. Patton, K. H. McCorkle, and A. L. Rakow, “Cultivation of microalgae in a photobioreactor,” W. R. Barclay and R. P. MuIntosh eds, pp. 218-221
 32. Mori, K., “Photoautotrophic bioreactor using solar rays condensed by fresnel lenses,” *Biotechnol. Bioeng. symp.*, Vol. 15, pp. 331-345.
 33. Tredici, M. R., P. Carlozzi, G. C. Zittelli, and R. Materassi, “A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyano bacteria,” *Bioresource Technol.*, Vol. 38, pp. 153-160, 1991
 34. Burgess, J. G., K. Iwamoto, Y. Miura, H. Takano, and T. Matunaga, “An optical fiber photobioreactor for enhanced production of the marine unicellular alga *Isochrysis aff. Galgana T-Iso(UTEX LB 2307)* rich in docosahexaenoci acid,” *Microbiol Biotechnol*, Vol. 39, pp. 456-459, 1993
 35. Zijffers, J. F., Jassen, M., Tramper, J. and Wijffels, R. H., “Design Process of an Area-Efficient Photobioreactor,” *Marine Biotechnology*, Vol. 10, No. 4, pp. 404-415, 2008
 36. Ono, E. and Cuello, J. L., “Design Parameters of Solar Concentrating System for Carbon dioxide mitigating Algal Photobioreactors,” *Energy*, Vol. 29, No. 9-10, pp. 1651-1657, 2004
 37. Bolton, J. R. and Hall, D. O., “The maximum Efficiency of Photosynthesis,” *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 53, No. 4, pp. 545-548, 1991
 38. Kunjapur, A. M. and Eldridge, R. B., “Photobioreactor Design for Commercial Biofuel

- Production from Microalgae," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 49, No. 8, pp. 3516-3526, 2010
39. Parker, http://www.texloc.com/closet/cl_refractiveindex.html
 40. W. Stumm and J.J. Morgan, "Aquatic Chemistry," John Wilkey & Sons, New York, Vol. 2, pp. 44, 1981
 41. Van Swaij WPM, Versteeg GF., "Mass transfer accompanied with complex reversible chemical reactions in gas?liquid systems," *An overview. Chem Eng Sci Vol. 47*, pp. 95, 1992
 42. Tsao GT., "Simultaneous gas liquid interfacial mass transfer and uptake by small particles," *Biotechnol Bioeng. Vol. 11*, pp. 87, 1969
 43. Merchuk JC., "Further considerations on the enhancement of oxygen transfer in fermentation broths," *Biotechnol Bioeng Vol. 19*, pp. 9, 1977
 44. Ju LK, Sundararajan A., "Model analysis of biological oxygen transfer enhancement in surface-aerated bioreactors," *Biotechnol Bioeng Vol. 40*, pp. 52, 1992
 45. Garcia-Ochoa F., Gomez E., "Prediction of gas liquid mass transfer in sparged stirred tank bioreactors," *Biotechnol Bioeng Vol. 92*, pp. 72, 2005
 46. E. W. Becker, "Microalgae Biotechnology and microbiology," Cambridge University Press, 1994
 47. Kim, W. D., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. H., Kang, C. M., Kim, D. J., and Kim, S. W., "Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae," *Bioprocess Biosyst. Eng., Vol. 35*, pp. 19-27, 2012
 48. Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., and Liu, T., "Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation," *Chemical Engineering Research and Design, Vol. 89, No. 9*, pp. 1758-1762, 2011
 49. Nedbal, L., Trilek, M., Cervený, J., Komárek, O., and Pakrasi, H. B., "A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics," *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 100, No. 5*, pp. 902-910, 2008
 50. Stibal, M., "Comparison of life strategies in two green algae from snow and soil of the polar regions," M.Sc. Thesis, Biological Sciences, University of South Bohemia, 2004
 51. www.online-ins.com/erp/common/download.php?...turbidity.pdf

52. Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., and Lambert, R. J. W., "Growth curve prediction from optical density data," *Int. J. of Food Microbiology*, Vol. 154, pp. 169-176, 2012
53. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Bombouts, F. M., and Riet, K. V., "Modeling of the Bacterial Growth Curve," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 6, pp. 1875-1881, 1990
54. Baranyi, J. and Roberts, T. A., "Mathematics of predictive food microbiology," *Int. J. of Food Microbiology*, Vol. 26, pp. 199-218, 1995
55. Kim, G. H., Ahn, D. G., Park, J. R., Choi, G. H., Kim, J. T., Kim, K. W., Jeong, S. H., "Bioprocess Control for Continuous Culture of *Dunaliella Salina* in Flat Panel Photobioreactor," *한국정밀공학회지*, Vol. 30, No. 2, pp. 137-142, 2013
56. William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling, Brian P. Flannery., "Numerical Recipes, 3rd ed," Cambridge University Press. 2007
57. A. Savizky and M. J. E. Golay, "Soothing and differentiation of data by simplified least squares procedures," *Anal. Chem.*, Vol. 36, pp. 1627-1639, 1964
58. Lee, S. B., Park, C. B., Seo, I., S., "Development of biological carbon fixation process," *Chemical Industry and Technology*, Vol. 13, No. 4, pp. 347-353, 1995
59. Nakamura, T., Olaizola, M., Cushman, M. and Masutani, M., "Capture and sequestration of CO₂ from stationary combustions by photosynthesis of microalgae", *Proceedings of 1st national conference on CO₂ sequestration, Washington D.C., USA* Vol. 4, pp. 1-6, 2001
60. Kim, Y., M., Kim, J., Y., Lee, S., M., Ha, J., M., Gwon, T., H., Lee, J., H., "Carbon Dioxide Fixation using *Spirulina Platenis* NIES 39 in Polyethylene Bag," *Appl. Chem. Eng.*, Vol. 21, No. 3, pp. 272-277, 2010