



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

석사학위논문

해수 스피룰리나(*Spirulina maxima*)의
저가 배양을 위한 기초연구

A fundamental study on low-cost medium for the culture
of *Spirulina maxima*

제주대학교 대학원
해양생명과학과
정 주 영

2013년 02월

해수 스피룰리나(*Spirulina maxima*)의
저가 배양을 위한 기초연구

지도교수 최 광 식

정 주 영

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2013년 2월

정주영의 이학석사 학위논문으로 인준함

심사위원장 강 도 형 (인)

위 원 허 수 진 (인)

위 원 최 광 식 (인)

제주대학교 대학원

2013년 02월

**Fundamental Study on the Culture of *Spirulina*
maxima Using Low-Cost Materials**

Joo Yeong Jeong

(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the Degree of Master of Science

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February 2013

목 차

ABSTRACT	3
LIST OF FIGURES	5
LIST OF TABLES	6
1. 서 론	7
2. 재료 및 방법	14
2.1. 균주 및 배양재료	14
2.2. 배양 환경	14
2.3. 폐각의 전처리	14
2.4. 토양의 전처리	15
2.5. 실험 1 (CaCl ₂ 변화량 실험)	15
2.6. 실험 2 (NaHCO ₃ 변화량 실험)	15
2.7. 실험 3 (토양추출물 실험)	16
2.8. 최종실험 (폐각과 토양 추출물의 복합실험)	16
2.9. Biomass	17
2.10. 클로로필- <i>a</i> (Chl- <i>a</i>) 함유량 측정	17
2.11. C-Phycocyanin (C-PC) 함유량 측정	17
2.12. 일반성분(Biochemical compositions) 분석	18
3. 결 과	26
3.1. 폐각의 전처리 및 검출된 금속이온의 농도	26
3.2. 실험 1 (CaCl ₂ 변화량 실험)	28
3.3. 실험 2 (NaHCO ₃ 변화량 실험)	31
3.4. 실험 3 (토양추출물 실험)	34
3.5. 최종실험 (폐각과 토양 추출물의 복합실험)	38
4. 고 찰	42
4.1. 폐각의 전처리 및 검출된 금속이온의 농도	42
4.2. 실험 1 (CaCl ₂ 변화량 실험)	44

4.3. 실험 2 (NaHCO ₃ 변화량 실험)	45
4.4. 실험 3 (토양추출물 실험)	45
4.5. 기 타	46
5. 결 론	47
6. 참고문헌	48

ABSTRACT

Spirulina sp. which is one of commercially important interest alga with *Chlorella* sp. and *Dunaliella* sp. has been produced in the form of pills and spray-dried powder approximately 3000 tons per year in the world. Though *Spirulina* sp. cultivated in several sites so far, many places have ceased its production owing to high cost of production, so *Spirulina* sp. is, today, produced in only few countries. The reason for the high cost of production is because of the Zarrouk's medium generally used for cultivating *Spirulina* sp. which contains a tremendous amount of carbon, nitrogen and phosphorus compounds resulting in the high cost of production, compared to other mediums such as Allen's medium, Bold's Basal Medium, Blue Green Medium-11, F/2 medium for cultivating other microalgae such as *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Scenedesmus* sp.

This study was conducted with applying shells and soil to improve efficiency and economic feasibility of *spirulina* production. Both materials went through chemical treatments in their separate ways, which were the alkali treatment with 0.1 M sodium hydroxide for shells and the acid treatment with 10% hydrogen peroxide for soil. The by-products from these treatment on materials; shells and soil extract, were used in this study. Finally, the shells extract was used as a solvent for the medium and the soil extract was used as metal solution to substitute for that of Zarrouk's medium.

As a result, not only was there much differences in the biomass, yield of chlorophyll-*a*, C-PC and biochemical compositions between the control group and the experiment group but also it showed 15% cost reduction from Zarrouk's medium. Additionally, two things which that the amount of the

carbon content had an effect on the growth of *spirulina* sp. rather than production of chlorophyll-*a* and C-phycoyanin and that *Spirulina* sp. was able to produce chlorophyll-*a* and C-phycoyanin even without molybdenum (Mo) and copper (Cu) were also shown in this study.

LIST OF FIGURES

Fig. 1. A pre-treatment of shells. Shells were put into the distilled water for one week, without alkali treatment.	20
Fig. 2. A pre-treatment of soils. Soils were treated with hydrogen peroxide (10%) for one week.	21
Fig. 3. Biomass (A), Chl- <i>a</i> (B) and C-PC (C) in the experiment 1. CaCl ₂ (0.04g/L) was included in Ta-1 and excluded in Ta-2.	30
Fig. 4. Biomass (A), Chl- <i>a</i> (B) and C-PC (C) in the experiment 2. The content of NaHCO ₃ (g/L) was A (0 g/L), B (5 g/L), C (10 g/L) and D (10 g/L). CaCl ₂ was excluded in all experiment group.	33
Fig. 5. Biomass (A), Chl- <i>a</i> (B) and C-PC (C) in the experiment 3. The content of soil extract (mL/L) was S-1 (1 mL/L), S-2 (5 mL/L), S-3 (10 mL/L), S-4 (20 mL/L) and S-5 (30 mL/L).	36
Fig. 6. The metal concentration in the soil extract.	37
Fig. 7. Biomass (A), Chl- <i>a</i> (B) and C-PC (C) in the experiment 4. TR - 1 mL/L (soil extract) and 10 g/L (NaHCO ₃).	40

LIST OF TABLES

Table 1. Components of Zarrouk's Medium (Zarrouk, C., 1966).	10
Table 2. The comparison of medium unit cost between Zarrouk's medium (a) and F/2 medium (b).	11
Table 3. The Soil chemical property by the national soil monitoring.	13
Table 4. Chemical components in Experiment 1.	22
Table 5. Chemical components in Experiment 2.	23
Table 6. Chemical components in Experiment 3.	24
Table 7. Chemical components in Experiment 4.	25
Table 8. pH and the concentration of calcium, magnesium and silicon ion in the pre-treatment of shells. D.W: Distilled water, K-1: D.W with shell having been put into for one week, K-2: Ta-1 treated by 0.1 M NaOH, K-3: D.W already treated by 0.1 M NaOH with shell having been put into for one week. Ca, Mg and Si (M): measured by the kit.	27
Table 9. Biomass, Chl- <i>a</i> and C-PC in the experiment 1. CaCl ₂ (0.04g/L) was included in Ta-1 and excluded in Ta-2.	29
Table 10. Biomass, Chl- <i>a</i> and C-PC in the experiment 2. The content of NaHCO ₃ (g/L) was A (0 g/L), B (5 g/L), C (10 g/L) and D (10 g/L). CaCl ₂ was excluded in all experiment group.	32
Table 11. Biomass, Chl- <i>a</i> and C-PC in the experiment 3. The content of soil extract (mL/L) was S-1 (1 mL/L), S-2 (5 mL/L), S-3 (10 mL/L), S-4 (20 mL/L) and S-5 (30 mL/L).	35
Table 12. Biomass, Chl- <i>a</i> and C-PC in the experiment 4. TR - 1 mL/L (soil extract) and 10 g/L (NaHCO ₃).	39
Table 13. Biochemical compositions analysis in the experiment 4.	41

1. 서론

“용수철 모양으로 꼬였다(Spiral)”라는 라틴어에서 유래한 종명을 가지는 스피롤리나(Spirulina)는 남조 강(Class Cyanophyceae), 연쇄체 목(Order Nostocales), 흔들말 과(Family Oscillatoria), 스피롤리나 속(Genus Spirulina)에 속하는 사상형의 다세포성 남세균으로 아열대, 열대 지역의 고염분, 강알칼리 환경에서 서식하는 산소발생 광합성 생물이다(Hong and Lee, 1993).

스피롤리나는 비타민(vitamin B₁₂, β-carotene), 단백질(60—70%), 불포화지방산인 gamma-linolenic acid(GLA)을 다량 함유하고 제아산틴(zeaxanthin), 피코시아닌(phycoyanin), 마이소크산토펜(myxoxanthophyl)등과 같은 천연 색소를 가지고 있어 면역강화, 혈액순환제, 식품첨가물, 건강보조식품 등으로 이용되고 있는 미세조류로, 알약 혹은 분말가루 형태로 전세계적으로 연간 약 3천톤이 상업적으로 생산되고 있다(Vonshak and Richmond, 1988; Kim et al., 2006). 지금까지 국외 여러 지역에서 스피롤리나의 대량생산이 시도되었지만 높은 생산비용으로 대부분 중단되었고(Vonshak and Richmond, 1988), 그 결과 현재 멕시코(Spirulina Mexicana SA), 중국(Yunnan Spirin Co., Ltd., Hainan DIC Microalgae Co., Ltd.), 태국(Siam Algae Co, Ltd.), 인도(Parry Agro Industries Ltd.), 일본(Nippon Spirulina Co, Ltd.), 대만(Nan Pao Resins Chemical Co., Ltd, Blue Continent Co., Ltd, Far East Microalgae Co., Ltd., Tung Hai Chlorella Co., Ltd.), 이스라엘(Koor Foods Co., Ltd.), 미국(Earthrise Farms, Cyanotech Corporation) 등, 소수의 지역에서만 생산되고 있는 실정이다(Kim et al., 2006).

스피롤리나 배양에 표준배지로 사용되고 있는 Zarrouk's 배지(Zarrouk, 1966, Table 1)는 크게 3종류의 화학적 성상인 산성, 알칼리성 그리고 금속성(미량원소) 이온으로 구성되어 있고, 그 조성에는 주원소인 탄산수소나트륨(NaHCO₃, 16.8 g/L), 질산나트륨(NaNO₃, 2.5 g/L), 인산칼륨(K₂HPO₄, 0.5 g/L), 염화나트륨(NaCl, 1 g/L), 황산칼륨(K₂SO₄, 1 g/L), 염화마그네슘(MgCl₂, 0.2 g/L), 염화칼슘(CaCl₂, 0.04 g/L), 황산철(FeSO₄, 0.01 g/L), Na₂·EDTA(0.08 g/L)와 미량원소인 금속원소와 비타민으로 구성되어 있는데, 이중에서 탄소, 질소, 인 화합물이 전체

화합물의 약 89%를 차지한다. Zarrouk's 배지가 다른 미세조류(*Cheatoceeros* sp., *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. *Haematococcus* sp., *Scenedesmus* sp.)의 기초 및 응용 배양연구에 사용되는 배지인 Allen's medium (Allen and Stanier, 1968), Bold's Basal Medium (BBM) (Bold, 1949), Blue Green Medium-11 (BG-11) (Allen and Stanier, 1968), f/2 (Guillard and Ryther, 1962)등에 비해서 비용이 높은 것은 상기한 바와 같이 다른 배지보다 월등히 많은 양의 탄소, 질소 그리고 인 화합물을 포함하기 때문이다(Table 2).

스피롤리나 생산의 효율성 및 경제성을 높이기 위해서 그 동안 올리브 오일 제분소 폐수 사용(Markou, G., Chatzipavlidis, I. and Georgakakis, D., 2012), 탄산수(Alberto Vieira Costa et al., 2004) 및 해수(Marry Leema et al., 2010)의 활용 등, 지금까지 다양한 연구가 선행 되었다. 올리브 오일 제분소 폐수를 사용한 경우 이를 하이포염소산나트륨으로 처리하여 배양액으로 사용한 결과 폐수가 포함하고 있는 다량의 폐놀, 인 그리고 질소를 제거하였고, 탄산수를 활용한 경우 이에 요소 및 중탄산나트륨을 혼합하여 사용한 결과 스피롤리나의 성장이 증가한 것으로 나타났다. 그리고 해수를 사용하여 배양한 경우, Zarrouk's 배지를 구성하는 원소를 해수로 대체하여 그 배지 비용을 절감하였다.

동일한 목적으로 실시한 이번 실험에서는 탄소원과 미량원소를 얻고자 폐각과 토양이 각각 다른 방법의 화학적 처리를 거쳐 실험에 사용되었는데, 전자의 경우 0.1 M 의 수산화나트륨에 의한 알칼리 처리가, 후자의 경우 10% 농도의 과산화수소에 의한 산처리가 그것이며, 전처리를 거친 폐각 추출물은 배지의 용매로, 토양 추출물은 Zarrouk's 배지의 미량원소 용액의 대체물로 사용하고자 하였다.

폐각은 대부분 탄산칼슘으로 구성되어 있지만 종에 따라 마그네슘과 규소를 포함한다는 사실은(Kotz et al., 2009; 이광우, 1998), 전처리 과정의 폐각을 담고 있는 수용액에서 이와 같은 금속 원소의 존재 가능성을 제시하였고, 금속원소가 산화환경에서 안정된 불용성 산화물을 형성함에 따라(이광우, 1998) 수용액을 알칼리 처리함으로써 이를 제거하고자 하였다. Zarrouk's 배지의 미량원소에 해당되는 7종류의 금속원소인 철(Fe), 붕소(B), 몰리브덴(Mo), 망간(Mn), 아연(Zn), 코발트(Co) 및 구리(Cu)는 비록 적은 양이 요구되나 친생물원소와 함께 육상식물

의 생육에 필수적으로 요구되는 미량원소로 알려져 있다(김계훈 외., 2006). 토양을 재료로 선택한 것은 토양의 미량원소 함유량이 pH에 영향을 받고, 붕소 및 몰리브덴을 제외한 나머지 5가지 금속원소들의 경우 알칼리 토양보다 산성 토양이 상대적으로 많은 양을 함유하고 있다는 것(김진우 외, 2001)과 경기도를 포함하는 대부분의 한국의 토양이 약산성을 나타내고 있었기 때문이다(Table 3).

실험은 4단계로 구성되며, 최종실험인 네 번째 실험의 실험군은 앞의 각 단계의 실험에서 관찰되었던 스피롤리나의 성장률 및 광합성 색소 함유량에서 상위 결과를 보였던 실험군으로 구성되어 있다. 첫 번째와 두 번째 실험은 패각을 재료로 한 실험이고 세 번째 실험은 토양추출물을 재료로 한 실험이다. 따라서 스피롤리나 배양에 있어 두 재료의 활용 가능성의 확인이 이번 연구의 주목적이며 이에 따른 생산 비용의 절감이 이차적 목표라 하겠다.

Table 1. Components of Zarrouk's Medium (Zarrouk, C., 1966).

Components	Amount (g/L)
NaHCO ₃	16.8
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08
Trace metal solution (mL/L) ✓	1
Vitamin solution (mL/L) ✓	1

✓ Trace metal solution

Components	Amount (g/L)
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.8
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.7
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
H ₃ BO ₃	0.01
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.001
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.001
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.000005

✓ Vitamin solution

Components	Amount (g/L)
Cyanocobalamin	

Table 2. The comparison of medium unit cost between Zarrouk's medium(a) and F/2 medium(b).

(a) Zarrouk's medium (Zarrouk, C., 1966).

Components	Cost (won)
NaHCO ₃	31.5
K ₂ HPO ₄	3
NaNO ₃	9.975
K ₂ SO ₄	5.75
NaCl	2.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.546
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.308
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.03
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3.84
Trace metal solution	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.0384
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0021
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0000049
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.00007
H ₃ BO ₃	0.0000375
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.000095
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0000925
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.00005
Vitamin solution	
Cyanocobalamin	0.81
Total	57.75

(b) F/2 medium (Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962).

Components	Cost (won)
NaNO ₃	0.29925
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	0.01996
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	0.594
Trace metal solution	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0756
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.20928
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.000098
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00058275
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0001078
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.00095
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.002376
Vitamin solution	
Thiamine HCl	6.6
Biotin	0.107
Cyanocobalamin	0.162
Total	8.07

Table 3. The Soil chemical property by the national soil monitoring.

Province	pH
Kyeong-gi	5.6
Kangwon	5.2
Chung-buk	5.5
Chung-nam	5.5
Jeon-buk	5.7
Jeon-nam	5.9
Kyeong-buk	5.4
Kyeong-Nam	5.4
National average	5.5

Experimental and research report, Agricultural Science and Technology
institute '92~'93

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양재료

실험 균주로는 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC)에서 분양받아 한국해양과학기술원에서 배양하고 있는 *Spirulina maxima* Setchell & Gardner (Cy-23, UTEX 2342)를 사용하였다. 탄소원 대체를 위한 재료로 사용한 패각의 경우 한국해양과학기술원에서 저서생물 및 퇴적물 조사 시 측정하고 남은 개체의 패각들을, 토양의 경우 한국해양과학기술원 주변의 산(N37°289043, E126°832631)에서 무작위로 채집하여 사용하였다.

2.2. 배양 환경

실험은 2012년 2월부터 약 5개월 동안 실내 배양실에서 진행되었고 실험의 모든 대조군에는 Zarrouk's 배지를, 패각과 토양을 전처리한 재료들을 사용하여 Zarrouk's 배지를 변형한 배지를 실험군의 배지로 사용하였다. 배양액의 수온($29\pm 2^{\circ}\text{C}$), 염분(13~14 psu, Lutron YK-31SA, Taiwan) 그리고 빛의 세기(7.204 Klux, TM-205, TENTARS, Taiwan)를 고정변수로 둔 실험으로, 동일한 온도를 유지하기 위해서 항온항습장치를 사용하여 실내 온도를 유지하였고 염분은 필요시 NaCl을 첨가하여 대조군과 동일하게 유지하였다. 광주기는 일 기준으로 12 : 12 = Light : Dark였고 배양은 공기(250 cc/min, ZP-40, 제피로스 Air pump)를 주입하는 회분식 배양(batch culture)으로 진행되었다.

2.3. 패각의 전처리

증류수에 패각(50 g/L)을 넣고 일주일 동안 외부환경(8°C)에 노출시킨 용액을 0.1 M의 수산화나트륨으로 알칼리처리를 하였고 이를 GF/C 여과지(Whatman, Germany)로 여과시킨 용액을 배지의 용매로 사용하였다(실험1, 2). 이와는 달리

0.1 M의 수산화나트륨으로 미리 알칼리 처리를 한 증류수에 일주일 동안 폐각을 넣은 후 같은 방법으로 여과한 용액을 실험 4의 배지의 용매로 사용하였다(Fig. 1.). 폐각의 전처리 후의 상등액이 포함하는 칼슘, 마그네슘 그리고 규소 이온의 함량을 UV/vis spectrophotometer (Optizen-pop, Korea)와 분석키트(Merck, Spectroquant® test kit, Germany)를 사용하여 정량하였다.

2.4. 토양의 전처리

채집한 토양을 50°C에서 (Digital Drying oven, Do-150) 일주일 동안 건조시키고 이를 10%의 과산화수소 용액에 다시 일주일간 반응시킨(10 mg/100 mL) 후 (Fig. 2.), 그 상등액을 GF/C 여과지로 여과하여 이를 실험군의 미량원소 용액으로 사용하였다. 미량원소를 구성하는 7가지 금속원소인 Mn, Cu, Mo, Zn, B, Fe 및 Co에 대한 추출물의 성분분석은 한국고분자시험연구소(Korea polymer testing & research Institute, Koptri)에 의뢰하여 분석을 수행하였다.

2.5. 실험 1 (CaCl₂ 변화량 실험)

폐각의 전처리 결과를 토대로 CaCl₂ 함유량에 변화를 준 실험으로 배지 조성은 Table 4와 같다. 실험군 Ta-1에는 CaCl₂ (0.04 g/L)을 첨가하였고 실험군 Ta-2에는 이를 배제하였으며, CaCl₂를 제외한 나머지 화합물의 양은 두 실험군 모두 Zarrouk's 배지의 비율과 동일하다. 실험은 1 L 삼각플라스크에서 21일 동안 수행되었고 샘플링은 3일 간격으로 각각 10 mL씩 2번 반복 실시하여 생물량 (Biomass), 클로로필-a(Chl-a) 그리고 C-피코시아닌(C-PC) 함유량을 정량하였다.

2.6. 실험 2 (NaHCO₃ 변화량 실험)

실험 1의 결과를 토대로 NaHCO₃의 함유량에 변화를 준 실험으로 배지 조성은

Table 5와 같다. 모든 실험군에는 CaCl_2 를 제외하였고 나머지 화합물의 양은 Zarrouk's 배지의 비율과 동일하다. 각 실험군에 첨가한 NaHCO_3 의 양은 A (0 g/L), B (5 g/L), C (10 g/L) 그리고 D (10 g/L)이다. 실험군 D의 경우, NaHCO_3 의 중량만 조정된 Zarrouk's 배지로 대조군과 실험군 C에 상응하는 준대조군이 다. 실험은 1 L 플라스크에서 22일 동안 진행되었고 샘플링은 3일 간격으로 각각 10 mL씩 2번 반복 실시하여 Biomass, Chl-*a* 그리고 C-PC 함유량을 정량하였다.

2.7. 실험 3 (토양추출물 실험)

토양추출물을 미량원소 용액으로 사용한 실험으로 배지 조성은 Table 6과 같다. 미량원소를 제외한 모든 실험군의 화합물 양은 Zarrouk's 배지의 비율과 동일하며, 실험군의 배지의 용매 역시 대조군과 같은 증류수를 사용하였다. 각 실험군에 첨가된 토양추출물의 양은 S-1 (1 mL/L), S-2 (5 mL/L), S-3 (10 mL/L), S-4 (20 mL/L) and S-5 (30 mL/L)이다. 실험은 2 L 플라스크에서 25일 동안 진행되었고 샘플링은 3일 간격으로 각각 10 mL씩 2번 반복 실시하여 Biomass, Chl-*a* 그리고 C-PC를 함유량을 정량하였다.

2.8. 최종실험 (폐각과 토양 추출물의 복합실험)

실험 2와 실험 3의 결과를 토대로 진행한 최종 실험으로 배지 조성은 Table 7과 같다. 실험군은 실험 2의 실험군 C(NaHCO_3 , 10 g/L)와 실험 3의 실험군 S-1 (토양추출물 1 mL/L)으로 구성되어 있다. 다른 화합물의 양은 Zarrouk's 배지의 비율과 동일하다. 대조군과 실험군 모두 각각 3개의 5 L 삼각플라스크에서 26일 동안 진행되었고 샘플링은 3일 간격으로 각각 20 mL씩 3번 반복 실시하여 Biomass, Chl-*a* 그리고 C-PC 함유량의 결과(평균±표준편차)를 표시하였다. 추가적으로 통계분석과 기능성 식품으로서의 이용 가능성을 확인하고자 일반성분 (Biochemical compositions) 분석을 하였다. 통계분석은 SPSS (Statistical

Package for Social Science. USA) 프로그램을 이용하여 이원배치분산분석 (two-way ANOVA test)에 의한 평균값간 유의성을 검정하였다. 실험군의 초기 pH는 10.05, 염분은 13.4 psu (HORIBA, D-51, Japan)였다.

2.9. Biomass

Biomass는 건조중량으로 산출하였는데, 배양시료를 GF/C 유리섬유여과지로 여과하고, 이를 50°C에서 24시간 건조한 후, 그 여과지의 최종무게와 초기무게의 차이로 계산하였다.

2.10. 클로로필-a (Chl-a) 함유량 측정

배양시료를 GF/C 유리섬유여과지로 여과하고 15 mL conical tube에 90% 아세톤 5 mL을 첨가하여 24시간 냉장보관 후, 원심분리(3000 rpm, 20 min)하였다. 상등액은 UV/vis spectrophotometer (Optizen-pop, Korea)에서 625, 647, 664 nm 파장에서의 흡광도를 분광광도계로 측정하여 함유량을 정량하였다 (Moran, 1982, 식 1).

$$\text{Chl-a} = 12.65 \times A_{664} - 2.99 \times A_{647} - 0.04 \times A_{625} \dots\dots\dots (\text{식 1})$$

2.11. C-Phycocyanin (C-PC) 함유량 측정

배양시료를 GF/C 유리섬유여과지로 여과하고 15 mL conical tube에 0.1 M Sodium Phosphate buffer (add NaN₃, pH 7.0) 10 mL을 첨가하여 24시간 냉장보관 후 원심분리(3000 rpm, 20 min)하여 상등액은 UV/vis Spectrophotometer (Optizen-pop, Korea)에서 562, 620, 652 nm 파장에서의 흡광도를 분광광도계로 측정하여 함유량을 정량하였다 (A and L. 1973, 식 2).

$$\text{C-PC} = [A_{620} - 0.474 \times (A_{652})] / 5.34 \dots\dots\dots (\text{식 2})$$

2.12. Biochemical compositions 분석

조지방 분석의 경우, 샘플 50 mg을 넣은 15 mL conical tube에 클로로포름과 메탄올을 1:2로 섞은 용액을 3 mL 넣고 초음파분쇄기로 파쇄한 후 원심분리(3000 rpm, 5 min)를 한 상등액을 50 mL conical tube에 보관한다. 샘플만 남아 있는 15 mL conical tube에 클로로포름과 메탄올을 2:1로 섞은 용액을 3 mL 넣고 초음파분쇄기로 파쇄한 후 원심분리(3000 rpm, 5 min)를 한 상등액을 앞의 50 mL conical tube에 담아 넣는다. 가능한 색소가 모두 추출될 때까지 이를 반복하여 시행한다. 이렇게 모아진 상등액의 50% 양만큼 0.9% NaCl을 50 mL conical tube에 첨가하여 1시간가량 반응시킨 후 다시 원심 분리하여 층을 분리시키고 클로로포름 층의 용액만을 바이알에 넣고 휘발시킨 후 그 무게를 측정하여 다음과 같은 식(식 3)으로 조지질 함량을 산출하였다.

$$\text{Lipid (\%)} = (\text{BF} - \text{AF}) / \text{S} \times 100 \dots\dots\dots (\text{식 3})$$

(BF : 휘발시키기 전 바이알 무게(g), AF : 휘발시킨 후 바이알 무게(g), S : 샘플 무게(g))

조단백질 분석의 경우, 샘플 0.5 g, 황산 12 mL 그리고 촉매제(kjeldahl tablets) 2알을 실험용 유리관에 함께 넣어 1시간 동안 가열한(410°C) 후 이를 KjeltecTM8200 system 자동증류장치(Foss, Denmark)에서 증류 반응을 시키고 남은 용매를 1 N 염산으로 적정하여 다음과 같은 식(식 4)으로 조단백질 함량을 산출하였다.

$$\text{Protein (\%)} = (\text{T}-\text{B}) \times \text{H} \times \text{N} \times 100 / \text{S} \times \text{F} \dots\dots\dots (\text{식 4})$$

(T : 0.1 N HCl 적정량(mL), B : 공시험에 소비된 0.1 N HCl 소비량(mL), H : HCl의 노르말 농도, N : 질소원자량, F : 질소 단백질 환산계수(6.25), S : 샘플의 무게(g))

수분 분석의 경우, 24시간 동안 105°C(DO-150, 동서과학, Korea)에서 건조시킨 샘플(0.5 g)을 실온에서 방랭한 후 그 초기무게와 최종무게의 차이를 측정하여

다음과 같은 식(식 5)으로 수분 함량을 산출하였다.

$$\text{Moisture (\%)} = ((S+D) - AM) / S \times 100 \dots\dots\dots (\text{식 5})$$

(D : 도가니 무게(g), S : 샘플 무게(g), AM : 건조 후 샘플 무게(g))

조회분 분석의 경우, 수분 분석 후의 샘플을 회화로(600℃, 24 hour, PMF-4.5, Lab house, Korea)에서 건조시키고 실온에서 방랭한 후 그 초기무게와 최종무게의 차이를 측정하여 다음과 같은 식(식 6)으로 조회분 함량을 산출하였다.

$$\text{Ash (\%)} = (BA - D) / S \times 100 \dots\dots\dots (\text{식 6})$$

(D : 도가니 무게(g), AM : 태운 후 샘플 무게(g), S : 샘플 무게(g))

탄수화물의 경우, 위에 열거한 네 가지 성분들의 합을 백분율과의 차이를 그 함량으로 하였다.

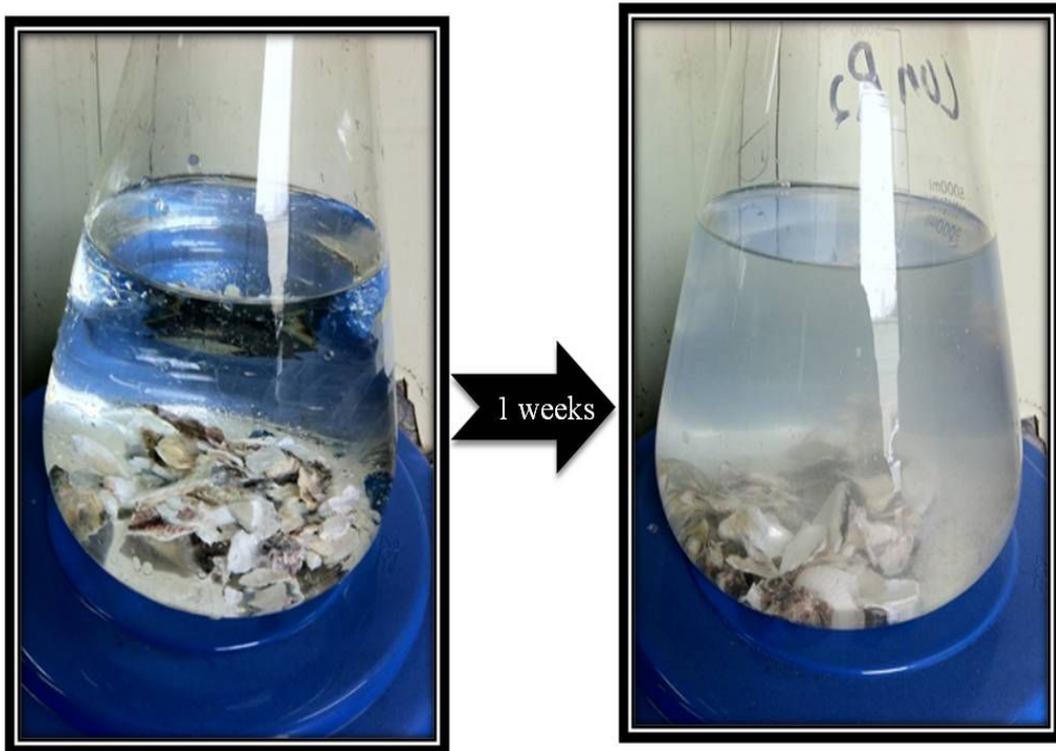


Fig. 1. A pre-treatment of shells. Shells were put into the distilled water for one week, without alkali treatment.



Fig. 2. A pre-treatment of soils. Soil was treated with hydrogen peroxide (10%) for one week.

Table 4. Chemical components in Experiment 1.

Components	(g/L)	
	Ta-1	Ta-2
NaHCO ₃	16.8	5
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5
NaNO ₃	2.5	2.5
K ₂ SO ₄	1	1
NaCl	1	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04	–
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08	0.08
Trace metal solution (mL/L)	1	1
Vitamin solution (mL/L)	1	1
Solvent	K-2	K-2

Table 5. Chemical components in Experiment 2.

Components	(g/L)				
	CON	A	B	C	D
NaHCO ₃	16.8	0	5	10	10
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
NaNO ₃	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
K ₂ SO ₄	1	1	1	1	1
NaCl	1	1	1	1	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	-	-	-	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Trace metal solution (mL/L)	1	1	1	1	1
Vitamin solution (mL/L)	1	1	1	1	1
Solvent	D.W	K-2	K-2	K-2	D.W

Table 6. Chemical components in Experiment 3.

Components	(g/L)					
	CON	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5
NaHCO ₃	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
NaNO ₃	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
K ₂ SO ₄	1	1	1	1	1	1
NaCl	1	1	1	1	1	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Vitamin solution (mL/L)	1	1	1	1	1	1
Trace metal Solution (mL/L)	1 (Zarrouk's)	1 (Soil)	5 (Soil)	10 (Soil)	20 (Soil)	30 (Soil)
Solvent	D.W	D.W	D.W	D.W	D.W	D.W

Table 7. Chemical components in Experiment 4.

(g/L)		
Components	CON	TR
NaHCO ₃	16.8	10
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5
NaNO ₃	2.5	2.5
K ₂ SO ₄	1	1
NaCl	1	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	0.01
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08	0.08
Vitamin solution (mL)	1	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04	-
Vitamin solution (mL)	1	1
Trace metal solution (mL)	1 (Zarrouk's)	1 (Soil extract)
Solvent	D.W	K-3

3. 결 과

3.1. 폐각의 전처리 및 검출된 금속이온의 농도

Table 8은 폐각의 전처리 과정 및 각 과정 단계에서의 pH, 검출된 금속원소; 칼슘, 마그네슘 그리고 규소의 농도를 나타내고 있다. K-1은 증류수에 폐각을 넣고 일주일 동안 외부(8℃)에 노출된 용액을, K-2는 K-1에 0.1 M 수산화나트륨을 첨가하여 알칼리처리 한 용액을 그리고 K-3은 수산화나트륨으로 알칼리처리를 한 증류수에 폐각을 넣고 일주일 동안 외부에 노출시킨 용액을 나타낸다. 실제로 실험에 사용한 용액은 K-2와 K-3로, 앞서 말한 바와 같이 K-2의 용액은 실험 1과 실험 2에, K-3의 용액은 실험 4에 사용되었다. 분석결과 칼슘 이온의 농도는 폐각을 처리한 각 과정의 모든 실험군의 용액에서(K-1, 2, 3) 대조군의 농도를 초과하였지만, 마그네슘 및 규소 이온은 검출되지 않았다.

Table 8. pH and the concentration of calcium, magnesium and silicon ion in the pre-treatment of shells.

	D.W	K-1	K-2	K-3	Zarrouk's medium
pH	6.61	8.49	13.16	13.12	9.53
Ca (M)		3.22×10^{-3}	3.56×10^{-3}	4.41×10^{-3}	2.72×10^{-4}
Mg (M)	-	-	-	-	8.10×10^{-4}
Si (M)	-	-	-	-	-

D.W: Distilled water, K-1: D.W with shell having been put into for one week, K-2: K-1 treated by 0.1 M NaOH, K-3: D.W already treated by 0.1 M NaOH with shell having been put into for one week. Ca, Mg and Si (M): measured by the kit.

3.2. 실험 1 (CaCl₂변화량 실험)

Table 9는 측정된 Biomass, Chl-*a*, C-PC의 결과값이고 Fig. 3은 이를 그래프로 나타낸 것이다. Ta-2의 모든 결과값이 Ta-1보다 다소 높게 나타났다.

Table 9. The contents of Biomass, Chl-*a* and C-PC in the experiment 1.

	Day	6	9	12	15	18	21
Biomass (g/L)	Ta-1	1.00	1.51	1.73	2.00	2.12	2.31
	Ta-2	0.91	1.34	1.87	2.10	2.33	2.21
Chl- <i>a</i> (mg/L)	Ta-1	4.38	9.50	14.64	23.80	25.98	18.09
	Ta-2	4.57	11.90	14.74	24.94	25.83	17.66
C-PC (mg/ml)	Ta-1	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.06
	Ta-2	0.00	0.01	0.04	0.03	0.03	0.06

CaCl₂ (0.04 g/L) was included in Ta-1 and excluded in Ta-2.

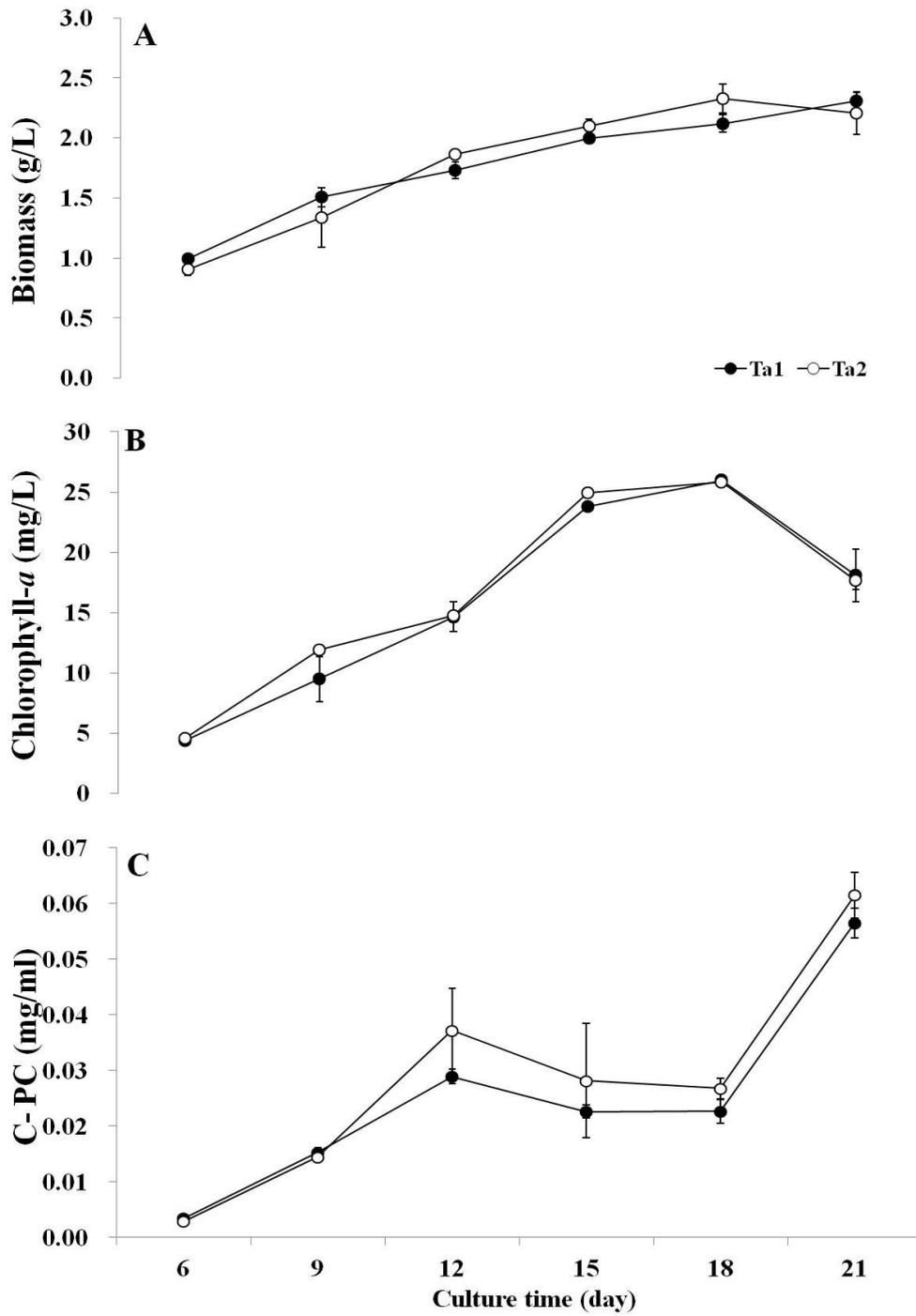


Fig. 3. Biomass(A), Chl-*a*(B) and C-PC(C) in the experiment 1. CaCl₂(0.04 g/L) was included in Ta-1 and excluded in Ta-2.

3.3. 실험 2 (NaHCO₃ 변화량 실험)

Table 10은 측정된 Biomass, Chl-*a*, C-PC의 결과값이고 Fig. 4는 이를 그래프로 나타낸 것이다. 성장은 모든 그룹에서 관찰되었다. 탄소원을 포함하지 않은 실험군 A에서 성장(Fig. 4(A))을 보였고, 탄소량만 달리했던 Con과 실험군 D에서 Biomass, Chl-*a* 및 C-PC의 성장률이 탄산수소나트륨의 양에 비례하여 나타났다(Fig. 4). 실험군 D보다 탄소원이 적게 첨가된 실험군 B와 같은 양이 첨가된 실험군 C에서 Chl-*a*와 C-PC의 함량이 비슷하거나 높게 나타났다(Fig. 4(B), (C)).

Table 10.

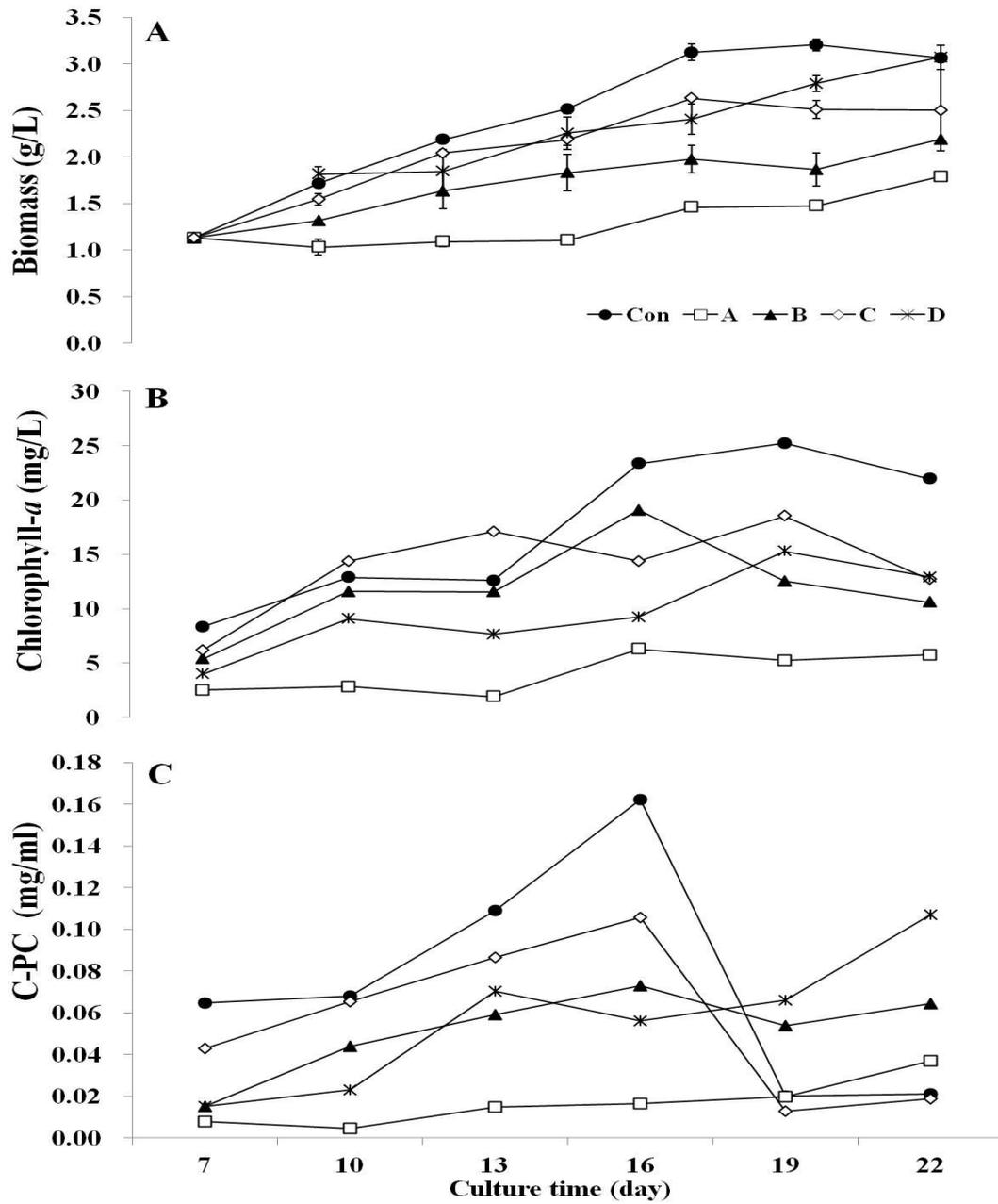


Fig. 4. Biomass(A), Chl-*a*(B) and C-PC(C) in the experiment 2. The content of NaHCO₃(g/L) was A(0 g/L), B(5 g/L), C(10 g/L) and D(10 g/L). CaCl₂ was excluded in all experiment group.

3.4. 실험 3 (토양추출물 실험)

Table 11은 측정된 Biomass, Chl-*a*, C-PC의 결과값이고 Fig. 5는 이를 그래프로 나타낸 것이다. 모든 그룹에서 비슷한 성장률이 관찰되었고, 다른 그룹과는 다르게 실험군 S-4와 S-5에서 지속된 성장을 보였다(Fig. 5(A)). Chl-*a*와 C-PC의 함량은 대조군보다 모든 실험군에서 높게 나타났다(Fig. 5(B), (C)). 토양추출물의 분석 결과, 실험에 사용한 토양에서 Mo과 Cu가 결여된 것으로 나타났다(Fig 6).

Table 11.

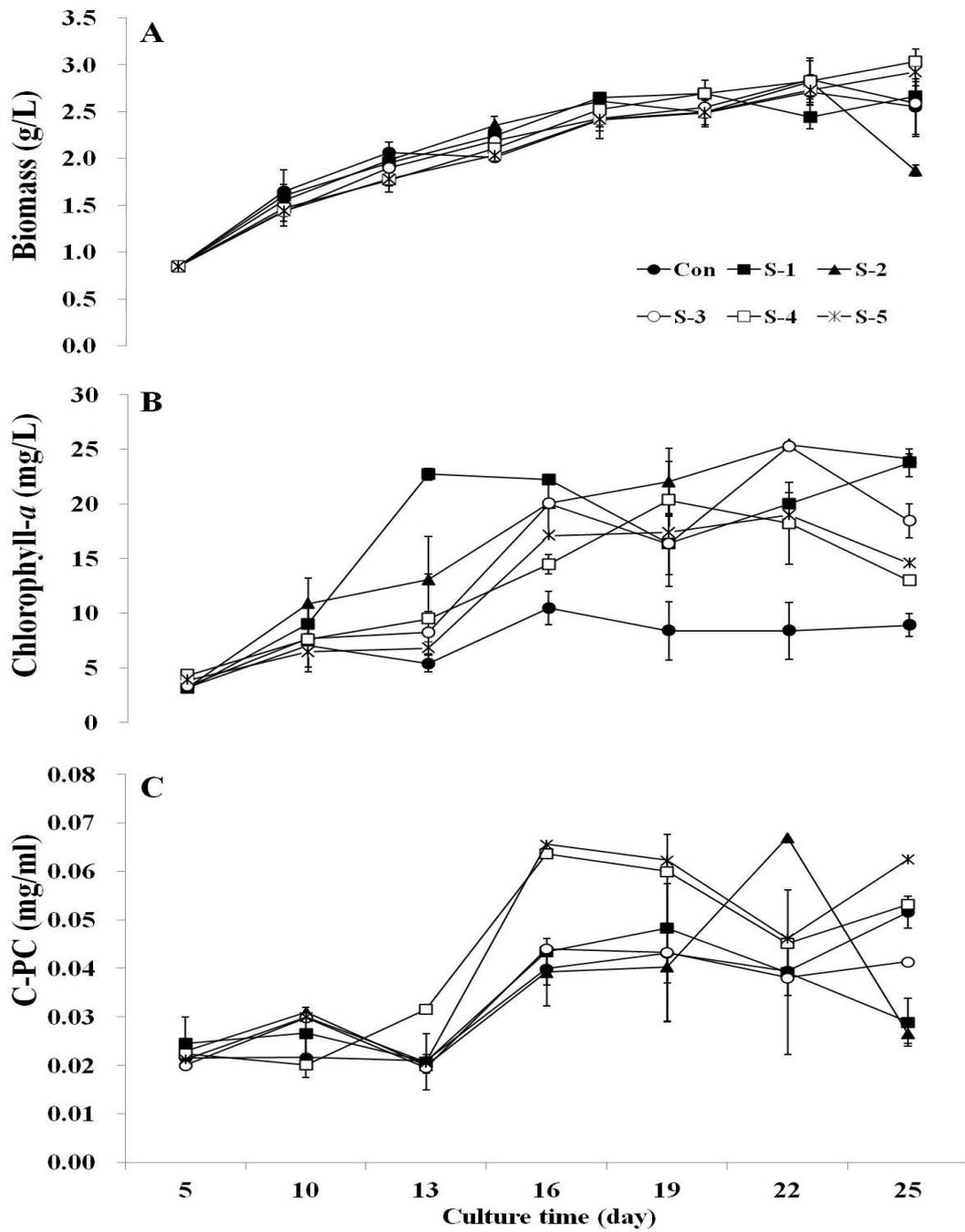


Fig. 5. Biomass(A), Chl-*a*(B) and C-PC(C) in the experiment 3. The content of soil extract(mL/L) was S-1(1 mL/L), S-2(5 mL/L), S-3(10 mL/L), S-4(20 mL/L) and S-5(30 mL/L).

Fig. 6. The metal concentration in the soil extract.



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 150-038 서울특별시 영등포구 영등포동8가 88-2 TEL (02)2164-0011 FAX (02)2634-1008

성적서번호 : TAE-001107 접수 일자 : 2012년 05월 02일
 대 표 자 : 강정극 시험완료일자 : 2012년 06월 07일
 업 체 명 : 한국해양연구원
 주 소 : 경기 안산시 상록구 사동 1270

시 료 명 : 토양추출물

시험 결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
Fe	mg/L	-	2.41	APHA Standard Methods : 2005
Zn	mg/L	-	0.24	APHA Standard Methods : 2005
Cu	mg/L	-	0.00	APHA Standard Methods : 2005
Mn	mg/L	-	15.7	APHA Standard Methods : 2005
Co	mg/L	-	0.21	APHA Standard Methods : 2005
Mo	mg/L	-	0.00	APHA Standard Methods : 2005
B	mg/L	-	2.06	APHA Standard Methods : 2005

용도 : 품질관리용

비 고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

3.5. 최종실험 (폐각과 토양 추출물의 복합실험)

Table 12는 측정된 Biomass, Chl-*a*, C-PC의 결과값이고 Fig. 7은 이를 그래프로 나타낸 것이다. 예상대로 대조군보다 실험군에서 모든 결과값; Biomass, Chl-*a*, C-PC 함량이 높게 나타났다(Fig. 7). 일반성분 분석결과(Table 13), 대조군에서 조단백질과 조회분의 함유량이, 실험군에서 조지질, 탄수화물 그리고 수분의 함유량이 보다 많이 검출되었지만 전반적으로 큰 차이는 보이지 않았다. 통계분석 결과, 대조군에 비해서 실험군이 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

Table 12.

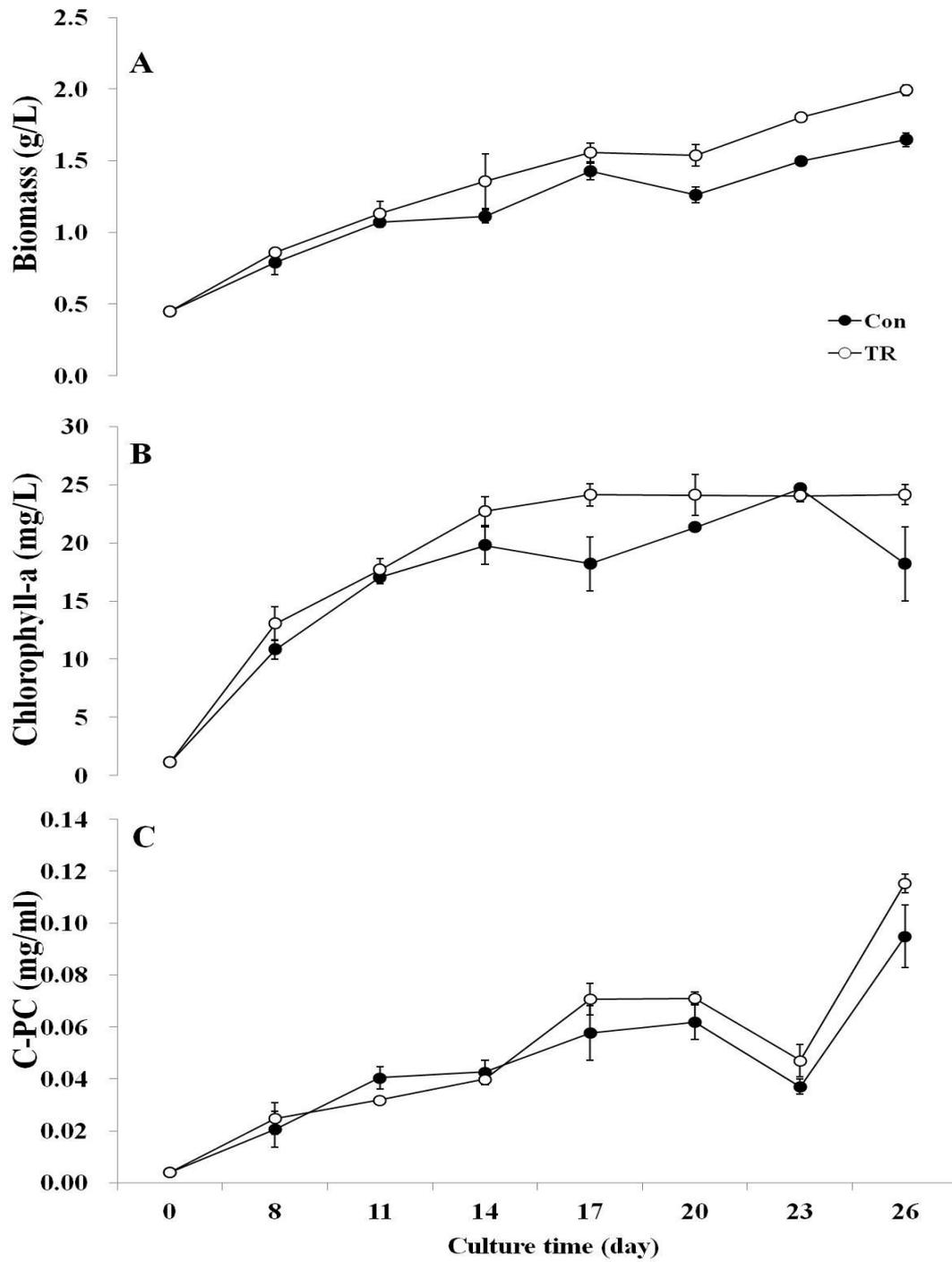


Fig. 7. Biomass(A), Chl-*a*(B) and C-PC(C) in the experiment 4. TR - 1 mL/L (soil extract) and 10 g/L (NaHCO₃).

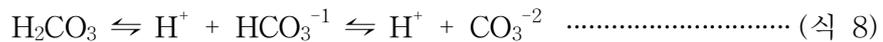
Table 13. Biochemical compositions analysis in the experiment 4.

	(%)				
	Protein	Lipid	Carbohydrate	Moisture	Ash
Con	50.72±0.3	9.1±0.53	17.77±0.3	2.15±0.13	20.26±0.26
TR	50.42±1.0	9.8±0.47	18.83±0.4	2.18±0.03	18.77±0.25

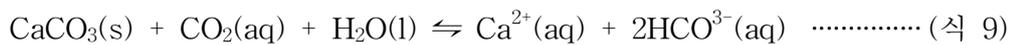
4. 고 찰

4.1. 폐각의 전처리 및 검출된 금속이온의 농도

대기 중의 이산화탄소가 기체와 액체 간의 분압 차이에 의해 물에 용해될 때 탄산 형태로 전환되고(이광우, 1998, 식 7), 물에 용해된 이산화탄소는 물의 pH에 따라 이산화탄소(pH<6.5), 탄산수소이온(6.5<pH<10.4) 그리고 탄산이온(pH>10.4) 형태로 수중에 존재한다(이광우, 1998, 식 8).



또한 폐각의 주요성분인 탄산칼슘(CaCO₃)은 이산화탄소를 함유하는 산성 용액에 용해되어 칼슘이온과 탄산수소이온, 즉 중탄산칼슘 형태로 수용액에 존재한다(Kotz et al., 2009, 식 9).



물에 대한 탄산칼슘의 용해를 위의 이론을 적용하여 2가지로 설명할 수 있는데 (Table 8) 증류수에 폐각을 일주일 동안 넣은 후의 pH값의 변화(K-1, pH 8.49)가 그 첫 번째로, 양쪽성 음이온으로 작용하는 탄산수소이온의 특성($K_a < K_b$) 때문에(Kotz et al., 2009) 수용액이 약염기성을 보이는 것이다. 증류수(D.W)가 약산성을 나타내는 것은 2가지의 가능성, 즉 실험에 사용된 증류수가 1차 증류수이므로 그 제조과정에서 이산화탄소가 완전히 제거되지 않았을 가능성과 평소에 사용하는 증류수를 실험에 사용하였으므로 상당기간 이를 사용하는 과정에서 대기 중으로부터 이산화탄소가 유입되었을 가능성 때문이라고 여겨진다. 어떤 과정이었든지 간에, 이 현상은 이산화탄소가 물에 녹으며 발생한 수소이온이 탄산칼슘을 용해하였고, 이로부터 해리된 탄산이 탄산수소이온 형태로 수용액에 존재한다는 것을 의미한다. 두 번째는 검출된 칼슘이온의 농도인데, 폐각을 넣기 전의 증류수에서는 그 농도가 검출되지 않았던 반면, 폐각을 넣고 일주일 후의 용액인 K-1에서는 그 농도가 검출된 것이다(3.22×10^{-3} M). 또한 K-1 수용액 내 검출

된 칼슘이온 농도와(식 10) 이산화탄소의 부분압에 따른 탄산칼슘의 용해도(Lide, D. R., 2005, 식 11)의 비교로도 설명이 가능하다.

$$\langle K-1 \rangle \quad [Ca^{2+}] = 3.22 \times 10^{-3} \dots\dots\dots (식 10)$$

$$P_{CO_2} (atm) = 10^{-1} (pH 6.63), [Ca^{2+}] = 3.05 \times 10^{-3} \dots\dots\dots (식 11)$$

참고자료와 이번 실험에서 검출된 칼슘농도의 값에 차이를 보이는 것은 각각의 실험이 서로 다른 환경, 즉 참고자료의 경우 상온에서, 이번 실험의 경우 낮은 온도의 환경(8°C)에서 수행되었기 때문인데 이것은 기체의 액체에 대한 용해도가 온도에 반비례한다는 것으로 설명되어 진다(이광우, 1998). 따라서 위의 2가지 근거는 탄산칼슘이 물에 용해되었다는 것을 반영하며 탄산의 경우, 칼슘과 동일한 산화수를 가지고 있기 때문에 이와 동일한 농도로 용해되어 탄산수소이온의 형태로 수용액 내 존재할 것이다.

K-2에서 검출된 칼슘농도가 K-1보다 높게 나타나는 것은 2가지 관점에서 설명이 가능한데, 앞의 경우와 마찬가지로 검출된 칼슘 농도와(식 12) 이산화탄소의 부분압에 따른 탄산칼슘의 용해도(Lide, D. R., 2005, 식 13)를 비교하는 것이 그 첫 번째이고

$$\langle K-2 \rangle \quad [Ca^{2+}] = 3.56 \times 10^{-3} \dots\dots\dots (식 12)$$

$$P_{CO_2} (atm) = 10^{-12} (pH 12.0), [Ca^{2+}] = 5.19 \times 10^{-3} \dots\dots\dots (식 13)$$

두 번째는 수산화칼슘의 용해도 상수(K_{sp})(Dominguez Hills., California State University, 식 14)와 평형지수(Q)(Kotz et al., 2009, 식 15)의 상관관계이다.

$$K_{sp} (Ca(OH)_2) = 5.5 \times 10^{-6}, [Ca^{2+}] = 2.35 \times 10^{-3} \dots\dots\dots (식 14)$$

$$Q = [Ca^{2+}][OH^-] = (3.22 \times 10^{-3})(1 \times 10^{-1}) = 3.22 \times 10^{-4} \dots\dots\dots (식 15)$$

$$Q (3.22 \times 10^{-4}) < K_{sp} (2.35 \times 10^{-3})$$

따라서 패각은 시간이 흐를수록 평형 상태에 이를 때까지 용해가 지속될 것이다. 또한 위의 K-1과 K-2의 이산화탄소의 부분압에 따른 탄산칼슘의 용해도를

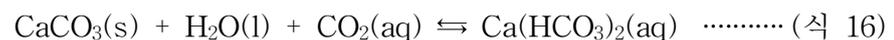
비교해보면(식 11, 식 13), 약산성 환경보다 강염기 환경에서 탄산칼슘이 보다 많은 용해가 이루어진다는 것을 알 수 있다.

$$P_{CO_2}(atm) = 10^{-1} \text{ (pH 6.63), } [Ca^{2+}] = 3.05 \times 10^{-3} \text{ (식 11)}$$

$$P_{CO_2}(atm) = 10^{-12} \text{ (pH 12.0), } [Ca^{2+}] = 5.19 \times 10^{-3} \text{ (식 13)}$$

실험1, 2(K-2 용액사용)와 실험4(K-3 용액사용)의 알칼리처리 방법이 다른 것은, 이 사실을 실험 3(토양추출물 실험)이 진행되는 동안 알게 됨에 따라 더 많은 탄소원을 얻고자 그 처리 방식을 변경했기 때문이었다. Table 8에 나타난 바와 같이, 예상대로 K-2보다 K-3의 수용액에서 더 많은 칼슘 농도(4.41×10^{-3} M)가 검출되었다.

마지막으로 패각의 전처리 과정(K-1)에서 작은 알갱이 모양의 침전물이 형성되는 것이 관찰되는데, 이것은 수용성 착이온(Ca^{2+})이 가끔씩 불용성 염($CaCO_3$)을 우선적으로 생성한다는 연속 평형의 예로 여겨진다(Kotz et al., 2009, 식 16).



따라서, 결과적으로 전체 반응은 생성물 쪽으로 진행되겠지만 관찰되는 침전물은 대부분 탄산칼슘, 존재한다면 탄산마그네슘과 같은 탄산염일 것이라고 사료된다.

4.2. 실험 1 (CaCl₂ 변화량 실험)

Table 8에서 K-2의 용액에서 검출된 칼슘농도(3.56×10^{-3} M)가 Zarrouk's 배지의 칼슘농도(2.72×10^{-4} M)를 초과하였기에, 이를 확인하고자 실시한 실험이다. Ta-2의 결과값이 Ta-1보다 높게 나타났는데, 이는 칼슘이온이 스피룰리나나 Biomass, Chl-*a* 및 C-PC을 생산함에 있어 한편으로는 제한요인으로, 다른 한편으로는 칼슘의 농도가 어느 정도 초과하더라도 이들의 생산에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

4.3. 실험 2 (NaHCO₃ 변화량 실험)

실험 1에서 CaCl₂를 첨가하지 않았던 Ta-2배지에서 스피롤리나의 성장이 관찰되어 모든 실험군에 CaCl₂를 제외했던 실험이다. 탄소원의 함유량만 달리 했던 실험군 D(NaHCO₃, 10 g/L)와 대조군(NaHCO₃, 16.8 g/L)의 모든 결과값; Biomass, Chl-*a* 및 C-PC 이 탄소원의 함량에 비례하여 나타난 것으로 보아, 이들 사이에는 상관관계가 있는 것으로 생각되는데, 이러한 관점에서 실험군 D보다 실험군 B와 실험군 C에서 Chl-*a* 및 C-PC의 함량이 높게 나타난 것은 매우 흥미로운 결과다. 실험군 B와 실험군 C에 사용한 배지의 용매 K-2에서 검출된 탄산이온의 농도(3.56×10^{-3} M)를 질량으로 환산하면 중탄산나트륨(NaHCO₃) 기준으로 약 0.3 g이므로 두 실험군에 첨가된 탄소원의 최종 함량의 경우 실험군 B은 5.3 g/L, 실험군 C은 10.3 g/L 이다. 대조군(16.8 g/L)과 실험군 D(10 g/L) 그리고 실험군 D와 실험군 B(5.3 g/L), C(10.3 g/L)의 결과를 종합해보면, 탄소원의 함량이 스피롤리나의 성장에는 관여하지만 광합성 색소를 생산하는데 있어서는 크게 관여하지 않는 것으로 보인다. 따라서 이와 관련하는 다른 가능성, 이를테면 폐각으로부터 탄산이온과 칼슘이온 외에 스피롤리나의 성장 및 광합성 색소의 생산에 영향을 미칠 수 있는 검출되지 않은 다른 원소; 질소, 인, 규소, 마그네슘, 미량원소 등, 의 용해가, 혹은 전처리 과정에서 공기로부터 이들의 유입이 있었을 것이라고 생각한다.

4.4. 실험 3 (토양추출물 실험)

Fig. 5.(B), (C)에서 엽록소의 높은 함유량이 실험군 S-1과 실험군 S-2에서, C-PC의 높은 함유량은 실험군 S-4와 실험군 S-5에서 나타난 것으로 보아 토양추출물의 양과 이들 함유량 사이에는 밀접한 상관관계는 없는 것으로 보인다. 흥미로운 점은 대조군보다 모든 실험군에서 이들의 함유량이 높게 나타난 것인데, 비록 이번 실험에서는 토양추출물의 분석항목을 7가지의 금속원소로 국한함에 따라 이 이상의 것은 알 수 없었지만, 다양한 유기물을 포함하는 토양으로부터

광합성 색소의 생산에 영향을 미치는 다른 원소들이 전처리 과정에서 유입이 있었을 것이라 또한 생각한다.

토양추출물의 분석결과 Mo과 Cu가 결여된 것으로 나타났다(Fig. 6). Mo은 여러 가지 효소의 보조인자, 특히 질소대사에 관여하는 효소의 보조인자로서 산화환원 관련에 반응하는 금속원소이고, Cu는 대부분 식물의 엽록체에 대부분 존재하여 광합성 및 대사과정의 산화환원 관련 효소에 필요한 금속원소로써 육상식물의 생육에 필요한 필수미량원소로 알려져 있다(김계훈 외., 2006). 이 두 가지 금속원소의 결핍에도 스피롤리나가 Chl-*a* 및 C-PC와 같은 광합성 색소를 생산함에 있어 영향을 받지 않았다는 것과 결핍된 모든 실험군에서 오히려 높은 함유량을 보였다는 것은 육상식물과 스피롤리나가 서로 다른 메커니즘으로 금속원소를 사용하여 광합성을 한다는 것을 시사한다.

4.5. 기 타

논문에는 나타나지 않았지만, 더 많은 탄소원을 얻고자 염산(HCl)과 황산(H₂SO₄)과 같은 강산을 사용하여 폐각을 화학 처리한 실험을 실시하였다. 황산을 사용한 것은 칼슘이온과 반응하려는 황산의 특성, 즉 수용액 내의 이산화황(SO²⁻)과 칼슘이온(Ca²⁺)이온이 반응하여 황산칼슘(CaSO₄)을 형성함으로써 탄산칼슘으로부터 해리된 과량의 칼슘이온을 제거할 수 있으리라는 기대 때문이었다. 하지만 이 방법에는 2가지의 문제점이 있었는데, 하나는 강산성 (pH<3) 환경에서의 이산화탄소는 대부분 기체 상태로 액체로부터 빠져 나간다는 것이고, 다른 하나는 설사 충분한 탄소원을 획득 했더라도, 수중 내 존재하는 과량의 칼슘 이온을 제거하기 위해서 EDTA와 같은 킬레이트제 혹은 염기성 화합물이 상당량 필요하다는 것이다(최재성, 2000). 따라서 강산을 사용하는 방법은 결과적으로 높은 비용이 요구되기 때문에 합리적인 방법이라 할 수 없겠다.

5. 결 론

배양액으로 사용한 패각 추출물에 탄산수소나트륨 10 g/L과 토양추출물 1 mL/L을 첨가하여 스피롤리나를 배양한 결과, Biomass, Chl-*a* 및 C-PC의 함유량, 일반성분이 대조군의 그것과 큰 차이를 나타내지 않았으며 배지비용의 경우 Zarrouk's 배지 대비 15%를 절감하였고, 또한 탄소원의 함량이 스피롤리나의 성장에는 관여하지만 Chl-*a* 및 C-PC와 같은 광합성 색소를 생산하는 데에는 크게 관여하지 않는 것과 스피롤리나가 광합성 색소를 생산하는데 있어 두 금속원소 (Mo, Cu)가 아무런 영향을 주지 않는 것이 추가적으로 나타났다. 따라서 스피롤리나를 배양함에 있어 두 재료(패각, 토양)의 활용 가능성의 확인과 함께 그 생산비용을 절감하고자 계획 및 수행되었던 이번 실험에서는 그 초기의 목적과 목표를 모두 달성하였음에 그 의의가 있다고 하겠다.

6. 참고문헌

- 김계훈, 김길용, 김정규, 사동민, 서장선, 손보균, 양재의, 엄기철, 이상은, 정광용, 정덕영, 정연태, 정종배, 현해남. 2006. 토양학. 향문사. p. 326-333.
- 김진우., 김창환., 이대진., 최용수., 허성수., 2001. 토양비료개론. 선진문화사. p. 108-112.
- 이광우, 1998. 화학해양학. 청문각. p. 99-165.
- 최재성, 2000. 분석화학 · 기기분석. 동화기술교역. p. 137-160.
- A. Bennett, L. Bogorad, 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue green alga, J. Cell Biol. 58, 419 - 435.
- Alberto Vieira Costa, J., Maria Colla, L., Fernando Duarte Filho, P., 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. Bioresource Technology. 92, 237-241.
- Allen, M. M., 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. T. phycol. 4, 1-4.
- Allen, M. M., and Stanier, R. Y. 1968. Growth and division of some unicellular blue-green algae. T. Gen. Microbiol. 51, 199-202.
- Bold, H. C. 1949. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bull. Torrey Bot. Chub. 76, 101-8.
- Dominguez Hills. Selected Solubility Products and Formation Constants at 25°C. California State University.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. T. Microbiol. 8, 229-39.
- Hong, S. S. and Lee, N. H., 1993. Growth of *Spirulina platensis* in Effluents from Wastewater Treatment Plant of Pig Farm. Journal of Microbiology and Biotechnology. 3(1), 19-23.
- Kim, C. J., Jung, Y. H., Choi, G. G., Park, Y. H., Ahn, C. Y. and Oh, H. M., 2006. Optimization of Outdoor Cultivation of *Spirulina platensis* and

- Control of contaminant Organisms. *Algae*. 21(1), 133-139.
- Kotz., Treichel. and Weaver. 2009 *Chemistry & Chemical Reactivity* Sixth Edition, 789-1081.
- Lide, D. R., 2005. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (86th ed.). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I. and Georgakakis, D., 2012. Cultivation of *Arthrospira platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite. *Bioresource Technology*. 112, 234-241.
- Marry leema, J.T., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S. and Karthikayulu, S., 2010. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*. 101, 9221-9227.
- Moran, R., 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. *Plant Physiol*. 69, 1376 - 1381.