

미세조류 활성도 평가를 위한 Photosynthesis and Respiration (P&R) Analyzer 분석조건 최적화

허재희^a · 심태석^b · 황선진^{c,*}

경희대학교 일반대학원 환경응용과학과

Photosynthesis and Respiration (P&R) Analyzer Analysis Optimization for Microalgal Activity Evaluation

Jae-Hee Huh^a · Tae-Suk Sim^b · Sun-Jin Hwang^{c,*}

Department of Applied Environmental Science, Kyung Hee University

(Received 5 October 2021, Revised 16 November 2021, Accepted 18 November 2021)

Abstract

Photosynthesis and respiration rate of microalgae are important factors during advanced wastewater treatment research using microalgae. There are several equipments and measurement methods for measuring photosynthesis and respiration, with different challenges that occur during pretreatment and stabilization of the analysis process. Therefore, in this study, for accurate Photosynthesis and Respiration (P&R) analyzer measurement, the analysis process was divided into pre-processing, DO stabilization, and analysis stages and each was optimized to enable accurate evaluation. For this purpose, the effect of DO saturation of the sample on P&R analysis, DO stabilization according to the degassing flow rate, and photoinhibition of the OD level on photosynthesis was investigated. Based on our study results, when DO was supersaturated, photosynthetic efficiency decreased due to photorespiration, making it inappropriate as a P&R sample. In addition, 0.5 L-N₂/min level was the optimal nitrogen degassing flow rate for DO desaturation. The inhibition of photosynthetic efficiency by self-shading caused by the increase in OD was observed from OD 2.0, and it was found that P&R analysis is preferably performed on samples with OD less than 2.0. In addition, based on the above three optimization results, an optimized P&R Analyzer instruction for accurate P&R analysis was also presented.

Key words : Microalgae, Photosynthesis rate, Photorespiration, P&R analyzer, Respiration rate

^a 연구원(Researcher), jaejjang@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0001-8306-8155>

^b 연구원(Researcher), 2014101789@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-7942-6834>

^c Corresponding author, 교수(Professor), sjhwang@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0003-3865-4811>

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

기존의 하폐수고도처리 시스템은 박테리아 기반으로 유기물 및 질소, 인 등을 제거하는 시스템으로 발전되어 왔으나, 최근에 미세조류를 적용한 수처리가 관심을 받고 있다. 미세조류를 이용한 수처리는 박테리아에 의해서 제거되던 하폐수 내 유기물 및 질소, 인 등을 미세조류의 성장과 대사에 의해 제거하는 것인데, 박테리아를 이용하는 시스템에 비하여 유기물 및 질소, 인 제거능이 뛰어나다는 장점이 있다 (Travieso et al., 2006). 이러한 배경에서 미세조류를 이용한 하폐수고도처리 연구가 관련 분야에서 활발히 진행되고 있는데, 이러한 연구에 있어 미세조류의 활성도는 중요한 인자이며, 이는 광합성량과 호흡량 측정을 통해서 가능하다 (Kim and Lee, 2001).

미세조류의 광합성 및 호흡량 측정을 위한 최근의 주요 선행연구 동향을 보면, 엽록소의 형광반응을 정량하여 광합성 속도를 산출하는 연구 (Jakob et al., 2005)와 광합성 및 호흡 작용에 의한 dissolved oxygen (DO) 변화를 측정하는 방법 (Tang et al., 2014) 등 다양한 연구가 보고된 바 있다. 광합성 속도를 측정하는 장비로는 Phyto-pam과 Water-pam 등이 있는데, 470, 520, 645, 665 nm의 파장에서 엽록소가 형광반응을 보이는 원리를 이용하여 미세조류의 광합성 속도를 측정한다. 이러한 엽록소 형광측정 장비는 아주 낮은 값의 광합성 속도 측정이 가능하고 정확도가 높다는 장점이 있다. 그러나 이러한 방법은 미세조류의 광합성 활성 평가에는 유효하지만, 호흡과는 직접적 관련이 없으므로, Phyto-pam과 Water-pam 등의 엽록소 형광측정원리를 사용한 장비는 광합성과 호흡속도 등을 동시에 같이 연구하는 경우에는 다소 아쉬움이 많은 방식이라 할 수 있다.

광합성 및 호흡량을 평가하기 위한 다양한 측정법들은 몇몇 문헌에서 제안된 바 있다. Petrini et al. (2020)의 연구에서는 미세조류의 광합성 및 호흡량을 측정할 때 DO 불안정화에 의한 영향을 배제하기 위해, 암조건 구간과 명조건 구간에 대한 측정시간을 고정하지 않고, 일정한 DO 범위 (8.5~7.5 mg-O₂/L)를 만족하는 조건에서 측정하였다. Rossi et al. (2018)의 연구에서는 DO를 안정화시키기 위해, DO 측정 전에 미세조류 시료를 0.4~0.6 OD로 희석하였으며, 분석 초기에 30분간 광을 조사함으로써 DO 안정화 구간을 설정하였다. 또한, Sanchez-Zurano et al. (2020)는 DO 포화도 90~130%에서 광합성 및 호흡량을 측정하였으며, 광합성 측정을 위한 명조건에서 증가한 DO는 질소가스를 주입해서 탈기시켜 DO를 낮춘 후 호흡량을 측정하였다고 보고하였다.

위와 같이 선행연구에서 실시한 다양한 측정방법들은 각각의 구체적인 연구목적에 맞게 분석조건을 설정하여 진행한 미세조류 관련 연구의 결과들이지만, DO 과포화 상태에서 광합성 속도를 측정할 경우 미세조류에 대한 광합성 저해가 초래될 수 있다. 따라서 표준화된 미세조류의 활성도 평가를 위해서는 적정 DO 수준은 필수적으로 검토되어야 함에도 불구하고, 아직 표준화 작업이 다소 미흡한 실정이다 (Kazbar et al., 2019). 이 외에도 DO 조절을 위해 질소탈기를 수행하

는 경우에도 탈기유량에 따른 DO 불안정화가 광합성 및 호흡량 측정에 방해요인으로 작용할 수 있으므로, 이를 확인할 필요가 있다. 또한, 광합성량 측정에 있어 optical density (OD) 농도가 증가할수록 문제가 되는 self shading effect 현상의 경우, 미세조류의 활성이 있음에도 불구하고 광합성량 측정시에 측정치가 낮게 구해져 활성도 평가에 혼선을 야기하는 바, 이에 대한 연구 및 표준화를 염두에 둔 검토가 필요하다 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 자체 제작한 P&R analyzer를 대상으로, 광합성 및 호흡량 측정 실험방법의 표준화를 목표로, 시료의 DO 포화도에 따른 광합성 및 호흡효율을 비교실험을 통해 평가하였으며, 질소탈기 유량에 따른 DO 안정화 경향 비교를 통해 탈기유량 최적화도 도모하였다. 또한, 다양한 미세조류 시료의 OD값을 대상으로 self shading effect에 의한 광합성 저해정도를 파악하고, P&R analyzer 분석목적에 맞는 표준화된 적정 OD를 제시하고자 하였다. 이러한 P&R analyzer 실험치에 기반한 표준화 작업을 통해, 미세조류의 광합성 및 호흡량을 보다 정확하게 측정할 수 있는 최적화된 전처리 및 분석조건을 정립하였고, 이러한 결과들을 다양한 미세조류 시료의 특성과 실험목적에 맞게 적용하여 활용할 수 있도록 각종 광합성 및 호흡량 결정을 위한 산출식과 P&R analyzer 분석 매뉴얼을 제시하였다.

2. Materials and Methods

2.1 대상 미세조류 선정 및 배양

본 연구에서는 *Chlorella vulgaris* 종을 대상 종으로 선정해서 실험하였으며, Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 분양받았다. *C. vulgaris*의 배양용 배지로는 BG-11 배지를 사용하였으며, 그 조성을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Composition of BG-11 medium

BG11 medium	
Chemicals	Concentration (mg L ⁻¹)
NaNO ₃	1,500
K ₂ HPO ₄	40
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36
Citric Acid	6
Ferric Ammonium Citrate	6
EDTA	1
Na ₂ CO ₃	20
<Trace element solution>	
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049

실험에 사용할 *C. vulgaris*를 배양하기 위해 계대배양 후 전배양 과정을 거쳤다. 계대배양은 순수 분리된 *C. vulgaris*를 BG-11 배지에 접종한 후 50~500 ml까지 그 양을 늘려가며 배양하는 과정이었으며, 광배양기(HB-305M, Hanbeak CO, KOREA)를 이용하여 온도 25±1°C, 광도 100 PPFD($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)를 유지한 환경에서 배양하였다.

계대배양 후 보존 중인 *C. vulgaris*를 이용해 전배양을 수행했는데, 사용한 배지는 BG-11 배지를 기본으로 하면서 질소 및 인 등의 주요 기질 농도를 실험의 목적에 맞게 조정된 modified BG-11 배지였으며, 약 0.5 OD가 되도록 전배양을 진행하였다. 즉, 탄소원으로는 NaHCO_3 를 500 mg-C/L가 되도록 주입해 주었고, 질소원으로는 NaNO_3 를 50 mg-N/L가 되도록 조정하였으며, 인은 KH_2PO_4 를 10 mg-P/L가 되도록 주입하였다. 항온챔버 및 pH controller를 이용하여 온도 25°C와 pH 7.5±0.5를 유지해 주었으며, 광도는 150 PPFD가 되도록 Bar-LED를 반응조 주변에 설치하여 조사해주면서 전배양하였다.

2.2 분석장비 및 분석조건

2.2.1 P&R analyzer 장치구성 및 측정원리

본 연구에서는 *C. vulgaris*의 광합성량 및 호흡량을 측정하기 위하여, Fig. 1과 같이 자체적으로 P&R analyzer를 제작하여 사용하였다.

P&R analyzer는 본체 내부에 약 150 PPFD의 광을 조사하는 LED가 부착되어 있으며, 외부는 검은색 상자모양으로 암조건에서 외부의 빛을 차단하는 역할을 하였다. 본체 내부에 삽입되는 P&R 반응조는 $\text{O} 90 \text{ mm} \times 93 \text{ mm}$ (H)로 working volume은 430 ml였다. DO meter 본체는 미세조류의 광합성 및 호흡 과정에서 변화하는 DO를 실시간으로 기록하는 역할을 하였으며, DO meter에 연결된 전극을 시료에 직접 넣어 DO 변화를 측정하였다.

미세조류는 암조건에서 호흡을 수행하며 그 과정에서 수증의 산소를 소모하는 반면, 명조건에서는 호흡과 광합성을 동

시에 수행하며 그 과정에서 대사산물로 산소를 생성하였다.

즉, 암조건에서는 시간이 지남에 따라 DO가 감소하게 되고, 명조건에서는 광합성으로 인해 생성된 산소와 호흡으로 소모된 산소의 차이에 해당하는 DO 변화가 일어나게 되었다. P&R analyzer를 운전할 때 암조건과 명조건 측정시간을 15 min으로 동일하게 설정하였다. 암조건을 수행할 때는 광조사를 해주지 않았으며, 명조건을 수행할 때는 150 PPFD의 LED를 조사해 주었다.

본 연구에서는 암조건에서 변화한 DO량을 호흡량, 명조건에서 변화한 DO를 순광합성량으로 계산하였으며, 또한 암조건에서 변화한 DO와 명조건에서 변화한 DO의 합을 총광합성으로 계산하였다.

미세조류의 활성도에 따라 단위시간 동안 변화한 DO는 P&R analyzer를 이용하여 측정할 수 있었으며, 미세조류의 광합성 및 호흡 속도 산출이 가능하였다.

2.2.2 Chlorophyll-a 측정

광합성을 하는 모든 생물에 존재하는 Chl-a를 측정하기 위하여 수질오염공정시험법(ME, 2017)에 명시된 방법을 사용하였으며, 그 방법은 아래와 같다.

Chl-a를 측정하기 위해 채취한 미세조류 시료를 여지(GF/C)에 여과 후, 마쇄하였다. 그 후 아세톤(9+1)을 이용하여 마쇄한 내용물을 4°C 암조건에서 4 hr 이상 추출하였다. 추출한 시료를 원심분리기를 이용하여 20 min 이상 원심분리를 거쳐 분리하였다. 추출된 상등액을 분광광도계를 이용하여 750, 663, 645, 640 nm에서 측정하였다. 아래에 Chl-a를 산출하기 위한 산출식을 제시하였다.

$$\text{Chlorophyll-a} (\text{mg}/\text{m}^3) = \frac{(11.64X_1 - 2.16X_2 + 0.10X_3) \times V_1}{V_2}$$

X_1 : OD663 - OD750 X_2 : OD645 - OD750

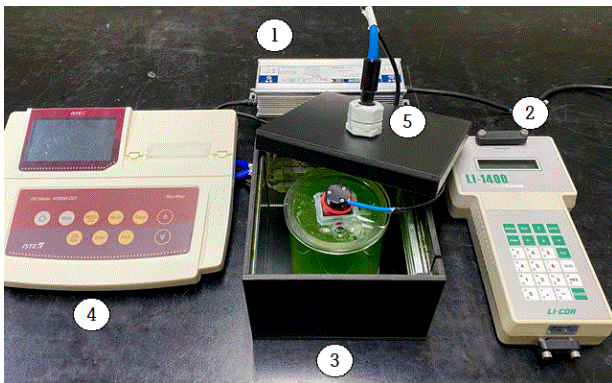
X_3 : OD630 - OD750 OD : 흡광도 (optical density)

V_1 = 상층액의 양 (ml) V_2 = 여과한 시료의 양 (L)

위와 같은 방법으로 측정된 Chl-a 값은 *C. vulgaris*의 광합성 및 호흡 속도를 산출하기 위한 데이터로 사용되었다.

2.3 회분식 실험조건

본 연구의 P&R analyzer 실험에 사용하기 위해 앞서 전배양한 *C. vulgaris*를 working volume 1 L의 원통형 아크릴 반응조로 옮겨서 실험하였다. 앞서 제시한 전배양 조건과 마찬가지로 배지의 기본 성분은 BG-11 배지를 이용하였으나, 탄소, 질소 및 인 등의 주요 기질 농도를 변경하였다. 또한 autotrophic 조건을 조성하기 위하여 무기탄소만 주입해 주었으며 NaHCO_3 500 mg-C/L를 탄소원으로 하였다. 또한 질소 및 인은 NaNO_3 를 50 mg-N/L로, KH_2PO_4 를 10mg-P/L로 주입해 주었으며, pH controller를 이용하여 pH 7.5±0.5를 유지해 주었다.



(① LED controller, ② Photometer, ③ Main reactor box on a magnetic stirrer, ④ DO meter, ⑤ DO probe)

Fig. 1. Photosynthesis & Respiration (P&R) analyzer used in this study.

3. Results and Discussion

3.1 용존산소 포화도가 미세조류의 광합성 및 호흡 속도 측정결과에 미치는 영향

다양한 미세조류 연구를 수행함에 있어, P&R analyzer를 이용하여 호흡 및 광합성 속도를 측정하는 것은 기본적인 정보의 획득과정일 뿐만 아니라, 매우 중요한 의미를 갖는 값으로서의 역할을 수행하는 경우가 많으므로, P&R analyzer를 이용하여 최대한 정확한 호흡 및 광합성 양을 구하는 것은 대단히 중요하다. 그러나, P&R analyzer 분석대상 시료는 호흡 및 광합성 수준에 따라 DO 수준이 제각기 다르고, 이러한 차이는 P&R analyzer 분석치에 오차로 작용할 수 있으므로, 이 부분에 대한 파악을 통한 P&R analyzer 분석용 시료준비의 표준화가 중요하다고 할 수 있다.

이에, P&R analyzer 분석시료의 용존산소가 과포화 및 불포화 상태인 경우에 대하여, P&R 분석을 수행하여, 어떤 조건에서 가장 안정적으로 측정이 가능한지 파악하여, 표준화하고자 하였다.

3.1.1 용존산소 포화도별 시료 준비

DO 포화도에 따른 광합성 및 호흡 속도 비교실험을 위해서 과포화 및 불포화 상태의 *C. vulgaris* 시료를 준비하였다. Autotrophic 조건에서 배양한 조류는 광합성 과정에서 산소를 생성하므로, sampling 직후의 DO는 약 10~15 mg-O₂/L로 과포화 상태이었다. 따라서, DO 과포화 시료는 별도의 탈기를 거치지 않고 sampling한 시료를 즉시 그대로 실험에 사용하였다.

한편, DO 불포화 시료는 sampling 직후에 과포화 상태인 시료에 질소탈기를 실시하여 DO 5 mg-O₂/L까지 탈기시켜 준비하였다. 불포화 시료의 DO 설정치를 5 mg-O₂/L로 정한 근거는 Kim et al. (2012)이 호기성 미생물은 DO가 최저 2 mg-O₂/L, 평균 4.5 mg-O₂/L 이상이 유지되어야 활성 관점에서 바람직하다고 보고한 내용이다. 더하여, 본 연구에서는 질소탈기 후 암조건을 적용했을 때 감소할 DO와 명조건을 적용했을 때 증가할 예상되는 DO 변화폭을 고려할 때, DO 불포화 시료는 5 mg-O₂/L 수준으로 유지하는 것이 적절하다고 판단하였다.

위와 같은 근거로 준비된 DO 과포화 및 불포화 시료에 대하여 자체 제작한 P&R analyzer를 이용하여, 암조건과 명조건에서 진행된 호흡 및 광합성 과정에서의 DO 변화 경향을 조사하였다.

3.1.2 시료의 용존산소 포화도가 P&R analyzer 측정치의 안정성에 미치는 영향

본 실험에서는 위 3.1.1에서 준비된 DO 과포화 및 불포화 시료를 대상으로 P&R analyzer를 이용하여, 광합성 및 호흡의 경향 및 효율에 어떠한 유의한 차이가 있는지 알아보았으며, DO 포화도에 따른 암조건과 명조건 구간에서의 DO 경향은 아래의 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2를 보면, *C. vulgaris*의 호흡과정(Dark)에서는 15분 동

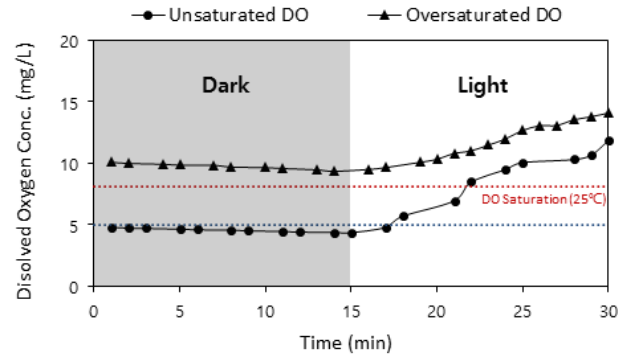


Fig. 2. A comparison of respiration and net photosynthesis efficiency of *C. vulgaris* according to the dissolved oxygen level.

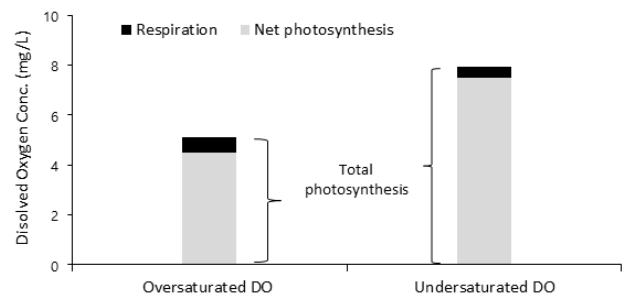


Fig. 3. A comparison of the total photosynthesis, net photosynthesis, and respiration of *C. vulgaris* according to the dissolved oxygen level.

안 DO 포화도에 따른 DO 변화량의 차이는 거의 없이 두 시료 모두 DO는 천천히 감소하였으나, 광합성 과정(Light)에서는 DO 포화도에 따른 DO 변화량의 차이가 컸다는 사실을 확인할 수 있었다. 순광합성 과정에서 DO 과포화 시료의 DO 변화는 4.5 mg-O₂/L, 불포화상태일 때의 변화량은 7.5 mg-O₂/L로, 동일한 미세조류 시료를 이용하여 즉시 실험하였음에도 불구하고, 초기 용존산소 포화도 차이에 따라, 약 1.7배의 순 광합성 속도 차이를 보였다.

용존산소 포화도가 다른 두 시료에 대하여 P&R analyzer를 이용하여 30분 동안 진행하여 얻은 결과값들을 바탕으로, 총 광합성량, 순광합성량 및 호흡량을 계산하여 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 두 시료 간의 총광합성량은 약 1.6배의 차이가 났고, 순광합성량은 전술한 바와 같이 약 1.7배의 차이를 보인 반면, 호흡량은 과포화상태에서는 0.6 mg-O₂/L, 불포화상태에서는 0.5 mg-O₂/L로 유의한 차이를 보이지 않았다.

위의 Fig. 2와 3의 명조건 결과와 같이, DO 과포화 시료에서의 광합성 효율이 DO 불포화 시료의 광합성 효율보다 낮은 원인으로, Fig. 4에 제시한 미세조류의 광호흡 기작을 들 수 있다. Kazbar et al. (2019)에 의하면, 광호흡(photorespiration)은 DO가 과포화 상태일 때 발생하는데, 광합성 과정에서 RuBisCO 효소가 이산화탄소를 고정시키는데 반해, 광호흡 과정에서는 RuBisCO 효소가 산소를 고정시킨다. 즉, DO 과포화 상태는 수중에 이산화탄소 보다 산소가 월등히 많은 상태이기 때문에, 산소를 리불로오스-1,5-이인산(RuBP)과 결합

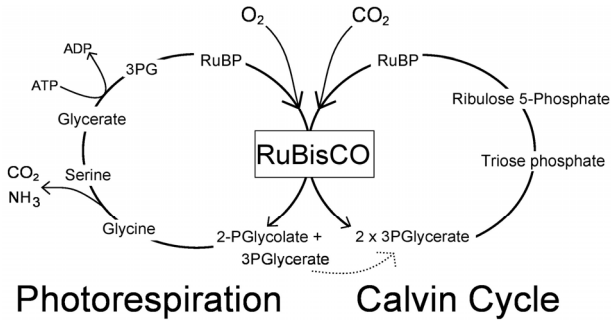


Fig. 4. Photorespiration and photosynthesis mechanism of the microalgae
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Photorespiration>).

시키는 RuBisCO의 카르복실화/산소화 촉매기능이 촉진되어, RuBisCO 효소가 산소를 고정하는 비율이 높아진다. 결국, 이러한 기작들에 의해서 광합성보다 광호흡 기작이 우세해진다 고 할 수 있다(Maurino and Peterhansel, 2010).

RuBP는 광합성 과정에서 카르복실화 반응에 의해 2분자의 3-포스포글리세르산(3-PGA)를 생성시키는 반면, 광호흡 과정에서는 산소화 반응을 통해 포스포글리콜산(2-phosphoglycolate, 2PG)을 생산한다(Peterhansel et al., 2013). 3-PGA는 광합성에 바로 사용되지만, 광호흡 과정에서는 2PG가 3-PGA로 바뀌는 단계에서 ATP 손실이 일어나므로, 광합성 효율이 다소 낮아진다(Peterhansel et al., 2013). 이상과 같은 설명들로부터, DO 과포화 시료에서 광호흡으로 인한 광합성 효율이 다소 감소하는 Fig. 2와 3의 실험결과가 설명된다.

3.1.3 용존산소 포화도에 따른 호흡 및 광합성 속도

용존산소 포화도가 호흡 및 광합성 속도에 미치는 영향을 Chl-a를 기준으로 평가하기 위하여, Fig. 2의 DO 변화량을 단위 Chl-a 당 광합성 및 호흡 속도로 표현하여 아래의 Fig. 5에 나타내고 용존산소 포화도의 영향을 비교 및 평가하였다.

DO 과포화 상태에서의 광합성 속도는 776 $\mu\text{mol-O}_2/\text{mg-chl-a/h}$, DO 불포화 상태에서는 531 $\mu\text{mol-O}_2/\text{mg-chl-a/h}$ 로 각각 산출되어, 같은 광 조건임에도 불구하고 약 1.5배의 차이가 발생하였다.

이는 Fig. 4를 통해 설명했듯이, DO 과포화 조건에서 광합

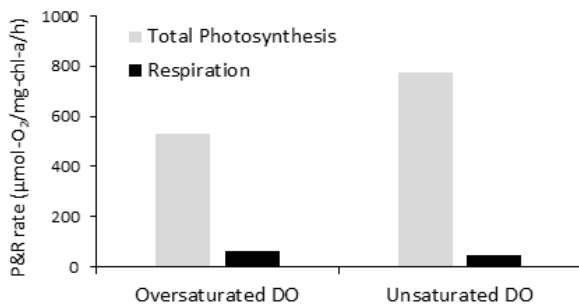


Fig. 5. A comparison of the photosynthesis and respiration rate of *C. vulgaris* according to the dissolved oxygen level

성 보다 광호흡이 우세하여 단위 Chl-a당 수행할 수 있는 광합성량에 저해를 받았음을 나타낸다. 이렇듯 DO 과포화 시료에 대한 호흡 및 광합성에 대한 실험 및 고찰 결과, DO 과포화 시료에서 광호흡에 기인한 저해가 확인된 바, 향후 본 연구에서 P&R analyzer를 이용하여 시료를 분석할 경우, DO 과포화 상태의 시료는 불포화 상태인 5 mg-O₂/L까지 탈기시킨 후 분석을 수행하는 것으로 결정하였다.

3.2 질소탈기 조건이 P&R analyzer 안정화에 미치는 영향

3.2.1 질소탈기 실험방법

용존산소 과포화 상태에서 광호흡에 의해 광합성 효율이 저해된다는 결과에 따라, DO 과포화 상태의 시료를 불포화 상태로 탈기시켜야 하는 필요성이 앞에서 검토된 바, 질소탈기 시의 유량이 P&R analyzer 분석에 있어 DO 안정화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 초기 DO 11~12 mg-O₂/L의 과포화 상태 시료를 대상으로 질소탈기 유량을 0.2, 0.5 및 1.0 L-N₂/min로 설정하여 DO가 5 mg-O₂/L가 될 때까지 탈기시킨 후, 이어 50분 동안 DO 안정화 경향을 모니터링하면서 DO 안정화 경향을 파악하였다. 또한, 탈기에 따른 DO 안정화 경향파악 실험 종료 후에는 DO 5 mg-O₂/L까지 질소탈기가 완료된 시점에서, 안정화 구간은 일단 10분, 암조건과 명조건은 기존에 P&R analyzer 분석에서 채택한 15분으로 각각 설정하여 표준적인 조건에서 호흡 및 광합성 속도를 측정하였다.

3.2.2 질소탈기 유량에 따른 DO 안정화

질소 탈기유량 0.2~1.0 L/min에 따른 DO 안정화 경향에 대한 실험결과는 Fig. 6과 같다. 초기 DO 11~12 mg-O₂/L의 과포화 상태 시료의 DO는 약 5분간 실시한 탈기에 의해 빠른 속도로 5 mg-O₂/L까지 감소했는데, 이후 5~50분 동안의 안정화 구간에서 탈기유량에 따라 다소 상이한 안정화 패턴을 보였다.

Fig. 6의 질소탈기 유량에 따른 안정화 경향을 보면, 0.5 및 1.0 L-N₂/min 유량에서 목표 DO인 5 mg-O₂/L 부근에서 두 유량 모두 안정적으로 서서히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 1.0 L-N₂/min 조건은 탈기시 미세조류가 강한 난류에 의해 심각한 스트레스를 받을 우려가 있어, 본 연구에서는 탈기 효과가 거의 같으면서 탈기 강도가 50% 수준인 0.5 L-N₂/min을 DO 과포화 시료에 대한 질소탈기 유량으로 결정하였다.

한편 모든 질소탈기 유량 조건 결과에서, 안정화 구간 동안에 목표 탈기 농도선 근처에서 평행하게 안정화되지 않고 꾸준히 DO가 미량씩 감소하는 경향을 보였는데, 이는 해당 실험을 수행하는 동안 별도의 광을 조사하지 않고, 일상적인 실내의 형광등(5~10 PPF) 하에서 진행되었기 때문이다. 즉, Patel et al. (2019)에 의하면, 미세조류의 광합성과 호흡량이 같아지는 광도를 광 보상점이라 하며, 광 보상점 이상의 광도가 주어져야 호흡에 의한 산소 소모량보다 광합성에 의한 산소 생산량이 높아지는데, 본 실험에서는 미세조류가 충분한 광합성을 수행할 수 있는 광량이 주어지지 않아 광합성량에

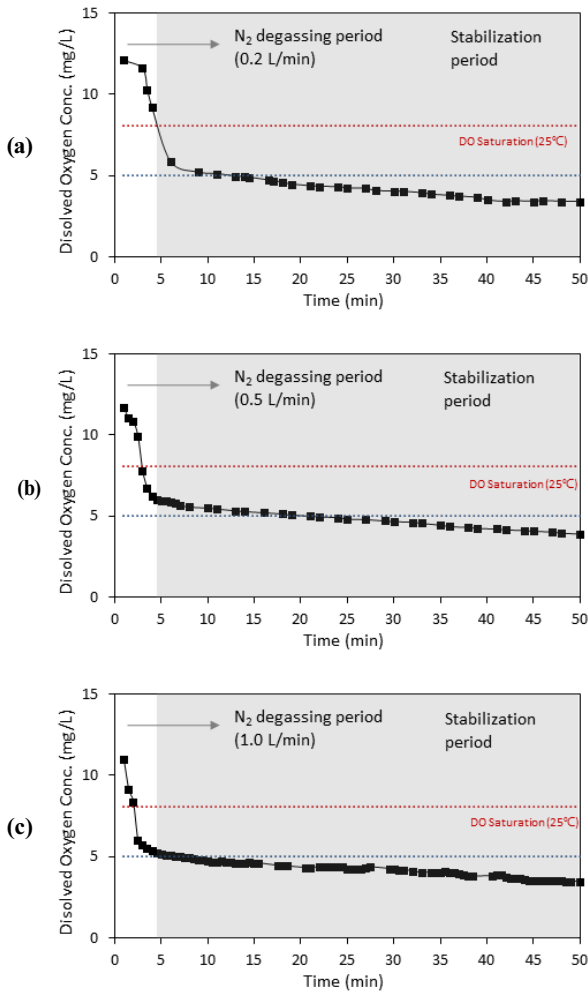


Fig. 6. DO stabilization patterns according to N₂ degassing flow rate (a) 0.2 L/min (b) 0.5 L/min, and (c) 1.0 L/min.

비해 호흡량이 약간 우세했기 때문에, 탈기 후에 DO가 평행하게 안정화되지 않고 천천히 감소하는 경향을 보이며 안정화되었다고 판단되었다.

그러나, P&R analyzer 분석시 암조건 구간에서는 빛을 조사해 주지 않아 광합성이 일어나지 않으며, 이어지는 명조건 구간에서는 광 보상점 이상의 광도 조건인 150 PPFD 수준의 광을 조사해 주기 때문에, 추후 P&R analyzer 분석 수행시 문제가 되지 않을 것으로 판단되었다. 결론적으로, P&R analyzer 실험결과를 바탕으로 적절한 질소탈기 유량에 대해 검토한 결과, 0.5 N₂-L/min 유량으로 질소탈기를 실시하는 것이 최적이라는 결과를 얻었다.

또한, DO 과포화 시료의 DO를 적정 수준인 5 mg-O₂/L로 조정하기 위해, 질소탈기를 0.5 N₂-L/min 유량으로 실시하면 시료의 DO 변화가 다소 불안정하여 안정화를 시켜줄 필요가 있다고 판단되었다. 이에, Fig. 7과 같이 12.5 mg-O₂/L 수준으로 과포화된 시료를 질소탈기를 통해 5 mg-O₂/L가 될 때까지 탈기 후, 안정화 구간을 15분으로 설정하여 정지해둔 상태에서 DO 변화를 모니터링하였다. 그 결과, 안정화 개시 5분 후

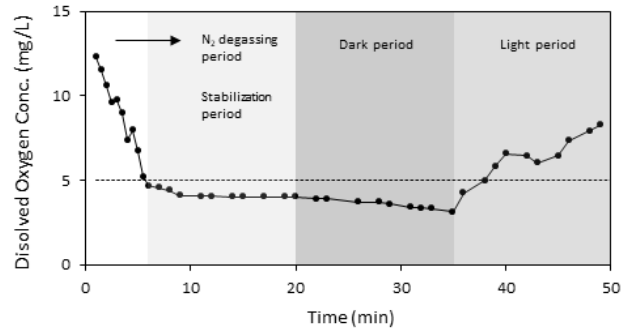


Fig. 7. Experimental P&R results to verify stabilization period.

부터 15분까지 상당히 안정된 DO를 유지하였다. 15분에 걸쳐 DO가 안정된 직후, P&R analyzer 분석을 수행하였다.

암조건 구간(Dark period)에서의 DO 감소는 15분간 약 0.5 mg-O₂/L이었으며, 명조건 구간(Light period)에서의 DO 증가는 15분간 약 5.2 mg-O₂/L이었는데, DO 과포화 시료를 그대로 이용하여 P&R analyzer 분석을 수행할 경우 DO 변화가 축소되어 왜곡된 결과가 얻어지던 경우와 비교하면, 적절한 질소탈기에 의해 상당히 정확한 P&R analyzer 분석이 가능해졌다는 사실이 확인되었다.

3.3 광합성 및 호흡량 측정을 위한 시료의 최대허용 OD 결정

3.3.1 OD 농도별 시료준비

시료의 OD 값이 P&R analyzer를 이용한 광합성 및 호흡량 분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 2.0 OD의 *C. vulgaris*를 이용하여 농축을 통해 2.25 OD, 2.5 OD, 3.0 OD의 시료를 준비하였다. *C. vulgaris*의 농축은 원심분리기를 이용할 경우 강한 원심력이 미세조류에게 스트레스로 작용할 우려가 있어, 3시간 이상 자연침강시킨 농축된 *C. vulgaris*를 이용하여 원하는 OD에 맞추어 조제하였다. 참고로 *C. vulgaris*는 침강성이 좋지 못해 단시간에 자연침강이 불가하여 3시간 이상 농축을 실시했다.

3.3.2 Self shading effect를 고려한 최대허용 OD 결정

미세조류의 활성도를 평가할 때 광합성 속도는 가장 중요한 평가인자 중 하나이므로 최대한 정확한 측정치를 얻는 것이 중요하다. 그런데, 미세조류는 OD가 커질수록 self shading effect에 의해 광량이 충분함에도 불구하고 광합성량이 광량에 비례하지 않는 등 실제 미세조류의 광합성 활성 보다 저평가를 받을 수 있다. Self shading effect는 Beer-Lambert Law의 원리와 일맥상통하며, 미세조류 광량에 따른 광합성 활성 실험에 있어 고려할 원리중 하나이다.

이에 P&R analyzer를 이용한 광합성 및 호흡량 분석에 있어, 시료의 OD 값이 광합성 및 호흡량 분석치에 미치는 부정적인 self shading effect 영향을 최소화하고자, P&R analyzer 분석시료의 최대허용 OD 값을 결정하기 위한 실험을 실시한 결과, Fig. 8과 같은 결과를 얻었다.

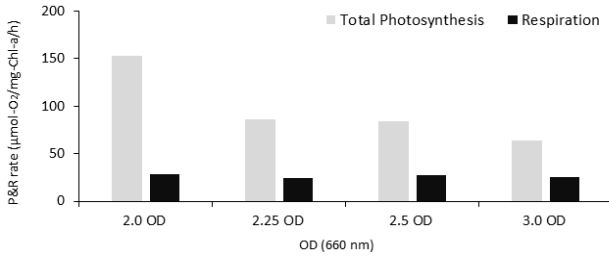


Fig. 8. A comparison of the total photosynthesis and respiration rate of *C. vulgaris* according to several high OD values.

Fig. 8의 광합성 속도 결과를 보면, self shading effect의 영향을 받아 *C. vulgaris*의 OD가 높아질수록 광합성 속도는 점차 감소하는 경향을 보인 반면, 호흡속도 결과는 OD 농도에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉, 2.0 OD 조건에서 광합성 속도는 153 µmol-O₂/mg-Chl-a/h 이었으나, 2.25 OD에서는 86 µmol-O₂/mg-Chl-a/hr, 3.0 OD에서는 84 µmol-O₂/mg-Chl-a/hr로 측정되어, 2.0 OD에 비해 3.0 OD에서 광합성 속도가 약 1.8배 저하된 결과를 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 추후 P&R analyzer 실험시, 2.0 OD를 초과하는 미세조류 시료의 경우, 전처리 개념으로 적절히 희석(본 연구에서는 1.0~1.5 OD 권장)을 실시한 후, P&R analyzer 실험을 하는 것이 적합하다는 판단을 하

였다. 단, 당연하지만 미세조류 개체의 광합성 효율이 아닌, 채취한 미세조류 시료 자체로서의 광합성 및 호흡능력을 평가하는 경우라면 self shading effect를 포함한 값을 구해야하므로, 이러한 경우에는 희석을 실시할 필요 없이, 채취한 시료 그대로 P&R analyzer 분석에 이용하면 된다고 할 수 있다.

3.4 광합성/호흡량 산출식 및 P&R Analyzer용

실험지침 제안

미세조류의 광합성 및 호흡 속도를 산출하기 위한 산출식을 Table 2에 제시하였다. 산출식은 크게 호흡속도, 총광합성 속도 및 순광합성 속도로 나누어 제시하였는데, 호흡속도를 산출할 경우에는 호흡과 직접적인 연관이 있는 OD, MLSS와 같은 생물량을 기준으로 표현하였으며, 총광합성 및 순광합성 속도를 산출할 경우에는, 호흡속도 산출에서 언급한 OD, MLSS 이외에 미세조류의 광합성과 직접적인 연관이 있는 Chl-a 농도도 기준으로 삼아 산출하는 식을 제시하였다.

전술한 전반적인 실험결과 및 결론을 바탕으로, 미세조류의 광합성 및 호흡량과 속도를 측정할 수 있는 P&R analyzer 분석을 위한 실험지침을 아래 Table 3에 제시하였다. 실험지침은 시료의 전처리, 안정화, 그리고 분석조건으로 구분되어 있으며, OD의 경우 shading effect 배제 여부에 맞추어 선택하여 분석할 수 있다.

Table 2. Summary Table for P&R rate evaluation

Respiration rate evaluation	
Equation for evaluating respiration rate per microalgal OD (µmol-O ₂ /L/OD/hr)	$\frac{\text{Respiration amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_1 \text{ (hr)}} \times \frac{1}{OD \text{ (660nm)}} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Equation for evaluating respiration rate per microalgal MLSS (µmol-O ₂ /mg-MLSS/hr)	$\frac{\text{Respiration amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_1 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{mg - MLSS} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Net-photosynthesis rate evaluation	
Equation for evaluating net-photosynthesis rate per microalgal Chl-a (µmol-O ₂ /mg-Chl-a/hr)	$\frac{\text{Net photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{mg - Chl-a} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Equation for evaluating net-photosynthesis rate per microalgal OD (µmol-O ₂ /L/OD/hr)	$\frac{\text{Net photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{OD} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Equation for evaluating net-photosynthesis rate per microalgal MLSS (µmol-O ₂ /mg-MLSS/hr)	$\frac{\text{Net photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{mg - MLSS} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Total-photosynthesis rate evaluation	
Equation for evaluating total photosynthesis rate per microalgal Chl-a (µmol-O ₂ /mg-Chl-a/hr)	$\frac{\text{Total photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{mg - Chl-a} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Equation for evaluating total photosynthesis rate per microalgal OD (µmol-O ₂ /L/OD/hr)	$\frac{\text{Total photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{OD} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$
Equation for evaluating total photosynthesis rate per microalgal MLSS (µmol-O ₂ /mg-MLSS/hr)	$\frac{\text{Total photosynthesis amounts } (O_2 - mg)}{L \times t_2 \text{ (hr)}} \times \frac{L}{mg - MLSS} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{32 \text{ mg}}$

Respiration amounts : DO decreases during the Dark period (mg-O₂/L)

Net-photosynthesis amounts : DO increases during the Light period (mg-O₂/L)

Total-photosynthesis amounts : Sum of both Respiration and Net-photosynthesis amounts (mg-O₂/L)

t₁ : Dark condition period (hr)

t₂ : Light condition period (hr)

Table 3. Optimized overall instruction for P&R analyzer test

P&R analyzer configuration and sample preparation	P&R Reactor Specifications		Ø 90 mm × 93 mm (H)
	Sample volume		450 ml
	Guides for OD setting	P&R rate analysis test under the exclusive condition of shading effects	If the OD of P&R sample exceeds 2.0, dilute to 1.0~1.5 OD is recommendable
P&R rate analysis test including shading effects by the OD of P&R sample		Dilution is not needed (even though OD exceeds 2.0)	
DO stabilization conditions for P&R test	Light intensity		Implementation at the 5~10 PPFD of ordinary room light intensity is desirable
	Nitrogen gas degassing flow rate		0.5 L-N ₂ / min
	Reaching point for DO stabilization		5 mg-O ₂ / L
	Period for DO stabilization after reaching stabilized point		15 min
	Temperature		Room temperature
Analysis conditions for P&R test	Mixing conditions		Without mixing
	Working volume		430 ml
	Dark : Light period		15 min : 15 min
	Light source & Light intensity		White LED / 150 PPFD
	DO measurement interval		0.5~1.0 min is recommendable

4. Conclusion

본 연구에서는 미세조류를 이용한 하폐수처리 연구를 수행하는데 있어 중요한 광합성 및 호흡량 측정을 위해 사용되는 P&R analyzer가 다양한 조류연구 분야에서 활용되고 있음에도 불구하고, 측정법에 대한 전처리나 측정조건 등에 대한 표준화가 의외로 부족하다는 문제점 해결에 기여하고자, 시료의 산소 포화도, 질소탈기를 통한 DO 안정화, self-shading 관련한 최대허용 OD 등에 대하여 실험 및 고찰을 통해 P&R 분석법 표준화를 수행하였으며, 주요 결과를 요약하면 아래와 같다.

첫째, DO 포화도 관련하여, DO 과포화 시료는 광호흡 기작을 따르는데, 이때 RuBisCO가 산소를 고정하는 과정에서 ATP 손실이 일어나 광합성 효율이 저해되므로 P&R 분석용으로 부적절한 시료이다. 따라서 광합성 및 호흡량을 측정시에는 DO 불포화 상태의 시료를 이용하여 측정해야 정확한 결과를 얻을 수 있고, 본 연구에서는 5 mg-O₂/L 수준을 제안하였다.

둘째, DO 과포화 시료를 5 mg-O₂/L 수준의 불포화 시료로 전환시키기 위한 전처리로서 질소탈기를 제안하였으며, 탈기 효율과 탈기 후 시료의 DO 안정화 등의 관점에서 볼 때, 본 연구에서 사용한 P&R analyzer 스펙의 경우, 0.5 L-N₂/min 유량으로 탈기하는 것이 최적이라는 결론을 얻었다.

셋째, 높은 OD로 인해 유발되기 쉬운 self shading으로 인한 광합성 효율저하 관점에 대해 2.0~3.0 OD에 대하여 조사한 결과, 2.0 OD 이상에 대하여 유의한 수준의 self shading에 의한 저해가 확인되어, self shading에 대응하기 위한 최대허용 OD를 2.0 OD로 제안하였다.

마지막으로 이상의 연구내용 및 결과 등을 바탕으로 P&R rate 산출식을 다양한 경우에 대하여 표로 정리하였으며, 분석조건 최적화를 바탕으로 P&R analyzer 실험지침도 제시하였다.

Acknowledgement

본 연구는 이 논문은 2018년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(No. NRF-2019R1A2C1084155) 이에 감사드립니다.

References

- Jakob, T., Schreiber, U., Kirchesch, V., Langner, U., and Wilhelm, C. (2005). Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: Performance and methodological limits, *Photosynth Research*, 83, 343-361.
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, G., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A., and Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors, *Algal Research*, 39, 101432.
- Kim, N. and Lee, C. (2001). A theoretical consideration on oxygen production rate in microalgal cultures, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(5), 352-358.
- Kim, S. J., Shin, M. S., Kim, J. K., Lee, J. Y., Jeong, G. J., Young, A. B., and Chul, K. B. (2012). Oxygen fluctuation monitored with high frequency in a eutrophic urban stream (the Anyang stream) and the effect of weather condition, *Korean Journal of Ecology and Environment*, 45(1), 34-41.
- Maurino, V. G. and Peterhansel, C. (2010). Photorespiration: Current status and approaches for metabolic engineering, *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 248-255.
- Ministry of Environment (ME). (2017). *Water pollution process test standard*, 2017-4, Ministry of Environment.
- Patel, A. K., Joun, J. M., Hong, M. E., and Sim, S. J. (2019).

- Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae, *Bioresource Technology*, 282, 245-253.
- Peterhansel, C., Krause, K., Braun, H. P., Espie, G. S., Fernie, A. R., Hanson, D. T., Keech, O., Maurino, V. G., Mielewczik, M., and Sage, R. F. (2013). Engineering photorespiration: Current state and future possibilities, *Plant Biology*, 15(4), 754-758.
- Petrini, S., Foladori, P., Donati, L., and Andreottola, G. (2020). Comprehensive respirometric approach to assess photosynthetic, heterotrophic and nitrifying activity in microalgal-bacterial consortia treating real municipal wastewater, *Biochemical Engineering Journal*, 161, 107697.
- Rossi, S., Bellucci, M., Marazzi, F., Mezzanotte, V., and Ficara, E. (2018). Activity assessment of microalgal-bacterial consortia based on respirometric tests, *Water Science & Technology*, 78(1), 207-215.
- Sánchez-Zurano, A., Gómez-Serrano, C., Ación-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., and Molina-Grima, E. (2020). A novel photo-respirometry method to characterize consortia in microalgae-related wastewater treatment processes, *Algal Research*, 47, 2211-9264.
- Tang, T., Fadaei, H., and Hu, Z. (2014). Rapid evaluation of algal and cyanobacterial activities through specific oxygen production rate measurement, *Ecological Engineering*, 73, 439-445.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A., and Colmenarejo, M. F. (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste, *Ecological Engineering*, 28(2), 158-165.