

## Hydrocarbon production and nitrogen/phosphorus removal from piggery wastewater by cultivation of *Botryococcus braunii*

심상준<sup>1\*</sup>, 안진영<sup>1,2</sup>, 공경택<sup>1,3</sup>, 김병우<sup>2</sup>, 박태현<sup>3</sup>  
 한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터<sup>1</sup>,  
 성균관대학교 화학공학과<sup>2</sup>, 서울대학교 응용화학부<sup>3</sup>  
 전화 (02) 958-5266, Fax (02) 958-5839 \*

### Abstract

The green algae, *Botryococcus braunii*, has an unusually high hydrocarbon content, ranging from 15 to 75% of dry weight, as a long-chain unsaturated hydrocarbon. It has a potential as a renewable source of chemical feedstocks or fuels. The commercial production of hydrocarbon by *B. braunii* has not been achieved mainly due to their economic and several technical barriers. The *B. braunii* cultivation with piggery wastewater could alleviate to economic problems by the reduction of inorganic nutrients, mainly nitrogen and phosphorus from wastewater.

We have been studying cultivation of *B. braunii* in the pretreated piggery wastewater by a MBR(membrane bioreactor), containing about 3000 mg NO<sup>3</sup> /L, 15 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, 3 mg P/L, and others. The purpose of this study was to develop a continuous culture system in piggery wastewater and nitrogen-limited chemostat.

### 서론

자연계로부터 순수분리된 *B. braunii*들은 일반적으로 성장속도가 낮고, 고농도의 배양이 어려운 것으로 알려져 있다. 아직 대부분의 *B. braunii*의 doubling time은 2 ~ 4일 정도로 매우 낮기 때문에, 배지조성의 최적화 등을 통한 효율적 배양기술의 개발이 필요하다. *B. braunii*의 성장과 탄화수소의 합성은 균주 자체의 고유한 형질 뿐 아니라, 배지의 조성, 광도(light intensity), 배양온도, 광주기 등의 배양조건에 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 배지조성은 세포의 성장 및 지질합성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 현재 일반적으로 많이 사용되고 있는 배지는 Chu 13과 Allen, 그리고 Prat 등이 있다. 배지성분 중에서는 특히 질소원이 탄화수소의 합성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 질소원이 결핍된 상황에서 탄화수소의 합성이 활발하게 일어나기는 하지만, 반대로 질소원의 부족한 경우, 세포 성장은 둔화되는 경향을 보인다. 하지만, 질소원은 성장속도와도 밀접한 관련이 있

어서, Prat 배지를 사용한 경우 potassium nitrate, potassium phosphate 등의 농도를 2 배로 높여줌으로써, *B. braunii*의 성장속도가 2 배 정도 향상됨이 보고되기도 하였다<sup>2)</sup>.

### 재료 및 방법

UTEX (The University of Texas at Austin)에서 분양받은 균체성 녹조류인 *Botryococcus braunii* UTEX 572를 사용하였다. 미세조류의 배양은 Chu 13 배지를 이용하였으며, 폐수의 배지로의 재활용 가능성을 알아보기 위하여 현재 하수처리장에서 문제시되고 있는 소화슬러지 탈리액을 조류 배양 배지로 이용하여 미세조류 성장 속도를 측정하여 Chu 13배지의 결과와 비교하였다.

균체의 농도는 680nm에서 흡광도를 측정하여 건조중량을 추정하였다 (Dry biomass (g/L) =  $0.515 \times OD_{680}$ ). 탄화수소는 10 ml 배양액을 80°C, 24h 건조시킨 후 acetone과 초음파균질기(VC 100, Materials & Sonics Inc., USA)를 이용하여 추출한 다음, silica gel로 충전된 chromatograph column(2×7cm)에서 탄화수소만을 정제한 다음, GC(FID)로 분석하였다.

T-N은 Persulfate digestion method, NO<sub>3</sub>-N은 Cadmium reduction method, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N은 Salicylate method, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P는 환경공정시험법에 의하여 인산이온을 몰리브덴산 암모늄과 반응하여 생성된 몰리브덴산인 암모늄을 염화제일주석으로 환원하여 생성된 몰리브덴 청의 흡광도를 690 nm에서 측정하여 인산염인을 정량화 하였다. COD는 시료를 황산 산성으로 하여 중크롬산칼륨 일정과량을 넣고 2시간 가열 반응 시킨 다음 소비된 중크롬산칼륨의 양을 구하기 위해 환원되지 않고 남아 있는 중크롬산칼륨을 황산제일철암모늄용액으로 적정하여 시료에 의해 소비된 중크롬산칼륨을 계산하고 이에 상당하는 산소의 양을 측정하였다. TOC (total organic carbon)는 TOC analyzer (Pharma TOC, Analytikjena, German)를 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

Fig. 1은 Chu 13 배지를 이용한 control culture의 경우, 미세조류의 성장과 엽록소, 그리고 배지내 질소 및 인의 농도변화를 나타낸다. 질소원의 고갈후 조류의 색은 녹색에서 황갈색으로 변화하였다. 질소원이 결핍될 때 엽록소와 핵산의 함량이 줄어들고, 반면 광합성을 위한 보조색소인 카로테노이드가 축적되어 황갈색으로 변색되게 되고, 이로인해 광합성 및 호흡의 활성이 급격히 저하되게 된다.

*B. braunii*를 질소/인이 함유된 폐수를 이용한 배양할 경우, 특히 축산폐수내 많이 함유된 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>가 조류성장에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 2는 조류의 성장과 배지내 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 농도를 나타낸다. Nitrate를 질소원으로 할 때의 비성장속도 ( $\mu$

=0.030 h<sup>-1</sup>) 보다 낮은 비성장속도인 0.021 h<sup>-1</sup>을 나타냈지만, 배양 5일동안 투여한 68 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L 거의 대부분을 제거하였다.

Fig. 3은 MBR에 의한 축산폐수의 2차처리수를 멸균없이 500 ml bubble column에서 12일동안 배양했을 때 *B. braunii*의 성장과 탄화수소 생산, 그리고 폐수내 nitrate의 농도변화를 보여준다. 12일 회분배양 결과, 바이오매스는 8.5 g/L, 탄화수소는 0.95 g/L를 얻을 수 있었고, 총 2750 mg/L의 nitrate가 제거되고, 732 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (165 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/L)가 폐수내 존재하였다.

### 요 약

본 연구에서는 축산폐수를 이용하여 건조질량의 15~75 %의 탄화수소를 생산한다고 알려진 *B. braunii* 배양에 적용하였다. 질소원이 부족한 상황에서 세포의 성장이나 탄화수소의 생산은 저해를 받았으며, 초기 인의 농도는 질소원이 결핍된 상황을 제외하고는 세포 성장이나 탄화수소의 생산에 큰 영향을 미치지 못했다. 축산폐수를 이용한 실험에서는 33 %의 축산폐수가 nitrate를 제거시키는데 가장 적절하였다.

### 참고문헌

1. Oh, H. M., S. B. Kim, J. H. Park, E. R. Park, S. T. Lee, K. S. Kwon and B. D. Yoon. "Effects of light intensity and nutrients on the growth of *Botryococcus* sp." (1997) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, pp 339-345
2. Volova, T. G., G. S. Kalacheva, N. O. Zhilo and V. F. Plotnikov. "Physiological and biochemical properties of the alga *Botryococcus braunii*." (1998) *Russ. J. Plant. Physiol.* vol. 45, pp 775-779

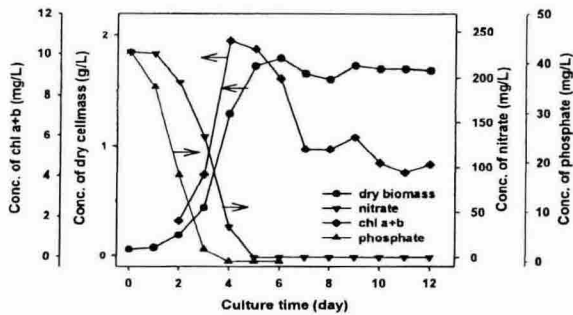


Fig. 1. Time courses of dry cellmass, chlorophyll, and nitrate in the bubble column.

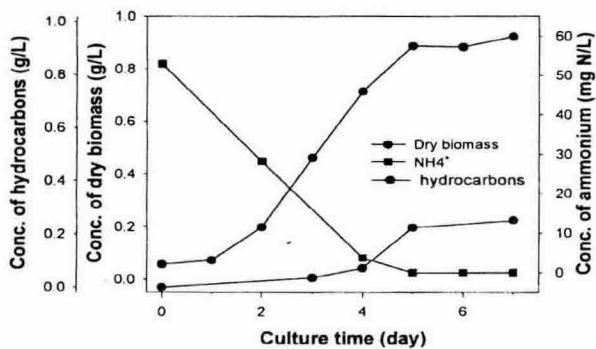


Fig. 2. Time courses of dry cellmass, hydrocarbons and  $\text{NH}_4^+$  in the bubble column.

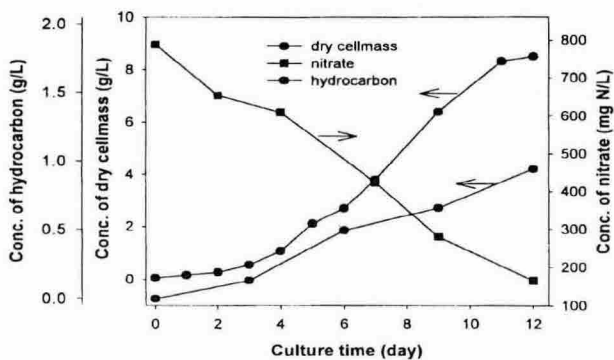


Fig. 3. Variation of dry biomass, hydrocarbon, and nitrate in pretreated piggery wastewater.