

Effects of pH on the growth, total nitrogen, total phosphorus and organic compound removal in heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* applied wastewater treatment

pH와 탄소원이 *Chlorella sorokiniana*의 heterotrophic 배양 및 하폐수고도처리능에 미치는 영향

Jeong-Eun Park · Yong-Beom Cho · Shan Zhang · Sun-Jin Hwang*

박정은 · 조용범 · 장산 · 황선진*

Department of Environmental Science and Engineering, Center for Environmental Studies, Kyung Hee University

Abstract : Among many microalgae cultivation types, heterotrophic culture with low cost carbon sources and energy saving culture method is crucial. A result of estimating the effects of pH on wastewater treatment using heterotrophic growing microalgae *Chlorella sorokiniana* shows that there was no difference in microalgae growth amount and nitrogen, phosphorus removal rate by wide range of pH(5 ~ 9). From pH 5 to 9, total nitrogen, phosphorous and glucose removal rates were 10.5 mg-N/L/d, 2 mg-P/L/d, 800 ~ 1000 mg/L respectively. This study reveals that *C. sorokiniana* cannot metabolite glycerol heterotrophically, however, glucose and acetate were proper carbon sources for growth and T-N, T-P and TOC removal. This research highlights the potential of heterotrophic microalgal growth with wastewater treatment plant with wide range of pH and carbon sources.

Key words : Microalgae, *Chlorella sorokiniana*, Wastewater treatment, Heterotrophic culture

주제어 : 미세조류, 클로렐라 소로키니아나, 하폐수처리, 중속영양배양

1. 서론

미세조류는 일반적으로 광합성을 통해 대기 중 이산화탄소를 섭취해 고정하고 산소를 배출하는 대사를 수행하므로 이를 이용한 하폐수의 영양 염류 제거 및 회수된 바이오매스의 Bio-fuel 생산 시스템 개발과 이를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Brennan and Owende, 2010; Pulz, 2001; de-Bashan et al., 2002, 2004; Hrun et al., 2010). 현재 대부분의 미세조류 연구는 광합성 대사를 주 에너지원으로 얻는 autotrophic 대사에 관한 것이며, 이를 실제 하폐수처리 시스템에 적용하고자 할 때, 태양광을 이용할 수 있는

open system으로 운영하지 않는 한 인공적인 광조사로 과도한 비용이 투입되어 경제성 및 실효성이 가장 큰 걸림돌로 지적받고 있다.

대부분의 미세조류를 이용한 하폐수고도처리에 관한 연구는 autotrophic 조류에 초점이 맞추어져왔으며, heterotrophic 대사를 이용한 적용 및 평가는 연구가 미비하다. Heterotrophic 대사는 autotrophic 대사와 달리 광조사가 필요하지 않기 때문에 경제성 측면에서 현실적이며, 성장률이 높고(Javanmardian and Palsson, 1991) 유기물과 질소, 인 제거가 효과적이므로 (Wang et al., 2012) 하폐수처리 적용에 유리하다고 평가받고 있다(Kaplan et al., 1986; Droop, 1974; Tsavalos and Day, 1994; Radmer and Parker, 1994). Heterotrophic 대사가 가능한 미세조류의 종류는

• Received 19 November 2013, revised 30 November 2013, accepted 02 December 2013.
* Corresponding author: Tel : +82-31-201-2497 Fax : +82-31-203-4589 E-mail : sjhwang@khu.ac.kr

제한적이며(Tuchman, 1996), 그 중 *Chlorella sorokiniana*는 직경 2 ~ 10 μm 크기의 구형이며 지질함량 19 ~ 22 % (dry weight)로 하폐수처리와 바이오연료 생산에 관한 연구가 비교적 다양하게 진행되었다(Mata et al., 2010).

미세조류의 heterotrophic 배양시 외부 탄소원으로는 일반적으로 glucose를 이용하고 있으나, 실제 하폐수처리 시스템에서 외부 탄소원으로 추가적인 glucose를 투입해야할 경우 경제성이 떨어진다. 이에 반해 glycerol은 차세대 에너지로 각광받고 있는 바이오디젤 공정에서 부산물로 다량 생산되기 때문에 이를 이용할 경우 비용절감 측면에서 현실적이다(Perez-Garcia et al., 2011). 또한, acetate 역시 외부 탄소원으로 이용 가능하고 저분자 물질로 미세조류가 섭취하기 용이한 형태이며, 산업적 응용 과정에서 부산물로 다량 발생되므로 heterotrophic 배양을 위한 경제적인 탄소원이 될 수 있다는 점에서 연구가치가 높다. Heterotrophic 배양에서 외부탄소는 미세조류 cell의 영양염류 섭취, 대사 및 증식에 필요한 에너지를 제공하는 유일한 에너지원이므로 매우 중요하며, 미세조류 종에 따라 대사 가능한 유기탄소원의 종류와 각각의 탄소원에 대한 대사경로가 상이하다고 알려져 있다(Perez-Garcia et al., 2011).

따라서 본 연구에서는 *C. sorokiniana*를 이용한 하폐수고도처리를 위해 heterotrophic으로 배양시 운전인자를 파악하고자 pH와 탄소원에 따른 성장특성 및 유기물, 질소와 인 제거능을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 미세조류 분양 및 배양

본 연구에 사용한 *Chlorella sorokiniana*는 한국생명자원센터(KCTC)에서 분양 받았으며, NaNO_3 48.6 mg/L, K_2HPO_4 11.3 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg/L, NaCl 25 mg/L, Citric acid 6 mg/L,

Ferric ammonium citrate 6 mg/L, EDTANa₂ 1 mg/L, NaCO_3 20 mg/L, Trace elements solution (H_3BO_3 2860 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1810 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 222 mg/L, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 390 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 79 mg/L, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 49.4 mg/L) 1 mL로 제조된 BG11 배지와 250 mL cell culture flask를 이용하여 온도 25 $^\circ\text{C} \pm 1$, 광도 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 인 조건에서 계대배양한 후, 실험 직전에 암 조건에서 4일간 탄소원별로 전배양 하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 pH에 따른 영향

pH가 미세조류 성장 및 영양염류 제거에 미치는 영향을 평가하기 위해 BG11 배지 (Watanabe, 2005)내의 질소농도를 40 mg-N/L, 인 농도를 10 mg-P/L로 조정하였으며, 1 L 삼각플라스크에 BG11 배지와 전배양한 *Chlorella sorokiniana*를 초기 OD가 0.05가 되도록 식종해준 뒤 working volume 600 mL로 운전을 실시했다. 초기 pH는 각각 3, 5, 7, 9가 되도록 조정하였으며, 초기 2.5일까지 6 시간마다 1M NaOH와 1M HCl을 이용하여 pH를 조정해 주었다. 배양은 알루미늄 호일로 삼각플라스크를 감싸고 빛이 차단된 항온조 내부에서 진행했으며, 실험 시작 전 각기 다른 탄소원 적응에 의한 lag phase를 최소화하기 위해 4일간 전배양한 뒤 본 실험은 온도 25 $^\circ\text{C} \pm 1$ 인 조건에서 batch test를 5일간 진행하였다(Table 1).

Table 1. Summary of experimental conditions for evaluating pH on the growth of *C. sorokiniana*

Items	Conditions
Microalgae	<i>Chlorella sorokiniana</i>
Initial microalgae conc.	0.05 OD
Initial N, P conc.	40 mg/L ($\text{NO}_3\text{-N}$), 10 mg/L ($\text{PO}_4\text{-P}$)
Initial glucose conc.	5 g/L
pH	3, 5, 7, 9
Light condition	Dark

2.2.2 탄소원에 따른 영향

미세조류의 heterotrophic 배양시 가장 적합한 탄소원을 알아보기 위해 glucose, acetate, glycerol을 각각 5 g/L, 6.8 g/L, 5.1 g/L 농도로 주입하여 모두 2 g-C/L가 되도록 하였으며, 다른 운전조건은 실험 2.2.1과 동일한 조건으로 설정하여 batch test를 4 일간 진행했다 (Table 2).

Table 2. Summary of experimental conditions for evaluating carbon sources on the growth of *C. sorokiniana*

Items	Conditions
Microalgae	<i>Chlorella sorokiniana</i>
Initial microalgae conc.	0.05 OD
Initial N, P conc.	40 mg/L (NO ₃ -N), 10 mg/L (PO ₄ -P)
Organic carbon sources	Glucose, Acetate, Glycerol
pH	7
Light condition	Dark

2.3 분석방법

미세조류의 성장량은 Standard method (2005)에 명시된 SS 측정방법과 OD를 측정하여 평가하였으며, OD (Optical Density) 측정에는 Spectrophotometer (X-ma 2000, Human Co., Korea)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. T-N, T-P 분석은 수질자동분석기인 Auto Analyzer (AA3, BLTEK Co., Korea)를 이용하여 측정하였다. Glucose는 DNS 법으로 UV spectrometer (HS 3300, Humas Co.)를 이용하여 575 nm에서 측정하였으며, 미세조류의 비 증식속도 (Specific growth rate, d⁻¹)는 식 (1)을 이용하여 계산했다(Kwon et al., 2012).

$$\mu = \ln(X - X_0) / (t - t_0) \quad \text{식 (1)}$$

식 (1)의 X는 t (day) 시간의 미세조류 건조중량이고, X₀는 t₀ (day) 시간의 미세조류 건조중량이며 최대 비증식속도는 대수성장기의 비증식

속도 값 중 가장 큰 값을 이용했다. TOC (Total Organic Carbon) 분석은 TOC Analyzer (TOC-VCSN, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정했다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 하폐수고도처리를 위한 운전인자 파악

3.1.1 pH 조건에 따른 *C. sorokiniana*의 성장 및 영양염류제거

초기 pH를 각각 3, 5, 7, 9로 조정하고 배양 초기 60 시간동안은 6 시간 간격으로, 이후로는 12 시간 간격으로 pH를 조정해 실험을 진행한 결과, 미세조류의 최종 성장량은 pH 3에서 약 200 mg/L, pH 5, 7, 9에서 약 950 ~ 1000 mg/L로, pH 3을 제외한 나머지 pH 조건에서 성장량 차이는 없었으며, 비성장률도 pH 5 ~ 9 조건에서 약 2.3 d⁻¹로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1).

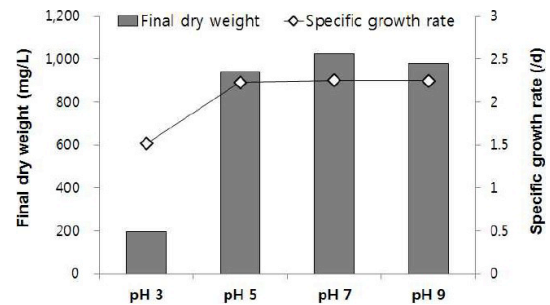


Fig. 1. Effects of pH on final dry weight and specific growth rate of *C. sorokiniana* in heterotrophic cultivation

pH 7, 9 조건의 경우 운전 2 일 만에 대부분의 질소와 인이 소비되었으며, pH 9 조건은 3 일 시점에 대부분 제거되었다. pH 3 조건은 총 질소 및 총 인 모두 전혀 제거되지 않았다. 질소, 인 제거율은 실험 종료 시점인 4일째에 pH 5, 7, 9 조건에서 약 21 mg-N/L/d, 3.5 mg-P/L/d로 유사하게 나타났다(Fig. 2).

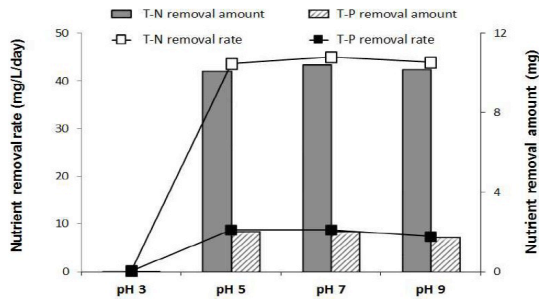


Fig. 2. Effects of the pH on T-N and T-P removal

pH 3 조건에서 질소와 인이 거의 제거되지 않아 제거율이 0 mg/L/d로 나타났으며 이는 세포질의 pH가 매우 낮을 경우, 세포막이 파괴되고 효소와 막 수송 단백질의 활성이 억제되어 세포가 손상되었기 때문이라고 판단된다. 미세조류 배양시 외부 pH가 급격히 낮아질 경우, 영양물질 분자의 이온화 경향이 달라져 물질흡수 능력이 감소한다고 알려져 있다(Prescott et al., 2002). Glucose 제거율은 pH 3, 5, 7, 9 조건에서 각각 127 mg/L/d, 810 mg/L/d, 940 mg/L/d, 996 mg/L/d로 나타나 pH 3 조건을 제외한 나머지 pH 5 ~ 9 조건에서 모두 유사한 제거율을 나타냈다(Table 3).

일반적인 미세조류의 배양을 위한 최적 pH는 7 ~ 9로 알려져 있으나(Barsanti and Gualtieri, 2006), 실험 종료 4 일 시점까지의 질소, 인 제거속도는 Table 3에서와 같이 pH 3을 제외한 pH 5 ~ 9 조건에서 유의한 차이를 나타내지 않아 *C. sorokiniana*는 강한 산성인 pH 3 조건을 제외한 pH 5 ~ 9 조건의 넓은 범위에서 저해

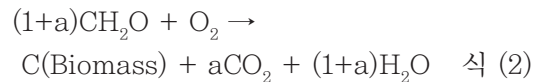
Table 3. Removal rates of glucose, nitrogen and phosphorus according to pH

	pH			
	3	5	7	9
Glucose removal rate (mg/L/day)	127	810	940	996
T-N removal rate (mg-N/L/day)	0	10.5	10.8	10.6
T-P removal rate (mg-P/L/day)	0	2.1	2.1	1.8

없이 성장과 영양염류 제거가 가능한 것으로 판단되며, 하수처리장의 유입수는 pH 6.5 ~ 7.5의 범위로 유입되므로 *C. sorokiniana*의 하폐수고도처리 적용이 가능할 것으로 판단된다.

3.1.2 탄소원에 따른 *C. sorokiniana*의 성장 pH 변화 및 영양염류제거

미세조류의 유기물 섭취는 membrane을 통한 sugar trans-location을 통해 일어나며 이때 교환되는 proton의 이동량에 따라 배양액 내 pH 변화가 결정된다(Komor and Tanner, 1974, 1976; Komor et al., 1985). 일반적으로 heterotrophic 대사시 산소를 소모하면서 이산화탄소를 배출하므로 식 (2)와 같이 배지 내 pH가 감소하게 된다(Chojnacka, 2004).



*Chlorella vulgaris*는 외부 탄소원으로 충분한 glucose 농도에서 성장할 경우 glucose uptake로 동반된 proton의 이동에 의해 alkalinity가 낮아지며, 이로 인하여 배양액의 alkalization을 향상시키기 위해 hexose/H⁺ symport system이 유도된다(Perez-Garcia et al., 2011). 이때 증가되는 pH와 변화속도는 당의 종류나 농도에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다(Komor and Tanner, 1974).

Acetate는 isocitrate lyase 효소를 이용해 glyoxylate cycle을 거쳐 동화되며(Nelson and Lewin, 1974; Ahmad and Hellebust, 1990) 본 실험에서 acetate원으로 사용된 sodium acetate의 경우, 배지 내 해리된 Na⁺가 OH⁻와 결합해 alkali를 형성하기 때문에 배양액 내 pH가 상승하게 된다(Perez-Garcia et al., 2011). 이는 heterotrophic 대사로 인해 pH가 급격하게 감소하는 현상을 완화시킬 수 있으며, pH control을 위한 추가적인 약품투입의 부담

을 감소시킬 수 있는 대안이 될 수 있을 것으로 기대된다. Fig. 3은 *C. sorokiniana*의 glucose 소비시 성장에 따라 pH가 6까지 감소하는 경향과, 이와는 반대로 acetate를 탄소원으로 이용할 경우, pH가 증가하는 배지 내 pH 변화를 나타낸다.

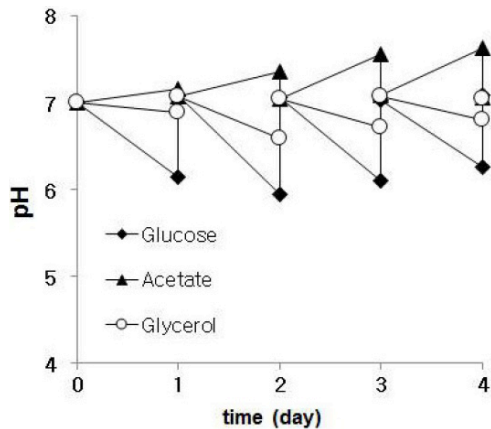


Fig. 3. Influence of carbon sources on the pH of *Chlorella sorokiniana*

*C. sorokiniana*의 성장량은 탄소원이 glucose일 경우 가장 높게 나타났으며, acetate의 경우 최종 성장량은 glucose의 성장량에 비해 약 20% 낮았고 비성장률은 glucose, acetate 조건에서 각각 3.2 d^{-1} , 2.2 d^{-1} 로 나타났다. Glucose를 외부 탄소원으로 이용한 조건에서 성장량이 가장 높게 나타난 이유는 다른 기질에 비해 mol당 에너지 함량이 높아 높은 성장률과 호흡률을 나타내기 때문인 것으로 판단된다(Boyle and morgan, 2009). Acetate는 glucose에 비해 저분자물질로 대사경로가 비교적 간단하지만 uptake 하기까지의 lag phase가 24 시간 더 길게 나타나 비성장률은 낮게 평가되었다. Glycerol을 탄소원으로 주입해준 경우 실험 종료시점까지 미세조류의 건조중량 차이는 없어 *C. sorokiniana*는 glycerol을 heterotrophic 조건에서 에너지원으로 이용할 수 없는 것으로 판단된다(Fig. 4).

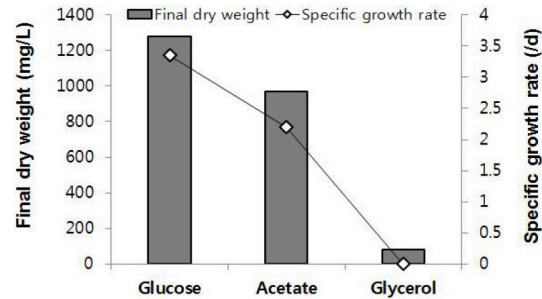


Fig. 4. Effects of carbon sources on final dry weight and specific growth rate of *C. sorokiniana* in heterotrophic cultivation

탄소원별 TOC, T-N 및 T-P 제거는 Table 4에 나타난 것과 같이, glucose를 외부 탄소원으로 이용했을 때 가장 높은 제거율을 나타냈으며, acetate는 TOC 제거율이 약 200 mg/L/d 로 glucose의 TOC 제거율과 큰 차이가 없었으나 T-N과 T-P는 glucose에 비해 약 60%의 제거율을 나타냈다. 이는 glucose를 기질로 이용할 때 가장 높은 성장률 및 성장률을 나타냈으며, 이로 인해 성장과정에서 질소와 인을 더 소모했기 때문이라고 판단된다.

Table 4. Removal rates of glucose, nitrogen and phosphorus according to carbon sources

	Carbon sources		
	Glucose	Acetate	Glycerol
TOC removal rate (mg-C/L/day)	218	194	41.6
T-N removal rate (mg-N/L/day)	9.8	5.9	1.5
T-P removal rate (mg-P/L/day)	2.0	1.2	0.5

4. 결론

- 일반적으로 하폐수 유입수의 pH 범위는 약 6.5 ~ 7.5 이므로, pH 5 ~ 9 범위에서 높은 성장과 질소, 인 및 유기물 제거율을 나타내는 미세조류의 heterotrophic 배양방식을 하폐수처리에 적용할 수 있을 것으로 평가되며, autotrophic 미세조류 배양시 소요되는 광조사 에너지를 절약할 수 있을

므로 경제적 처리방식이라고 사료된다. 또한, 유기물, 질소 및 인의 동시제거가 가능해 처리공정의 간소화를 도모할 수 있을 것으로 판단된다.

- *Chlorella sookiniana*의 경우, glucose와 acetate를 외부 탄소원으로 이용할 경우 질소, 인 제거 및 성장이 가능했으나, glycerol은 heterotrophic 조건에서 대사할 수 없는 것으로 나타났다. Acetate는 산업적 응용과정에서 많이 발생하는 물질이므로, 폐수처리시 heterotrophic 대사를 위한 경제적인 탄소원으로 이용 가능할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임.(NRF-2011-0023132)

참고문헌

APHA-AWA-WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC.

Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006) *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, pp.213-214, CRC Press, Boca Raton, FL.

Boyle, N.R., Morgan, J.A. (2009) Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *BMC syst. Biol.* **3**, 4.

Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. **14**, pp.557-577.

de-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K., Bustillos, J.J. (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-

promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* **48**, pp.514-521.

de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Morey, T., Bashan, Y. (2004) Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, **38**, pp.466-474.

Droop, M.R. (1974) *Heterotrophy of carbon*. In: Stewart, W.D.P. (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, pp.530-559.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K. (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, pp.1037-1047.

Javanmardian, M., Palsson, B.O. (1991) High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, pp.1182-1189.

Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. & Aaronson, A. (1986) *Algal Nutrition*. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook for Microalgal Mass Culture*, pp.147-198, CRC Press, Boca Raton, FL.

Komor, E., Tanner, W. (1974) The hexose-proton symport system of *Chlorella vulgaris*: specificity, stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake, *European Journal of Biochemistry*, **44**, pp.219-223.

Komor, E., Tanner, W. (1976) The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*: evidence for electrogenic sugar transport, *European Journal of Biochemistry*, **70**, pp.197-204.

Komor, E., Schobert, C., Cho, B.H. (1985) Sugar specificity and sugar-proton interaction for the hexose-proton-symport system of *Chlorella*. *European Journal of Biochemistry*, **146**, pp.649-656.

Kwon, S. H., Lee, E. M., Cho, D. C. (2012) Optimal culturing and enhancement of lipid accumulation in a microalga *Botryococcus braunii*, *Journal of Korean Environmental Sciences*, **21(7)**, pp.779-785.

- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(1)**, pp.217–232.
- Neilson, A.H., Lewin, R.A. (1974) The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*, **13**, pp.227–264.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, **45**, pp.11–36.
- Prescott, L., Harley, J. P., Klein, D. A. (2003) *Microbiology*, 5th ed. pp.114–116, McGraw-Hill, New York
- Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, pp.287–293.
- Radmer, R.J., Parker, B.C. (1994) Commercial applications of algae: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, **6**, pp.93–98
- Tuchman, N. C. (1996) “The role of heterotrophy in algae. In : Stevenson, R. J., M. L. Bothwell, and R. L. Lowe(eds.)”, *Algal Ecology : Freshwater Benthic Ecosystems*, pp. 299–319, Academic Press, New York.
- Wang, H., Xiong, H., Hui, Z., Zeng, X. (2012) Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. *Bioresource Technology*, **104**, pp.215–220.
- Watanabe, M. (2005) Freshwater culture media. *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, Amsterdam