

# 미세조류 옥외 배양시스템을 이용한 바이오디젤 생산 및 도시하수 영양염류 제거

강시온<sup>1,2</sup>, 김병혁<sup>1</sup>, 오희목<sup>1,2</sup>, 김희식<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 환경바이오연구센터

<sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 청정화학 및 생물학과

Received : January 3, 2013 / Revised : February 8, 2013 / Accepted : February 12, 2013

**Production of Biodiesel and Nutrient Removal of Municipal Wastewater using a Small Scale Raceway Pond.** Kang, Zion<sup>1,2</sup>, Byung-Hyuk Kim<sup>1</sup>, Hee-Mock Oh<sup>1,2</sup>, and Hee-Sik Kim<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea, <sup>2</sup>Green Chemistry and Environmental Biotechnology, University of Science and Technology (UST), Daejeon 303-333, Korea

A concerted effort to develop alternative forms of energy is underway due to fossil fuel shortages and its deleterious effects. Recently, bioenergy from microalgae has gained prominence and the use of municipal wastewater as a low cost alternative for a nutrient source has significant advantages. In this study, we have employed municipal wastewater directly after primary treatment (primary settling basin) in a small scale raceway pond (SSRP) for microalgal growth. Indigenous microalgae in the wastewater were encouraged to grow in the SSRP under optimal conditions. The mean removal efficiencies of TN, TP, and NH<sub>3</sub>-N after 6 days were 77.77%, 63.55%, and 89.02%, respectively. The average lipid content of the microalgae was 19.51% of dry cell weight, and linolenate and linoleate (18:n) were the predominant fatty acids. The 18S rRNA gene analysis and microscopic observations of the indigenous microalgae community revealed the presence of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* as the dominant microalgae. These results indicate that untreated municipal wastewater, serving as an excellent nitrogen and phosphate source for microalgal growth, could be treated using microalgae in open raceway ponds. Moreover, microalgal biomass could be further profitable by the extraction of biodiesel.

**Keywords:** Microalgae, biodiesel, wastewater treatment, small scale raceway pond (SSRP)

## 서 론

20세기 들어 산업혁명과 운송수단의 발달로 인하여 인류는 급속한 발달을 이루었고 이는 화석연료의 이용으로 가능할 수 있었다. 하지만 화석연료는 제한된 매장지역과 매장량으로 인하여 여러 차례 세계경제 위기를 야기하는 등의 문제점이 지적되었다[25]. 또한 무분별한 화석연료의 사용은 막대한 온실가스를 발생시켰으며, 지구온난화와 같은 환경문제를 야기했다[23]. 이에 대응하고자 교토의정서와 같은 국가적 차원의 기후변화협약을 통해 온실가스를 감축하려는 노력들이 시도되었다. 미국의 경우, 코펜하겐협약에서 2020년

까지 온실가스배출을 1990년 대비 3% 감축을 합의하였으며 [8], 2050년까지 단계적으로 온실가스 배출을 감축하여 2005년 기준 17% 수준으로 감축하는 목표를 법으로 규정하고 있다[13, 16]. 우리나라도 기후협약에 따라 온실가스배출을 2020년까지 2005년 대비 4% 감축해야 하며, 2020년 전망치 대비 30%를 감축하는 목표를 법으로 규정하고 있다[13, 24].

지구온난화에 대한 근본적인 해결책은 기존의 화석연료를 줄이고, 발생된 온실가스를 저감하거나, 온실가스를 배출하지 않는 에너지를 사용하는 것이며, 선진국들은 화석연료를 대체할 수 있는 대체에너지 개발에 박차를 가하고 있다. 미국은 대체에너지에 대한 막대한 재정적 지원과 세제혜택을 시행하고 있으며, 2035년까지 전기사용량의 80%를 대체에너지로 전환하기로 하였다[7, 13]. 특히 2017년까지 휘발유소비량을 20% 감축하고 바이오디젤과 같은 바이오연료의

### \*Corresponding author

Tel: +82-42-860-4326, Fax: +82-42-879-8103

E-mail: hkim@kribb.re.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

사용을 2020년까지 4배이상 늘리도록 법안을 개정하였다[16]. 이러한 전세계적 흐름에 맞추어 바이오에탄올·디젤 생산을 위해 콩이나 옥수수, 사탕수수, 미세조류 등을 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오연료 생산을 위한 바이오매스 획득은 농작물을 이용할 경우 많은 재배면적이 필요하고 식량 공급과 경쟁하게 되어 세계 곡물 가격에 큰 영향을 미치는 등의 문제점이 지적되고 있다[5, 17, 25].

이에 반해, 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산은 단위면적당 생산량이 뛰어나며 세계 곡물 시장에 영향을 주지 않는 이점을 가지고 있어, 농작물 유래 바이오연료가 가지고 있는 한계점을 극복할 수 있을 것으로 기대되고 있다[5, 17, 25]. 또한 미세조류의 광합성 작용을 통한 이산화탄소 고정 능력이 있으므로 온실가스 감축에도 기여할 수 있으며[5, 14, 25, 30], 바이오디젤을 생산하고 남은 미세조류 부산물은 가축사료로 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다[1, 27, 29].

하지만 미세조류 배양에는 질소와 인과 같은 영양염류의 첨가와 많은 양의 물이 필요하며, 이는 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산비용을 높이는 요인이 되고 있다[30]. 이에 반해, 미세조류 배양액으로 유기성 폐수를 이용한다면 바이오매스 획득을 위한 미세조류 배양비용을 줄일 수 있으며, 동시에 폐수 처리효과도 기대해 볼 수 있다[6, 29].

따라서 본 연구는 유기성 폐수를 이용한 미세조류 배양의 효율적인 미세조류 바이오매스 획득 가능성과 생산된 바이오매스의 바이오 디젤 전환 가능성을 알아보려고 유기성 폐수 옥의 배양 시스템(Small Scale Raceway Pond, SSRP)을 적용하였다. 또한 미세조류의 성장을 통해 도시에서 발생하는 유기성 폐수의 영양염류 제거능을 탐색하고, SSRP에서 성장하는 미세조류의 균집을 분자생물학적 방법을 통해 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 옥외 배양 시스템

하수종말처리장에 유입되는 유기성 폐수를 이용해 미세조류 배양을 하기 위해 SSRP를 설치하였다. SSRP의 깊이는 약 30 cm, 용적 60 L이며, 폭기는 paddle wheel을 이용하여 유속 30 cm/sec로 운전하였다. 광원은 태양광을 이용하였으며 자연적인 변화에 의해 light/dark cycle (L/D cycle)을 주었고, HRT (hydraulic retention time)는 6일로 반연속식으로 운전하였으며, 실험에 사용한 유기성 폐수는 대전시 하수종말처리장의 유입수(1차 침전지를 거쳐 포기조에 들어가기 전)를 이용하였다. 유기성 폐수의 평균 성장(2011년 1월~2012년 5월)은 BOD (biological oxygen demand, mg/L):  $167.85 \pm 31.01$ , COD<sub>Mn</sub> (chemical oxygen demand, mg/L):  $111.90 \pm 24.28$ , TSS (total suspended solids, mg/L):

$169.39 \pm 40.24$ , TN (total nitrogen, mg/L):  $40.30 \pm 2.52$ , TP (total phosphorus, mg/L):  $4.36 \pm 0.42$ 를 나타냈다. SSRP에 접종한 토착 미세조류는 1차 침전지 내벽에 서식하는 미세조류를 획득하여 SSRP에 접종하였다. 접종한 토착 미세조류를 우점시키기 위해, 유기성 폐수의 배출없이 6일간 운전하였으며, 6일 후 접종한 토착 미세조류가 우점하기 시작하였다. 우점된 토착 미세조류는 대부분 녹조류의 형태를 나타냈다. 본 SSRP는 대전 하수종말처리장에서 실험하였다.

### 수질분석방법

SSRP의 배양액을 2일마다 채취하여 0.45  $\mu\text{m}$  마이크로여과지로 여과한 후 잔류 TN, TP, NH<sub>3</sub>-N를 측정하였다. TN, TP, 및 NH<sub>3</sub>-N는 Standard method를 이용하여 분석하였다[2].

### 미세조류 성장 측정

미세조류의 성장은 건조중량 및 chlorophyll-*a*로 측정하였다. 건조중량은 SSRP 배양액 10 ml을 0.45  $\mu\text{m}$  마이크로여과지에 거른 후 105°C에서 24시간 동안 건조하여 측정하였다. Chlorophyll-*a*는 90% 아세톤을 이용하는 수질오염공정시험법에 따라 측정하였다[2].

### DNA 추출 방법 및 PCR 조건

SSRP의 미세조류 균집을 분석하기 위하여, 분자·생물학적 기법인 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)를 이용하였다. SSRP 운전 20일째의 배양액 1.5 ml로부터 FastDNA Spin kit for Soil (Bio101, USA)을 이용하여 total DNA를 추출하였으며, 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. 18S rRNA 유전자를 증폭하고자 SR-4F GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAG CCG CGG TAA TTC CAG CT-3')와 SR-7R (5'-TCC TTG GGC AAA TGC TTT CGC-3')을 각각 사용하였고[22], 이 primer를 이용하여 50  $\mu\text{l}$  안에 1 $\times$  PCR buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1  $\mu\text{M}$ ), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다[20, 21]. 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 pre-denaturation 시켜, 94°C에서 45 sec denaturation, 60°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension하고 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. Annealing 온도는 초기에는 60°C에서 시작해서 1 cycle 당 0.5°C 감소하게 20 cycles 수행하였고, 그 후 50°C에서 15 cycles을 수행하여 touch-down PCR을 완료하였고, 2차 PCR의 산물을 이용하여 DGGE를 수행하였다[21].

## DGGE 조건

PCR 산물은 Dcode™ System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 DGGE를 수행하였다[21]. Denaturing gradient gel은 10% polyacrylamide (37.5:1 = acrylamide:bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40-70%까지 농도구배가 형성되도록 첨가하여 제작하였으며, 제작된 DGGE gel에 PCR 증폭산물을 30 µl씩 loading하여 1× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 115 V로 19시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 DGGE gel은 ethidium bromide (1:10,000)에서 염색한 후, UV로 확인하였다[21].

## 염기서열분석

DGGE gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 선택한 후, 잘라내어 3차 멸균수 50 µl를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 상등액을 취하였다. Band에서 회수한 DNA를 주형으로 PCR에 사용한 primer를 이용하여 재증폭을 수행했으며, PCR 산물은 아가로스젤에서 전기영동하여 DNA recovery kit (QIAGEN, Germany)로 정제한 후 cloning 하였다. Cloning은 T-Blunt vector (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 18S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

## Lipid 추출 방법

미세조류의 세포내 지질함량은 Bligh & Dyer의 방법을 변형한 방법으로 분석하였다. 미세조류 시료에 Chloroform : methanol (2:1 v/v)를 넣어 교반 후, 증류수를 첨가하여 Chloroform : methanol : water의 비율이 1 : 1 : 0.9가 되게 조절하여 분리된 chloroform 층을 건조시켜 지질함량을 측정하였다[3, 14].

## FAME 분석방법

지방산 메틸 에스터 (Fatty acid methyl esters, FAME) 조성 분석을 위해 Gas Chromatograph (Shimadzu GC-2010, Japan)를 통하여 분석하였다. 미세조류 시료 50 mg과 1ml의 KOH-CH<sub>3</sub>OH를 test tube에 75°C에서 10분, 5% HCl과 methanol을 넣어 75°C에서 10분간 반응시켰다. 그 뒤, hexane과 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>을 넣어 반응시킨 후 증류수를 첨가하여 FAME가 포함되어 있는 층을 분리하였다. 지방산은 Gas chromatography (GC-2010, Shimadzu, Japan)를 통하여 분석하였다[14]. GC detector는 flame ionized detector (FID)를 사용하였으며 Rtx-wax capillary column (30 m ×

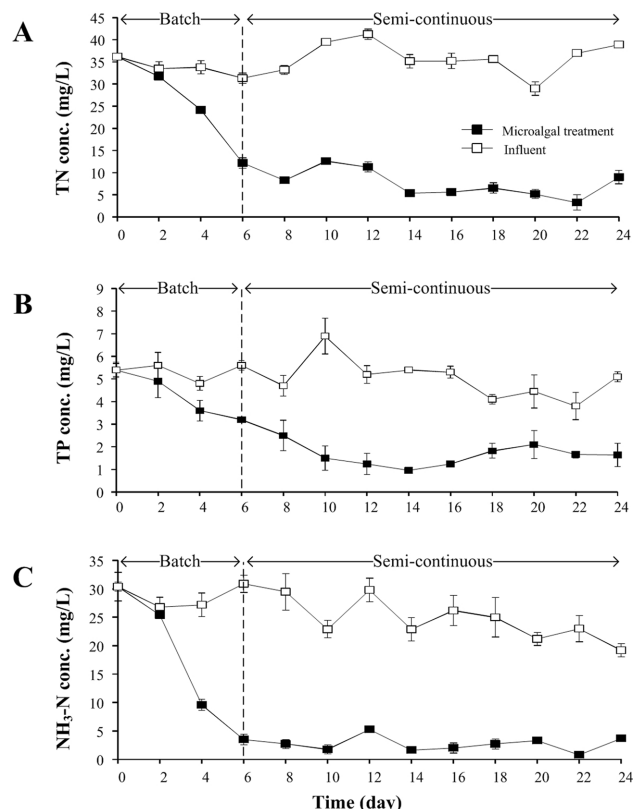
0.25 mm × 0.25 µm) (RESTEK, USA)을 사용하였다. Injector와 detector는 300°C로 설정하였으며, column 온도는 170°C로 1분 후, 5°C/min의 속도로 승온하여 250°C에서 12분 동안 유지하였고, 총 분석시간을 29분으로 설정하였다.

## 결과 및 고찰

### 미세조류 배양을 통한 도시하수 수질정화

본 연구에 사용된 1차 침전지 방류수의 TN은 평균 35.35 ± 1.00 mg/L이며, SSRP를 이용하여 처리된 처리수의 TN은 운전 6일을 시점으로 평균 7.92 ± 1.04 mg/L로 나타났다 (Fig. 1A). 같은 기간에 활성슬러지 공법에 의해 처리된 최종 방류수의 TN은 평균 13.01 ppm이며, 이는 미세조류를 이용한 유기성 폐수처리가 활성슬러지 공법보다 높은 TN 제거 효율을 가지고 있으며 TN의 도시하수 방류수 수질기준인 20 mg/L 이하로 TN을 제거할 수 있는 우수한 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

또한 실험에 사용된 1차 침전지 방류수의 TP는 평균

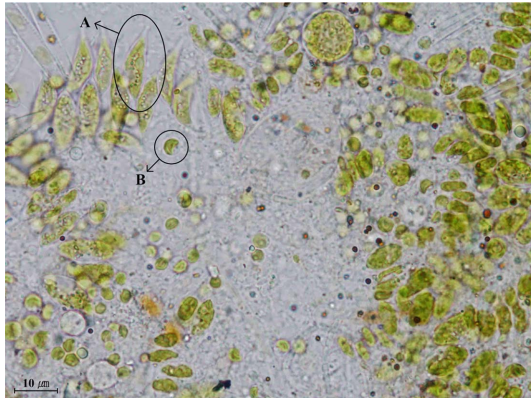


**Fig. 1.** The removal of total nitrogen (A), total phosphorus (B), and NH<sub>3</sub>-N (C).

Closed square; SSRP using municipal wastewater, open square; influent. First 6 days; SSRP was batch operation, after 6 days; semi-continuous operation.

5.10 ± 0.40 mg/L이며, SSRP를 이용하여 미세조류를 배양한 처리수의 TP는 운전 6일을 시점으로 평균 1.79 ± 0.39 mg/L으로 나타났다(Fig. 1B). 같은 기간에 활성슬러지 공법에 의해 처리된 최종 방류수의 TP는 평균 0.29 ppm이며, SSRP를 이용한 TP제거 효율이 활성슬러지 공법의 TP 제거 효율에 미치지 못함을 알 수 있었다. 하지만 도시하수의 방류수 수질기준인 2 mg/L에 만족하는 수질정화 수치를 나타냄으로써 SSRP는 인 제거에도 탁월한 결과를 나타낸다고 판단될 수 있다. 또한 HRT 6일로 운전 시, TP & TN이 방류수 수질기준 이하로 유지되는 것을 확인하였다.

또한 유기성 폐수의 NH<sub>3</sub>-N는 평균 25.77 ± 2.11 mg/L이며, SSRP를 이용하여 미세조류를 배양한 배양액의 NH<sub>3</sub>-N는 운전 6일을 시점으로 평균 2.74 ± 0.48 mg/L으로(Fig. 1C) 평균 89.02%의 높은 제거 효율을 보였다. SSRP를 통한 미



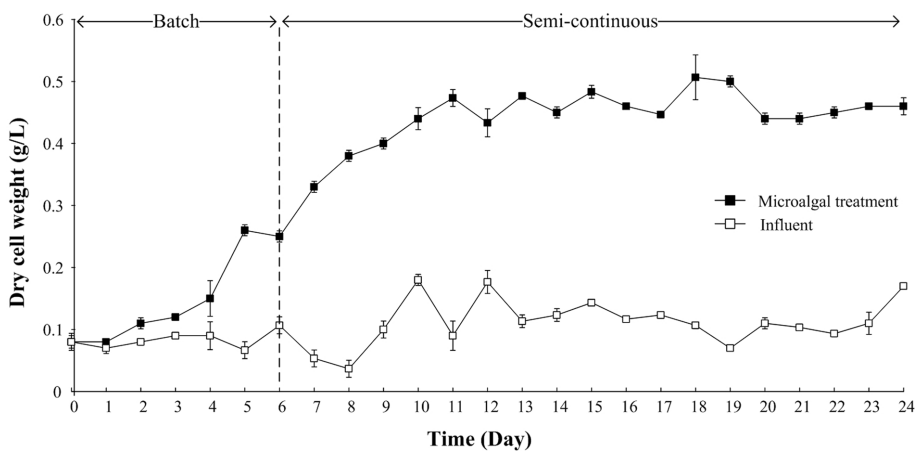
**Fig. 2. Photographs of dominant microalgae cells visualized under a light microscope ×1000 in the SSRP using municipal wastewater.** *Scenedesmus* (A) is oval shape and *Chlorella* (B) is a circle. Scale bars: 10 μm.

세조류의 유기성 폐수의 처리시 NH<sub>3</sub>-N의 제거능력이 매우 우수함을 입증한 결과로 판단된다. NH<sub>3</sub>-N는 미생물의 생장에 있어 중요한 물질인데, 미생물들이 바로 체내합성으로 이용이 가능한 형태의 질소로 알려져 있기 때문이다. 미생물들이 성장하면서 NH<sub>3</sub>-N의 농도가 먼저 감소한 뒤에 NO<sub>3</sub>-N의 농도가 감소하게 되는데, 이는 nitrate reductase의 합성이 암모니아에 의해 후전사단계에서 억제되기 때문인 것으로 알려지고 있다[10, 19, 26, 28]. 즉, NH<sub>3</sub>-N와 NO<sub>3</sub>-N가 함께 존재하면 NO<sub>3</sub>-N보다 NH<sub>3</sub>-N가 먼저 감소된 후, NO<sub>3</sub>-N의 농도가 감소하게 된다.

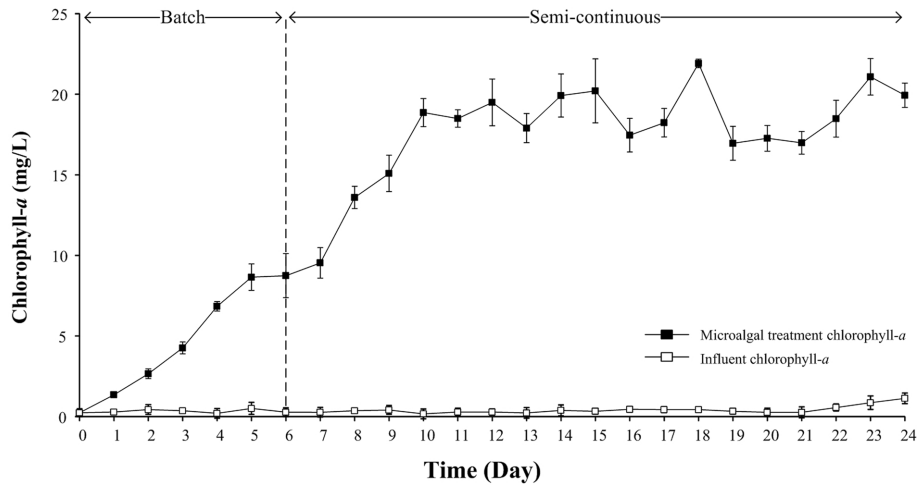
**미세조류 군집분석**

SSRP를 이용한 미세조류 배양으로 유기성 폐수를 정화하는 미생물 군집은 구형의 녹조류인 *Chlorella*와 2개, 4개 혹은 8개 등의 세포들이 배열되어 군체를 이루는 녹조류인 *Scenedesmus*가 우점했다(Fig. 2). 우점한 미세조류의 시간에 따른 성장을 확인하기 위해 건조중량과 chlorophyll-*a*를 측정하였다. 유입되는 유기성 폐수의 건조중량은 평균 0.10 ± 0.01 g/L이며, SSRP내의 건조중량은 운전 6일을 시점으로 평균 0.44 ± 0.01 g/L로 유지되었으며, 바이오매스 생산량은 0.07 g/L/day로 나타남을 확인하였다(Fig. 3). 또한 유입되는 유기성 폐수의 chlorophyll-*a*는 평균 0.39 ± 0.23 mg/L이며, SSRP는 운전 6일을 시점으로 평균 16.11 ± 0.70 mg/L로 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 4). SSRP 내의 미세조류의 건조중량과 chlorophyll-*a*의 측정 결과를 통해 미세조류들이 우점·유지되는 것을 확인할 수 있었다.

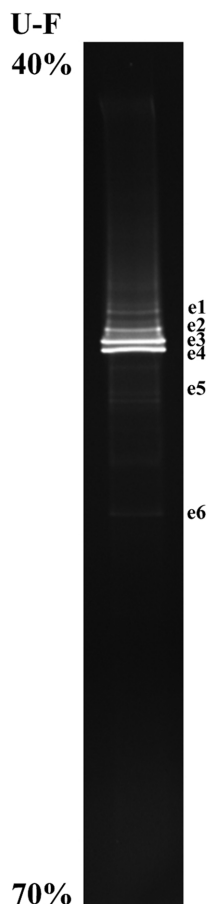
SSRP 운전 24일의 배양액으로부터 DNA를 추출하여, 미생물군집 다양성을 분석하는데 유용한 기법인 DGGE를 통해 미생물 군집의 다양성을 조사해본 결과, Fig. 5와 같이 DGGE gel 상에서 다양한 bands를 확인할 수 있었다. 또한



**Fig. 3. Dry cell weight according to the operating time of the SSRP using municipal wastewater.** Closed square; DCW by SSRP using municipal wastewater, open square; DCW of influent.



**Fig. 4. Chlorophyll-a according to the operating time of the SSRP using municipal wastewater.**  
Closed square; Chlorophyll-a by SSRP using municipal wastewater, open square; Chlorophyll-a of influent.



**Fig. 5. DGGE profiles based on 18S rRNA gene generated from SSRP.**

DGGE condition: 10% polyacrylamide (37.5:1 = acrylamide: bisacrylamide), urea, formamide 40-70%, 60°C, 115 V, 19 h running.

DGGE profile상의 각 bands로부터 회수한 DNA의 염기서열을 결정한 뒤, NCBI의 GenBank를 이용하여 상동성을 비교하였다. 진행생물 18S rRNA 유전자 6개 bands에 대한 염기서열을 결정하였고, Table 1과 같이 분석되었다.

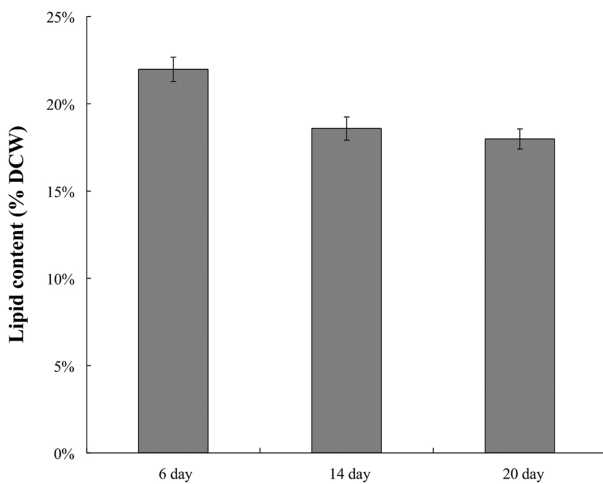
18S rRNA 유전자에 대한 6개의 bands를 분석한 결과, 2가지 속의 녹조류와 한가지의 진균으로 분석되었다. DGGE band e1, e3, e4는 *Chlorella vulgaris*로 분석되었고, DGGE bands e2, e6는 *Scenedesmus obliquus*로 분석되었다. 그리고 DGGE band e5는 *Spizellomyces* sp.의 fungi로 분석되었다. *C. vulgaris*는 담수녹조류로서 고농도 이산화탄소에 대한 내성을 가지고 있으며 적응력이 뛰어난 것으로 보고되었다[31]. 또한 유기성 산업폐수 내의 고농도  $\text{NH}_3\text{-N}$ 에 대한 내성이 우수하며 폐수 내의  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , P의 제거 효율이 높은 것으로 보고되었다[9, 30]. 그리고 다른 *Chlorella*에 비하여 성장속도가 빠르며 이산화탄소 저감 능력이 높다고 보고되었다[11]. *S. obliquus* 역시 유기성 폐수내의  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , P을 제거하는데 높은 효율을 나타낸다고 알려져 있으며[9, 18], 산업폐수의 중금속을 제거하는데 이용할 수 있고, 높은 지질함량을 포함하여 바이오디젤 생산 연구에 이용되고 있다[4, 17].

#### 미세조류 바이오매스의 지질함량 및 지방산 조성

SSRP 운전 6일, 14일, 그리고 20일의 배양액에서 미세조류를 수확하여 미세조류 내의 지질함량을 분석한 결과, 각각 21.97%, 18.58%, 17.98%로 나타났으며, 지질 생산량은 14.31 mg/L/day로 나타남을 확인하였다(Fig. 6). 14일, 20일의 지질함량보다 6일의 지질함량이 비교적 높은 것은 초기 6일간 배양액의 배출없이 SSRP를 운전하여 배양액 내의 질소 고갈상태에 근접하였기 때문으로 판단된다. 일반적으로

**Table 1. Identity of the bands obtained from 18S rRNA gene DGGE profile of SSRP.**

Band no.	Accession no.	Closest relative	Similarity (%)
e1	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%
e2	FR865738	<i>Scenedesmus obliquus</i> CCAP 279/46	99%
e3	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%
e4	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%
e5	GQ499385	<i>Spizellomyces</i> sp. JEL 549	97%
e6	FR865738	<i>Scenedesmus obliquus</i> CCAP 279/46	99%

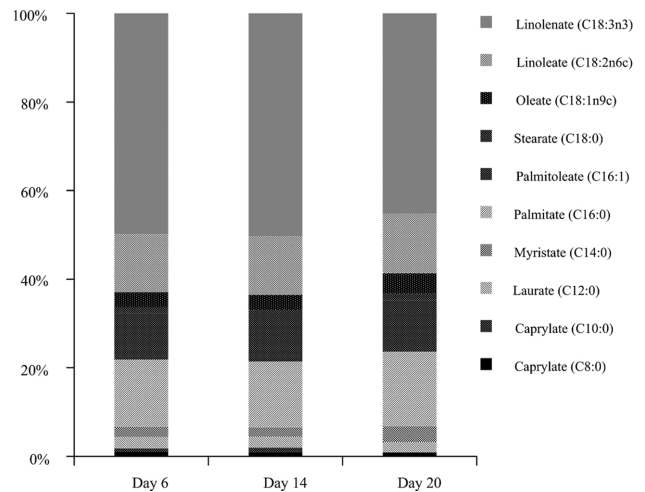


**Fig. 6. Lipid contents of microalgae of SSRP after the incubation days.**

미세조류는 질소가 고갈된 상태에서 체내 지질축적을 증가시키는 것으로 알려져 있다[15, 17]. HRT 6일로 SSRP 운전 시 질소가 고갈되는 조건은 아니지만, 지질함량을 증가시키기 위해서는 HRT를 좀 더 길게 운전하는 것이 유리하다는 것을 알 수 있었다.

SSRP 운전 6일, 14일, 그리고 20일의 배양액에서 미세조류를 수확하여 미세조류 내의 지질을 FAME로 전환하여 지방산 조성을 분석하였으며, Fig. 7과 같은 조성을 나타내었다. SSRP에서 우점하는 미세조류들의 FAME는 주로 C18:n인 Linolenate (C18:3n3), Linoleate (C18:2n6c)와 C16:n인 Palmitate (C16:0)로 이루어져 있음을 확인하였다. 일반적으로 *Chlorella* sp.의 FAME 조성은 16:0, 18:2, 18:3이 많고, *Scenedesmus obliquus*의 FAME 조성은 16:0, 18:2가 많은 부분을 차지한다고 알려져 있다[12]. SSRP에서 배양된 미세조류의 FAME 분석 결과를 볼 때, *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus obliquus*가 우점하는 것을 나타낸 현미경 사진(Fig. 2)과 DGGE의 결과(Table 1)가 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 유기성 폐수를 이용한 효율적인 미세조류 바이



**Fig. 7. Fatty Acid Methyl Ester (FAME) composition of microalgae of SSRP after the incubation days.**

오매스 획득 가능성과 미세조류 배양을 통한 유기성 하·폐수의 수질정화 가능성을 탐색하였다. 또한, 유기성 하·폐수를 정화하는 미세조류의 군집과 미세조류 바이오매스의 바이오디젤 전환능을 분석하였다. 도시에서 발생하는 유기성 폐수를 이용하여 SSRP에서 미세조류 배양 후 잔류 TN, TP, NH<sub>3</sub>-N를 분석한 결과, SSRP를 통한 유기성 폐수의 영양염류의 처리능이 우수함을 확인하였다. SSRP 시스템에서 배양액으로 사용된 뒤에 방류되는 배출수의 TN, TP 농도는 도시하수 방류수 수질기준(TN: 20 mg/L, TP: 2 mg/L)을 충족시키는 수준으로 나타났다. 이는 미세조류 바이오매스 수확 후에 배양액을 재처리하는 과정이 불필요함을 의미한다. HRT 6일에서 8일로 변경 시, 바이오매스 생산량은 증가하나 COD 값 역시 증가하는 것으로 나타났다(결과 미 제시). 따라서 HRT를 증가시키는 것은 수질정화 측면에서는 비효율적임을 확인하였다. 또한, 배양액에서 유기성 폐수 내의 질소, 인들을 섭취하여 영양염류 제거에 기여하는 미세조류를 동정한 결과 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*가 우점함을 확인하였고, *C. vulgaris*와 *S. obliquus* 유래의 지질을 분석하여 바이오디젤 전환 가능성을 확인하였다. 이를 통해 미세조류 바이오매스

생산단가의 절감뿐만 아니라 미세조류 배양을 통한 영양염류의 제거와 하수처리 공법에서 호기성 처리로 인한 과도한 발전비용의 절감과 바이오매스를 이용한 바이오디젤 전환 가능성을 확인하였다. 향후 scale up 연구를 통하여 유기성 폐수를 이용한 미세조류 배양이 경제적인 바이오매스 생산과 바이오디젤 생산 및 효율적인 질소와 인 제거 시스템으로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

화석연료의 매장량 한계와 해로운 영향으로 인하여 이를 대신할 대체 에너지연구가 요구되고 있다. 최근, 미세조류를 통한 바이오에너지 생산이 주목을 받고 있으며, 도시하수를 영양원으로 이용하여 미세조류를 배양하는 것은 생산비용을 낮추는 좋은 대안이 될 수 있다. 본 연구에서는 옥외 수질정화 배양 시스템(Small Scale Raceway Pond; SSRP)을 이용하여 적용했다. 실험에 사용한 도시하수는 하수종말처리장의 1차 침전지를 거친 유입수를 이용하였으며, 토착 미세조류를 SSRP에서 배양하였다. 체류시간 6일 운전 후 TN, TP, NH<sub>3</sub>-N의 평균 제거 효율은 77.77%, 63.55%, 89.02%로 각각 나타났다. 또한 미세조류 내의 지질함량은 평균 19.51%로 나타났으며, FAME는 주로 18:n인 linolenate, linoleate로 이루어져 있음을 확인하였다. 18S rRNA 유전자 분석과 현미경 관찰을 통하여 녹조류인 *Chlorella*와 *Scenedesmus*가 우점하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 도시하수는 미세조류 배양에 필요한 질소와 인을 제공할 수 있으며, 미세조류를 이용한 SSRP를 통하여 정화될 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한 미세조류 배양을 통해 얻어진 바이오매스는 바이오디젤 전환을 통하여 상업화될 수 있는 가능성을 확인하였다.

## Acknowledgements

This work was supported by the Advanced Biomass R&D Center (ABC) of Global Frontier Project funded by the Ministry of Education, Science and Technology (ABC-2011-0031351), the Energy Efficiency & Resources of the Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning (KETEP) grant funded by the Korea government Ministry of Knowledge Economy (No. 2012T100201665), and grant from the KRIBB (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) Research Initiative Program (www.kribb.re.kr).

## References

- Aaronson, S. and Z. Dubinsky. 1982. Mass production of microalgae. *Cell. Mol. Life Sci.* **38**: 36-40.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington, DC. 20th ed.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **37**: 911-9117.
- Cain, J. R., D. C. Paschal, and C. M. Hayden. 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **9**: 9-16.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**: 294-306.
- Craggs, R. J., P. J. McAuley, and V. J. Smith. 1997. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Res.* **31**: 1701-1707.
- Galbraith, K. 2009. Obama signs stimulus packed with clean energy provisions. *The New York Times*.
- Garber, K. 2009. Top 5 Issues at the Copenhagen Climate Conference. *US News*.
- González, L. E., R. O. Cañizares, and S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol.* **60**: 259-262.
- Guerrero, M. G., J. M. Vega, and M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**: 169-204.
- Jeong, M. L., J. M. Gillis, and J. -Y. Hwang. 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**: 1763-1766.
- Knothe, G. 2011. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chem.* **13**: 3048-3065.
- Lee, E. K. 2012. Change of energy related legislation system in Korea and USA. *Korean Environ. Law Assoc.* **34**: 117-157.
- Lee, J. Y., C. Yoo, S. Y. Jun, C. Y. Ahn, and H. M. Oh. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* **101**: S75-S77.
- Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu, and C. Q. Lan. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 629-636.
- Liang, F. -Y., M. Ryvak, S. Sayeed, and N. Zhao. 2012. The role of natural gas as a primary fuel in the near future, including comparisons of acquisition, transmission and waste handling costs of as with competitive alternatives. *Chem. Cent. J.* **6 (Suppl 1)**: S4.
- Mandal, S. and N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**: 281-291.
- Martínez, M. E., S. Sánchez, J. M. Jiménez, F. E. Yousfi, and L. Muñoz. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* **73**: 263-272.
- Morris, I. and P. J. Syrett. 1963. The development of nitrate

- reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Microbiol.* **47**: 32-41.
20. Mulyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 317-322.
  21. Mulyzer, G., E. C. D. Waal, and A. G. Uiterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
  22. Nakayama, T., S. Watanabe, K. Mitsui, H. Uchida, and I. Inouye. 1996. The phylogenetic relationship between the *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* **44**: 47-55.
  23. Oh, S. H., J. G. Han, N. Y. Kim, C. J. Sub, Y. T. Bin, L. S. Young, and L. H. Youg. 2009. Cell growth and lipid production from fed-batch cultivation of *Chlorella minutissima* according to culture condition. *KSBB J.* **24**: 377-382.
  24. Park, S. H. and J. K. Koh. 2012. Greenhouse Gas Emission Allocation for Provinces in Korea. *J. Korean Regional Sci. Assoc.* **28**: 39-57.
  25. Pittman, J. K., A. P. Dean, and O. Osundeko. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* **102**: 17-25.
  26. Smith, F. W. and J. F. Thompson. 1971. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **48**: 224-227.
  27. Soeder, C. J. 1980. Mass production of microalgae: Results and Prospects. *Hydrobiologia* **72**: 197-209.
  28. Syrett, P. J. and I. Morris. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochimica et Biophysica Acta* **67**: 566-575.
  29. Wilkiea, A. C. and W. W. Mulbry. 2002. Recovery of dairy manure nutrients by benthic fresh water algae. *Bioresour. Technol.* **84**: 81-91.
  30. Yun, Y. S., S. B. Lee, J. M. Park, C. I. Lee, and J. W. Yang. 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**: 451-455.
  31. Yun, Y. S., J. M. Park, and J. W. Yang. 1996. Enhancement of CO<sub>2</sub> tolerance of *Chlorella vulgaris* by gradual increase of CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnology Techniques* **10**: 713-716.