

## 바이오티젤 생산을 위한 미세조류 옥외배양 시스템의 영양원에 따른 미세조류 성장 특성 비교

김동호<sup>1,2</sup> · 김병혁<sup>1</sup> · 최종은<sup>1,2</sup> · 강시온<sup>3</sup> · 김희식<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 지속가능자원연구센터

<sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 청정화학 및 생물학전공

<sup>3</sup>한국과학기술원 생명화학공학과

### The Effect of Microalgal Growth on Nutrient Sources Using Microalgal Small Scale Raceway Pond (SSRP) for Biodiesel Production

Dong-Ho Kim<sup>1,2</sup>, Byung-Hyuk Kim<sup>1</sup>, Jong-Eun Choi<sup>1,2</sup>, Zion Kang<sup>3</sup>, and Hee-Sik Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Sustainable Bioresource Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),  
Daejeon 305-806, Republic of Korea

<sup>2</sup>Green Chemistry and Environmental Biotechnology, University of Science and Technology (UST),  
Daejeon 303-333, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, Daejeon 305-701, Republic of Korea

(Received November 10, 2014 / Accepted December 22, 2014)

The world is in need of sustainable and eco-friendly energy sources such as microalgal biodiesel due to global warming and fossil fuel shortages. In this study, we compared the effectiveness of liquid fertilizer produced from swine manure and agriculture grade solid fertilizers as nutrient sources for microalgal biomass production. Mixed culture (*Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Stigeoclonium* spp.; CSS) was cultivated for 28 days in Small Scale Raceway Pond (SSRP) using various nutrient sources (swine manure liquid fertilizer, agricultural solid fertilizer, and mixture of these two fertilizers). Biomass and lipid productivity of fertilizer mixture were the highest at 0.8 g/L and 5.8 mg/L/day, respectively. These results indicate that the fertilizer mixture can provide microalgae necessary nutrient sources for stable biodiesel production and biomass growth. In addition, overall cost of microalgal cultivation and subsequently biodiesel production would be significantly reduced.

**Keywords:** biodiesel, biomass, microalgae, open culture system, swine manure

산업화와 교통수단의 발달로 인해 화석연료의 소비가 급격하게 증가하면서, 우리 인류는 화석연료 자원 부족문제와 대기오염이라는 두 가지 커다란 숙제를 안게 되었다. 화석연료 자원의 공급이 불안정해져 가격이 급등할 때, 세계 경제는 여러 차례 위기를 겪었다. 또한, 화석연료 자원 사용 시 발생하는 온실가스는 지구온난화 등 여러 환경문제를 일으켰다(Oh *et al.*, 2009; Pittman *et al.*, 2011). 이러한 문제점을 해결하기 위해 전 세계 각국은 여러 가지 국제협약을 맺어 온실가스 배출량을 줄이기 위한 노력을 하고 있다(Garber, 2009; Lee, 2012). 또한 세계 여러 나라는 온실가스를 줄이는 것뿐만 아니라 화석연료를 대체하기 위한 에너지자원도 활발히 연구하고 있다. 화석연료를 대체하기 위한 차세대 청정에너지는 풍력, 조력, 지열, 태양에너지, 그리고 바이

오에너지 등이 있다. 그중에서 바이오티젤은 광합성 과정을 통한 바이오매스로부터 생산되기 때문에 온실가스 증가율을 어느 정도 둔화시킬 수 있으며, 경유와 혼합하여 기존의 디젤 엔진 연료로 사용될 수 있는 장점이 있다(Chisti, 2007; Xue *et al.*, 2011). 이러한 이유로 현재 여러 나라에서 콩, 옥수수, 사탕수수 등의 농작물과 미세조류를 이용해서 바이오티젤을 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 농작물을 이용한 생산방식은 많은 재배면적이 필요하고, 인류의 식량 부족문제를 심화시키는 등 여러 부작용을 안고 있다(Chisti, 2007; Mandal and Mallick, 2009; Pittman *et al.*, 2011). 반면 미세조류를 이용한 생산방식은 세계 곡물 시장에 영향을 주지 않으며, 면적당 바이오매스 생산량이 농작물을 이용한 생산방식에 비해 높다는 장점이 있다(Chisti, 2007; Mandal and Mallick, 2009; Pittman *et al.*, 2011). 또한, 바이오티젤을 생산하고 남은 부산물을 가축 사료나 화장품 원료, 바이오 플라스틱 등으로 이용할 수 있어 최근에 많

\*For correspondence. E-mail: hkim@krribb.re.kr; Tel.: +82-42-860-4326; Fax: +82-42-860-4594

은 주목을 받고 있다(Aaronson and Dubinsky, 1982; Spolaore et al., 2006). 한편, 미세조류의 생장은 광원과 CO<sub>2</sub>, 물 뿐만 아니라, 질소, 인 등의 여러 영양염류가 필요하므로, 미세조류 배양 시 미세조류 배양액에 이러한 영양염류를 첨가해 주어야 한다(Yun et al., 1997). 이때 첨가되는 영양염류는 바이오디젤의 생산단계에 직접적인 영향을 미치므로, 가격이 저렴한 영양염류 물질을 첨가한다면, 미세조류 배양단가를 낮출 수 있을 것이다. 이러한 이유로 최근에는 영양염류를 함유한 폐수를 사용하여 미세조류 배양단가를 줄이는 연구가 활발히 진행되고 있다(Kang et al., 2012, 2013). 폐수를 영양원으로 이용한다면, 미세조류 배양단가 절감 효과와 오염물질 제거 효과를 기대할 수 있을 것이다(Pittman et al., 2011; Kang et al., 2012). 그러나 유입되는 폐수는 매일 물질 조성이 변화되므로 미세조류 배양액으로 이용하는 데 어려움이 있다(Lam and Lee, 2012).

한편 미세조류를 배양하는 시스템은 옥외배양시스템(Raceway Pond)과 광생물반응기(Photobioreactor, PBR) 등의 방식이 있다. 옥외배양시스템은 광생물배양기에 비해 설치비용과 관리비용이 적게 들고, 대형으로 제작하기 더 용이하기 때문에 미세조류를 대량으로 배양할 때 유리한 점이 있다(Rodolfi et al., 2009; Shen et al., 2009). 운전비용이 저렴한 미세조류 배양 시스템을 이용한다면 미세조류 배양단가를 더욱 낮출 수 있을 것이다.

이에 돈분 액체비료와 복합비료는 농업에 사용되는 비료로써, 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 가용성 인 등 여러 영양염류를 함유하고 있다. 이러한 돈분 액체비료와 복합비료 등 농업용 비료를 폐수에 첨가하여 영양염류 비율을 조절한다면 폐수가 가진 단점을 어느 정도 해소할 수 있을 것이다(Choi et al., 2014).

본 연구에서는 미세조류를 대량 배양하기 위한 영양원으로 돈분 액체비료와 농업용 복합비료를 사용하여 바이오디젤 생산을 위한 미세조류의 성장률을 비교하였다. 그리고 미세조류 배양수는 대전하수종말처리장에서 처리되어 방류되는 방류수를 직접 사용하여 옥외배양시스템에서 배양하였다. 이를 통해 바이오디젤 생산을 위한 미세조류 영양원으로 폐수의 활용 가능성과 미세조류 바이오매스 생산량을 확인해보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 옥외 배양 시스템

하수종말처리장의 방류수와 돈분 액체비료(Swine manure liquid fertilizer, LF), 농업용 복합비료(Agricultural solid fertilizer, SF)를 이용해 미세조류 배양을 하기 위해 개방형 옥외 배양시스템의 일종인 SSRP 시스템(Small Scale Raceway Pond, SSRP)을 설치하였다. SSRP의 깊이는 약 30 cm, 용적 70 L이며, paddle wheel을 이용하여 유속 30 cm/sec로 운전하였다. 폭기는 air pump와 diffuser를 이용하였으며(0.1 vvm), 1%의 CO<sub>2</sub>를 첨가하였다. 실험에 사용한 배양액은 대전 하수종말처리장에서 최종 하수처리를 거친 방류수를 사용하였다. 광원은 태양광을 이용하였으며 실험기간 동안 평균 일조시간은 7시간 39분이었다. 자연증발로 손실된 물은 방류수로 2일에 한 번씩 보충해주었고,

28일간 희분식으로 운전하였다. 본 SSRP는 대전 하수종말처리장에서 실험하였다.

### 미세조류 균주

본 실험에서는 대전 하수종말처리장 방류수 내에서 검출된 혼합 토착 미세조류 CSS mixed culture (*Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Stigeoclonium* spp. 등 미세조류 3종이 우점하고 있는 균집)를 이용하여 배양하였다(Kang et al., 2012, 2013).

### 영양염류

실험에 사용한 돈분 액체 비료는 경상남도 하동군 양보면 우복리에 위치한 하동축협 자연순환농업센터에서 얻은 호기성 소화 돈분을 이용하였다. 경상남도 하동농협 자연순환농업센터에서는 농가에서 고액 분리 후 반입된 돼지분뇨를 화학적 응집처리 없이 원심분리만을 이용하여 고형분과 액체성분을 분리하고, 자체 생성된 미생물을 이용하여 액체 비료 및 퇴비를 생산하고 있으며, 현재 연간 30,000 ton (100 ton/day)의 돼지분뇨를 처리하여 돈분 액체비료를 생산하고 있다. 액체 비료의 수질 성상은 TN 1,954 ppm, TP 144 ppm으로 확인되었다(Choi et al., 2014). 복합비료는 질산칼슘 비료(Calcium nitrate, Hydro, Norway)와 수용성 인산비료(Hi foliar plus, Haifa chemicals, Israel)를 혼합하여 사용하였다. 돈분 액체비료를 이용한 미세조류 배양은 LF 1%로 첨가해주었으며, 농업용 복합비료를 이용한 미세조류 배양은 TN 120 ppm, TP 10 ppm으로 운전하였고, LF와 SF의 혼합은 LF 500 ppm, TN 120 ppm, TP 10 ppm으로 운전하였다.

### 미세조류 성장 측정

본 실험에서는 돈분 액체비료와 농업용 복합비료를 사용하여 3가지 배양액을 제조하고 각 배양액에서 미세조류의 건조 세포중량과 엽록소-a, 지질함량 등을 측정하여 비교하였다. 미세조류 건조중량은 SSRP 배양액 10 ml을 0.45 μm 여과지에 거른 후 105°C에서 24시간 동안 건조하여 측정하였다. 엽록소-a는 90% 아세톤으로 추출하여 750 nm, 664 nm, 647 nm, 630 nm의 파장으로 측정하였다(APHA, 1998).

엽록소-a의 계산식은 다음과 같다.

$$= \{11.85 \times (664 \text{ nm} - 750 \text{ nm}) - 1.54 \times (647 \text{ nm} - 750 \text{ nm}) - 0.08 \times (630 \text{ nm} - 750 \text{ nm})\} \times \text{acetone volume} \div \text{sample volume}$$

### 수질분석방법

SSRP의 배양액을 2일마다 채취하여 0.45 μm 여과지로 여과한 후 잔류 TN, TP를 측정하였다. TN과 TP는 Standard method를 이용하여 분석하였다(APHA, 1998).

### Lipid 추출 방법

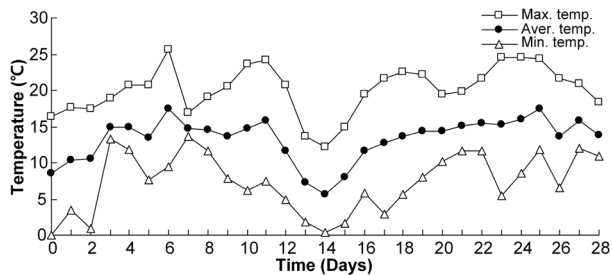
미세조류의 세포 내 지질함량은 Bligh & Dyer의 방법을 변형한 방법으로 분석하였다. 미세조류 시료에 Chloroform : methanol (2:1 v/v)를 넣어 교반 후, 증류수를 첨가하여 chloroform : methanol : water의 비율이 1 : 1 : 0.9가 되게 조절하여 분리된 chloroform 층을 건조시켜 지질함량을 측정하였다(Bligh and Dyer, 1959; Lee et al., 2010).

**FAME 분석방법**

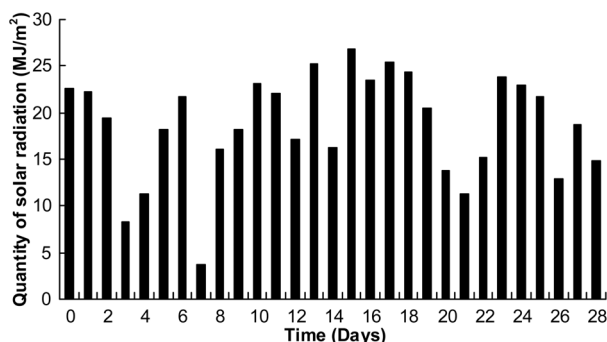
지방산 메틸 에스터(Fatty acid methyl esters, FAME) 조성 분석을 위해 Gas Chromatograph (Shimadzu GC-2010, Japan)를 통하여 분석하였다. 미세조류 시료 50 mg과 1 ml의 KOH-CH<sub>3</sub>OH를 test tube에 75°C에서 10분, 5% HCl과 methanol을 넣어 75°C에서 10분간 반응시켰다. 그 뒤, hexane과 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>을 넣어 반응시킨 후 종류수를 첨가하여 FAME가 포함된 층을 분리하였다. 지방산은 GC-FID (GC-2010, Shimadzu, Japan)를 통하여 분석하였다. 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 온도를 올려 250°C에서 12분 동안 유지하였고, 총 분석시간을 29분으로 설정하였다(Kang *et al.*, 2013).

**결과 및 고찰**

미세조류 유래의 바이오디젤 생산 시, 미세조류 배양비용은 바이오디젤 생산비용 중 많은 비율을 차지한다(Yun *et al.*, 1997). 따라서 바이오디젤 생산단가를 줄이기 위해서는 값비싼 영양원 대신 저렴한 대체물질이 요구되며(Choi *et al.*, 2014), 대체물질로 폐수를 사용하는 연구가 진행되어 왔다(Craggs *et al.*, 1997; Wilkie and Mulbry, 2002). 그러나 폐수는 날씨와 기후의 영향을 많이 받아 안정적인 영양공급이 어렵다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 단점을 보완하고자 돈분 액체비료와 농업용 복합비



**Fig. 1.** Temperature in Daejeon for operation period. Open square; maximum temperature, closed circle; average temperature, open triangle; minimum temperature.



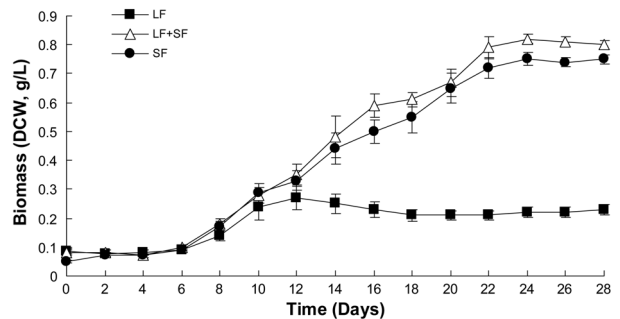
**Fig. 2.** quantity of solar radiation in Daejeon for operation period.

료를 사용하였다. 돈분 액체비료와 농업용 복합비료는 질소와 인이 풍부하여 미세조류에게 안정적인 영양원이 될 가능성이 있다. 액체비료를 이용한 미세조류 배양과 복합비료를 이용한 미세조류 배양에서 성장률을 비교함으로써, 바이오디젤 생산을 위한 미세조류 영양원으로 활용할 가능성을 확인해보았다.

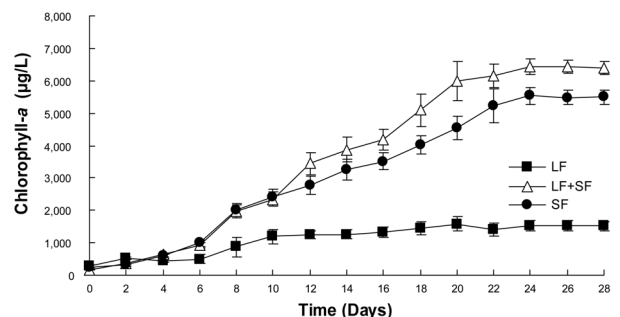
본 연구에 사용한 SSRP는 대전하수종말처리장에서 실험하였으며, 2014년 3월 22일부터 4월 19일까지 진행되었다. 실험기간 동안 대전광역시의 평균기온은 5.7°C-17.5°C였고, 최소기온은 0°C-13.7°C, 최고기온은 12.1°C-25.7°C였다(Fig. 1). 또한, 같은 기간의 평균 일조량은 3.76 MJ/m<sup>2</sup>-26.9 MJ/m<sup>2</sup>이었다(Fig. 2).

**영양원에 따른 미세조류 바이오매스 생산**

본 연구에서는 대전 하수종말처리장 방류수 내에서 검출된 혼합 토착 미세조류 CSS mixed culture를 선택하여 옥외배양에 이용하였으며, 운전기간중 CSS mixed culture의 종조성을 관찰한 결과 종의 천이가 일어나지 않고 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다(자료 미제시). 미세조류 배양을 위한 영양염류는 돈분 액체비료, 돈분 액체비료와 복합비료의 혼합액, 복합비료를 이용하였다. 미세조류 성장률을 측정하기 위하여 건조중량(DCW, Dry Cell Weight)과 엽록소-a를 28일간 측정하였다(Figs. 3 and 4). 배양 종료 시점의 건조중량은 액체비료 실험구, 혼합 실험구, 복합비료 실험구에서 각각 0.23 ± 0.18 g/L, 0.8 ± 0.02 g/L, 0.75 ± 0.02 g/L로 확인되었으며 이중 혼합 실험구가 가장 높았다. 그리고 엽록소-a도 액체비료 실험구, 혼합 실험구, 복합비료 실험구에서 각각 1516 ± 150 μg/L, 6389 ± 200 μg/L, 5497 ± 200 μg/L



**Fig. 3.** Dry cell weight. Closed square; liquid fertilizer, open triangle; liquid and solid fertilizer mixture, closed circle; solid fertilizer.



**Fig. 4.** Chlorophyll-a. Closed square; liquid fertilizer, open triangle; liquid and solid fertilizer mixture, closed circle; solid fertilizer.

으로 혼합 실험구에서 가장 높은 결과를 보여주었다. 돈분 액체비료로 실험구에서의 바이오매스 생산이 가장 낮게 나타났는데, 이는 돈분 액체비료가 특유의 색도와 탁도를 가지고 있어서 미세조류가 광합성 하는데 방해되기 때문으로 추정된다. 이는 돈분 액체비료를 5%와 3%로 희석한 배양액에서는 영양물질이 더 풍부함에도 미세조류의 생장이 거의 일어나지 않았기 때문이다(자료 미제시). 엽록소-a는 식물과 조류가 광합성을 하는데 필수적인 물질로, 엽록소-a의 양을 측정함으로써 광합성을 활성도와 바이오매스량을 간접적으로 확인하는 데 유용한 척도로서, 엽록소-a의 양이 높을수록 광합성 중인 세포 수가 많다는 것을 의미한다(Gitelson, 1992). 이 결과를 통해 액체비료만으로 미세조류를 배양했을 때보다 복합비료로 미세조류를 배양할 때, 바이오매스 생산성이 더욱 증가한다는 사실을 확인하였다. 복합비료에 액체비료를 소량 투입했을 때 액체비료 내의 여러 무기물질 성분이 미세조류 생장에 도움을 주는 것으로 추측된다.

토착 혼합 미세조류 CSS mixed culture의 군집을 확인해보면, 주로 *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus obliquus*가 우점하고 있는 것으로 확인되었다(Kang et al., 2012, 2013). *C. vulgaris*는 다른 *Chlorella* 종보다 성장속도가 빠르고 고농도의 이산화탄소에 대한 내성이 강하며, 이산화탄소 저감능력이 우수한 것으로 알려져 있다(Jeong et al., 2003). 그리고 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*는 유기성 폐수 내의 고농도 암모니아에 대한 내성이 우수하며, 폐수 내의 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 인 등을 높은 효율로 제거한다고 보고되었다(González et al., 1997). 또한, *S. obliquus*는 산업폐수 내의 아연, 카드뮴과 같은 중금속을 제거하는 데에도 이용될 가능성이 있다(Cain et al., 1980). 게다가 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*는 성장속도가 빠르고 지질함량이 높아서 바이오디젤 생산 연구에 이용되고 있는 종들이기도 하다(Scragg et al., 2003; Mandal and Mallick, 2009). 본 연구에 사용된 CSS mixed culture는 단일 종에 비해 높은 생장률을 보인다(Choi et al., 2014). 그리고 CSS는 외부의 환경변화에 대한 적응력이 우수하여 옥외배양시스템에 배양하기 적합하다(Choi et al., 2014). 자연환경 내에서 미생물들이 단일 종으로 존재하는 경우는 극히 드물며, 주변 환경에 적응하는 다른 미생물과 상호작용하며 미생물 군집을 이루며 살아간다. 이때 혼합된 미생물의 바이오매스 생산량과 군집의 안정성이 높게 유지된다고 보고되고 있으며, 이러한 현상을 “transgressive overyielding”이라고 한다(Weis et al., 2008). 또한, 혼합 미세조류 군집 속에서 공존하는 박테리아는 미세조류의 응집(flocculation)을 유도하여 미세조류 수확효율을 높일 가능성이 있다(Lee et al., 2013).

**미세조류 바이오매스 내의 지질함량과 FAME**

실험 종료 시점에 각 시료를 채취하여 미세조류 내의 지질함량을 측정된 결과 돈분 액체비료 실험구 20.1%, 혼합 실험구 20.3%, 복합비료 실험구 21.1%로 확인되었다. 각 실험구의 지질함량은 거의 비슷한 수준으로 영양원의 차이가 지질함량에 큰 영향은 주지 않는 것으로 확인되었다. 일반적으로 미세조류는 질소가 고갈된 상태나 높은 염도의 환경 등의 스트레스 상태에서 세포 내 지질축적을 증가시키는 것으로 알려졌다(Takagi et

al., 2006; Li et al., 2008; Mandal and Mallick, 2009). 그러므로 미세조류를 배양하여 바이오매스량을 충분히 증가시킨 후에 질소가 고갈된 환경이나 높은 염도 환경에서 일정 시간 유지해 주면 미세조류 지질함량을 더욱 높일 수 있다고 추측된다. 바이오디젤 생산을 위한 미세조류를 선발할 때 지질함량이 높은 종을 선택한다면 바이오디젤 생산에 더 유리할 것이다(Choi et al., 2014). 미세조류는 종에 따라 지질함량이 다르며, 일반적으로는 건조중량 당 지질함량이 20~50% 수준인 것으로 알려졌다(Chisti, 2007). 건조중량 당 지질함량이 50% 이상으로 알려진 종들도 보고되고 있지만, 단순히 지질함량이 높다고 해서 바이오디젤 생산에 유리한 것은 아니다(Choi et al., 2014). *Botryococcus braunii*는 건조중량 당 지질함량이 70% 이상으로 지질량이 매우 높지만, 성장속도가 매우 느려서 바이오디젤 생산효율은 높지 않은 것으로 알려졌다(Mandal and Mallick, 2009). 바이오디젤의 효율적인 생산을 위해서는 지질함량이 높은 균주를 선별하는 것도 중요하지만, 지질 생산성이 높은 균주를 선발하는 것이 매우 중요하다. 그리고 지질성분 중에서 지방산(Fatty acid)은 바이오디젤로 변환될 수 있는 성분으로 실험 종료 시점의 시료를 채취하여 지방산을 FAME으로 전환하여 지방산 조성을 분석하였다(Kumar Tiwari et al., 2007)(Fig. 5). 미세조류의 지방산 조성을 분석해본 결과, 주로 Palmitate (C<sub>16:0</sub>), Linoleate (C<sub>18:2</sub>), 그리고 Linolenate (C<sub>18:3</sub>)으로 구성된 것을 확인하였다. Palmitate (C<sub>16:0</sub>), stearate (C<sub>18:0</sub>), oleate (C<sub>18:1</sub>), linoleate (C<sub>18:2</sub>), linolenate (C<sub>18:3</sub>) 등 지방산은 바이오디젤 변환하는데 핵심적인 지질성분으로, 이러한 지방산이 많이 함유된 지질은 바이오디젤 생산에 유리하다(Canakci and van Gerpen, 2001; He et al., 2007; Halim et al., 2011). 일반적으로 *Chlorella* spp.의 지방산 조성은 C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:3</sub>이 많고, *Scenedesmus obliquus*의 지방산 조성은 C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:2</sub>가 대부분을 차지하는 것으로 알려졌다(Knothe, 2011). 그리고 영양원의 종류에 따른 지방산 조성에는 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

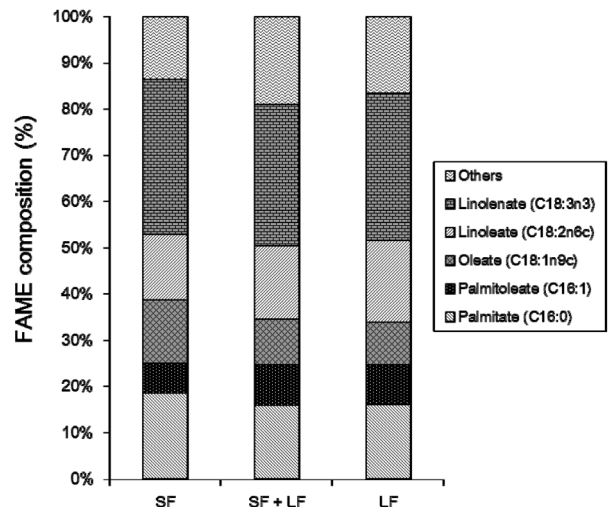


Fig. 5. FAME contents. Fatty acid percentages of total fatty acid.

미세조류 배양액의 수질분석

미세조류는 성장하면서 C, H, O 등의 원소뿐만 아니라 N과 P도 이용하기 때문에 배양액 내 N과 P의 감소량을 확인하여 미세조류의 성장률을 간접적으로 확인해볼 수 있다. 미생물들의 질소와 인 소비량을 실험 시작일부터 종료일까지 이를 간격으로 측정하였다(Fig. 6). 혼합 실험구의 total nitrogen은 120 ppm 수준에서 22일 만에 10 ppm 수준으로 감소하였고, 복합비료 실험구도 혼합비료 실험구와 유사한 경향을 나타내었다. 복합비료 실험구의 total nitrogen도 120 ppm 수준에서 22일 만에 10 ppm 수준으로 감소하였다. 그러나 돈분 액체비료 실험구의 total nitrogen은 40 ppm에서 16일 만에 10 ppm 수준으로 하락하였다. 한편 혼합 실험구의 total phosphorus는 10 ppm 수준에서 28일 만에 0 ppm 수준으로 감소하였다. 복합비료 실험구의 total phosphorus도 10 ppm 수준에서 28일 만에 0 ppm 수준으로 감소하였다. 돈분 액체비료 실험구의 total phosphorus는 실험 초기부터 거의 검출되지 않아 액체비료 성분 내 인 성분은 거의 없는 것으로 확인하였다. 이는 미세조류를 배양하는 데 불리한 요소로 작용할 수 있다.

질소원의 종류에는 질산염( $\text{NO}_3^-$ ), 아질산염( $\text{NO}_2^-$ ), 질산( $\text{HNO}_3$ ), 암모늄( $\text{NH}_4^+$ ), 암모니아( $\text{NH}_3$ ), 질소 가스( $\text{N}_2$ ) 등이 있다. 그중에서 암모늄이나 암모니아 같은 암모니아성 질소( $\text{NH}_3\text{-N}$ )와 질산염, 아질산염, 질산 등의 질산성 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )는 미생물들이 이용하기 유리한 형태의 질소라고 알려졌다(Choi *et al.*, 2014). 특히 암모니아성 질소는 질산성 질소보다 용이한 형태이며 미생물에게는 가장 중요한 질소원이라고 할 수 있다. 따라서 미생물은 암모니아성 질소를 먼저 이용한 후 질산성 질소를 이용하게 되는데, 이는 암모니아가 질산환원효소(nitrate

reductase)의 합성을 억제하기 때문으로 알려져 있다(Syrett and Morris, 1963). 돈분 액체비료는 대부분 암모니아성 질소로 구성되어있으며, 농업용 복합비료는 대부분 질산성 질소로 구성되어 있다. 따라서 돈분 액체비료가 농업용 복합비료보다 미세조류 성장에 더 유리하다고 판단할 수 있다. 그러나 암모니아는 고농도에서 오히려 미생물에 독성으로 작용하기 때문에 사용 가능 농도에 한계가 있다(Choi *et al.*, 2014). 그리고 돈분 액체비료는 특유의 색도와 탁도 때문에 광 투과성을 저해하기 때문에 고농도로 사용하기 어렵다. 그러나 농업용 복합비료는 색도와 탁도가 거의 없어 광 투과성이 우수하고 고농도로 투입할 수 있기 때문에 사용 가능 농도 범위가 돈분 액체비료보다 더 넓은 장점이 있다. 또한, 돈분 액체비료는 질소와 인의 비율이 매일 다르게 생산되고 질소와 인의 비율 조절이 어렵지만, 복합비료는 원료의 배합비율을 조정하여 질소와 인의 비율을 조절하기 쉽다는 장점도 있다.

본 연구에서는 돈분 액체비료나 농업용 복합비료를 이용했을 때의 미세조류 생산성을 비교하여 효율적인 미세조류 기반 바이오디젤 생산 가능성을 탐색하였다. 돈분 액체비료와 복합비료를 혼합하여 사용할 경우 돈분 액체비료와 복합비료를 사용했을 때보다 바이오매스 생산성이 더 우수한 것으로 확인되었다. 이는 돈분 액체비료 내의 여러 가지 미량물질이 미세조류가 성장하는데 필요한 trace element로 작용하기 때문으로 판단된다. 그러나 각 실험구 별 지질 함량과 지방산 조성에는 큰 차이가 없었다. 미세조류에게 공급하는 영양물질의 차이가 지질 생산과 지방산 생산과정에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 그리고 배양액의 총질소와 총인을 측정하여 미세조류가 배양되는 동안 질소와 인을 소비하는 것을 확인하였다. 돈분 액체비료에는 인 성분이 거의 없는 것으로 나타나서, 질소와 인의 양을 조절할 수 있는 복합비료가 돈분 액체비료보다 미세조류 배양에 더 유리한 것으로 판단된다. 바이오디젤을 생산하기 위한 미세조류 배양에 농업용 복합비료를 이용한다면 미세조류에 안정적으로 영양물질을 공급할 수 있고, 공급되는 영양물질의 양을 쉽게 조절할 수 있다. 또한, 복합비료를 이용한 옥외배양시스템은 기존의 폐수이용 미세조류 배양법의 단점을 해결할 수 있어서 더 효율적인 미세조류 대량배양시스템에 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

적요

최근 지구온난화문제와 화석연료 자원의 부족문제로 인해 지속적이고 친환경적인 미세조류 기반 바이오디젤이 주목받고 있다. 본 연구에서는 돈분 액체비료와 농업용 복합비료가 바이오디젤 생산을 위한 미세조류 영양원으로 활용될 가능성을 확인해 보았다. 혼합 미세조류 CSS (*Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Stigeoclonium* spp.) 배양을 위한 영양원은 돈분 액체비료, 돈분 액체비료와 농업용 복합비료의 혼합, 농업용 복합비료이며, 28일간 Small Scale Raceway Pond (SSRP)에서 옥외배양하였다. 그 결과 혼합 실험구의 바이오매스와 지질 생산성은 각각 0.8g/L, 5.8 mg/L/day로 가장 우수한 바이오매스량과 지질 생산성을 보여주었다. 이 연구를 통해 농업용 복합비료와 돈분 액체

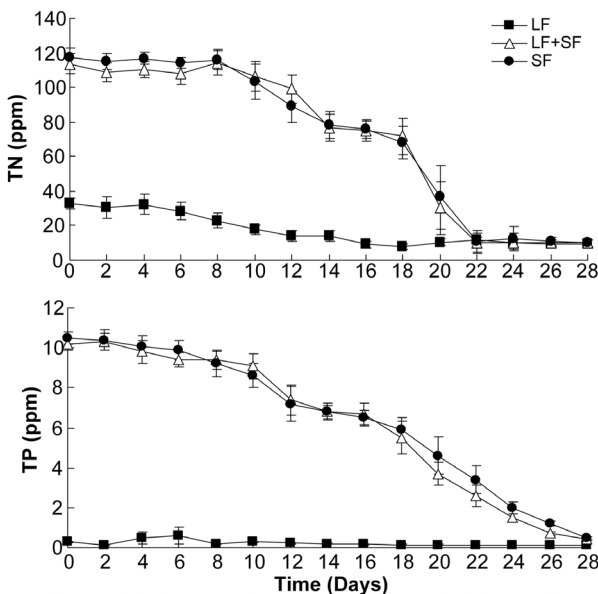


Fig. 6. Total nitrogen (upper one) and total phosphorous (lower one) of culture medium. Closed square; liquid fertilizer experimental group, open triangle; liquid and solid fertilizer mixture experimental group, closed circle; solid fertilizer experimental group.

비료의 혼합액이 미세조류에 안정적인 영양 공급을 하는 영양원으로 활용될 가능성을 확인하였다. 또한, 미세조류 배양단가와 바이오디젤 생산단가를 낮출 가능성도 탐구하였다.

### 감사의 말

본 연구는 미래창조과학부 글로벌프런티어사업 차세대 바이오매스 연구단(www.biomass.re.kr) (ABC-2011-0031351), 2012년도 산업통상자원부의 재원으로 한국에너지기술평가원(KETEP) (No.2012T100201665)과 한국생명공학연구원(www.kribb.re.kr)의 기관고유사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

### References

- Aaronson, S. and Dubinsky, Z. 1982. Mass production of microalgae, pp. 42–46. In Mislin, H. and Bachofen, R. (eds.), *New trends in research and utilization of solar energy through biological systems*, Birkhäuser Basel.
- APHA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.
- Cain, J., Paschal, D., and Hayden, C. 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 9–16.
- Canakci, M. and van Gerpen, J. 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions ASAE* **44**, 1429–1436.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294–306.
- Choi, J.E., Kim, B.H., Kang, Z., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2014. Biodiesel production and nutrients removal from piggery manure using microalgal small scale raceway pond (SSRP). *Korean J. Environ. Biol.* **32**, 26–34.
- Craggs, R.J., McAuley, P.J., and Smith, V.J. 1997. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Res.* **31**, 1701–1707.
- Garber, K. 2009. Top 5 issues at the copenhagen climate conference. *US News*.
- Gitelson, A. 1992. The peak near 700 nm on radiance spectra of algae and water: Relationships of its magnitude and position with chlorophyll concentration. *Int. J. Remote Sens.* **13**, 3367–3373.
- González, L.E., Cañizares, R.O., and Baena, S. 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.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., and Webley, P.A. 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **102**, 178–185.
- He, H., Wang, T., and Zhu, S. 2007. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel* **86**, 442–447.
- Jeong, M.L., Gillis, J.M., and Hwang, J.Y. 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 4.
- Kang, Z., Kim, B.H., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2013. Production of biodiesel and nutrient removal of municipal wastewater using a small scale raceway pond. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 207–214.
- Kang, Z., Kim, B.H., Shin, S.Y., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2012. Municipal wastewater treatment and microbial diversity analysis of microalgal mini raceway open pond. *Korean J. Microbiol.* **48**, 192–199.
- Knothe, G. 2011. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Roy. Soc. Chem.* **13**, 3048–3065.
- Kumar Tiwari, A., Kumar, A., and Raheman, H. 2007. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass Bioenerg.* **31**, 569–575.
- Lam, M.K. and Lee, K.T. 2012. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Appl. Energy* **94**, 303–308.
- Lee, E.K. 2012. Change of energy related legislation system in Korea and USA. *Korean Environ. Law Assoc.* **34**, 117–157.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., and Oh, H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* **101**, S75–S77.
- Lee, J., Cho, D.H., Ramanan, R., Kim, B.H., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2013. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **131**, 195–201.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., and Lan, C. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 629–636.
- Mandal, S. and Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 281–291.
- Oh, S.H., Han, J.G., Kim, N.Y., Cho, J.S., Yim, T.B., Lee, S.Y., and Lee, H.Y. 2009. Cell growth and lipid production from fed-batch cultivation of *Chlorella minutissima* according to culture conditions. *KSBB J.* **24**, 377–382.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., and Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* **102**, 17–25.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100–112.
- Scrugg, A.H., Morrison, J., and Shales, S.W. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 884–889.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z.J., Wu, Q., and Mao, E. 2009. Microalgae mass production methods. *Transactions ASABE* **52**, 1275–1287.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 87–96.
- Syrett, P.J. and Morris, I. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 566–575.
- Takagi, M., Karseno, and Yoshida, T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 223–226.
- Weis, J.J., Madrigal, D.S., and Cardinale, B.J. 2008. Effects of algal diversity on the production of biomass in homogeneous and heterogeneous nutrient environments: A microcosm experiment. *PLoS One* **3**, e2825.
- Wilkie, A.C. and Mulbry, W.W. 2002. Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresour. Technol.* **84**, 81–91.
- Xue, J., Grift, T.E., and Hansen, A.C. 2011. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. *Renewable Sustainable Energy Reviews* **15**, 1098–1116.
- Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., and Yang, J.W. 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 451–455.