

## 미세조류 옥외배양 시스템을 이용한 돈분 액체 비료의 영양염류 제거 및 바이오디젤 생산

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

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 환경바이오연구센터, <sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 청정화학 및 생물학과

### Biodiesel Production and Nutrients Removal from Piggery Manure Using Microalgal Small Scale Raceway Pond (SSRP)

Jong-Eun Choi<sup>1,2</sup>, Byung-Hyuk Kim<sup>1</sup>, Zion Kang<sup>1,2</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

**Abstract** - Due to the rapid energy consumption and fossil fuel abundance reduction, the world is progressively in need of alternative and renewable energy sources such as biodiesel. Biodiesel from microalgae offers high hopes to the scientific world for its potential as well as its non-competition with arable lands. Taking consideration to reduce the cost of production as well as to attain twin environmental goals of treatment and use of animal waste material the microalgal cultivation using piggery manure has been tested in this study. Unialgal strains such as *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, and an indigenous mixed microalgal culture CSS were cultured for 20 days in diluted piggery manure using Small Scale Raceway Pond (SSRP). Biomass production and lipid productivity of CSS were  $1.19 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$ ,  $12.44 \pm 0.38 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , respectively and almost twice that of unialgal strains. Also, total nitrogen and total phosphorus removal efficiencies of CSS was 93.6% and 98.5% respectively and 30% higher removal efficiency compared to the use of unialgal strains. These results indicate that the piggery manure can provide microalgae necessary nitrogen and phosphorus for growth thereby effectively treating the manure. In addition, overall cost of microalgal cultivation and subsequently biodiesel production would be significantly reduced.

**Key words** : microalgae, biodiesel, piggery manure, small scale raceway pond (SSRP)

## 서 론

20세기 들어 화석연료의 사용은 산업혁명과 운송수단의 급속한 발달을 가능케 하였다. 화석 연료는 제한된

공급과 수요의 증가에도 불구하고 여전히 전 세계에서 가장 값이 싼 연료이다. 그러나 화석연료는 제한된 매장 지역과 매장량으로 인하여 여러 차례 세계 경제 위기를 야기하는 등의 문제점이 지적되었다(Pittman *et al.* 2011). 또한, 수요가 공급을 뛰어넘기 시작한다면 필연적으로 화석연료의 가격이 폭등하게 되는 문제점을 여전히 가지고 있다. 그러므로 재생 가능하며 환경친화적일 뿐만

\* Corresponding author: Hee-Sik Kim, Tel. 042-860-4326,  
Fax. 042-879-8103, E-mail. hkim@kribb.re.kr

아니라, 경제성도 갖춘 신재생에너지의 개발이 필수적이다(Georgianna and Mayfield 2012). 신재생에너지 중 바이오디젤(biodiesel)은 식물성 또는 동물성 유지의 주요 성분인 triglyceride와 alcohol의 transesterification 반응을 통해 얻은 fatty acid methyl ester를 주성분으로 하는 물질로서, 다음과 같은 장점으로 많은 관심을 받고 있다(Demirbas 2008). 바이오디젤은 석유 기반 디젤에 비해 상대적으로 일산화탄소, UHCs(Unburned hydrocarbon), PM(particulate matter) 등과 같은 공해물질이 적으며 재생 가능하다(Gerpen 2005). 또한, 바이오디젤은 기존의 엔진을 거의 개조하지 않고 직접 사용할 수 있으며(Altin *et al.* 2001), 폐식용유 등의 폐자원도 활용할 수 있다(Felizardo *et al.* 2006; Phan and Phan 2008). 그리고 바이오디젤은 탄소 함유 연료이지만 연소 시 발생하는 CO<sub>2</sub>는 식물 또는 조류(algae)의 광합성 작용으로 다시 회수되므로 재생 가능하며 탄소 중립적(carbon neutral)이라는 장점을 갖고 있다(Sharma *et al.* 2008).

현재 콩, 옥수수 등과 같은 농작물 유래의 바이오매스를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Ma and Hanna 1999; Chisti 2007). 그러나 바이오연료 생산을 위한 바이오매스 획득은 농작물을 이용할 경우, 많은 재배면적이 요구되며 식량 공급과 경쟁하게 되어 세계 곡물 가격에 큰 영향을 미치는 문제점이 지적되고 있다(Chisti 2007; Pittman *et al.* 2011). 이에 반해, 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산은 단위면적당 높은 생산량을 가지며, 농작물과 경쟁하지 않아 세계 곡물 시장에 영향을 주지 않는다. 또한, 농작물에 비해 미세조류는 빠른 성장률과 높은 지질함량을 가진 것으로 보고되고 있어 농작물 유래 바이오디젤이 가지고 있는 한계점을 극복할 수 있을 것으로 기대하고 있다(Chisti 2007; Mandal and Mallick 2009; Pittman *et al.* 2011). 그리고 바이오디젤을 생산하고 남은 미세조류 부산물은 건강식품이나 가축 사료, 화장품 등의 원료 생산을 위해 이용될 수 있다(Spolaore *et al.* 2006).

미세조류를 배양하기 위해서는 CO<sub>2</sub>, 물 외에도 N, P와 같은 영양염류의 첨가가 반드시 필요하며, 이러한 영양염류의 비용은 직접적인 생산 비용의 증가로 이어진다. 따라서 미세조류의 생산 비용을 절감하기 위해 질소와 인 성분이 풍부한 산업·축산 폐수 및 도시 하수를 미세조류 배양에 이용하기도 한다(Kang *et al.* 2012; Cai *et al.* 2013; Kang *et al.* 2013). 가축분뇨는 질소, 인과 같은 비료 성분이 다량 함유되어 있어 퇴비 및 액체 비료로 이용 가능하다. 현재 우리나라 가축분뇨 발생량은 연간 46,534천톤이며, 이중 양돈 분뇨가 전체 38%인 17,843

천톤을 차지하고 있으며, 가축분뇨의 86.6% 정도인 40,286천톤이 퇴비 및 액체 비료로 재활용되어 이용되고 있다(MIFAFF 2010). 벼, 보리, 오이 등 다양한 농작물 생산에 이러한 축산 폐수의 재활용 및 적용 가능성에 대한 연구는 상당히 수행되어 왔다(Lee *et al.* 2011; Park *et al.* 2011). 그러나 분뇨 퇴비 및 액체 비료를 이용한 미세조류 생산으로의 적용 가능성에 관한 국내 연구는 매우 부족한 실정이며, 대부분이 실험실 규모에 국한되어 있다. 따라서 본 연구에서는 돈분 액체 비료의 야외 현장 적용 가능성을 탐색하고자 옥외 배양 시스템(Small Scale Raceway Pond)을 이용하였으며, 실제 액체 비료를 이용한 옥외 배양에서 우수한 성장을 가지는 미세조류를 선별하고자 하였다. 또한, 옥외 배양시스템을 통해 생산된 바이오매스 내의 지질함량 및 FAME 구성 성분을 확인하여 바이오디젤 전환 가능성을 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 미세조류 균주

도시 하수에서 성장하는 토착 미세조류를 분리하여 질소와 인의 제거가 우수하며 biomass 생산이 우수한 균주 *Chlorella* sp. JK2와 *Scenedesmus* sp. JK10를 옥외 배양시스템(SSRP)에 적용하였다. 또한, 대전 하수의 수질 정화능이 우수한 SSRP내의 혼합 토착 미세조류 CSS(mixed culture)를 실험에 이용하였다(Kang *et al.* 2012; Kang *et al.* 2013). *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10의 전배양은 BG11 배지를 이용하였으며, 배지 조성은 다음과 같다: NaNO<sub>3</sub> (17.6 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.22 mM), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.3 mM), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.2 mM), Citric Acid · H<sub>2</sub>O (0.03 mM), Ferric Ammonium Citrate (0.02 mM), Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O (0.002 mM), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.18 mM), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (46 µM), MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (9 µM), ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.77 µM), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (1.6 µM), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.3 µM), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.17 µM).

### 2. 옥외 배양 시스템과 돈분 액체 비료

돈분 액체 비료를 이용한 미세조류 배양을 위해 SSRP를 설치하였다. SSRP의 깊이는 약 30 cm, 용적 60L이며, 교반은 paddle wheel을 이용하여 유속 30 cm sec<sup>-1</sup>로 운전하였다(Kang *et al.* 2012; Kang *et al.* 2013). 폭기는 air pump와 diffuser를 이용하였으며(0.1 vvm), 1%의 CO<sub>2</sub>를

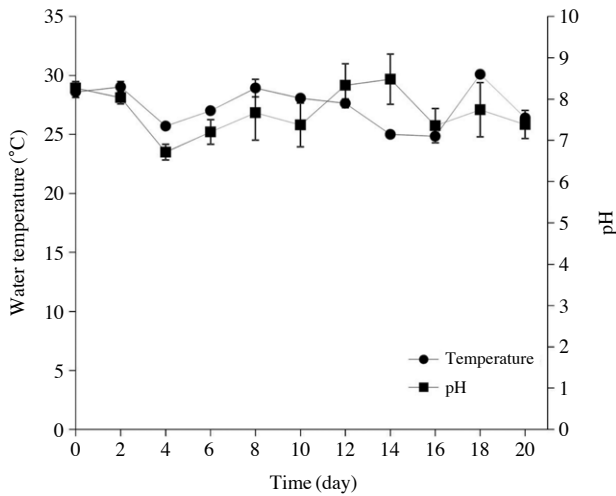


Fig. 1. Cultivation conditions in SSRP for operation period. Square; pH, circle; water temperature.

첨가하였다. 광원은 태양광을 이용하였으며, 자연적인 변화에 의한 light/dark cycle (L/D cycle)을 주었고, 회분식 (batch culture)으로 운전하였다. 본 연구에서 SSRP는 대전 하수종말처리장에서 실험하였으며, 2013년 7월 8일부터 28일까지 운전하였다. 운전기간 동안 SSRP 내의 수온은 평균  $27.3 \pm 1.75^\circ\text{C}$ 였으며, pH는 평균  $7.68 \pm 0.54$ 를 나타냈다 (Fig. 1). 또한, 외부 기온은 최대  $27.4 \sim 33.2^\circ\text{C}$ , 최소  $22.5 \sim 26.2^\circ\text{C}$ , 평균  $25.2 \sim 28.9^\circ\text{C}$ 였으며, 일조 시간은  $0 \sim 12.8$  hr 였다 (Fig. 2). 실험에 사용한 액체 비료는 경상남도 하동군 양보면 우복리에 위치한 하동축협 자연순환자원센터에서 얻은 호기성 소화 돈분을 대전 하수 방류수에 3%로 희석하여 이용하였다. 국내 하동농협 자연순환 농업센터에서는 농가에서 고액 분리 후 반입된 돈분뇨를 화학적 응집처리 없이 원심분리만을 이용하여 고형분과 노를 분리하고, 자체 생성된 미생물을 이용하여 액체 비료 및 퇴비를 생산하고 있으며, 현재 연간 30,000 ton ( $100 \text{ ton day}^{-1}$ )의 돈분뇨를 처리하여 돈분 액체 비료를 생산하고 있다. 액체 비료의 수질 성상은 TN 1,500 ppm, TP 135 ppm으로 확인되었다.

### 3. 미세조류 성장 측정

미세조류의 성장은 건조중량 및 chlorophyll-*a*로 측정하였다. 건조중량은 SSRP 배양액 10 mL을  $0.45 \mu\text{m}$  여과지에 거른 후  $105^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 건조하여 측정하였다. Chlorophyll-*a*는 90% 아세톤을 이용하는 수질오염 공정 시험법에 따라 측정하였다 (APHA 2005).

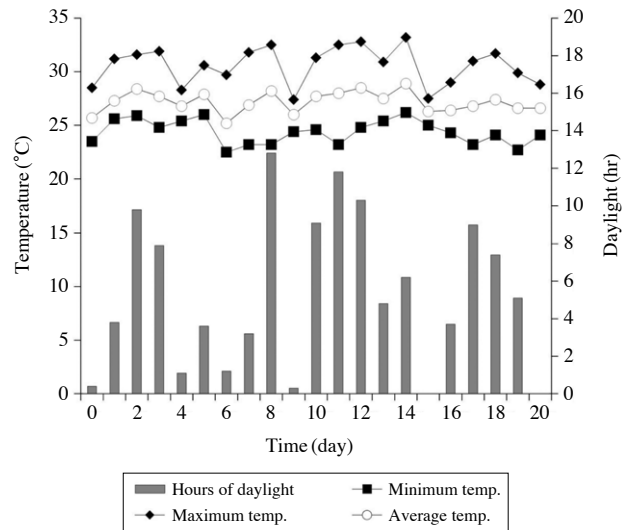


Fig. 2. Weather conditions in Daejeon for operation period. Bar; hours of daylight, closed square; minimum temperature, closed diamond; maximum temperature, open circle; average temperature.

### 4. 수질 분석방법

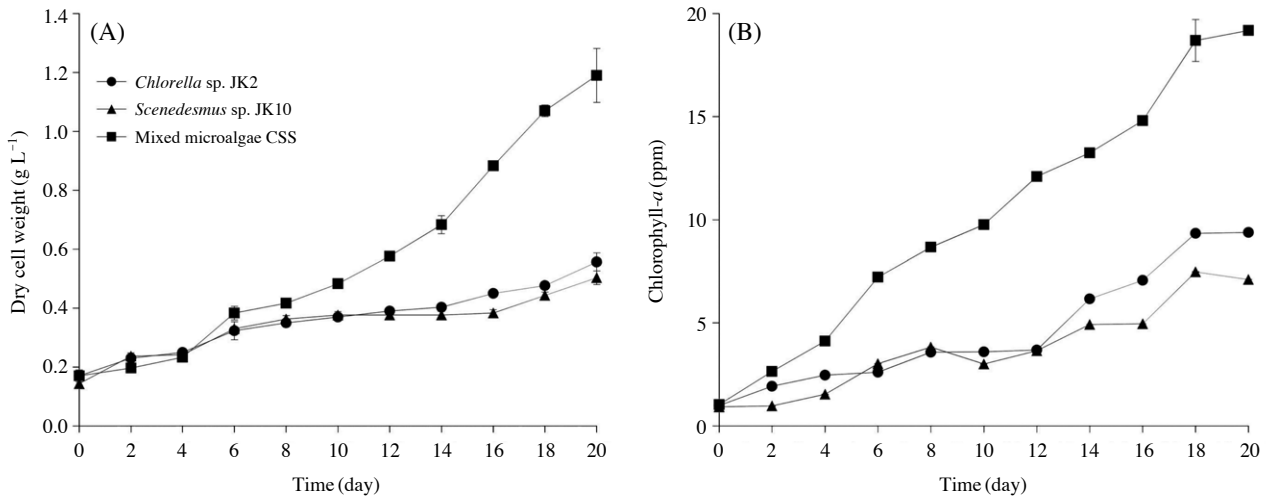
SSRP의 배양액을 2일마다 채취하여  $0.45 \mu\text{m}$  여과지로 여과한 후 잔류 TN과 TP를 측정하였다. TN과 TP는 Standard method를 이용하여 분석하였다 (APHA 2005).

### 5. 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 최종 Chloroform : methanol : water의 비율이 1 : 1 : 0.9가 되도록 조절하였다. 분리된 chloroform층을 건조시켜 지질함량을 측정하였다 (Bligh and Dyer 1959; Lee *et al.* 2010).

### 6. 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  $75^\circ\text{C}$ 에서 10분, 5% HCl과 methanol을 넣어  $75^\circ\text{C}$ 에서 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,



**Fig. 3.** Dry cell weight (A) and chlorophyll-*a* (B) according to the operating time of the SSRP using piggery manure. Square; mixed microalgae CSS, circle; *Chlorella* sp. JK2, triangle; *Scenedesmus* sp. JK10.

Japan)를 통하여 분석하였다(Lee *et al.* 2010). 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 min<sup>-1</sup>의 속도로 승온하여 250°C에서 12분 동안 유지하였고, 총 분석시간을 29분으로 설정하였다.

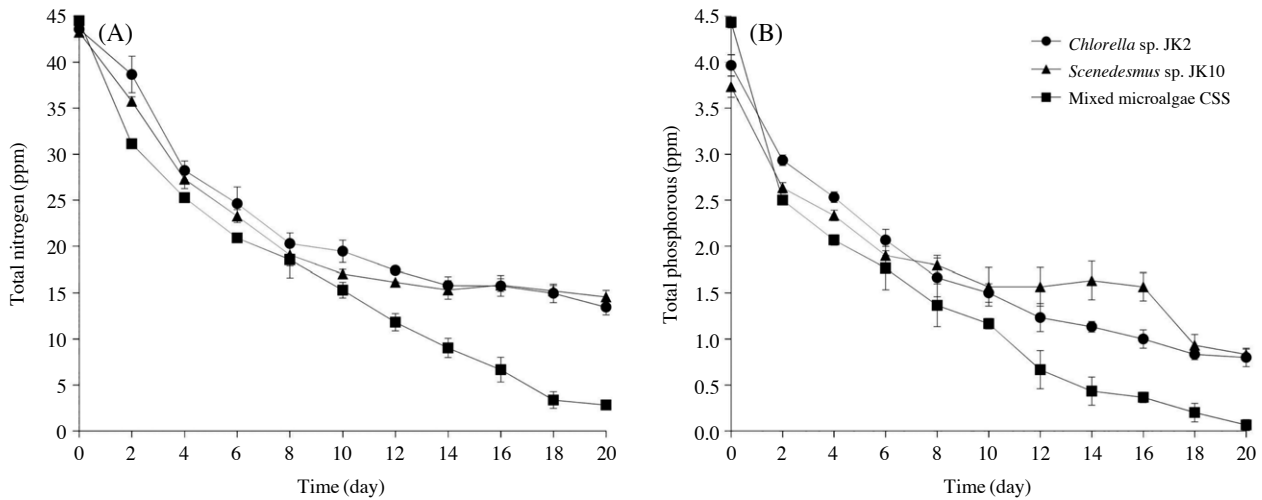
## 결과 및 토의

미세조류를 이용한 바이오디젤 생산 시 배양에 소요되는 비용은 전체 공정의 대부분을 차지한다. 따라서 합리적인 바이오디젤 생산을 위해서는 미세조류 배양 비용의 감소가 요구된다. BG11 배지를 이용하여 미세조류를 배양할 경우, 돈분 액비를 이용할 경우보다 약 12.5% 정도 높은 바이오매스 생산성을 갖는 것을 확인하였다 (lab-scale, 자료 미제시). 그러나 BG11과 같은 배지의 이용은 생산비용의 증가로 이어지기 때문에 실제 현장에서 이용하기에는 어려움이 따른다. 따라서 본 연구에서는 미세조류의 생산 비용을 낮추기 위한 방법으로, 돈분 액비를 이용함으로써 합리적인 바이오디젤 생산을 위한 현장 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

### 1. 미세조류 성장 특성 및 바이오매스 생산성

본 연구에서는 SSRP에서 3%로 희석된 돈분 액체 비료를 이용하여 단일 미세조류 *Chlorella* sp. JK2, *Scenede-*

*mus* sp. JK10와 혼합 토착 미세조류 CSS를 각각 배양하였다. 본 연구에 앞서 lab-scale 실험 결과, 도시 하수로부터 분리된 여러 미세조류를 돈분 액체 비료에서 배양하였으며, 그중 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10이 성장과 영양염류의 제거가 우수했던 것으로 확인되어 본 연구에 이용하였다(*Chlorella* sp. JK2의 질소와 인 제거율: 84.9%, 71.4%, *Scenedesmus* sp. JK10의 질소와 인 제거율: 88.9%, 70.6%) (자료 미제시). 또한, 대전 하수종말처리장에서 하수의 수질 정화능력이 우수했던 혼합 토착 미세조류 CSS (mixed culture)를 선택하여 옥외 배양에 이용하였다(Kang *et al.* 2012; Kang *et al.* 2013). 각각의 미세조류의 성장 특성을 확인하기 위해 건조 중량과 chlorophyll-*a*의 변화를 20일간 측정하였다. 배양 종료 시점인 운전 20일째의 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, 혼합 토착 미세조류 CSS의 건조중량은 각각 0.56 ± 0.03 g L<sup>-1</sup>, 0.50 ± 0.02 g L<sup>-1</sup>, 1.19 ± 0.09 g L<sup>-1</sup>로 CSS의 바이오매스량이 다른 두 균주에 비해 2배 이상 높았다 (Fig. 3A). 또한, chlorophyll-*a*는 CSS에서 19.18 ± 0.02 ppm으로 가장 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 3B). *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, CSS의 바이오매스량을 바이오매스 생산성은 각각 27.83 ± 1.57 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, 25.17 ± 1.15 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, 59.5 ± 4.58 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>로 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10에 비해 CSS의 바이오매스 생산성이 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 단일 미세조류를 인공적으로 배양하여 접종해 주었을 경우와 이미 환경에 잘 적응되어 있는 혼합 미세조류를 접종해 주었을 경우를 비교해 볼



**Fig. 4.** Total nitrogen (A) and total phosphorous (B) according to the operating time of the SSRP using piggery manure. Square; mixed microalgae CSS, circle; *Chlorella* sp. JK2, triangle; *Scenedesmus* sp. JK10.

때, 혼합 미세조류가 높은 바이오매스 생산성을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 자연 환경 내에서 미생물들은 독자적으로 존재하는 경우는 극히 드물며, 다른 미생물과 주변 환경과 상호관계를 이루는 미생물 커뮤니티를 형성한다. 혼합 미세조류는 단일 종의 미세조류보다 더 높은 바이오매스 생산량과 군집 안정성 (stability)을 갖고 있다고 보고되고 있으며, 이러한 현상을 “Overyielding” 이라고 부른다 (Weis *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010). 자연 환경에서 발생한 혼합 미세조류는 단일 종에 비해 더 높은 바이오매스 생산성과 지질 생산성을 갖고 있으며, 인공적으로 배양된 혼합 미세조류에서도 유사한 현상이 일어난다고 알려져 있다 (Smith *et al.* 2010; Stockenreiter *et al.* 2012). 즉, 환경적으로 잘 적응되어 있는 토착 미세조류 커뮤니티 CSS의 경우 단일 종에 비해 높은 성장을 보이며, 높은 지질 생산성을 갖는 것으로 보인다. 또한, 혼합 미세조류 군집 속에 공존하는 박테리아는 미세조류의 응집 (flocculation)을 유도하여 미세조류 수확을 용이하게 할 수 있는 가능성이 있다 (Lee *et al.* 2013).

토착 혼합 미세조류 CSS의 군집을 보면, 주로 *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus obliquus*가 우점하고 있다 (Kang *et al.* 2012; Kang *et al.* 2013). *C. vulgaris*는 녹조류로서 고농도 이산화탄소에 대한 내성이 높으며 (Yun *et al.* 1996), 다른 *Chlorella* 종보다 성장속도가 빠르고 이산화탄소 저장 능력이 높은 것으로 보고되었다 (Jeong *et al.* 2003). 그리고 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*는 유기성 폐수 내의 고농도 암모니아성 질소에 대한 내성이 우수하며, 폐수 내의 암모니아성, 질산성 질소, 인을 제거하는데 높은 효율

을 나타낸다고 알려져 있다 (González *et al.* 1997; Yun *et al.* 1997). 특히 *S. obliquus*는 산업 폐수 내의 아연, 카드뮴과 같은 중금속을 제거하는 데 이용될 수도 있다 (Cain *et al.* 1980; Omar 2002). 또한, *C. vulgaris*와 *S. obliquus*는 모두 빠른 성장 속도와 높은 지질 함량을 갖고 있어 바이오디젤 생산 연구에 이용되고 있다 (Scragg *et al.* 2003; Mandal and Mallick 2009).

## 2. 돈분 액체 비료의 영양염류 제거

SSRP에서 돈분 액체 비료를 3%로 희석하여 미세조류를 배양한 후, 배양액의 잔류 총 질소 (Total nitrogen, TN)와 총 인 (Total phosphorous, TP)의 변화를 20일 동안 관찰하였으며, 초기 희석된 돈분 액체 비료의 총 질소와 인의 농도는 평균 44.8 ppm과 4.04 ppm 이었다. 배양 종료 시점인 운전 20일째의 총 질소의 농도는 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, 혼합 토착 미세조류 CSS의 배양액에서 각각  $13.47 \pm 0.84$  ppm,  $14.57 \pm 0.72$  ppm,  $2.83 \pm 0.38$  ppm으로 나타났다 (Fig. 4A). 이 결과를 통해 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, CSS의 질소 제거율은 각각 69.1%, 66.3%, 93.6%로 혼합 토착 미세조류 CSS에서 높은 매우 질소 제거능을 보여주었다. 또한, 배양 종료 시점의 총 인의 농도는 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, CSS의 배양액에서 각각  $0.80 \pm 0.10$  ppm,  $0.83 \pm 0.06$  ppm,  $0.07 \pm 0.06$  ppm으로 나타났다 (Fig. 4B). *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, CSS의 인 제거율은 79.8, 77.7, 98.5%로 CSS에서 매우 높은

인 제거능을 보여주었다. 질소와 인은 모든 미생물이 성장하는 데 가장 중요한 영양소이다. ADP, ATP와 같은 에너지 운반 물질, RNA, DNA와 같은 유전 물질을 비롯하여 단백질, 지질 생성에 반드시 필요하다(Barsanti and Gualtieri 2005). SSRP 안에는 미세조류 외 다양한 종류의 박테리아들이 함께 공존하고 있다. 박테리아의 성장에는 질소와 인을 필요로 한다. 그러나 Fig. 3B와 Fig. 4를 통하여 각각의 미세조류의 chlorophyll-*a*의 양이 증가함에 따라 배양액 내의 총 질소와 총 인의 농도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 즉, 미세조류의 성장에 비례하여 영양염류가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이 결과를 통해 돈분 액체 내의 영양염류 제거는 박테리아의 영향보다 미세조류에 의한 기여가 더 크다고 판단할 수 있다.

유기 질소원의 종류에는 질산염( $\text{NO}_3^-$ ), 아질산염( $\text{NO}_2^-$ ), 질산( $\text{HNO}_3$ ), 암모늄( $\text{NH}_4^+$ ), 암모니아( $\text{NH}_3$ ), 질소 가스( $\text{N}_2$ )로 이루어져 있다. 이 중 암모늄이나 암모니아와 같은 암모니아성 질소( $\text{NH}_3\text{-N}$ )는 미생물이 체내합성으로 이용이 가능한 형태의 질소로 알려져 있기 때문에 가장 중요한 질소원이다. 미생물들이 성장하면서 암모니아성 질소의 농도가 먼저 감소한 뒤에 질산성 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )가 감소하게 되는데, 이는 질산환원효소(nitrate reductase)의 합성이 암모니아에 의해 후전자 단계에서 억제되기 때문인 것으로 알려져 있다(Morris and Syrett 1963; Syrett and Morris 1963; Smith and Thompson 1971; Guerrero *et al.* 1981). 돈분 액체 비료의 질소 성분은 대부분이 암모니아성 질소로 구성되어 있다. 따라서 미세조류가 이용하기에 가장 적합한 질소 형태를 갖고 있다. 그러나 고농도의 암모니아성 질소는 오히려 미세조류에 독성으로 작용하여 미세조류 성장을 방해한다고 알려져 있으며, 미세조류의 암모니아성 질소 내성은 종에 따라 약 25~1,000  $\text{mmol L}^{-1}$ 로 알려져 있다(Cai *et al.* 2013). 그러므로 돈분 액체 비료를 미세조류 배양에 이용하기 위해서는 반드시 희석해서 사용해야 하며, 본 연구에서도 돈분 액체 비료를 희석하여 고농도의 암모니아성 질소를 50 ppm 이하로 낮추어 수행하였다. 암모니아 내성이 높으면서 질소, 인 제거 효율이 높은 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*가 우점하고 있는 CSS에서 가장 좋은 질소, 인 제거율을 보였으며, 단일 미세조류 균주 이용에 비해서 약 30% 이상 높은 질소, 인의 제거능을 가진 것으로 확인되었다.

### 3. 바이오매스의 지질 함량 및 지방산 조성

SSRP 운전 20일 후 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp.

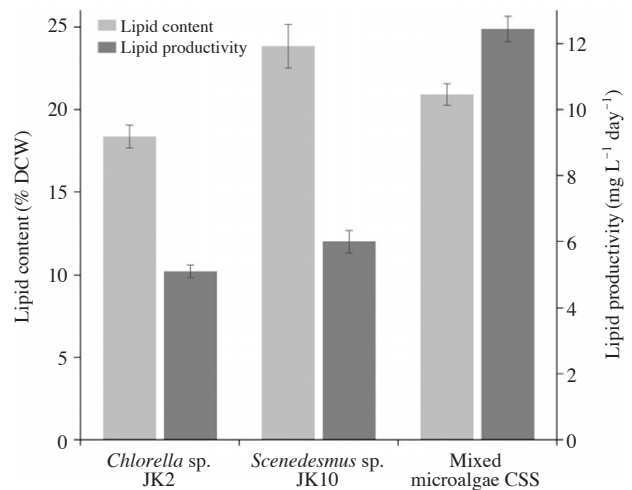


Fig. 5. Lipid contents and lipid productivity of microalgae obtained from SSRP after 20 days of cultivation

JK10, 혼합 토착 미세조류 CSS의 배양액으로부터 미세조류를 수확하여 미세조류 내의 지질 함량(lipid content)을 분석한 결과, 건조중량 대비 각각  $18.36 \pm 0.69\%$ ,  $23.84 \pm 1.32\%$ ,  $20.91 \pm 0.65\%$ 로 *Scenedesmus* sp. JK10에서 가장 높게 나타났다. 그러나 지질 생산성(lipid productivity)은 각각  $5.11 \pm 0.19 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ,  $6 \pm 0.33 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ,  $12.44 \pm 0.38 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 혼합 토착 미세조류 CSS의 지질 생산성이 단일 균주를 접종하였을 때보다 2배 이상 높았다(Fig. 5). 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산에서는 지질 함량이 높은 미세조류를 선택하는 것이 중요하다. 미세조류는 종에 따라 체내 지질 함량이 건조중량 당 보통 20~50%로 알려져 있으며, 그 중 특정 몇 종들은 체내 지질 함량을 건조 중량의 50% 이상 합성할 수 있다(Chisti 2007; Hu *et al.* 2008). 특정 환경에서 *C. vulgaris*의 경우 건조중량 대비 약 40%, *S. obliquus*의 경우 약 43%의 지질 함량을 가지는 것으로 보고되어 있다. 그러나 지질함량이 높다고 무조건 좋은 것은 아니다. *Botryococcus braunii*는 약 86%의 지질 함량을 갖고 있으나, 성장속도가 매우 느리기 때문에 바이오디젤 생산 효율이 좋지 않은 것으로 알려져 있다(Mandal and Mallick 2009). 따라서 바이오디젤 생산을 위한 미세조류는 지질 함량도 중요하지만 지질 생산성이 높은 균주를 선택하는 것이 바람직하다. 또한, SSRP 운전 20일 후 *Chlorella* sp. JK2, *Scenedesmus* sp. JK10, CSS의 배양액으로부터 미세조류를 수확하여 미세조류 내의 지질을 FAME로 전환하여 지방산 조성을 분석하였다(Fig. 6). 미세조류의 FAME는 주로 Linolenate ( $\text{C}_{18} : 3\text{n}3$ ), Linoleate ( $\text{C}_{18} : 2\text{n}6\text{c}$ ),



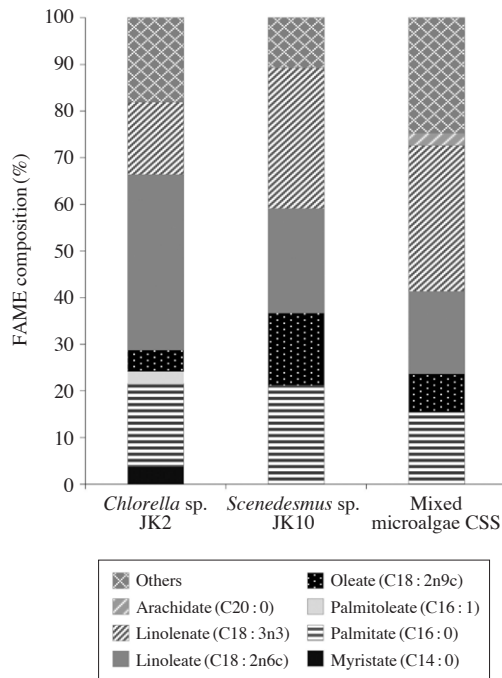


Fig. 6. FAME compositions of microalgae obtained from SSRP using the diluted piggery manure.

Oleate (C18:2n9c), 그리고 Palmitate (C16:0)로 이루어져 있음을 확인하였다. *Chlorella sp.* JK2, *Scenedesmus sp.* JK10, 혼합 토착 미세조류 CSS 간에 지방산 조성에는 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 돈분 액체 비료를 이용한 효율적인 미세조류 바이오매스 획득 가능성과 미세조류 바이오매스 디젤 생산 가능성 탐색하였다. 액체 비료를 이용하여 *Chlorella sp.* JK2, *Scenedesmus sp.* JK10, 혼합 토착 미세조류 CSS를 배양한 후 바이오매스 생산량을 확인한 결과, 혼합 토착 미세조류에서 가장 높은 바이오매스 생산성 ( $59.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )을 나타내었다. 획득한 미세조류 바이오매스의 지질을 분석함으로써 미세조류의 바이오디젤 전환 가능성을 확인한 결과, 단일 균주보다 자연 환경에 최적화된 혼합 토착 미세조류를 이용할 경우 더 높은 지질 생산성을 얻을 수 있었다. 또한, 액체 비료 내의 영양염류 농도 변화를 관찰한 결과, 단일 균주를 이용하였을 경우보다 혼합 토착 미세조류에서 높은 총 질소, 인 제거능을 확인하였다. 이를 통해 미세조류 바이오디젤의 생산을 위해 돈분 액체 비료의 이용은 바이오매스의 생산단가를 절감할 수 있을 뿐만 아니라, 돈분뇨의 수질 처리 측면에서도 좋은 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 돈분 액체 비료를 이용한 옥외 배양 시스템은 향후 scale-up 연구를 위한 토대를 제공하며, 경제적인

바이오매스 생산과 바이오디젤 생산 시스템으로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

에너지 소비의 증가와 화석 연료의 감소로 인해 바이오디젤과 같은 재생 가능한 대체 에너지 자원이 관심을 받고 있다. 미세조류를 이용한 바이오디젤은 기존의 농작물과 경쟁하지 않는 것과 더불어 많은 장점을 갖고 있다. 본 연구에서는 미세조류 배양의 생산 비용 절감과 축산 폐수 처리라는 두 가지 목표를 충족시키기 위해 돈분 액체 비료를 사용하였다. 옥외 배양 시스템 (Small Scale Raceway Pond; SSRP)과 희석된 돈분 액체 비료를 이용하여 단일 미세조류 *Chlorella sp.* JK2, *Scenedesmus sp.* JK10 과 혼합 토착 미세조류 CSS를 20일 동안 각각 배양하였다. 미세조류 혼합균주인 CSS의 바이오매스 생산과 지질 생산성은 각각  $1.19 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$ ,  $12.44 \pm 0.38 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 단일 종에 비해 2배 이상 높았다. 돈분 액체 비료의 TN, TP의 제거율 역시 혼합 토착 미세조류 CSS에서 93.6%, 98.5%로 단일 종의 이용에 비해 30% 이상 높은 제거 효율을 보여주었다. 이를 통해 돈분 액체 비료는 미세조류 배양에 필요한 N과 P를 제공하며, 미세조류를 이용한 SSRP를 통하여 영양염류를 제거할 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한 미세조류 배양을 위한 생산 비용의 감소로 경제성 있는 바이오디젤의 생산 가능성을 확인하였다.

## 사 사

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

## REFERENCES

- Altin R, S Çetinkaya and HS Yücesu. 2001. The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines. *Energy Conv. Manag.* 42:529-538.
- APHA. 2005. Standard methods for the examination of water

- and wastewater.
- Barsanti L and P Gualtieri. 2005. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Bligh EG and WJ Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37:911-917.
- Cai T, SY Park and Y Li. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 19:360-369.
- Cain J, D Paschal and C 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.
- Demirbas A. 2008. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conv. Manag.* 49:125-130.
- Felizardo P, MJ Neiva Correia, I Raposo, JF Mendes, R Berke-meier and JM Bordado. 2006. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage.* 26:487-494.
- Georgianna DR and SP Mayfield. 2012. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488:329-335.
- Gerpen JV. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.* 86:1097-1107.
- González LE, RO Cañizares and S Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agro-industrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol.* 60:259-262.
- Guerrero MG, JM Vega and M Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:169-204.
- Hu Q, M Sommerfeld, E Jarvis, M Ghirardi, M Posewitz, M Seibert and A Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54:621-639.
- Jeong ML, JM Gillis and J-Y Hwang. 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24:1763-1766.
- Kang Z, B-H Kim, H-M Oh and H-S Kim. 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, B-H Kim, S-Y Shin, H-M Oh and H-S Kim. 2012. Municipal Wastewater Treatment and Microbial Diversity Analysis of Microalgal Mini Raceway Open Pond. *Kor. J. Microbiol.* 48:192-199.
- Lee J, D-H Cho, R Ramanan, B-H Kim, H-M Oh and H-S Kim. 2013. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 131:195-201.
- 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.
- Lee S-B, K-M Cho, N-H Baik, J-J Lee, Y-J Oh, T-I Park and K-J Kim. 2011. Effects of application method of pig compost and liquid pig manure on yield of whole crop barley (*Hordeum vulgare* L.) and chemical properties of soil in Gyehwa reclaimed land. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44:353-360.
- Ma F and MA Hanna. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* 70:1-15.
- Mandal S and N Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:281-291.
- MIFAFF. 2010. Discharges amounts of livestock manure and resource recycling. Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries. Seoul. Korea.
- Morris I and PJ Syrett. 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Archiv. Mikrobiol.* 47:32-41.
- Omar HH. 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50:95-100.
- Park JM, TJ Lim, SE Lee and IB Lee. 2011. Effect of Pig Slurry Fertigation on Soil Chemical Properties and Growth and Development of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44:194-199.
- Phan AN and TM Phan. 2008. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel* 87:3490-3496.
- Pittman JK, AP Dean and O Osundeko. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* 102:17-25.
- Scragg AH, J Morrison and SW Shales. 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb. Technol.* 33:884-889.
- Sharma YC, B Singh and SN Upadhyay. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* 87:2355-2373.
- Smith F and JF Thompson. 1971. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 48:224.
- Smith VH, BSM Sturm, FJ deNoyelles and SA Billings. 2010. The ecology of algal biodiesel production. *Trends Ecol. Evol.* 25:301-309.
- Spolaore P, C Joannis-Cassan, E Duran and A Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101:87-96.



- Stockenreiter M, A-K Graber, F Haupt and H Stibor. 2012. The effect of species diversity on lipid production by microalgal communities. *J. Appl. Phycol.* 24:45-54.
- Syrett PJ and I Morris. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 67:566-575.
- Weis JJ, DS Madrigal and BJ Cardinale. 2008. Effects of algal diversity on the production of biomass in homogeneous and heterogeneous nutrient environments: a microcosm experiment. *PLoS one* 3:e2825.
- Yun Y-S, J 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. *Biotechnol. Tech.* 10:713-716.
- Yun YS, SB Lee, JM Park, CI Lee and JW Yang. 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:451-455.

Received: 1 November 2013

Revised: 21 December 2013

Revision accepted: 24 December 2013