

Effects of acetate in food waste leachate on cell growth and nitrogen, phosphorus consumption by *Chlorella vulgaris*

음폐수 소화액에 포함된 acetate가 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 질소, 인 제거에 미치는 영향

Shan Zhang · Kyoung Jin Choi · SeokMin Lee · Sung-Jin Joo · Thi-Hiep Han · Sun-Jin Hwang*

장산 · 최경진 · 이석민 · 주성진 · 한티협 · 황선진*

Department of Environmental Engineering, Center for Environmental Studies, Kyung Hee University
경희대학교 환경공학과 환경연구센터

Abstract : VFAs like acetate are the major soluble metabolites of food waste leachates after digested. Therefore this study investigates the effect of acetate on growth rate and nutrient removal efficiency of *Chlorella vulgaris* to treat digested food waste leachates. The initial acetate concentration varied from 0 to 20 mM. As a result, *Chlorella vulgaris* growth rate was increased as high as the concentrations ranged from 0 to 20 mM. The same trend was observed with $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ consumption. The highest growth rate and the highest $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ removal rate were observed at acetate concentration of 20 mM. The microalgae growth rate and $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ removal rates were 1.5, 1.8, 2.3 times higher than the condition without acetate.

Key words : *Chlorella vulgaris*, food waste leachate, acetate, nitrogen, phosphorus

주제어 : 클로렐라 볼가리스, 음폐수, 아세테이트, 질소, 인

1. 서론

우리나라 음식물 폐기물 발생량은 2011년 현재 13,537 톤/일(연간 500만 톤)이 발생되고 있으며, 전체 생활 폐기물 발생량의 약 25%를 차지하고 있다. 현재 음식물 폐기물은 유기성 자원으로 퇴비화 및 사료화 등 재활용을 적극 추진하고 있다. 음식물류 폐기물을 재활용하는 과정에서 음폐수는 필연적으로 발생하고 2011년에는 9,590 톤/일로 음식물 폐기물 처리량의 73%를 차지하고 있다. 음폐수의 처리는 66% 이상 “해양배출”에 의존하여 왔다. 그러나, 런던협약 및 '96 의정서에 가입함으로써 2013년부터 해양배출이 금지

되었기 때문에 음폐수의 육상 청정처리 기술개발이 시급하다(Environment, 2012). 음폐수는 고농도의 유기물을 포함하므로 혐기성 소화공정을 통한 바이오가스의 에너지화를 중점적으로 추진하고 있으며(Environment, 2007), 음폐수 소화 후 배출되는 소화폐액은 고농도의 질소와 유기산을 함유하고 있어 공공수역 방류를 위해서는 적절하고 경제적인 처리기술의 적용이 필요하다.

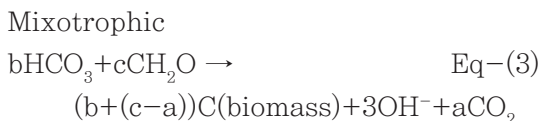
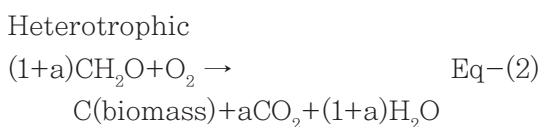
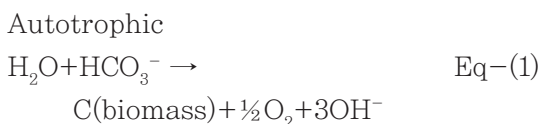
미세조류를 이용한 하폐수, 축산폐수 등의 처리에 대한 연구는 이러한 하폐수 및 축산폐수 중에 미세조류의 성장에 필요한 질소 및 인이 고농도로 포함되어 있어, 미세조류를 적용하면 효과적으로 고도처리할 수 있으며, 발생하는 잉여 미세조류는 바이오 연료, 사료 등 다양한 용도로 활용이 가능(Cai et al., 2013)하여, 최근 몇 년간 관련 연구가 많이 진행되고 있다(Lau et al., 1995;

* Received 12 August 2014, revised 07 October 2014, accepted 10 October 2014.

* Corresponding author: Tel : +82-31-201-2497 Fax : +82-31-203-4589 E-mail : sjhwang@khu.ac.kr

Ruiz-Martinez et al., 2012). 하지만, 미세조류를 이용하여 음폐수 소화폐액을 처리하는 연구는 거의 전무하다고 할 수 있다.

미세조류는 Eq-(1)과 같이 무기탄소를 이용하는 autotrophic 대사가 일반적으로 많이 알려져 있으나, 종에 따라 유기물이 존재할 때 미세조류가 heterotrophic 기작에 의해 외부 유기탄소원을 이용하여 성장할 수 있다(Eq-(2)) (Perez-Garcia et al., 2011). Mixotrophic 미세조류는 Eq-(3)과 같이 유기탄소 및 무기탄소를 모두 흡수하여 성장할 수 있다. 또한, mixotrophic 대사는 외부환경(빛 및 탄소원)에 따라 autotrophic과 heterotrophic 대사를 동시에 수행할 수 있으며, 선택적으로 전환할 수 있다. Mixotrophic 미세조류는 autotrophic 미세조류 보다 광 저해는 적고 성장량이 더 많은 것으로 보고되었다(Vonshak et al., 2000). 또한, mixotrophic 미세조류는 광도가 약한 조건에서도 높은 미세조류의 성장율을 얻을 수 있다 (Bouarab et al., 2004). 따라서, mixotrophic 미세조류에 의한 폐수 처리효율이 autotrophic 보다 더 좋을 수 있다고 판단할 수 있다.



선행연구에 의하면 *Chlorella sp.*의 경우 glucose, acetate, glycerol 등과 같은 유기물을 mixotrophic에 의해 대사하여 성장한다는 보고가 있다(Perez-Garcia et al., 2011). 유기물을 포함한 음폐수는 혐기성 소화과정을 거쳐서 acetate와 같은 유기산이 다량으로 발생한다. 이때 acetate는 약 20 mM이 발생되며, 이

는 유기산 발생량의 약 25 ~ 40%를 차지한다.

이에, 본 연구에서는 환경분야 하폐수 고도처리의 주체로서 가장 일반적으로 검토되고 있는 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 음폐수 소화폐액을 고도처리 하는 경우, 소화폐액 중의 acetate가 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 질소, 인 제거에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 미세조류 및 배양방법

본 연구에 사용된 미세조류는 *Chlorella vulgaris*이고 KCTC(Korean collection for type culture)에서 분양을 받았다. 배지는 BG 11 medium을 이용하였으며 조성은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg/L, Na_2CO_3 20 mg/L, Citric acid 6 mg/L, Ferric ammonium citrate 6 mg/L, EDTA 1 mg/L, Trace 1 ml/L 이었다. 미세조류의 독립영양 대사에 필요한 무기탄소를 공급하기 위해 NaHCO_3 을 1 g-C/L 첨가해 주었고, 질소 및 인은 각각 NH_4Cl 100 mg-N/L 및 K_2HPO_4 15 mg-P/L를 주입해 주었다. 또한, acetate가 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 제거에 미치는 영향을 평가하기 위해 sodium acetate를 농도 별로 5, 10, 15, 20 mM 주입해 주었다.

본 연구에서는 2.5 L의 원통형 아크릴 반응조를 제작하여 실험하였으며 working volume은 2 L로 6일간 진행되었다. *Chlorella vulgaris*의 순조로운 생육을 위해 실험이 시작될 때 150 mg/L의 농도로 전배양한 *Chlorella vulgaris*를 식중해 주었으며, pH는 pH controller를 이용하여 7.0 ± 0.2 , 온도는 상온인 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. 광원은 White LED를 이용하여 $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광량으로 24시간 동안 지속적으로 조사해 주었다.

2.2 분석방법

*Chlorella vulgaris*의 성장량은 dry weight

를 측정하여 평가하였다. PO_4^{3-} 는 수질자동분석기 Auto Analyzer(AA3, BLTE Co., KO-REA), NH_4^+ 분석은 Water Analyzer(HS69 3100, Humas, Korea)를 이용하여 측정하였다. Chlorophyll-a는 standard method에 따라 분석하였다. 또한, acetate는 이온크로마토그래피(Metrohm, Basic 792, UK)를 이용하였으며, 컬럼은 유기산 컬럼(Metrosep), 이동상은 0.5 mmol/L perchlotic acid, suppressor는 10 mmol/L lithium chloride를 이용하였다.

*Chlorella vulgaris*의 성장특성을 파악하기 위해 비성장 속도를 계산하였으며, 비성장 속도 μ 는 Eq-(4)를 이용하여 계산하였다(Perez-Garcia et al., 2010).

$$\mu = \ln(X - X_0) / (t - t_0) \quad \text{Eq-(4)}$$

여기서, μ 는 비성장 속도이고, X 는 t 시간 후의 *Chlorella vulgaris*의 건조중량, X_0 는 t_0 시간 후의 *Chlorella vulgaris*의 건조중량이다. 계산된 최대 비성장 속도는 대수성장기의 비증식 속도값 중 가장 큰 값을 이용하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 초기 acetate 농도가 acetate의 소비 및 *Chlorella vulgaris*의 성장에 미치는 영향

Acetate 농도를 0 ~ 20 mM로 달리했을 때의 반응 후 잔여 acetate 농도 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 초기 acetate 농도가 5, 10, 20 mM인 경우는 각각 1.5, 2, 2.5일 만에 모두 소비되었고, 소비속도는 각각 3.3, 5.0, 8.0 mM/day로 산출되어 acetate 농도가 높을수록 소비속도도 증가하는 것으로 나타났다. Combres et al.(1994)의 연구에 의하면 acetate의 대사과정에서 필요한 효소인 이소시트르산 분해효소(isocitratelase)는 acetate의 농도가 증가할수록 활성이 증가하는 것으로 보고했다(Combres et al., 1994). 따라서, acetate의 농도가 증가할수록 이소시트르산 분해효소의 활성이 증

가하여 acetate의 소비속도가 증가하는 것으로 사료된다.

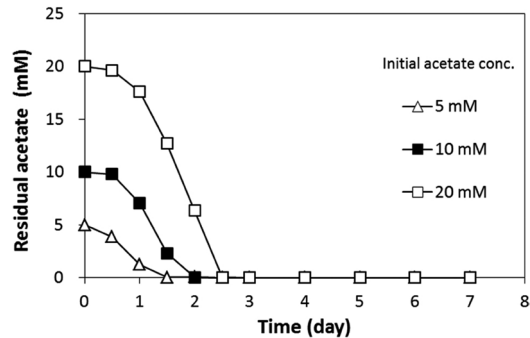


Fig. 1. Effects of initial acetate concentration on acetate consumption.

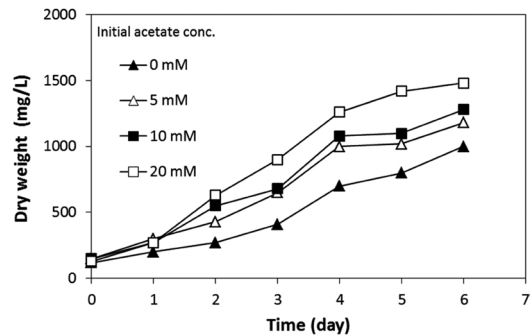


Fig. 2. Effects of acetate concentrations on dry weight of *Chlorella vulgaris*.

Acetate 농도에 따른 6일 간의 dry weight 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이, 모든 농도범위에서 6일째까지 지속적으로 성장을 지속하였고, acetate 농도가 높을수록 *Chlorella vulgaris*의 성장량이 증가하였다. Acetate 농도가 20 mM인 경우의 *Chlorella vulgaris* 성장량은 acetate가 없는 대조군 보다 약 1.5 배 dry weight가 증가하였다.

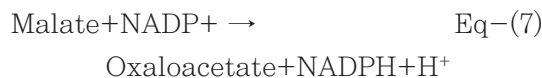
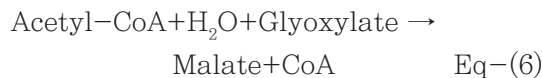
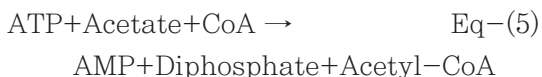
또한, Eq-(4)에 의해서 산출된 비성장속도는 각각 1.02, 1.39, 1.42, 1.69 day^{-1} 이었고, acetate 농도가 증가할수록 비성장속도가 증가하는 것으로 나타났다. Bouarab et al.(2004) 및 Combres et al.(1994)의 연구에서는 acetate 농도 0 ~ 20 mM의 범위에서 acetate 농도가

증가할수록 *Chlorella vulgaris*의 비성장속도가 증가하는 것으로 보고하여, 본 연구의 결과와 비슷하게 나타난 것을 알 수 있다(Bouarab et al., 2004; Combres et al., 1994).

이상의 결과들로부터 acetate 농도가 증가할수록 *Chlorella vulgaris*의 성장을 촉진한다고 말할 수 있는 것으로 나타났다. 하지만, acetate 농도가 너무 높을 때는 *Chlorella vulgaris*의 성장이 오히려 저해될 수 있다. Jeon et al.(2006)의 연구에 의하면 acetate의 농도가 30 mM 일 때 미세조류 성장량이 가장 많았지만, 30 mM 보다 높은 농도에서는 오히려 미세조류의 성장량이 감소하는 것으로 나타났다(Jeon et al., 2006).

미세조류가 acetate를 대사하는 과정은 다음과 같이 설명될 수 있다. Acetate가 먼저 proton transporter protein에 의해서 미세조류 세포 내부로 이송되면, 다음에 Coenzyme-A의 acetylation에 의해 ATP를 소비하면서 Acetyl-CoA가 생성된다(Eq-(5)). 이후 Acetate는 Acetyl-CoA의 형태로 다음의 두 과정을 거쳐 산화되는 대사과정을 거친다. 즉, Eq-(6)과 같이 Glyoxylate cycle을 거치면서 malate를 생성하고, 이후 생성된 malate가 다시 TCA(tricarboxylic acid) cycle을 통해서 미세조류의 성장에 필요한 carbon skeleton 및 에너지를 생성하는 Eq-(7)과 같은 과정으로 설명된다(Perez-Garcia et al., 2011).

또한, Boyle and Margan의 연구에 의하면 미세조류는 1 mole의 acetate를 소비하면 0.8 KJ의 에너지를 생성한다(Boyle and Morgan, 2009). 따라서, 본 연구에서 acetate 농도가 증가할수록 더 많은 양의 필요한 탄소 및 에너지를 미세조류 성장에 제공할 수 있어 성장량이 많았던 것으로 사료된다.



3.2 Acetate 농도가 N, P 제거에 미치는 영향

Acetate 농도에 따른 $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거 결과는 아래의 Fig. 3과 같다. 초기조건은 모든 경우 $\text{NH}_4\text{-N}$ 100 mg/L 였으며, acetate를 주입하지 않는 조건에서는 6일째까지도 $\text{NH}_4\text{-N}$ 가 완전히 제거되지 않고 약 15 mg/L가 잔류된 반면, acetate가 존재한 모든 경우에선 6일째 이전에 $\text{NH}_4\text{-N}$ 가 모두 제거되었으며, 특히, 20 mM인 경우 $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거속도가 가장 빨라 100 mg/L의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 가 4일만에 완전히 제거되었다.

Table 1에 acetate 농도에 따른 $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거속도에 대해 나타냈다. $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거속도는 acetate 농도 0, 5, 10, 20 mM에 비례하여 빠른 속도로 소비되어 각각 14.1, 16.6, 16.6, 25.0 mg/L의 제거속도를 보였다. 또한, acetate를 주입한 조건의 경우, acetate가 소비되는 구간에서의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거속도가 실험 종료시의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 제거속도에 비해 높은 것으로 나타났다. 이는 acetate로 인해 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 소비가 촉진되었기 때문으로 판단된다.

Acetate 농도에 따른 $\text{PO}_4\text{-P}$ 제거율에 대한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. Acetate를 주입하지 않은 control 조건에서는 $\text{PO}_4\text{-P}$ 가 6일째에 고갈되었으나, acetate를 주입한 모든 조건에서는 $\text{PO}_4\text{-P}$ 가 6일 이전에 모두 고갈되는 경향이 나타났다. 또한, 고농도의 acetate 조건일수록 $\text{PO}_4\text{-P}$ 가 빠르게 제거되는 등 전반적으로 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 결과와 유사한 결과를 보였다. $\text{PO}_4\text{-P}$ 제거속도를 나타낸 Table 1을 통해서도 acetate 농도가 높을수록 $\text{PO}_4\text{-P}$ 가 빠르게 제거됨을 알 수 있다.

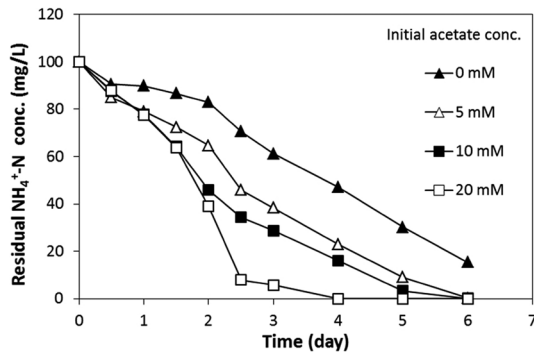


Fig. 3. Effects of acetate concentrations on NH₄-N consumption.

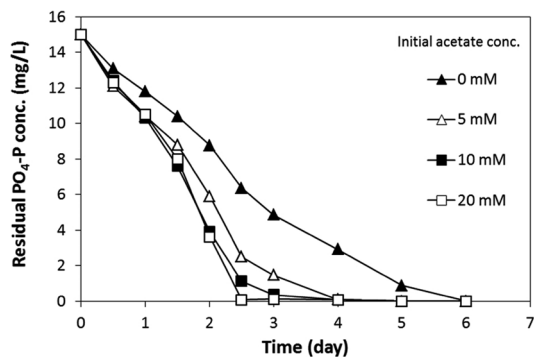


Fig. 4. Effects of acetate concentrations on PO₄-P consumption.

Table 1. Summary for NH₄-N and PO₄-P removal rate according to acetate conc.

Acetate concentration	NH ₄ -N removal rate (mg/L/day)		PO ₄ -P removal rate (mg/L/day)	
	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽²⁾
0 mM	-	14.1	-	2.5
5 mM	13.5	16.6	3.2	3.7
10 mM	23.1	16.6	4.9	3.7
20 mM	34.4	25.0	5.4	6.0

⁽¹⁾A : NH₄-N removal rate was calculated at the time when acetate was completely consumed.

⁽²⁾B : NH₄-N removal rate was calculated at 6 day operation.

질소와 인은 아미노산, 단백질, 핵산, DNA 합성 등 cellular process에 필수적인 영양물질이다. 질소와 인이 위의 물질들을 합성하기 위해서는 탄소 골격(carbon skeleton) 및 ATP를 필요로 한다(Kim, 2013). 이를 위해 본 연구의 경우에는 미세조류가 acetate를 대사하여 이에 필요한 탄소 및 ATP를 제공하였으므로 위와 같은 결과가 얻어졌다고 판단된다.

3.3 Acetate 농도가 chl-a의 생성에 미치는 영향

Acetate 농도가 chl-a의 생성에 미치는 영향은 Fig. 5와 같다. Acetate가 존재하는 조건에서 초기에 chl-a의 함량이 감소하다가 다시 증가하는 것으로 나타났다. Shigeji et al.(1965)의 연구에서도 이와 유사한 결과가 보고되었다. Aoki et al.에 의하면 acetate 등 유기물이 대사되는 과정에서 생성되는 중간 대사산물로 인해 미세조류에 표백작용(bleaching effect)이 나타난다고 하고 있으며, 이러한 표백작용은 미세조류의 증식에 의해 사라지는 것으로 보고하고 있는 바, Fig. 5의 결과는 이와 관련이 있을 것으로 사료된다(AOKI and HASE, 1964).

Chl-a의 함성은 2일째부터 모든 조건에서 급격히 증가하였으며, acetate가 존재하는 조건에서의 chl-a 함량이 acetate가 없는 조건에서 보다 높은 것으로 나타났다. 또한, 6일 동안 *Chlorella vulgaris*의 chl-a 함량은 acetate 농도 5 mM에서 다소 높고 10 mM 및 20 mM에서는 거의 유사하며 0 mM에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 따라서, Acetate는 기본적으로 chl-a의 생성을 촉진하지만, acetate 농도가 어느 수준 이상인 경우 chl-a의 생성을 오히려 부분적으로 저해할 수 있는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Richard et al.(1975)의 선행연구와 맥락을 같이 하고 있다(Ellis et al., 1975).

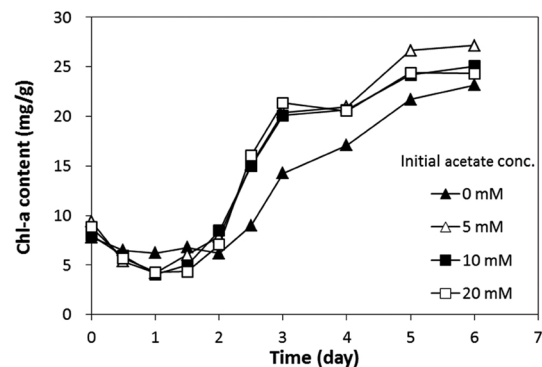


Fig. 5. Effects of acetate concentration on chl-a content.

4. 결론

본 연구에서는 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 음폐수 소화액 처리시 폐수의 주성분에 하나인 acetate가 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 N, P 제거능에 미치는 영향을 평가하였다.

Acetate 농도 0 ~ 20 mM의 조건에서 6일간 회분식으로 실험을 진행한 결과, 모든 조건에서 2.5일째까지 acetate가 모두 소비되었으며, acetate 농도가 증가할수록 소비속도도 증가하는 것으로 나타났다. 또한, Acetate 농도가 증가할수록 *Chlorella vulgaris*의 성장량 및 N, P 제거속도가 증가하여, acetate 20 mM 인 경우에 *Chlorella vulgaris*의 성장량 및 N, P 제거속도가 가장 높았고, acetate가 없는 대조군보다 각각 1.5, 1.8, 2.3배 높았다. 또한, 일정한 범위 내에서 acetate는 chl-a의 생성을 촉진하였다.

이상의 결과로부터, 음폐수 소화액 중의 주성분인 acetate는 미세조류의 성장에 필요한 유기탄소원으로 유효하며, 미세조류의 성장을 촉진하고 이러한 과정에서 질소와 인이 효율적으로 제거될 수 있어, 향후 음폐수 및 기타 하폐수 처리에 적용이 가능할 것으로 판단된다는 결론을 얻었다.

사사

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다. (No. 2013R1A2A2A03067619)

References

- AOKI, S., and HASE, E. (1964) De- and re-generation of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides* I. Syntheses of nucleic acids and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast, *Plant and Cell Physiology*, **5**, pp. 473-484.
- Bouarab, L., Dauta, A., and Loudiki, M. (2004) Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration, *Water research*, **38**, pp. 2706-2712.
- Boyle, N. R., and Morgan, J. A. (2009) Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *BMC systems biology*, **3**, pp. 4.
- Cai, T., Park, S. Y., and Li, Y. (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **19**, pp. 360-369.
- Combres, C., Laliberté, G., Reyssac, J. S., and Noué, J. (1994) Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Physiologia plantarum*, **91**, pp. 729-734.
- Ellis, R., Spooner, T., and Yakulis, R. (1975) Regulation of chlorophyll synthesis in the green alga *Golenkinia*, *Plant physiology*, **55**, pp. 791-795.
- Environment, M. o. (2007). A policy proposal for the stable inland treatment and energy recovery of wastewater discharged from food waste (2008~2012).
- Environment, M. o. (2012). A study on management policy and improvement measurements of food waste.
- Jeon, Y. C., Cho, C. W., and Yun, Y. S. (2006) Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*, *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, pp. 490-495.

- Kim, T. H. (2013). A development of next-generation advanced wastewater treatment system using microalgae and LED light source. PhD thesis, Kyung Hee University
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., and Wong, Y. S. (1995) Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater, *Environmental Pollution*, **89**, pp. 59-66.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., and Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products, *Water research*, **45**, pp. 11-36.
- Perez-Garcia, O., De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., and Bashan, Y. (2010) Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*, *Journal of phycology*, **46**, pp. 800-812.
- Ruiz-Martinez, A., Martin Garcia, N., Romero, I., Seco, A., and Ferrer, J. (2012) Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent, *Bioresource technology*, **126**, pp. 247-253.
- Vonshak, A., Cheung, S. M., and Chelln, F. (2000) Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light, *Journal of phycology*, **36**, pp. 675-679.