



Mixotrophic microalgae에 의한 음폐수 소화액 고도처리에 있어 유기산이 microalgae의 성장 및 질소, 인 제거에 미치는 영향

Effects of volatile fatty acids on microalgae growth and N, P consumption in the advanced treatment process of digested food waste leachate by mixotrophic microalgae

장산·황선진*

Shan Zhang·Sun-Jin Hwang*

경희대학교 공과대학 환경학 및 환경공학과

Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University

ABSTRACT

Acetate, propionate, butyrate are the major soluble volatile fatty acids metabolites of fermented food waste leachates. This work investigate the effects of volatile fatty acid on the growth rate and $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ removal efficiency of mixotrophic microalgae *Chlorella vulgaris* to treat digested food waste leachates. The results showed that acetate, propionate and butyrate were efficiently utilized by *Chlorella vulgaris* and microalgae growth was higher than control condition. Similar trends were observed upon $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ consumption. Volatile fatty acids promoted *Chlorella vulgaris* growth, and nutrient removal efficiencies were highest when acetate was used, and butyrate and propionate showed second and third. From this work it could be said that using mixotrophic microalgae, in this work *Chlorella vulgaris*, fermented food waste leachates can be treated with high efficiencies.

Key words: *Chlorella vulgaris*, digested food waste leachate, mixotrophic metabolism, volatile fatty acids

주제어: 클로렐라 불가리스, 음폐수 소화액, 양쪽성 대사, 휘발성 유기산

1. 서 론

우리나라의 경우, 발생된 음식물 쓰레기 대부분이 자원화 시설인 퇴비화 및 사료화 시설에서 재활용되고 있다. 하지만, 음식물쓰레기 재활용 처리공정의 염분제거 및 탈수과정에서 고농도의 음폐수가 발생하며, 그 발생량은 최근 몇 년간 지속적으로 증가하는 추세를 보이고 있다. 음폐수 처리는 66% 이상을 해양

배출에 의존하여 왔으나, 런던협약 발효에 따라 2013년부터 해양배출이 금지되어 음폐수의 육상처리 기술 개발이 시급해졌다. 음폐수는 고농도 유기물을 포함하므로 혐기성 소화공정을 통한 바이오 가스 에너지화에 초점이 맞추어져 추진되고 있다. 하지만 음폐수 혐기성 소화 후 배출되는 소화폐액은 고농도의 질소와 인, 유기산을 함유하고 있어, 직접 방류를 할 수 없으므로 공공수역으로의 방류를 위해서는 희석 후 경제적인 적정처리 기술을 적용할 필요가 있다.

한편, 식물성 플랑크톤인 미세조류(microalgae)는 이

Received 20 July 2017, revised 10 August 2017, accepted 11 August 2017

*Corresponding author: Sun-Jin Hwang(E-mail: sjhwang@khu.ac.kr)

pp. 273-279

pp. 281-287

pp. 289-296

pp. 297-301

pp. 303-310

pp. 311-319

pp. 321-328

pp. 329-338

pp. 339-346

pp. 347-356

pp. 357-362

제까지 제약, 염료생산, 단백질 생산 등 고부가가치 제품생산을 위한 원료로 사용되어 왔으며, 특히 최근에는 바이오-연료 생산 가능성이 주목 받으며 많은 관련 연구가 진행되고 있다. 또한, 미세조류는 하폐수에 있는 질소와 인을 성장을 위한 주요 영양염류로 이용하는 기작을 응용하여 최근 몇 년간 미세조류를 이용한 하폐수 고도처리 및 잉여 미세조류를 이용한 바이오 연료화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Lau et al., 1995; Lee and Lee, 2001; Ruiz-Martinez et al., 2012). 그렇지만 미세조류를 이용하여 음폐수를 처리하는 연구는 상대적으로 거의 전무하다고 할 수 있다.

미세조류는 광합성을 하고, CO₂를 고정하여 성장하는 autotrophic 대사뿐만 아니라 heterotrophic과 mixotrophic 조건에서도 성장이 가능하다. Mixotrophic microalgae는 유기 탄소 및 무기탄소를 모두 흡수하여 성장할 수 있고, 외부환경(빛 및 탄소원)에 따라 autotrophic과 heterotrophic 대사를 동시에 수행할 수 있으며, 선택적으로 전환할 수도 있다. 또한 mixotrophic microalgae는 autotrophic microalgae 보다 광 저해는 적고, 성장률은 높아 효과적이다(Wang et al., 2012). 그러나, mixotrophic에 의한 배양시 유기 탄소원이 배양비용의 80%를 차지하는 것으로 알려져 있어, 더 경제적인 유기 탄소원을 모색해야 한다. Mixotrophic에 의한 미세조류 배양시, microalgae가 mixotrophic 기작에 의해 glucose, acetate, glycerol 등과 같은 유기물을 대사하여 성장한다는 보고가 있다(Perez-Garcia et al., 2011). 음폐수는 혐기 소화과정을 통해 다량의 유기산을 발생시키며, 그 중에 acetate, propionate, butyrate가 약 80%를 차지한다. Acetate가 미세조류의 heterotrophic이나 mixotrophic 배양시 외부 탄소원으로 이용된 연구는 보고된 바 있으나, propionate와 butyrate를 이용한 연구는 그 사례를 찾기 어려운 실정이다(Bouarab et al., 2004; Combres et al., 1994; Hu et al., 2012; Jeon et al., 2006; Perez-Garcia et al., 2011).

이에, 본 연구에서는 mixotrophic microalgae인 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 음폐수를 혐기성 소화로 처리할 때 생성되는 acetate, propionate 및 butyrate가 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 질소, 인의 제거에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

2. 실험방법

2.1 미세조류 배양

실험에 사용된 mixotrophic microalgae는 *Chlorella*

*vulgaris*이고, KCTC(Korean Collection for Type Culture)에서 분양 받았다. *Chlorella vulgaris*는 BG 11 medium에서 배양하였으며, 배지의 조성은 MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 36 mg/L, Na₂CO₃ 20 mg/L, Citric acid 6 mg/L, Ferric ammonium citrate 6 mg/L, EDTA 1 mg/L, Trace 1 ml/L 이었다. 질소 및 인은 음폐수 소화액의 성상을 고려해서 BG 11 medium에 각각 NH₄Cl 100 mg-N/L 및 K₂HPO₄ 20 mg-P/L를 주입해 주었다.

*Chlorella vulgaris*의 유기산 제거능 평가를 위해 이분해성 glucose를 기질로 취하는 경우를 설정하였고, 이에 대한 단일 유기산인 acetate, propionate 및 butyrate의 소비속도를 측정하였는데, 기질농도는 네 경우 모두 1500 mg-COD/L가 되도록 주입했다. 또한, 혼합 유기산이 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 NH₄-N 제거에 미치는 영향을 평가하기 위해 acetate, propionate 및 butyrate를 각각 500 mg-COD/L씩 혼합한 조건에 대해서도 제거패턴을 분석하였다. 독립영양 대사에서 필요한 무기탄소는 모든 조건에서 동일하게 NaHCO₃를 이용하여 1 g-C/L로 설정(이후 결과 그래프에선 'Control'로 표현한 조건)해 주었다.

2.2 분석방법

*Chlorella vulgaris*의 성장량을 측정하기 위해 dry weight를 측정하였다. Acetate, propionate 및 butyrate의 측정은 이온-크로마토그래피(Metrohm, Basic 792, UK)를 이용하였으며, 컬럼은 유기산 컬럼(Metrosep), 이동상은 0.5 mmol/L perchloric acid, suppressor는 10 mmol/L lithium chloride를 이용하였다. NH₄⁺-N 분석은 수질분석 kit법을 이용하여 Water Analyzer(HS69 3100, Humas, Korea)로 분석하였다. PO₄³⁻-P는 수질자동분석기 Auto Analyzer(AA3, BLTE Co., KOREA)를 이용하여 분석하였다.

각 조건에서 *Chlorella vulgaris*의 성장을 비교하기 위해 비성장 속도(Specific Growth Rate, μ)를 계산하였으며, 계산하는 방법은 Eq. - (1) 과 같다(Perez-Garcia et al., 2010).

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

여기서, μ 는 비성장 속도이고, X는 t 시간 후의 *Chlorella vulgaris*의 dry weight, X₀는 t₀ 시간 후의



*Chlorella vulgaris*의 dry weight 이다. 최대 비성장 속도는 대수 성장기에서 계산된 비증식 속도 값들 중에서 가장 큰 값을 이용하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 유기 탄소원 종류에 따른 제거속도 및 *Chlorella vulgaris* 성장

각 유기 탄소원들의 잔류농도 결과를 Fig. 1에 나타냈다. Glucose는 예상대로 다른 유기산들에 비해 빠른 분해가 일어나 하루 만에 거의 모두 소비되었다. *Chlorella vulgaris*에 의한 acetate, propionate 및 butyrate의 소비속도는 각각 약 750, 370 및 590 mg-COD/L/day로 산출되어, acetate, butyrate, propionate 순으로 *Chlorella vulgaris*의 확인한 선호도가 있음을 알 수 있었다. Hu *et al.*(2012)의 연구에서도 *Chlorella sp.*는 위의 세가지 유기산을 대사할 수 있고, 미세조류의 성장을 촉진시키는 것으로도 보고되었다. 그러나, Imase *et al.* (2008)의 연구에 의하면, *Chlorella sorokiniana*는 propionate를 대사할 수 없고, 오히려 성장을 저해하는 것으로 보고되었는데, 이러한 사실은 종에 따라 대사가능여부가 달라짐을 의미한다. 또한, Liu *et al.* (2013)의 연구에서는 *Chlorella vulgaris*의 butyrate 대사 특성에 대한 언급이 있는데, 이 보고에 의하면 *Chlorella vulgaris*는 기본적으로 butyrate를 대사할 수 있지만, butyrate 농도가 100 mg/L를 초과하면 오히려 *Chlorella vulgaris*의 성장을 저해한다고 한다. Acetate, propionate 및 butyrate를 각각 500 mg-COD/L씩 혼합하여 주입한

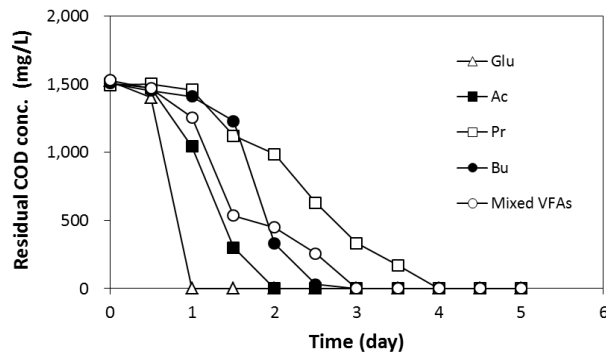


Fig. 1. Residual COD variations of glucose and several volatile fatty acids as an organic carbon source (Glu=Gulcose, Ac=Acetate, Pro=Propionate, Bu=Butyrate)

조건에서는 유기물 제거속도가 약 510 mg-COD/L/day로 산출되었는데, 이는 acetate와 butyrate를 단독으로 주입한 조건 보다 낮고, propionate만을 주입한 조건 보다는 높은 값으로, 상술한 전반적인 경향과 일치하는 결과라고 할 수 있다.

각 유기 탄소원에 따른 *Chlorella vulgaris*의 성장량 및 비성장 속도를 계산한 결과는 Fig. 2와 같다. 5일간의 배양 결과, 유기 탄소원에 의해 성장한 미세조류의 성장량은 유기물의 종류에 관계없이 무기탄소에 의해 성장한 성장량 보다 높은 것으로 나타났다. Glucose, acetate 및 butyrate 조건에서 *Chlorella vulgaris*의 최종 성장량은 비슷했고, Control 보다 약 2.3배 높았다. 그러나, 비성장 속도를 계산한 결과는 다소 차이가 있어, glucose 조건의 비성장 속도가 1.6 day⁻¹로 가장 높았고, acetate 및 butyrate 조건은 1.2 day⁻¹로 다소 낮게 산정되었다. 이는 미세조류가 glucose를 대사하는 과정에서 발생하는 에너지가 다른 유기성 기질에 비해 더 높기 때문인 것으로 사료되는데, 1 mole의 glucose를

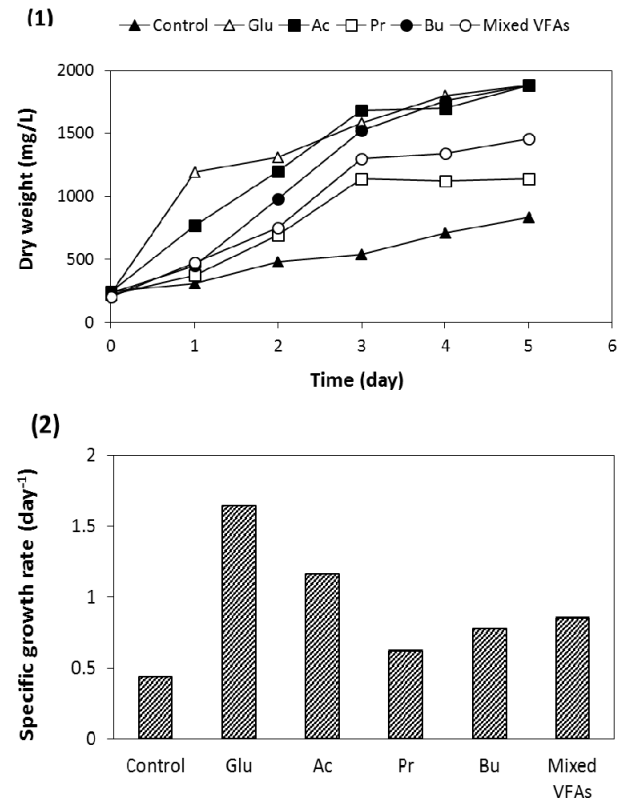


Fig. 2. Dry weight and specific growth rate variations of glucose and several volatile fatty acids as an organic carbon source.

pp. 273-279
pp. 281-287
pp. 289-296
pp. 297-301
pp. 303-310
pp. 311-319
pp. 321-328
pp. 329-338
pp. 339-346
pp. 347-356
pp. 357-362

대사하면 2.8 kJ의 에너지가 발생되는 반면, 1 mole의 acetate 및 butyrate를 대사하면 약 0.8 kJ의 에너지 밖에 발생되지 않는다는 사실이 이를 뒷받침해 준다 (Boyle and Morgan, 2009).

또한 5일간의 배양 결과, acetate, propionate 및 butyrate 조건에서 *Chlorella vulgaris*의 성장량은 Control에 비해 2.3, 1.4 및 2.3배 높았고, 비성장 속도는 1.2, 0.6 및 0.8 day⁻¹으로, acetate, butyrate, propionate 순으로 높은 것으로 나타났는데, 이는 Fig. 1의 유기산 소비속도와 일치한다. 세 가지 유기산을 500 mg-COD/L씩 혼합한 조건에서의 *Chlorella vulgaris* 성장량은 Control에 비해 약 1.7배 높고, acetate, butyrate를 단독으로 주입해 준 조건 보다는 낮고 propionate 단독주입 조건 보다는 예상대로 다소 높은 것으로 나타났다.

미세조류의 heterotrophic 또는 mixotrophic 배양에 있어 acetate는 외부 탄소원으로서 여러 문헌을 통해 사용되고 있는 사실이 확인되지만, propionate와 butyrate를 외부 탄소원으로서 사용한 연구는 매우 드물다고 할 수 있다(Bouarab et al., 2004; Combres et al., 1994; Hu et al., 2012; Jeon et al., 2006; Perez-Garcia et al., 2011). 그러나, 본 연구결과에 의하면 butyrate 및 propionate도(특히, butyrate) 미세조류의 유기성 기질로서 이용될 수 있는 것으로 판단된다. 또한, Moon et al.(2013)의 연구에 의하면 혼합된 유기산 (acetate : propionate : butyrate = 8:1:1)을 이용하여 미세조류를 배양하고 더 나아가 biofuel도 생산한 사례가 보고되고 있다. 이렇듯, *Chlorella vulgaris*가 유기산을 충분히 대사할 수 있다는 것은, heterotrophic 또는 mixotrophic 대사가작에 의해 유기산이 다량 고농도로 포함된 음폐수 소화액을 적당히 희석하여 탄소원으로서 이용할 수 있음을 의미한다고 할 수 있다.

3.2 유기 탄소원에 따른 N, P 제거능 평가

탄소원에 따른 미세조류의 NH₄-N 제거능을 평가한 결과는 Fig. 3과 같다. 무기탄소만 공급된 Control 조건에서 보면, 초기 100 mg/L이던 NH₄-N 농도는 5일 후 약 40 mg/L까지 감소하여 약 60%의 제거율을 보였다. Glucose 및 acetate 조건에서 NH₄-N는 2일만에 모두 소비되었으며, butyrate는 약 2.5일, propionate는 약 4.5일 경과 후에 모두 제거되었다. 세 가지 유기산이 혼합된 조건에서는 약 3일만에 모두 제거되었으며, 예상대로 propionate의 경우 보다 제거능이 높은 것으로

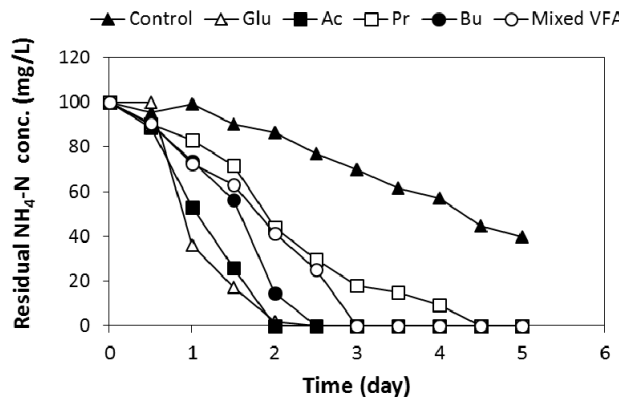


Fig. 3. Residual NH₄-N variations of glucose and several volatile fatty acids as an organic carbon source.

나타났다. 이상의 결과들로부터 *Chlorella vulgaris*에 의한 NH₄-N 제거능은 이용된 유기물이 glucose, acetate, butyrate, 혼합 유기산, propionate 순으로 높게 나타남을 알 수 있다.

탄소원에 따른 미세조류의 PO₄-P 제거능을 평가한 결과는 Fig. 4와 같다. 초기 20 mg/L이던 PO₄-P 농도는 5일이 경과해도 Control, propionate 및 혼합 유기산 조건들 모두에서 완전히 제거되지 않고 각각 6.4, 3.0 및 0.5 mg/L 수준으로 잔류하였으며, glucose, acetate 및 butyrate 기질 조건에서는 약 4.5일이 경과한 시점에서 전량이 제거되었다. 이상의 결과를 바탕으로 4.5일 동안 제거된 PO₄-P의 제거속도를 산정해 보면, glucose, acetate, butyrate, 혼합 유기산, 그리고 propionate 순으로 빠른 것으로 나타났으며, 이들 결과는 예상한 대로 NH₄-N 제거속도 경향과도 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

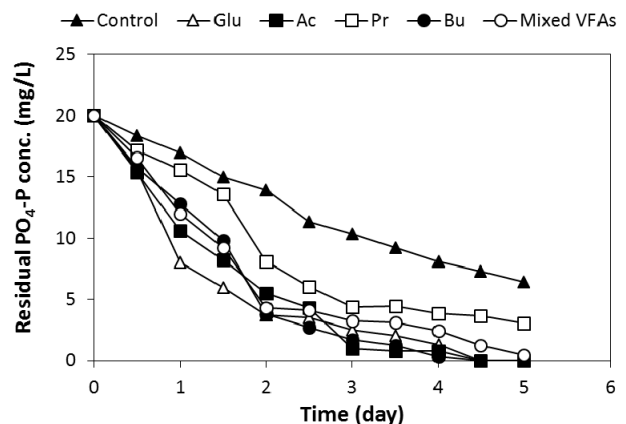


Fig. 4. Residual PO₄-P variations of glucose and several volatile fatty acids as an organic carbon source.



Table 1. NH₄-N and PO₄-P removal rate values according to glucose and several volatile fatty acids as an organic carbon source

Organic carbon sources	NH ₄ -N removal rate (mg/L/day)	PO ₄ -P removal rate (mg/L/day)
Control	12.8	2.7
Glucose	64.0	12.0
Acetate	50.0	7.3
Propionate	22.7	4.0
Butyrate	40.0	6.9
Mixed VFAs	33.3	5.6

이상의 각 유기 탄소원에 대해 구한 *Chlorella vulgaris*의 NH₄-N 및 PO₄-P 제거속도를 표로 정리하면 Table 1과 같다. 얻어진 결과값들은 기대 이상의 양호한 값인데, 이는 실패수를 사용할 경우 미세조류의 대사특성을 정확히 파악하고 해석하기 어려운 현실적인 제반 제약사항 때문에 정제된 형태의 인공 음폐수 소화액 및 BG-11 배지를 이용하였기 때문인 것으로 사료되며, 실제 음폐수 소화액을 사용하여 실험한다면 다양한 성분으로부터 야기될 저해 또는 독성영향 등에 의해 이 보다 현저히 낮은 값이 얻어질 수도 있는 바, 향후 이에 대한 추가 연구가 요망된다.

4. 결 론

음식물쓰레기 처리에 필수적으로 동반되는 음폐수의 처리를 위해 최근 국내외 혐기성 소화기술이 다양한 규모로 적용되고 있는데, 유출되는 혐기성 소화 처리수는 여전히 유기물 농도가 높아 추가적인 처리가 이루어진다. 이에 본 연구에서는 대표적인 미세조류인 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 처리수의 주성분인 acetate, propionate 및 butyrate에 대한 *Chlorella vulgaris*의 성장에의 이용률 및 이러한 과정에서의 질소 및 인에 대한 제거능에 대해 기본적인 평가를 진행하였다.

연구 결과, *Chlorella vulgaris*는 기본적으로 glucose를 이용하는 기질소비속도 수준은 아니지만, acetate > butyrate > propionate 순으로 유기산을 mixotrophic 대사에 의해 활발히 대사할 수 있었고, 그 결과 *Chlorella vulgaris*는 성장량 및 성장속도 면에서 대조군인 독립영양 무기탄소 주입조건 보다 전반적으로 높은 성장량 및 성장속도를 나타냈다.

질소 및 인과 같은 영양염류 제거속도 역시 위의 탄소제거 패턴과 동일하여 유기탄소 공급조건에서 대조군인 무기탄소 공급조건 보다 질소 및 인 제거효율이 높은 것으로 나타났다. 즉, NH₄-N 및 PO₄-P 제거속도 역시 acetate > butyrate > propionate 순인 것으로 나타났다.

이상의 결과들로부터, *Chlorella vulgaris*를 이용하여 음폐수 혐기성 소화액을 처리시, 주요 유기산인 acetate, propionate 및 butyrate는 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 mixotrophic 대사에 필요한 유기 탄소원이며, 이러한 과정에서 질소 및 인과 같은 영양염류도 효과적으로 제거될 수 있는 것이 확인되었다.

사 사

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. NRF-2017R1A2B4008906)

References

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, 2706-2712.

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

Combres, C., Laliberté, G., Reyssac, J. S., and Noüe, J. (1994) Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Physiologia plantarum*, 91, 729-734.

Hu, B., Min, M., Zhou, W., Du, Z., Mohr, M., Chen, P., Zhu, J., Cheng, Y., Liu, Y., and Ruan, R. (2012) Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal, *Bioresource Technology*, 126, 71-79.

Imase, M., Watanabe, K., Aoyagi, H., and Tanaka, H. (2008) Construction of an artificial symbiotic community using a *Chlorella*-symbiont association as a model, *FEMS*

pp. 273-279

pp. 281-287

pp. 289-296

pp. 297-301

pp. 303-310

pp. 311-319

pp. 321-328

pp. 329-338

pp. 339-346

pp. 347-356

pp. 357-362

- microbiology ecology, 63, 273-282.
- 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, 490-495.
- 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, 59-66.
- Lee, K., and Lee, C.-G. (2001) Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 194-199.
- Liu, C.-H., Chang, C.-Y., Liao, Q., Zhu, X., and Chang, J.-S. (2013) Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents, *Bioresource Technology*, 145, 331-336.
- Moon, M., Kim, C. W., Park, W.-K., Yoo, G., Choi, Y.-E., and Yang, J.-W. (2013) Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Algal Research*, 2, 352-357.
- 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, 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, 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, 247-253.
- Wang, H., Xiong, H., Hui, Z., and Zeng, X. (2012) Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids, *Bioresource Technology*, 104, 215-220.