



광 조사 간격이 *Chlorella vulgaris*의 성장률 및 질소, 인 대사에 미치는 영향

Effects of light irradiation interval on the metabolism of nitrogen, phosphorus and growth rate of *Chlorella vulgaris*

황현정·황선진*

Hyeon-Jeong Hwang·Sun-Jin Hwang*

경희대학교 공과대학 환경학 및 환경공학과

Department of Environmental Science & Engineering, Kyung Hee University

ABSTRACT

This study aimed to investigate growth rate and nutrient consumption of *Chlorella vulgaris* according to different light irradiation interval. Applied light irradiation intervals were 12 hr, 4 hr, 1 hr, and 1 min. The light source was flexible LED(Blue:Red=1:1), light intensity was 200 PPF and Light/Dark cycle was 1:1. As a result, growth rate and nutrient removal efficiencies showed no significant differences depending on the light irradiation interval. Considering the reproduction characteristics of applied microalgae cultures of this study, this is thought to be one of the possible reasons of above results. Because *Chlorella vulgaris* performs an asexual reproduction and it is known that there is no significant relationship between light irradiation interval and growth rate, including nutrient consumption in case of asexual reproduction.

Key words: Asexual reproduction, *Chlorella vulgaris*, Light irradiation interval, Microalgae, Nutrient removal

주제어: 무성생식, 클로렐라 불가리스, 광 조사 간격, 미세조류, 영양염류 제거

1. 서 론

국내 하수처리장 대부분은 유기물 및 영양염류 제거에 목적을 둔 활성슬러지 공법으로 운전되고 있다. 활성슬러지 공법은 박테리아에 의한 유기물 제거 효율이 약 90%로 높은 장점을 갖지만, 질소 및 인의 제거효율은 약 30%로 낮은 단점이 있다. 이와 같은 효율을 가진 공법에 의해 처리된 처리수가 하천 및 호소로 방류되면 부영양화 현상이 나타날 수 있고, 이로 인한 생태계 및 상수원 오염으로 정수처리 비용을 증가시킬 수 있다. 따라서 현재의 공법 보다 질소, 인 제거효율을 높일 수 있는 새로운 기술개발이 필요한 실정이다.

미세조류는 광합성을 이용하여 성장하는 단세포 생물로서 가시광선 영역의 빛에너지를 ATP, NADPH₂와 같은 화학 에너지로 전환시키면서 생성된 에너지를 이용하여 성장한다. 또한, 성장을 위한 영양소로 질소와 인을 필요로 하기 때문에 하폐수 내에 포함된 다양한 영양염류의 효율적인 제거가 가능할 것으로 기대된다. 이에 현재 미세조류를 적용한 하폐수처리에 대한 기초연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다 (Abinandan and Shanthakumar, 2015; Cai et al., 2013; Shen et al., 2015).

미세조류를 적용한 하폐수처리는 미세조류의 성장 및 대사과정을 통해 유기물 뿐만 아니라 활성슬러지 공법에서 낮은 효율로 제거되었던 질소와 인을 제거할 수 있다. 또한, 미세조류는 세포 내에 박테리아에

Received 11 September 2017, revised 25 September 2017, accepted 28 September 2017

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

pp. 373-381
pp. 383-388
pp. 389-395
pp. 397-407
pp. 409-414
pp. 415-419
pp. 421-430
pp. 431-440
pp. 441-445
pp. 447-457
pp. 459-469

비해 풍부한 지질, 단백질, 탄수화물 등을 함유하고 있기 때문에 잉여 미세조류를 이용하여 바이오 연료 등으로의 자원화가 가능하다(Chen et al., 2011; Milledge, 2011).

미세조류의 광합성은 빛에 의해 수행되는 광반응과 빛 에너지와는 상관없이 수행되는 광독립 반응에 의해 완성된다. 광반응은 빛 에너지를 이용하여 ATP와 NADPH₂를 생성하며, 광독립 반응은 광반응에서 생성된 ATP와 NADPH₂를 이용하여 CO₂를 환원시켜 탄수화물을 생성한다. 탄소를 고정하는 광독립 반응은 광반응의 대사산물인 NADPH₂와 ATP가 있어야만 진행되므로 미세조류 성장에 있어 빛은 필수적인 요소이다.

미세조류는 성장에 필요한 빛 에너지를 획득하기 위해 색소를 함유하고 있으며, 각 색소는 특정 파장만을 흡수할 수 있다. 녹조류의 경우 광합성 색소로 chlorophyll-a, chlorophyll-b, carotenoid를 가지며, 주로 Blue(450~475nm) 또는 Red(630~675nm) 파장의 빛을 흡수한다. Blue와 Red 파장을 선택적으로 혼합하여 조사할 경우, 성장량이 증가하며(Korbee et al., 2005), Blue 파장은 효소의 활성을 증대시키고(Ruyters, 1984), 손상된 세포를 조속히 회복시키는 역할도 한다고 보고되고 있다(Shu et al., 2012).

또한, 미세조류는 세포 내의 chlorophyll-a 함량을 조절하여 광조건 변화에 적응한다. 광합성에 필요한 빛 에너지가 과도한 경우에는 세포 내 chlorophyll-a 함량을 감소시켜 빛 에너지 획득효율을 감소시키지만, 부족한 경우에는 세포 내의 chlorophyll-a 함량을 증가시켜 빛 에너지 획득효율을 증가시킨다(Chen et al., 2011).

광 조사 조건 중 하나인 광 조사 간격은 light 구간과 dark 구간이 반복되는 단위시간을 나타내며, 광 조사 간격에 따른 광합성 효율은 미세조류 종마다 다르게 나타난다(Chisti, 2007). 또한, 광 조건 변화에 따른 적응시간은 최소 10~40분이며, 이에 대응하기 위한 기작인 chlorophyll-a의 합성은 2시간 이후부터 나타난다(Pulz, 2001).

한편, 미세조류는 다양한 방법의 무성생식과 유성생식을 통해 번식한다. 유성생식은 개체군의 유전적 변이성을 증대시켜 진화에 의하여 환경변화에 반응하는 능력을 촉진시킨다. 이와는 달리 무성생식은 생장에 적합한 조건에서 배우자를 만들고 짝을 찾을 필요 없이 스스로 복제하여 번식하므로 개체군 생장이 신속하게 일어난다(Graham et al., 2009).

*Chlorella vulgaris*는 직경 2~10 μm의 구형으로, 담수에 서식하는 녹조류로 성장이 빠르다고 알려져 있

다. 또한, 폐수 중의 질소와 인을 효과적으로 섭취하며 지질함량이 30~40%(dry base)에 달하기 때문에 하폐수처리와 바이오 연료생산에 관한 연구가 관련하여 다양하게 진행되었다.

이에 본 연구에서는 하폐수처리에 적용 가능성이 높을 것으로 기대되는 *C. vulgaris*를 이용하여, 여러 가지 조건의 광 조사 간격에 따른 *C. vulgaris*의 성장과 질소 및 인 대사상의 특성에 대한 연구를 진행하였다.

2. 연구 방법

2.1 사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 미세조류는 KCTC(Korean collection for type culture)에서 분양받은 *C. vulgaris*를 사용하였으며, 이 종주의 배양을 위해 사용한 배지는 BG11으로 구체적인 조성은 Table 1과 같다. 제조된 BG11 배지와 250 mL cell culture flask를 이용하여 온도 25±1°C, 광도 100 PPFD(Photosynthetic Photon Flux Density)인 항온 광배양기(Multi-thermo chamber, HB-305M)에서 계대배양을 실시하였다.

Table 1. Composition of BG(Blue-Green) medium

Blue-Green Medium		
Ingredient	Concentration	Dosage
NaNO ₃	150 g/L	10 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5 g/L	10 ml
K ₂ HPO ₄	4 g/L	10 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.6 g/L	10 ml
Na ₂ CO ₃	2 g/L	10 ml
Citric acid	0.6 g/L	10 ml
Feric ammonium citrate	1.2 g/L	5 ml
EDTA	0.2 g/L	5 ml
Trace		1 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049 g	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g	
H ₃ BO ₃	2.86 g	
Distilled water	1 L	
Distilled water		1 L



본 실험에 앞서 volume 2.5 L인 원통형 반응기에 2 L의 working volume으로 *C. vulgaris*를 배양하였다. pH는 pH controller를 이용하여 황산 및 수산화나트륨 용액을 자동주입하여 8±0.5로 유지시켰다. 광원은 태양광과 같은 혼합파장을 갖는 White LED를 사용하였고, 광 조사 주기는 24:0(Light:Dark), 광량은 100 PPFd로 설정하여 일주일 간 배양 후 본 실험에서 사용하였다.

2.2 실험 방법

광 조사 간격에 따른 미세조류의 성장을 평가하기 위해 Light:Dark(L:D) 비율을 12:12(hr), 4:4(hr), 1:1(hr), 1:1(min)로 설정하여 조사해 주었다. 본 실험 역시 working volume 2 L로 하여 batch test로 진행하였다. 광원은 flexible LED를 사용하여 반응기를 감싸는 방식으로 설치하여 광이 조사되도록 해 주었고, 광도는 200 PPFd가 되도록 출력을 조절해 주었다. 광 파장은 Blue와 Red를 1:1 비율로 혼합하여 조사해 주었으며, pH는 8.0±0.5, 온도는 25±3°C가 되도록 유지시켰다. (Fig. 1 참조) 초기 *C. vulgaris* 식종 농도는 0.3 OD(Optical Density) 이었으며, 광합성에 필요한 무기 탄소원은 NaHCO₃를 이용하여 1 g·C/L가 되도록 조제하여 운전 초기에 주입해 주었다.



Fig. 1. Experimental microalgae cultivation setup for survey the effects of light irradiation interval.

2.3 *C. vulgaris* 성장 및 영양염류 소비

C. vulgaris 성장량 파악을 위해 OD를 측정하였다. OD 측정은 UV spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys)를 사용하여 660 nm 파장에서 측정했다. 질소 및 인은 수질자동분석기인 AA3(Auto Analyzer, BLTECH Co., KOREA)를 이용하여 시료내의 NO₃-N 및 PO₄-P를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 광 조사 간격에 따른 *C. vulgaris* 성장량

광 조사 간격이 *C. vulgaris*의 성장량에 미치는 영향을 평가하기 위해, 광 조사 간격을 12 hr, 4 hr, 1 hr, 1 min 단위로 설정하여 얻어진 성장량 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 광 조사 간격에 따른 미세조류 성장량은 모든 조건에서 유사하게 나타났으며, 광 조사 간격들에 대한 별다른 경향성도 나타나지 않았다. 따라서, *C. vulgaris* 성장량은 본 연구의 대상범위에 대해, 광 조사 간격에 따른 영향이 없는 것으로 판단된다.

Choi (2015)의 연구에 의하면, 무성생식으로만 번식하는 종과 유성생식 및 무성생식으로 번식하는 종을 대상으로 실험한 결과, 무성생식으로만 번식하는 종은 광 조사 간격에 따른 성장량 차이를 나타내지 않은 반면, 유성생식 및 무성생식으로 번식하는 종에서는 광 조사 간격에 따른 성장량 차이가 나타났다고 보고되었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아, 본 연구에서 사용한 *C. vulgaris*는 무성생식만 하는 종이므로 광 조사 간격에 대한 영향을 거의 받지 않은 것으로 판단된다. (Jason B.K., 2014)

또한, Liu et al.,(2014)의 연구에서 무성생식으로만 번식하는 종인 *Chlorella* sp와 유성생식 및 무성생식으로 번식하는 *Scenedesmus obliquus* 종을 혼합하여 실험한 결과, 광 조사 간격이 짧아질수록 미세조류 성장량이 감소하였다고 보고되고 있다. 이러한 결과는 무성생식으로만 번식하는 종과 유성 및 무성생식으로 번식하는 종이 혼합되어 있기 때문에 유성생식에 의한 미세조류의 성장량이 광 조사 간격이 짧아질수록 감소했기 때문으로 사료된다.

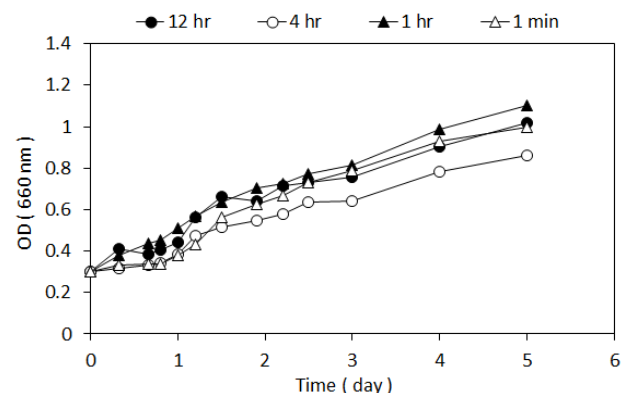


Fig. 2. *C. vulgaris* growth by OD according to light irradiation interval.

pp. 373-381

pp. 383-388

pp. 389-395

pp. 397-407

pp. 409-414

pp. 415-419

pp. 421-430

pp. 431-440

pp. 441-445

pp. 447-457

pp. 459-469

3.2 광 조사 간격에 따른 *C. vulgaris*의 영양염류 소비

광 조사 간격을 12 hr, 4 hr, 1 hr, 1 min 단위로 설정하여 *C. vulgaris*를 배양하는 과정에서 얻어진 영양염류 소비 결과를 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타내었다.

광 조사 간격에 따른 배지 내 NO₃-N 및 PO₄-P 소비는 성장량 결과와 마찬가지로 모든 조건에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 일반적으로 미세조류는 광 조사 조건 기간에서 광 의존성 반응에 의해 생성된 ATP와 NADPH₂만으로 생체합성이 일어나며(Richmond, 2004), 이때 질소와 인이 소비되는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 모든 조건에서 광 조사 기간이 동일하여 생성된 ATP와 NADPH₂의 양이 동일했을 것으로 추측되며, 이에 따라 각 조건에서 생체합성에 이용된 질소와 인의 양에 있어 유의한 차이가 없이 소비된 것으로 판단된다.

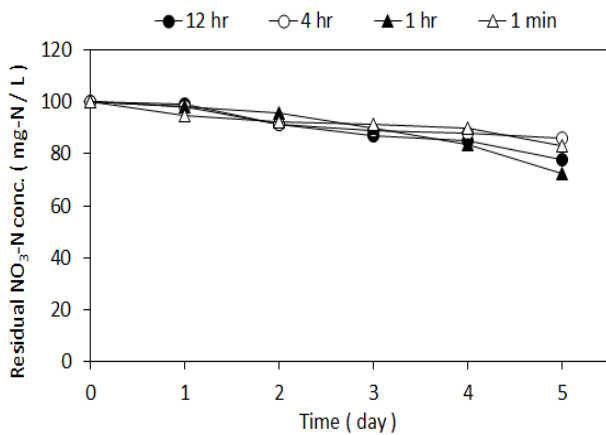


Fig. 3. Residual NO₃-N conc. variations according to light irradiation interval.

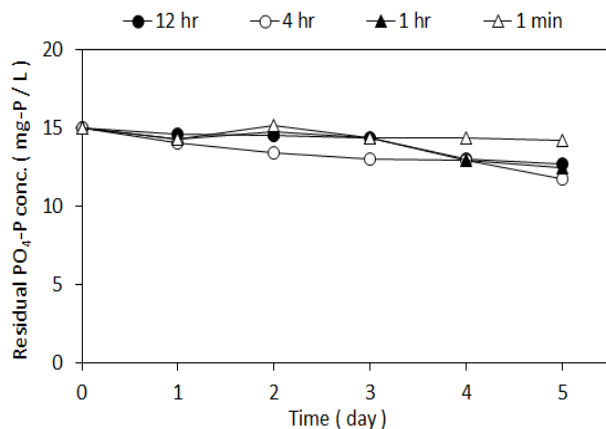


Fig. 4. Residual PO₄-P conc. variations according to light irradiation interval.

3.3 광 조사 간격에 따른 *C. vulgaris*의 chlorophyll-a 농도 및 함량

광 조사 간격에 따른 *C. vulgaris*의 chlorophyll-a 농도 및 함량을 측정하고 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Chlorophyll-a의 농도와 함량 모두 모든 조건에서 유의한 차이가 나타나지 않았으며, chlorophyll-a 농도는 성장량 결과와 유사한 경향으로 나타났다. 미세조류는 chlorophyll-a 함량을 조절하여 광도 변화에 적응하지만(Chen et al., 2011), 본 연구에서는 광도를 200 PPFD로 고정하여 실험하였기 때문에 chlorophyll-a 함량에 유의한 차이가 있지 않았을 것으로 판단된다. 또한, 세포 내에 함유하고 있는 chlorophyll-a 함량이 모든 조건에서 유사하기 때문에 chlorophyll-a 농도가 미세조류 성장량 경향과 유사하게 나타난 것으로 판단된다.

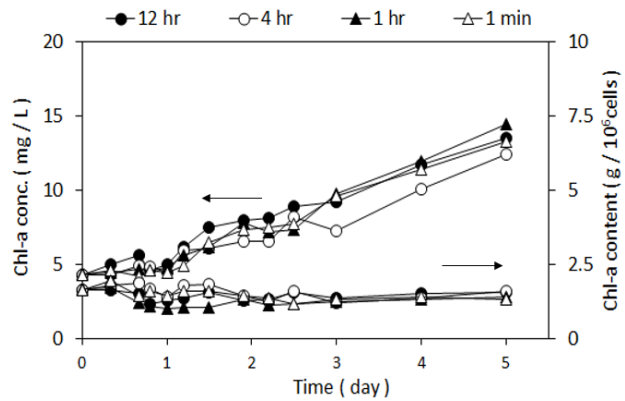


Fig. 5. Chl-a conc. and content variations according to light irradiation interval.

4. 결론

본 연구에서는 광 조사 간격이 미세조류의 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여, *C. vulgaris*를 이용하여 광 조사 간격을 12 hr, 4 hr, 1 hr, 1 min 로 설정한 후 배양과정에서의 성장량 및 질소, 인 제거능을 평가하였다.

실험결과, 성장량 및 질소, 인 대사에 있어서 광 조사 간격에 따른 유의한 차이가 나타나지 않았는데, 이는 본 연구에서 사용한 *C. vulgaris*는 무성생식으로만 번식하기 때문에 광 조사 간격에 영향을 받지 않은 것으로 사료된다.



따라서, *C. vulgaris*를 적용한 하폐수처리에 있어서 광 조사 간격은 종의 성장 및 질소와 인의 제거에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단된다. 또한, 유성 생식을 하는 미세조류를 적용하여 하폐수처리 시스템을 운영한다면, 광 조사 간격을 길게 설정하여 운전할 경우, 높은 성장량 및 질소, 인 제거효율을 기대할 수 있을 것으로 사료되는 바, 향후 이 부분에 대한 연구가 요망된다.

사 사

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

References

- Abinandan, S., Shanthakumar, S. (2015). Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 123-132.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Chen, P., Min, M., Chen, Y. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. 2 (4). *Cited times*, 24, 64.
- Chen, X., Goh, Q.Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W.N., Lau, R. (2011). Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*, 102(10), 6005-6012.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Choi, Y. K. (2015). Effect of illumination conditions on microalgal biomass production, wastewater treatment and its characteristics, Ph.D. Thesis, Konkuk University
- Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W. (2009). *Algae*. Benjamin Cummings.
- Harris, P., James, A. (1969). The effect of low temperatures on fatty acid biosynthesis in plants. *Biochemical Journal*, 112(3), 325-330.
- Jason B.K. Park, Rupert J. Craggs, Andy N. Shilton, (2014) Investigating the life-cycle and growth rate of *Pediastrum boryanum* and the implications for wastewater treatment high rate algal ponds, *water research*, vol.60, pp.130-140
- Korbee, N., Figueroa, F.L., Aguilera, J. (2005). Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80(2), 71-78.
- Liu, G., Qiao, L., Zhang, H., Zhao, D., Su, X. (2014). The effects of illumination factors on the growth and HCO₃⁻ fixation of microalgae in an experiment culture system. *Energy*, 78, 40-47.
- Milledge, J.J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(1), 31-41.
- Nichols, B.W., James, A.T., Breuer, J. (1967). Interrelationships between fatty acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Journal*, 104(2), 486-496.
- Podojil, M., Livanský, K., Prokeš, B., Wurst, M. (1978). Fatty acids in green algae cultivated on a pilot-plant scale. *Folia Microbiologica*, 23(6), 444-447.
- Pratt, R., Johnson, E. (1963). Production of protein and lipid by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 52(10), 979-984.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 125-177.
- Ruyters, G. (1984). Effects of blue light on enzymes. in: *Blue light effects in biological systems*, Springer, pp. 283-301.
- Shen, Q.-H., Gong, Y.-P., Fang, W.-Z., Bi, Z.-C., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Chen, H.-L. (2015). Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. *Bioresource Technology*, 193, 68-75.
- Shu, C.-H., Tsai, C.-C., Liao, W.-H., Chen, K.-Y., Huang, H.-C. (2012). Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(5), 601-607.

pp. 373-381

pp. 383-388

pp. 389-395

pp. 397-407

pp. 409-414

pp. 415-419

pp. 421-430

pp. 431-440

pp. 441-445

pp. 447-457

pp. 459-469