



MMBR에서 탄소원 종류 및 질소 농도가 *S. quadricauda*의 P-EPS 및 Chl-a 생성에 미치는 영향

Effects of carbon source and nitrogen concentration on the P-EPS and Chl-a production at the MMBR system

최윤정·심태석·황선진*

Yun-Jeong Choi·Tae-Suk Sim·Sun-Jin Hwang*

경희대학교 일반대학원 환경응용과학과

Department of Applied Environmental Science, Kyung Hee University

ABSTRACT

MMBR system has been suggested as a promising system to resolve harvesting problems induced from low settling efficiency of microalgae. And recently, a lot of research on reducing fouling at the MMBR system has investigated focused on EPS in many cases. EPS of microalgae mainly consists of polysaccharides and protein components, and is produced through photosynthesis and nitrogen-carbon metabolic pathways. Especially, P-EPS is one of major compounds which occur membrane fouling phenomenon, as its hydrophobic protein components cause floc formation and cake layer accumulation. And it is already known that almost every microalgae can metabolize P-EPS or Chl-a when nitrogen sources as a substrate is insufficient or exhausted situation. With the above backgrounds, uptake rates of P-EPS or Chl-a by *Scenedesmus quadricauda* according to the type of carbon source and nitrogen concentration were evaluated in order to verify correlation between carbon source vs P-EPS production, and indeed *Scenedesmus quadricauda* uses P-EPS or Chl-a when the amounts of nitrogen sources in the feed is not satisfied. As a result, it was shown that P-EPS and Chl-a production were increased proportional to nitrogen concentration under organic carbon condition. And especially, the amounts of P-EPS and Chl-a in the cell were diminished with the nitrogen source becomes insufficient or exhausted. Because P-EPS accelerates fouling

Received 14 October 2021, revised 6 November 2021, accepted 9 November 2021.

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

- 최윤정 (석사과정) / Yun-Jeong Choi (Master Student)
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 17104
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea
- 심태석(석사과정) / Tae-Suk Sim (Master Student)
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 17104
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea
- 황선진 (교수) / Sun-Jin Hwang (Professor)
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 17104
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, Republic of Korea

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

pp. 379-387

pp. 389-403

pp. 405-415

pp. 417-424

pp. 425-436

pp. 437-454

pp. 455-463

pp. 465-476

pp. 477-487

pp. 489-496

pp. 497-505

pp. 507-516

pp. 517-531

pp. 533-544

at the MMBR system, P-EPS degradation by *Scenedesmus quadricauda* in order to get nitrogen source may contribute to reducing fouling. About a affects of N-consumed Chl-a to the MMBR fouling, more survey is needed. On the contrary, considering the purpose of MMBR system of this study, *i.e.* harvesting useful high value microalgae efficiently feeding adequate industrial process wastewater, it seems like difficult to maintain satisfied metabolic activity and to harvest with high yield rate using nitrogen-poor MMBR feed.

Key words: Microalgae, Nitrogen concentration, Protein-extracellular polymeric substances (P-EPS), Chlorophyll-a, Microalgal membrane bioreator (MMBR)

주제어: 미세조류, 질소 농도, 세포 외 단백질 고분자 물질, 엽록소-a, 미세조류 분리막 생물반응기

1. 서 론

심화되는 산업화와 도시집중화 현상으로 인하여 국내 산업폐수 배출량이 급증하게 되었으며 이에 방류수 수질기준이 나날이 강화되는 실정이다. 산업폐수의 경우, 공정에 따라 배출량과 함유성분이 천차만별이며, 난분해성 물질이나 중금속, 독성물질 등 특정 유해물질이 함유되어 있는 등 매우 다양한 성상을 띤다. 일부 공정폐수는 특정유해물질이 거의 검출되지 않으며, 고농도의 질소와 인을 함유하고 있다. 질소와 인은 미세조류 생장에 필수 인자로서, 고농도 질소, 인을 함유한 공정폐수를 이용하여 고부가가치의 미세조류 바이오매스를 생산할 수 있다 (Li et al., 2008). 또한, 박테리아를 적용한 기존의 생물학적 처리에서는 질소, 인 제거효율이 낮아 추가적인 고도처리공정을 필요하는데 비해 미세조류를 적용하여 폐수처리를 수행할 경우, 이에 대한 비용이 절감될 수 있다 (Arbib et al., 2014). 이와 같이 일부 공정폐수가 미세조류 바이오매스 생산에 있어 재이용할 가치가 충분함에도 불구하고 대부분의 공정폐수가 무분별하게 혼합되어 공공 하수처리시설에 연계되어 처리되고 있는 실정이다 (Ministry of Environment, 2017). 미세조류는 무기탄소를 이용하여 독립영양 대사를 기반으로 대사를 수행하는 것으로 알려져 있으나, 일부 종은 무기탄소와 유기탄소를 동시에 혹은 선택적으로 이용하는 혼합영양 대사가 가능하여 이를 적용한 하폐수 고도처리 연구가 활발히 진행되고 있다 (Li et al., 2014; Luo et al., 2019). 재이용 가치가 높은 공정폐수를 이용하여 혼합영양 대사를 바탕으로 높은 유기물 및 영양염류 섭취능을 지닌 미세조류를 이용하여 부가가치가 높은 미세조류 바이오매스를 수확할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 미세조류는 낮

은 침강성으로 인해 미세조류 바이오매스 수확시 사용되는 응집제 비용으로 인해 비용 효율 면에서 적절하지 못하며, 2차 오염이 발생하는 등 기존의 미세조류 배양 및 수확기술의 개선이 필수적이다 (Chen et al., 2012). 이에 대한 대안으로써 미세조류를 고농도로 유지할 수 있을 뿐 아니라 효과적인 고액분리가 가능한 MMBR(Microalgal membrane bioreator) 공법에 주목하였다. MMBR은 기존의 PBR(Photo-bioreactor)에 막을 적용한 공법으로, 미세조류의 크기와 사용 목적을 고려하여 다양한 공극 크기의 막이 사용되며, 분리막을 통한 고액 분리 및 미세조류 고농도 농축이 가능하기 때문에 미세조류 수확을 위한 응집제 사용에 대한 문제에서 벗어날 수 있다. 또한, MMBR 내부에 미세조류가 고농도로 존재함에 따라 기존 PBR 공법에 비해 유기물 및 영양염류 제거효율이 향상되는 이점도 있다. 그러나 기존 MBR 공법에서 막 모듈을 장기간 사용함에 따라 오염물질이 막 표면에 축적되어 발생하는 막 오염(fouling) 문제가 MMBR 공법에서도 동일하게 문제가 되고 있어 이에 대한 막 오염 발생 메커니즘 규명이 필수적이다. MMBR 운전 시 발생하는 fouling은 주로 미세조류의 대사산물인 세포 외 고분자 물질(Extracellular Polymeric Substances, EPS)가 큰 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다 (Liu and Fang, 2002).

EPS는 미생물의 대사산물로, 세포 외부로 배출되는 고분자 물질을 의미하며, 일반적으로 구성성분의 70~80% 가량이 다당류 EPS(C-EPS)와 단백질 EPS(P-EPS)로 이루어져 있다 (Houghton et al., 2001). P-EPS는 소수성 아미노산을 함유하고 있어 세포 간 가교작용을 통해 flocc 형성에 직접적으로 관여하며(Lv et al., 2018), MMBR 공법에서 소수성 막과의 점착력을 높여 막 표면 케이크층을 축적시켜 fouling을 가속화시키



는 EPS 성분으로 알려져 있다 (Meng et al., 2009). C-EPS는 친수성으로 주로 점도에 영향을 미치며, P-EPS가 fouling 가속화에 주요하게 기여하기 때문에 fouling 관점에서 P-EPS/C-EPS ratio(P/C ratio)라는 평가인자에 주로 활용된다.

이러한 P-EPS는 질소 섭취에 의해 질소-탄소 대사 경로에 영향을 미쳐 생성되며, 질소원이 부족한 경우에 P-EPS를 기질로서 사용하게 된다 (Fig. 1). P-EPS 뿐만 아니라 Chl-a도 질소원으로 사용하는 것으로 보고된 바 있다. Fig. 2과 같이 Chl-a의 구조를 살펴보면

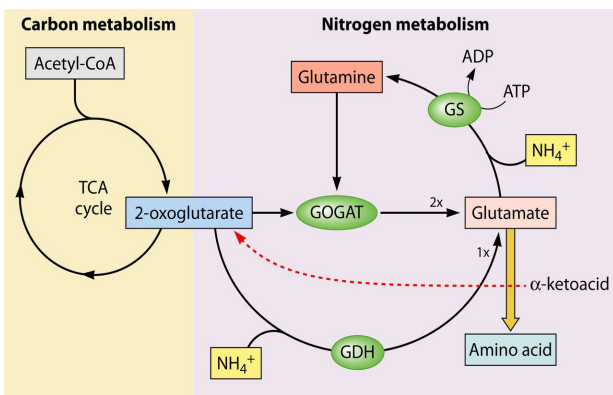


Fig. 1. TCA cycle and nitrogen metabolism (Luciano F. Huergo et al., 2021).

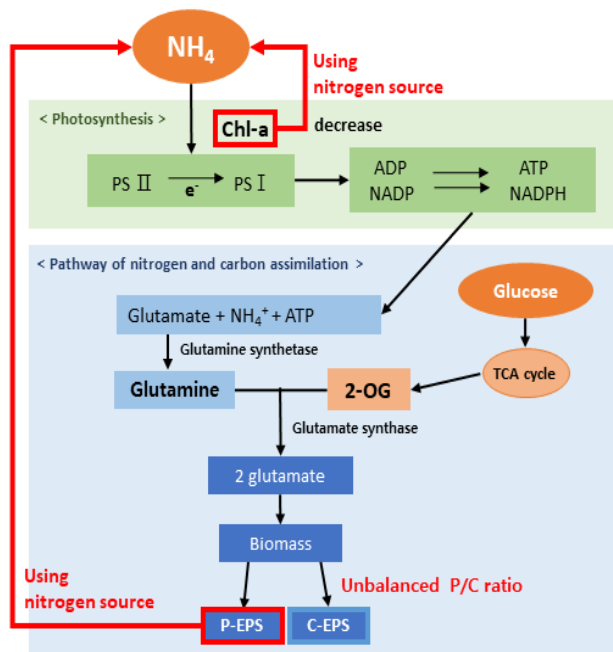


Fig. 2. The main pathway of nitrogen-carbon metabolism and P-EPS, Chl-a formation.

내부에 4개의 질소가 킬레이트 형식으로 결합되어 있는 것을 볼 수 있으며, 질소원이 부족할 때 Chl-a 내부에서 질소원을 보충한다 (Anita et al., 2009).

특히 공정폐수의 유기물 부하는 EPS 생성량 및 성분에 차이를 발생시킬 뿐 아니라 fouling 발생정도에도 영향을 미치기 때문에 유기물 부하와 미세조류의 EPS 발생에 대한 상관관계 분석은 필수적이다. 특히 P-EPS 및 Chl-a 발생은 광합성 대사 및 질소-탄소 대사경로의 영향을 받기 때문에 탄소원 종류 및 질소 농도가 P-EPS 및 Chl-a 발생량에 미치는 영향을 파악할 수 있다. 또한, P-EPS 및 Chl-a가 기질로 활용된다면 fouling이 저감될 것으로 예상하였으며, 질소 농도에 따른 P-EPS 및 Chl-a 소비속도를 비교하여 막 오염 발생 메커니즘을 규명할 수 있을 것으로 기대하였다. 본 연구를 시작하기에 앞서 선행연구를 통해 영양염류 제거능이 우수하며 지질 및 탄수화물 함량이 높아 하폐수처리 및 바이오매스 생산 및 수확 관련 연구에 많이 활용되는 미세조류 *Scenedesmus quadricauda*를 실험에 검토할 미세조류 종으로 선정하였다 (Dasgupta et al., 2018; Kandimalla et al., 2016). 이에 본 연구에서는 MMBR 공법을 이용하여 미세조류 바이오매스 수확 및 공정폐수 자원화를 수행하고자 할 때, MMBR 반응조에 유입되는 탄소원 종류 및 질소 농도에 따른 P-EPS 및 Chl-a 발생량을 검토하여 fouling 주요 유발물질인 P-EPS 및 Chl-a의 발생 특성을 파악하였다.

2. 연구방법

2.1 미세조류 배양

본 연구에서 미세조류 *Scenedesmus quadricauda*는 KCTC에서 분양받아 BG 11의 조성(Table 1)에서 계대배양 및 전배양을 거쳐 고농도로 배양한 후, 본 실험에 사용하였다. BG 11 medium에서는 질소원으로 질산염을 사용하였으나, 본 연구의 공정 폐수 자원화 관점에서 실제 공정폐수에서 대부분을 차지하고 있는 질소원으로써 암모늄을 이용하였다. 또한, 탄소원 종류에 따른 EPS 발생량을 평가하고자 BG-11 조성에 추가적으로 유기탄소원으로 글루코오스를 주입하였고, 무기탄소원으로 중탄산나트륨을 주입하였다.

pp. 379-387

pp. 389-403

pp. 405-415

pp. 417-424

pp. 425-436

pp. 437-454

pp. 455-463

pp. 465-476

pp. 477-487

pp. 489-496

pp. 497-505

pp. 507-516

pp. 517-531

pp. 533-544

Table 1. Composition of modified BG 11 medium for *Scenedesmus quadricauda* culture

Component	Concentration (mg/L)
NH ₄ Cl	115
K ₂ HPO ₄	17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36
Citric Acid·H ₂ O	6
Feric ammonium citrate	6
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494

2.2 실험 장치 및 방법

본 연구에서는 탄소원 종류 및 질소 농도에 따라 발생하는 P-EPS가 fouling에 미치는 영향을 평가하기 위해 유기탄소원이 글루코오스 형태인 OC-MMBR 및 무기탄소원이 중탄산염 형태인 IC-MMBR로 구성된 연속 운전 반응조 2대를 사용하였다 (Fig. 3). 운전 시작 시점부터 10일 간격으로 질소 농도 구간을 다르게 설정하였으며, 총 70일동안 가동하였다. 질소 농도 구간을 충분, 적정, 부족, 고갈로 설정한 이유는 fouling 주요 유발물질로 알려져 있는 P-EPS의 발생량이 질소 농도에 영향을 받는지 확인하기 위함이다. 실제 MMBR system으로 유입되는 질소부하에 따른 P-EPS 발생량이 fouling에 주요한 미치는 영향을 파악하기에 앞서 질소 농도에 따른 P-EPS 발생량을 파악하였다. 샘플링의 경우, 2일 간격으로 1회 샘플링하여 P-EPS, Chl-a, OD, C, N, P 등을 측정하였다.

반응조 상단에는 수위조절기를 설치하여 유출수량과 동일하게 유입수가 지속적으로 주입되도록 하였다. 유출펌프(EMP-2000EN, EMS Tech Co., Korea)의 경우, 프로그램 모드를 사용하여 MMBR system 운전 주기를 Table 2에 제시된 바와 같이 설정하였으며, 주기적인 휴지 및 역세척 등의 유지세정을 통해 막의 성능을 유지하도록 하였다.

또한, 백색광의 Bar LED를 사용하여 120 PPFD의

Table 2. Operation condition for MMBR system

Working volume	5 L (2 set)	
Membrane spec.	Type	CSTR
	Material	PVDF, hollow fiber
	Area	0.03 m ²
	Pore size	0.1 μm
Operation cycle (min)	8 : 0.5 : 1 : 0.5 Filtration : Rest : Backwash : Rest	
Flux	10 LMH	
Aeration	4 L/min	
Light	150 PPFD	
pH	7.5 ± 0.5	
Temp.	25 °C	
OD	1.5 OD	



Fig. 3. Continuous MMBR reactor set-up
(① Flow meter, ② Inlet pump, ③ Pressure gauge, ④ MMBR, ⑤ Outlet pump, ⑥ pH controller).

광도로 24시간 조사하였으며, 동일한 pH는 0.5 N H₂SO₄를 이용하여 약 7.5로 유지시켰다. 반응조의 경우, 가로 18 cm, 세로 10 cm, 높이 48 cm의 아크릴 반응조를 사용했으며 working volume은 약 5 L이다.

2.3 분석방법

2.3.1 EPS 추출 및 분석

(1) EPS 추출

탄소원 종류 및 질소 농도에 따른 EPS 발생량을 확



인하기 위해 미세조류의 시료에서 EPS를 추출하는 과정이 필수적이다. 이러한 EPS는 존재 형태에 따라 미생물의 세포 표면에 부착되어있는 bound EPS(bEPS)와 bEPS에서 떨어져 나오거나 용해, 부유 또는 콜로이드 상태로 존재하는 soluble EPS(sEPS)로 분류된다 (Flemming and Wingender, 2010).

sEPS는 용존된 형태로 존재하기 때문에 주로 여과 또는 원심분리를 통해 고액분리하여 추출하여 여과지(GF/C)로 여과하였다.

bEPS 추출법은 가열을 통해 세포 표면에 부착되어 있는 bEPS를 용출시키는 열처리법을 적용하였으며, 먼저 각 반응조에서 시료를 10 mL 채취하여 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하고 상등액을 폐기하여 용존성 물질을 모두 제거한 후에 증류수를 같은 부피로 채워 재현탁시키고 100°C에서 10분간 열처리하였으며, 이를 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 여과지(GF/C)로 걸러 여액을 bEPS로 하였다. 추출한 sEPS와 bEPS를 정량하여 합친 값을 P-EPS로 하였다.

(2) EPS 분석

EPS의 성분 분석을 위해 P-EPS은 Pierce BCA assay kit(Thermo Fisher Scientific Co., USA)를 이용하여 측정하였다.

하지만 본 실험에서 유기탄소원으로 사용한 glucose가 BCA법에 측정되어 모든 농도구간에 걸쳐 P-sEPS 측정값을 과대평가하는 문제를 유발하였다. 이에 기질로서 주입한 글루코오스를 정량하는데 적합한 SN법을 적용하였다. SN법은 글루코오스와 같은 환원당의 산화능력을 기반으로 하며, 글루코오스 정량방법으로 알려진 DNS법에 비해 민감도가 높아 10~180 mg/L의 저농도 글루코오스를 정량하는데 적합한 시험법이다. 본 실험에 주입한 글루코오스 농도가 100 mg/L 이하인 점을 감안하였을 때 SN법 적용이 적합하다고 판단하였다.

2.3.2 기타 수질분석

(1) OD 측정

미세조류의 성장량을 평가하기 위해 OD 분석을 실시하였다. 미세조류의 OD 분석은 600~800 nm의 다양한 파장대에서 분석이 가능하며, 위 실험에서는 일반적으로 미생물 정량에 사용되는 660 nm 파장대를 이용하였다. OD 측정시 미세조류 시료를 충분히 혼합시

켜 spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys, Korea)를 이용하여 미세조류의 성장량을 측정하였다.

(2) Chl-a 추출 및 분석

탄소원 종류 및 질소 농도에 따른 Chl-a 발생량을 평가하기 위해 수질공정시험기준에 명시된 방법을 이용하여 추출하였다. 추출한 Chl-a 시료를 4500 rpm에서 20분간 원심분리를 거쳐 상등액만 추출하여 흡광도를 750, 663, 645, 630 nm로 측정한다. 측정된 흡광도와 아래의 식을 이용해서 Chl-a를 분석하였다.

$$\text{Chlorophyll-a (mg/L)} = \frac{C_a \times \text{extravolume (L)}}{\text{volume of sample (m}^3\text{)}} \quad (1)$$

$$\text{Ca} = 11.85(\text{OD663}) - 1.54(\text{OD645}) - 0.08(\text{OD630}) \quad (2)$$

(3) 유기탄소 및 무기탄소 분석

*S. quadricauda*의 탄소 소비량을 파악하기 위해 TOC analyzer(TOC-V, SHIMADZU Co., Japan)를 사용하였다.

분석에 사용된 시료로는 0.45 μm 여지(NY045047A, HM, Korea)로 여과한 유입수 및 MMBR 반응조에서 0.1 μm 공극의 막으로 여과된 유출수를 사용하였다.

(4) 질소 및 인 분석

*S. quadricauda*의 질소 및 인 소비량을 평가하기 위해 질소, 인의 분석을 진행하였으며, 특정 파장에서 시료의 흡광도에 따라 농도를 나타내는 분광광도계와 동일한 원리로 측정되는 AA3(AutoAnalyzer 3, SEAL Analytical, Germany)를 이용하여 분석하였다.

3. 결 과

3.1 탄소원 종류 및 질소 농도에 따른 대사특성 및 P-EPS, Chl-a 발생경향

3.1.1 탄소원 종류 및 질소 농도가 성장량 및 P-EPS, Chl-a 발생량에 미치는 영향

본 연구에서 MMBR fouling의 주요 원인물질인 P-EPS의 발생특성 및 질소원으로서의 P-EPS, Chl-a 활용 가능성을 파악하기 위해 탄소원 종류 및 질소 농도에 따른 *S. quadricauda*의 대사 특성 및 P-EPS 및 Chl-a 발생량을 검토하였다. 질소 농도 설정은 *S. quadricauda*

pp. 379-387

pp. 389-403

pp. 405-415

pp. 417-424

pp. 425-436

pp. 437-454

pp. 455-463

pp. 465-476

pp. 477-487

pp. 489-496

pp. 497-505

pp. 507-516

pp. 517-531

pp. 533-544

의 질소 소비속도를 고려하여 질소 충분, 적정, 부족, 고갈로 설정하였으며 자세한 실험조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Experimental condition for MMBR system

Inoculum	Scenedesmus quadricauda		
	Substrate	OC-MMBR	IC-MMBR
Composition of influent	C (mg-C/L)	100	30
	N (mg-N/L)	30	14
		15	7
		5	2.5
		0	0
P (mg-P/L)	3	3	

또한, 공정폐수 자원화 관점에서 유기탄소 기반 공정폐수와 무기탄소 기반 공정폐수가 유입될 때 P-EPS, Chl-a 발생량에 미치는 영향을 확인하기 위해 탄소원 종류별 *S. quadricauda*의 성장량 및 P-EPS, Chl-a 발생량을 파악하여 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

탄소원 종류에 따른 OC-MMBR 및 IC-MMBR에서 P-EPS 및 Chl-a 함량을 비교하였다. 탄소원 관점에서 OC-MMBR에서 전반적으로 P-EPS 함량이 높았다. *S. quadricauda*가 최적으로 성장할 수 있는 질소 적정 구간에서 P-EPS 함량은 OC-MMBR 기준 120 mg-alb/L, IC-MMBR 기준 56 mg-alb/L로 OC-MMBR에서 우세한

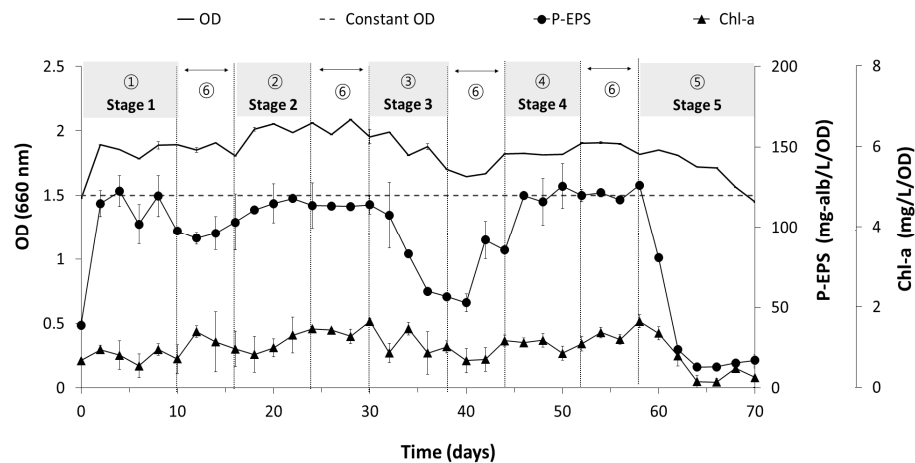


Fig. 4. Effects of nitrogen concentration on P-EPS, Chl-a and OD contents at OC-MMBR (① Suitable nitrogen concentration, ② Sufficient nitrogen concentration, ③ Insufficient nitrogen concentration, ④ Suitable nitrogen concentration, ⑤ Depleted nitrogen concentration, ⑥ Stabilization at suitable nitrogen concentration).

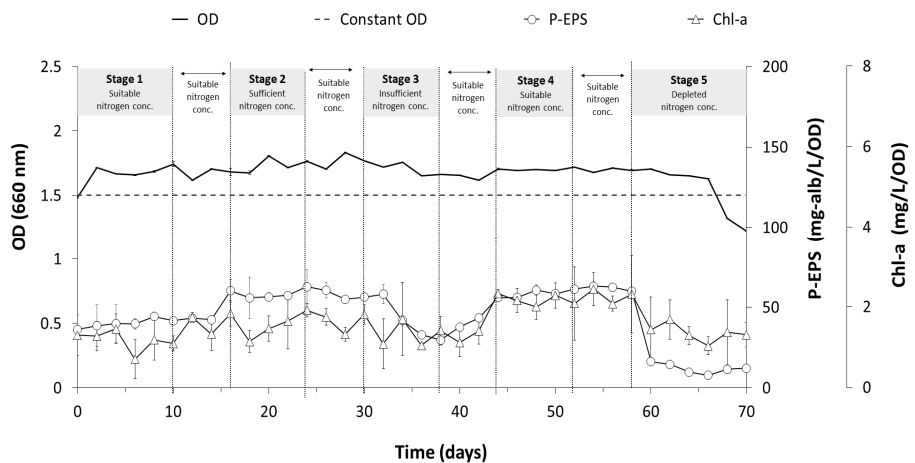


Fig. 5. Effects of nitrogen concentration on P-EPS, Chl-a and OD contents at IC-MMBR (① Suitable nitrogen concentration, ② Sufficient nitrogen concentration, ③ Insufficient nitrogen concentration, ④ Suitable nitrogen concentration, ⑤ Depleted nitrogen concentration, ⑥ Stabilization at suitable nitrogen concentration).



P-EPS 함량 경향을 보였다. Yang et al (2000)에 따르면 미세조류가 광합성에 의해 생성되는 ATP가 주로 세포합성에 활용되는 종속영양 및 혼합영양 대사에 비해 독립영양 대사에서는 산화적 인산화 과정 및 암반응에서 CO₂를 유기물로 고정하는데 77% 가량이 사용되기 때문에 상대적으로 대사효율이 낮다고 언급한 바 있다. 또한, EPS 발생량이 탄소원에 기인한다고 보았을 때, 탄소원이 유기탄소인 종속영양 및 혼합영양 대사가 EPS를 더 많이 생산한다는 연구결과와 일치하는 경향을 보인다 (Babaci et al., 2018). 탄소원 종류에 따른 Chl-a 함량은 유의한 차이가 없었으며, 이는 탄소원 관점에서 유기물을 합성해 에너지를 얻는 혼합영양 대사가 독립영양 대사보다 빛에 대한 의존도가 적기 때문에 Chl-a 함량이 감소한다는 문헌내용과 일치한다 (Da Silva Ferreira and Sant'Anna, 2017). 질소적정 및 질소충분 구간의 경우, 외부질소원이 유입되어 미세조류가 정상적으로 질소-탄소 대사경로를 통해 P-EPS 및 Chl-a를 생성하는 조건이다. 질소부족 및 질소고갈 구간의 경우, 외부 질소원이 부족하거나 없는 조건으로, P-EPS 및 Chl-a를 질소원으로 이용할 것으로 판단되는 조건이다. 질소적정 구간의 경우, OC-MMBR 기준 101 mg-P-EPS/L/OD, 1 mg-Chl-a/L/OD 함량으로 P-EPS 및 Chl-a의 발생경향을 확인하였다. 질소충분 구간의 경우, 110 mg-P-EPS/L/OD, 1.2 mg-Chl-a/L/OD 함량으로 질소적정 구간과 유의한 차이가 없는 P-EPS 및 Chl-a 함량을 보였다. 이는 2배 낮은 발생경향을 보였던 IC-MMBR에서도 비슷한 수준의 경향을 확인하였다 (Fig. 5). 이는 미세조류가 정상적인 질소대사가 가능할 때, 광합성 및 질소-탄소 대사경로에 의해 성장 및 P-EPS, Chl-a를 생성한 것으로 사료된다. 질소부족 구간의 경우, OC-MMBR 기준 초기 114 mg-P-EPS/L/OD에서 8일 경과시 56.6 mg-P-EPS/L/OD으로 감소하는 경향을 보였다. 이는 IC-MMBR에서도 동일하게 초기 56 mg-P-EPS/L/OD에서 8일 경과 시 30 mg-P-EPS/L/OD으로 감소하는 경향을 확인하였다. Chl-a 함량에서도 P-EPS보다는 미비한 함량이지만 동일한 경향을 확인할 수 있었다. 질소고갈 구간은 외부질소원의 유입이 없는 조건으로 OC-MMBR 기준 초기 126mg-P-EPS/L/OD에서 8일 경과시 17 mg-P-EPS/L/OD으로 감소하는 경향을 보였다. 이는 질소부족 구간의 경향보다 약 3배 빠른 속도로 P-EPS를 소비하였다. 이는 질소원을 외부 질소원 및 내부질소원 모두를 사용할 수 있는 질소부

족 구간과 달리, 내부질소원으로만 대사를 수행하는 질소고갈 조건이 높은 P-EPS 소비속도를 보였다고 할 수 있다. 이러한 경향은 IC-MMBR에서도 유사하였다. 이러한 P-EPS 및 Chl-a 함량 변화는 EPS 발생기작인 탄소-질소 대사 경로와 밀접한 관련이 있다. 질소-탄소 대사경로에 의해 바이오매스 및 EPS 합성하는 일련의 과정이 이루어지며(Flemming and Wingender, 2010), 이를 질소 소비에 따른 광합성 및 질소-탄소 대사에 미치는 영향에 대한 모식도를 통해 P-EPS 및 Chl-a를 질소원으로써 사용하는 전반적인 흐름을 파악할 수 있다 (Fig. 1).

선행연구에 의하면 미세조류가 생산한 EPS는 기질이 부족한 경우에 EPS를 기질원으로써 사용한다고 보고된 바 있다. 이중에서 P-EPS는 질소 섭취에 의한 영향을 받으며, 세포 외부 기질원으로서 질소가 고갈되면 미세조류 세포 내 P-EPS 및 Chl-a를 질소원으로서 이용한다고 알려져 있다 (Li et al., 2008; Xiao and Zheng, 2016). 본 실험에서 질소부족 및 질소고갈 구간에서 P-EPS와 Chl-a 발생량 감소 경향은 P-EPS와 Chl-a 질소원으로 사용함에 의한 결과로 판단된다.

3.1.2 탄소원 종류 및 질소 농도가 MMBR 처리수질에 미치는 영향

공정폐수 자원화를 염두에 둔 MMBR 운전에서 유입수 부하가 처리수질에 어떤 영향을 미치는지 파악하기 위해 OC-MMBR 및 IC-MMBR에서 질소 농도에 따른 *S. quadricauda*의 수처리 효율을 파악하여 Fig. 6와 Fig. 7에 나타내었다.

탄소원 종류 관점에서 질소충분 및 적정구간은 외부질소원이 유입되어 미세조류가 정상적인 질소대사를 수행할 수 있는 조건으로, OC-MMBR 기준 약 492 mg-C, IC-MMBR 기준 약 146 mg-C의 탄소가 소비되었으며, 예상대로 OC-MMBR에서 우세한 탄소 소비량을 보였다 (Fig. 6). 이는 탄소원 대사 관점에서 독립영양 대사시 미세조류 세포합성에 이용되는 ATP가 혼합영양 대사에 비해 낮기 때문에(Yang et al., 2000) 상대적으로 IC-MMBR의 대사효율이 낮은 것으로 판단된다. 또한, 주된 에너지원이 빛인 독립영양 대사의 경우, 동일 광도에서 미세조류의 생물량이 증가할수록 상대적으로 광원으로부터 멀어진 안쪽의 미세조류에 도달되는 광량이 낮아지는 self-shading effect에 의해 광저해를 받아 IC-MMBR의 대사효율이 상대적으로

pp. 379-387
pp. 389-403
pp. 405-415
pp. 417-424
pp. 425-436
pp. 437-454
pp. 455-463
pp. 465-476
pp. 477-487
pp. 489-496
pp. 497-505
pp. 507-516
pp. 517-531
pp. 533-544

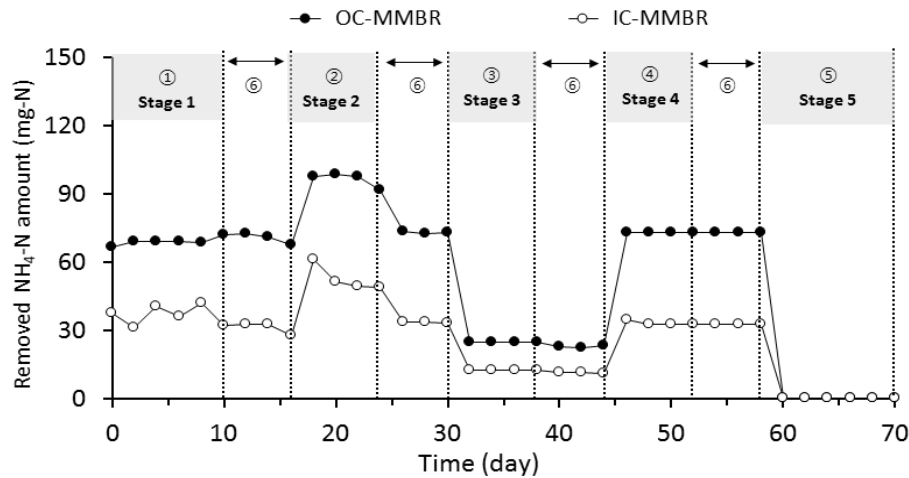


Fig. 6. Effects of nitrogen concentration on amount of removed Carbon at OC-MMBR and IC-MMBR (① Suitable nitrogen concentration, ② Sufficient nitrogen concentration, ③ Insufficient nitrogen concentration, ④ Suitable nitrogen concentration, ⑤ Depleted nitrogen concentration, ⑥ Stabilization at suitable nitrogen concentration).

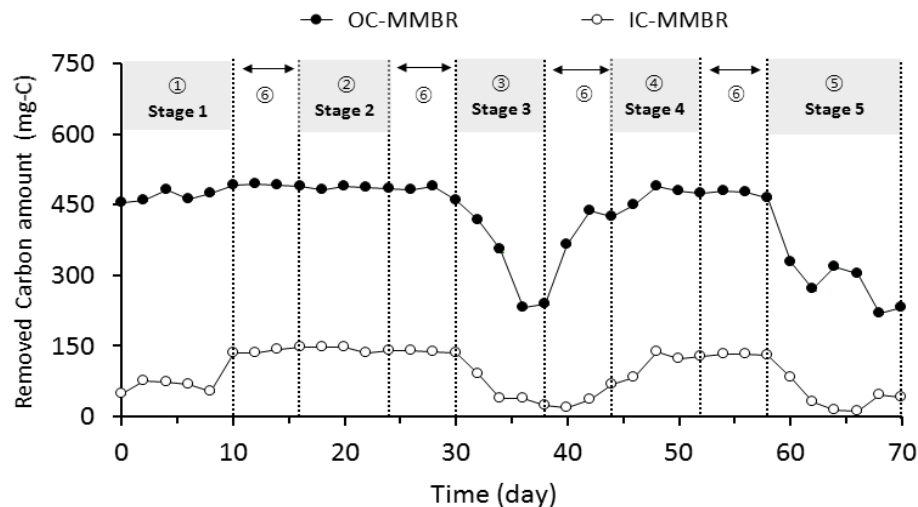


Fig. 7. Effects of nitrogen concentration on amount of removed NH₄-N at OC-MMBR and IC-MMBR (① Suitable nitrogen concentration, ② Sufficient nitrogen concentration, ③ Insufficient nitrogen concentration, ④ Suitable nitrogen concentration, ⑤ Depleted nitrogen concentration, ⑥ Stabilization at suitable nitrogen concentration).

떨어져 낮은 탄소 소비량을 보인 것으로 사료된다. 질소 농도에 따른 탄소 소비량 경향은 질소부족 및 고갈조건에서 탄소 소비량을 감소시키는 데 영향을 미쳤다. 외부질소원이 정상적으로 유입되는 질소적정 및 충분조건에 비해 질소부족 및 고갈 구간의 탄소소비량이 절반 이하로 감소한 것을 확인할 수 있다. 이는 질소의 부재가 질소-탄소 대사경로에 영향을 미쳐 탄소 소비량을 감소시킨 것을 확인하였다.

탄소원 종류 관점에서 질소 제거량은 질소적정 구간

에서 OC-MMBR 기준 약 71.5 mg-N, IC-MMBR 기준 약 33.8 mg-N로 질소충분 구간이 적정 구간보다 약 1.2 배 높은 질소 제거량을 보였다 (Fig. 7). 질소부족 및 고갈구간에서 질소 제거량은 P-EPS 및 Chl-a가 질소원으로 활용됨에 따라 성장량 저해가 발생하였다. 이는 성장에 필요한 질소원을 미세조류 체내의 P-EPS 및 Chl-a에서 활용하여 대사를 수행했지만 정상적으로 질소가 유입된 조건에 비해 대사효율이 떨어지기 때문에 낮은 질소 제거량을 보인 것으로 판단하였다.



3.2 대체 질소원으로서의 P-EPS 및 Chl-a 소비특성

P-EPS 및 Chl-a는 질소 섭취에 의해 생성되며, 질소가 부족하거나 고갈되었을 때, 대체 질소원으로 활용하여 대사하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 Fig. 4와 Fig. 5에서 도출한 P-EPS 및 Chl-a 발생량을 토대로 질소부족 및 고갈 조건에서 P-EPS 및 Chl-a의 소비속도를 비교하여 질소 농도가 대체 질소원 소비속도에 미치는 영향을 확인하였다.

질소부족 구간에서 OC-MMBR, IC-MMBR 조건에서의 P-EPS 소비속도는 각각 초기 60 mg-P-EPS/L/OD/day, 27.3 mg-P-EPS/L/OD/day에서 최종적으로 31.6 mg-P-EPS/L/OD/day, 18.1 mg-P-EPS/L/OD/day로 계산되었다 (Fig. 8). 질소고갈 구간의 경우, 질소유입이 없는 초기 2일차까지 OC-MMBR 기준 69~85.9 mg-P-EPS/L/OD/day, IC-MMBR 기준 51.8 mg-P-EPS/L/OD/day의 급격한 소비속도를 보였으며, 이때 대부분의 P-EPS가 전량 소비되었다. 질소부족 구간에 비해 질소고갈 구간에서 초기 우세한 P-EPS 소비속도를 나타내는 것으로 보아 미세조류 체내에서 질소원을 보충받는 질소고갈 구간이 정상적인 대사를 수행하기 위해 질소원으로서 더 많은 P-EPS를 활용한 것으로 판단되었다.

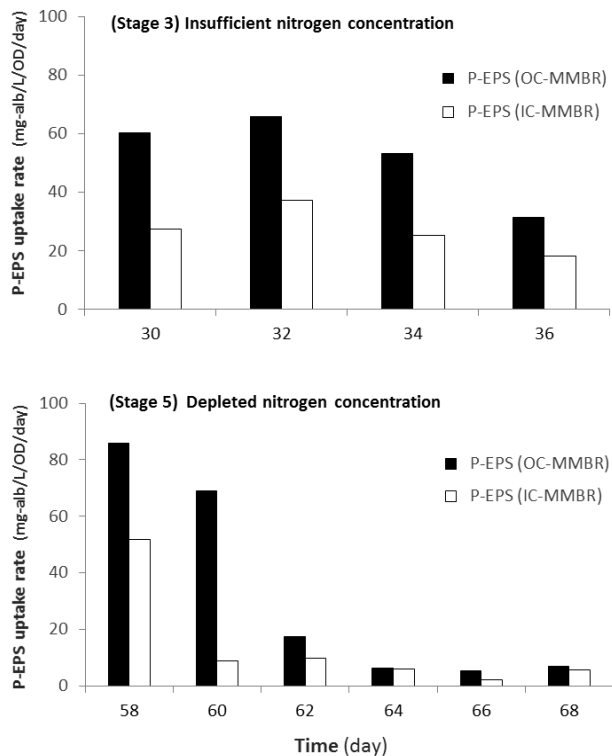


Fig. 8. P-EPS uptake rate as nitrogen source at OC-MMBR and IC-MMBR.

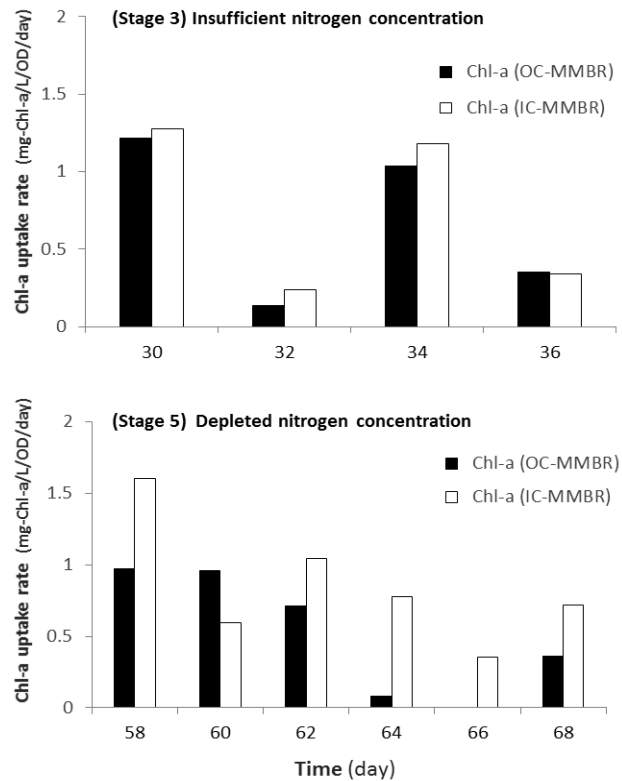


Fig. 9. Chl-a uptake rate as nitrogen source at OC-MMBR and IC-MMBR.

Chl-a 소비속도의 경우, 질소부족 구간에서 OC-MMBR 기준 초기 1.2 mg-Chl-a/L/OD/day, IC-MMBR 기준 1.3 mg-Chl-a/L/OD/day에서 최종적으로 0.35 mg-Chl-a/L/OD/day, 0.34 mg-Chl-a/L/OD/day로 유사한 값이 도출되었다 (Fig. 9). 질소고갈 구간에서의 Chl-a 소비속도도 유사한 경향을 보이며, P-EPS 소비속도 경향에 비해 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 이는 발생량 관점에서 P-EPS 함량에 비해 Chl-a 함량이 현저히 적기 때문에 질소원으로서의 P-EPS를 우선적으로 활용하여 더 빠른 소비속도를 보인 것으로 판단하였다. 따라서 질소부족 및 고갈구간에서 P-EPS와 Chl-a를 질소원으로 사용하였으며, 이 조건의 경우 미세조류 바이오매스 합성이 중요한 질소원이 비정상적으로 부족하거나 고갈되어 있는 조건이기 때문에 미세조류 체내의 P-EPS 및 Chl-a를 활용하여 성장할 수는 있지만 대사효율이 외부 질소원이 주입된 조건에 비해 현저히 떨어질 수밖에 없다고 판단하였다. 질소원으로서 P-EPS 및 Chl-a 소비속도가 *S. quadricauda*의 성장량에 미치는 영향은 Fig. 4, Fig. 5에서 확인할 수 있다. 질소부족 조건의 경우, P-EPS 및 Chl-a를 질소원으로 활용함에

pp. 379-387
pp. 389-403
pp. 405-415
pp. 417-424
pp. 425-436
pp. 437-454
pp. 455-463
pp. 465-476
pp. 477-487
pp. 489-496
pp. 497-505
pp. 507-516
pp. 517-531
pp. 533-544

도 불구하고 운전기간에 따라 비성장속도가 계속해서 감소하는 경향을 보였으며, 질소고갈 구간의 경우, 더 급격한 P-EPS 및 Chl-a 소비로 인해 질소원을 보충받을 수 없는 상황이 되자 운전 7일차 이후로 *S. quadricauda*가 사멸에 가까운 수준으로 생물량이 점차 감소하는 경향을 확인하였다.

따라서, 질소부족 및 질소고갈 구간에서는 질소충분 및 적정 구간에 비해 낮지만 성장량을 보였으며, 이는 성장에 필요한 질소원을 Chl-a와 P-EPS 등 미세조류 내부에서 이용한 것으로 판단하였다.

4. 결 론

본 연구를 통해 MMBR 공법에 있어 유입수의 질소 농도가 높을수록 P-EPS 및 Chl-a 발생량이 증가시키는데 기여하는 것을 확인하였으며, 질소가 부족하거나 고갈된 조건에서 실험초기 P-EPS 및 Chl-a 소비속도가 증가하는 결과를 얻어 대체 질소원으로 P-EPS, Chl-a를 활용하는 것을 실험적으로 확인하였다. 질소가 부족한 경우보다 고갈된 경우에서 P-EPS 및 Chl-a 소비속도가 약 1.5배 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 질소고갈 조건에서 대체 질소원으로 활용할 수 있는 성분이 미세조류 체내의 P-EPS 및 Chl-a이기 때문이었다. Chl-a 소비속도의 경우, 질소부족 및 고갈 조건 간의 유의한 차이가 없었으나, Chl-a 함량이 감소하는 경향을 통해 질소원으로 활용하는 것을 확인하였다.

즉, 공정폐수 내 유기물 부하에 따른 질소부족 및 고갈구간에서 P-EPS 및 Chl-a가 질소원으로 질소-탄소 대사경로에 활용되는 것을 확인하였다. 하지만 질소부족 및 고갈 조건은 미세조류가 정상적으로 대사하기 어려운 비정상적인 조건이기 때문에 미세조류 바이오매스 수확의 관점에서는 적합하지 않은 상충조건이라고 판단하였다. 향후, 질소부족 및 고갈에 따른 P-EPS, Chl-a 발생량 감소가 실제 MMBR fouling 저감에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

사 사

이 논문은 2019년도 정부(미래창조과학부)의 재원

으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며 (NRF-2019R1A2C1084155) 이에 감사드립니다.

References

- Arbib, Z., Ruiz, J., Diaz, P.A., Perez, C.G., and Perales, J.A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production, *Water Res.*, 465-474.
- Babaei, A., Mehrnia, M., Shayegan, J., and Sarrafzadeh, M.H. (2018). Evaluation of nutrient removal and biomass production through mixotrophic, heterotrophic, and photoautotrophic cultivation of chlorella in nitrate and ammonium wastewater, *Int. J. Environ. Res.*, 12, 167-178.
- Chen, X., Huang, C. and Liu, T. (2012). Harvesting of microalgae *Scenedesmus* sp. using polyvinylidene fluoride microfiltration membrane, *Desalination Water Treat.*, 45, 177-181.
- Da Silva, A.F., Lourenco, S.O. and Chaloub, R.M. (2009). Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp., *Aquat. Bot.*, 91(4), 291-297.
- Da Silva Ferreira, V. and Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 20.
- Dasgupta, C.N., Nayaka, S., Toppo, K., Singh, A.K., Deshpande, U. and Mohapatra, A. (2018). Draft genome sequence and detailed characterization of biofuel production by oleaginous microalga *Scenedesmus quadricauda* LWG002611, *Biotechnol. Biofuels*, 11, 308.
- Flemming, H.C. and J. Wingender, J. (2010). The Biofilm Matrix, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9), 623-33.
- Houghton, J.I., Quarmby, J. and T. Stephenson, T. (2001). Municipal wastewater sludge dewaterability and the presence of microbial extracellular polymer, *Water Sci. Technol.*, 44(2-3), 373-9.
- Kandimalla, P., Desi, S. and Vurimindi, H. (2016). Mixotrophic cultivation of microalgae using industrial flue gases for biodiesel production, *Environ. Sci. Pollut.*, 23, 9345-9354.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., Hu, Q., and Xu, J. (2014). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae, *Plant Cell*, 26(4), 1645-1665.



- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. and Lan, C.Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 629-636.
- Liu, H. and Fang, H.P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *J. Biotechnol.*, 95(3), 249-256.
- Luo, Y., Henderson, R.K., and Le-Clech, P. (2019). Characterisation of organic matter in membrane photobioreactors (MPBRs) and its impact on membrane performance, *Algal Res.*, 44, 101682.
- Ly, J., Liu, Y., Feng, J., Liu, Q. Nan, F. and Xie, S. (2018). Nutrients removal from undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment, *Bioresour. Technol.*, 264, 311-318.
- Meng, F. Chae, S.R. Drews, A. Kraume, M. Shin, H.S. and Yang, F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material, *Water Res.*, 43(6), 1489-1512.
- Ministry of Environment. (2017). Generation and treatment of industrial wastewater, 11-1480000-001452-10.
- Xiao, R. and Y. Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications, *Biotechnol. Adv.*, 34, 1225-1244.
- Yang, C., Hua, Q., and K. Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions, *Biochem. Eng. J.*, 6(2), 87-102.

pp. 379-387

pp. 389-403

pp. 405-415

pp. 417-424

pp. 425-436

pp. 437-454

pp. 455-463

pp. 465-476

pp. 477-487

pp. 489-496

pp. 497-505

pp. 507-516

pp. 517-531

pp. 533-544