ISSN 1226-9999 (print)
ISSN 2287-7851 (online)

Korean J. Environ. Biol. 32(1) : 58~67 (2014) http://dx.doi.org/10.11626/KJEB.2014.32.1.058

폐수를 이용한 겨울철 경제적 미세조류 배양 시스템의 개발

이상아[1,2] · 이창수[1] · 이승훈[1] · 안광국[2] · 오희목[1] · 김희식[1] · 안치용[1,*]

[1]한국생명공학연구원 환경바이오연구센터, [2]충남대학교 시스템생명과학부

Development of Economic Culture System Using Wastewater for Microalgae in Winter Season

Sang-Ah Lee[1,2], Changsoo Lee[1], Seung-Hoon Lee[1], Kwang-Guk An[2], Hee-Mock Oh[1], Hee-Sik Kim[1] and Chi-Yong Ahn[1,*]

[1]*Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea*
[2]*Department of Biological Science, School of Biological Sciences and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

Abstract - The outdoor mass cultivation is not possible for microalgae in Korea all year round, due to cold winter season. It is not easy to maintain proper level of productivity of microalgae even in winter. To prevent a drastic decrease of temperature in a greenhouse, two layers were covered additionally, inside the original plastic layer of the greenhouse. The middle layer was made up of plastic and the inner layer, of non-woven fabric. Acrylic transparent bioreactors were constructed to get more sunlight, not only from the upper side but also from the lateral and bottom directions. In winter at freezing temperatures, six different culture conditions were compared in the triply covered, insulated greenhouse. Wastewater after anaerobic digestion was used for the cultivation of microalgae to minimize the production cost. Water temperature in the bioreactors remained above 10°C on average, even without any external heating system, proving that the triple-layered greenhouse is effective in keeping heat. Algal biomass reached to 0.37g L^{-1} with the highest temperature, in the experimental group of light-reflection board at the bottom, with nitrogen and phosphorus removal rate of 92% and 99%, respectively. When fatty acid composition was analyzed using gas-chromatography, linoleate (C18 : 3n3) occupied the highest proportion up to 61%, in the all experiment groups. Chemical oxygen demand (COD), however, did not decrease during the cultivation, but rather increased. Although the algal biomass productivity was not comparable to warm seasons, it was possible to maintain water temperature for algae cultivation even in the coldest season, at the minimum cost.

Key words : biodiesel, microalgae, triple-layered greenhouse, winter cultivation

* Corresponding author: Chi-Yong Ahn, Tel. 042-860-4329, Fax. 042-879-8103, E-mail. cyahn@kribb.re.kr

ⓒ 2014. Korean Society of Environmental Biology.

서 론

현재 전 세계적으로 에너지 위기 시대를 맞이하고 있는 상황에서 에너지부족에 대비하여 바이오디젤 생산의 원료로서의 미세조류는 많은 이점을 가진다. 미세조류가 대체 에너지자원으로서 각광받는 이유는 다른 오일추출 식물자원들에 비해 더 높은 광합성율을 가지고, 바이오매스 생산이 월등히 높으며, 성장이 다른 작물보다 빠르기 때문이다(Chisti 2007). 또한 1 kg의 미세조류 바이오매스 생산에 필요한 이산화탄소량은 1.83 kg이며, 1 kg의 미세조류 기반 바이오디젤 생산에는 3,726 kg의 물과 0.33 kg의 질소, 0.71 kg의 인산을 필요로 한다(Yang *et al*. 2011). 에너지 위기와 더불어 인구의 증가는 자연환경에 심각한 영향을 줄 수 있다. 인간들이 매일 같이 배출해 내는 많은 양의 폐수에는 환경에 심각한 영향을 미칠 가능성이 있는 유기물과 무기물이 많이 농축되어 있다. 따라서, 환경에 미칠 부하를 경감시켜 주기 위한 적절한 폐수처리 시스템이 필요하다. 하지만 이를 물리적, 화학적으로 제거하기 위해서는 많은 비용이 들어 갈 수 밖에 없다(Graham and Wilcox 2000). 이를 해결하기 위해 폐수를 영양원으로 하여 성장 가능한 미세조류 배양 시스템을 구축하려는 노력이 진행되어 왔고, 수처리와 병행하여 바이오디젤 생산을 최대화하는 많은 연구가 이루어지고 있다(Olguin 2012; Zhou *et al*. 2012; Batten *et al*. 2013).

생활폐수를 이용하여 미세조류를 인공수조에 배양하는 방법은 이미 잘 정립되어 있다(Oswald 2003). 대한민국은 사계절이 뚜렷한 나라로 각 계절별로 다양한 기상조건을 가지며, 특히 겨울철에는 영하권의 기온으로 미세조류가 성장하기에 적합하지 않다. 기상청자료에 따르면 우리나라 대전지방은 지난 30년 동안 겨울철 기온이 평균 12월, 1월, 2월에 각각 1.2°C, −1.0°C, 1.5°C였다. 하지만 겨울철 추운 날씨에도 바이오디젤의 공급원료로서의 미세조류 배양을 적은 비용으로 이루어 낸다면, 차세대 대체에너지 생산에 많은 도움이 될 것이다. 본 연구에서는 겨울철 적은 비용으로 미세조류 바이오매스 향상을 위한 연구를 수행하였다. 사실상, 인위적인 수처리를 하기 위해서는 막대한 양의 비용과 에너지가 요구된다. 하지만 본 연구를 통해 적은 비용이 들어가는 폐수처리 공정을 운용함으로써 미세조류 바이오매스를 부산물로 얻게 되어, 미세조류 생산 자체에는 비용이 들지 않아 바이오디젤 생산의 경제성을 제고할 수 있다. 더욱이, 미세조류 성장에 적절치 않은 기후조건을 가지는 우리나라에서 겨울철에도 적은 비용으로 높은 미세조류 배양을 이루어 낸다면, 차세대 바이오매스 향상에 많은 연구들이 발전 할 수 있는 계기가 될 것이다.

따라서 본 연구는 다양한 예비 실험을 통해 겨울철 미세조류 성장에 적합한 조건을 가지고, 겨울철 폐수에서 자생하는 자생 미세조류 종을 이용하여 회분식 배양을 실시하였다. 그 결과, 차세대 연료를 위한 미세조류 바이오매스 생산을 영하의 환경조건에서 고가의 설비비용 없이 가능하게 하였으며, 미세조류 배양을 통한 수처리도 가능함을 밝혔다. 앞으로 더 많은 연구를 통해 바이오매스 향상과 더불어 수처리 효율 향상을 위해 최적의 미세조류 배양방법 개발이 필요하다.

재료 및 방법

1. 배양 시스템

본 연구는 대전광역시시설관리공단에 설치된 비닐하우스 내에서 수행되었다. 비닐하우스는 겨울철 온도 유지를 위해 3중으로 제작하였으며, 내막에는 단열 효과가 비닐보다 뛰어난 부직포를 사용하였다. 낮 동안에는 태양광의 이용성을 높이기 위하여 내막과 중간막을 열어 놓았으며, 밤에는 열기의 유지를 위해 두 막을 닫아 놓았다. 내막과 중간막은 배양시작일로부터 오전 08:00부터 오후 05:30분까지 개방하고, 그 이후의 시간은 닫아 놓았다. 실험에 사용된 배양기는 지름 100 cm, 길이 200 cm의 반원기둥 모양의 투명한 아크릴 재질 수조로 제작되었다(Fig. 1). 투명한 아크릴을 사용함으로써 배양액의

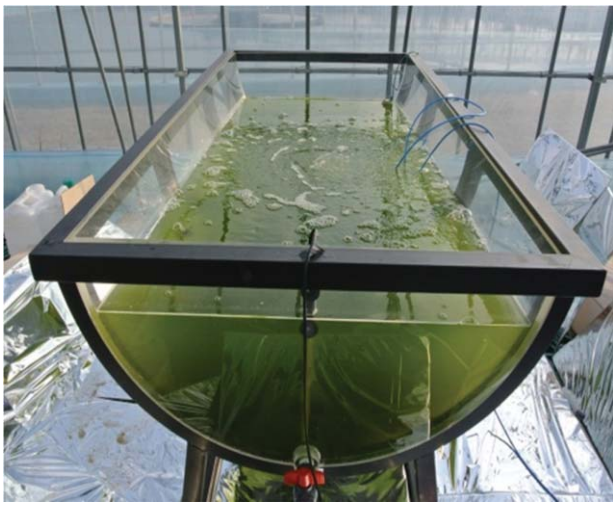

Fig. 1. Acrylic transparent bioreactor system.

Table 1. Comparison of experimental group conditions

	HL1	HL2	H0	H1	H2	HC
Highest light intensity (cloudy-sunny, μmol m^{-2} s^{-1})	170～1150	250～1691	58～390	58～390	58～390	58～390
Reflection film	–	*	–	–	–	–
Number of heaters	1	1	0	1	2	1
1% CO_2	–	–	–	–	–	*

*: treatment, –: non-treatment

상향에서 뿐만 아니라, 아래쪽에서도 광을 받을 수 있게 하여 광이용성을 최대화하였다. 거치대를 이용하여 투명한 배양조를 바닥으로부터 약 50 cm 띄어 놓았으며, 한 실험구에 대해서는 바닥에 농업용 반사필름을 설치하여 투명한 아크릴수조의 바닥 면에서도 빛을 추가로 더 받을 수 있도록 하였다. 총 용량은 785 L이며, 운전용량은 500 L로 실시하였다. 이 때 조류 배양배지로 이용된 폐수는 혐기성 소화조 처리수였으며, 최종방류수를 이용하여 10% (v/v)로 희석하여 사용하였다. 최초 처리수의 pH는 8.4였다. 각기 다른 조건 (Table 1)의 6개 실험구로 회분배양 실험을 하였다. HL1 (high-light), HL2 (high-light+반사필름), H0 (0 heater), H1 (1 heater), H2 (2 heaters), HC (1 heater+CO_2 1%)의 실험구를 설계하였다. 각 실험구별 광량은 HL2를 기준으로 HL1과 나머지 4개의 실험구 H0, H1, H2, HC가 각각 HL2의 68%, 23%였다. 수온의 변화로 인한 차이를 관찰하기 위하여 250 W 대형수조용 히터 (EHEIM JAGER Aquarium Heater, Ampet, Germany)를 설치하였다. 총 배양 기간은 21일이었고, 매일 14:00시에 각 수조의 온도, pH, DO를 측정하였으며, 샘플링 간격은 3일로 하였다. 태양광만을 광원으로 사용하였고, 자연광주기에 맞추어 명암주기를 주었다.

2. 미세조류 접종

실험에 사용된 미세조류 종은 특정 종을 분리, 배양하여 접종하지 않고, 겨울철에도 성장이 가능한 최적의 종을 찾기 위한 목적으로 최종 방류수에서 겨울철 자생하는 자생종을 접종하였다. 접종한 미세조류는 여러 종이 혼합된 상태였으며, 영하의 온도에서 완전히 동결되었다가 녹은 시료에서 채취하여 저온환경에서 살아 남을 가능성이 높은 것으로 판단하였다. 배양 초기에는 다양한 종이 혼합된 상태였으나, 배양이 진행되면서 각각의 서로 다른 실험구 조건에서 우점하는 종이 달라짐을 보여주었다.

3. 수질분석

수질분석은 시료를 glass microfiber filter (GF/C, WHATMAN 25 mm, cat. No. 1822-047)를 이용하여 배양액 안에 들어 있는 고체물질과 미세조류 세포를 여과한 후 총용존질소 (TDN), 총용존인 (TDP), 용존화학적산소요구량 (SCOD)을 측정하였다. 수질분석은 standard method를 이용하여 분석하였다 (APHA 1998). 또한 H1 실험구와 HC 실험구에 다항목수질분석기 (Multi 3420, WTW, Germany)를 설치하여 배양기간 동안 한 시간 간격으로 pH와 DO, 수온을 측정하였다. 다른 실험구에는 매일 14:00에 pH, 수온을 측정하고, 6개 실험구에 최고최저온도계 (D.K, Korea)를 설치하여 그날의 최고수온과 최저수온을 기록하였다.

4. 미세조류 생장측정

미세조류의 생장은 엽록소-*a*와 건조중량으로 측정하였다. 엽록소-*a*는 아세톤 추출방법으로 추출하였고, 측정파장은 750 nm, 664 nm, 647 nm, 630 nm로 측정하였다 (Jeffrey and Humphrey 1975). 시료 10 mL을 0.45 μm 공극의 필터를 이용하여 미세조류 세포를 여과하고, 그 필터에 아세톤 10 mL을 첨가한 후 4°C 암조건에서 over night 추출하였다. 이후, 분광광도계 (UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 엽록소-*a*를 정량하였다. 건조중량은 실험구에서 배양액 10 mL을 공극 0.45 μm인 필터로 여과한 후, 여과된 필터를 105°C 건조기에서 24시간 건조하여 필터 전 후의 무게차이를 이용하여 건조중량을 계산하였다.

5. 지방산분석

배양액 6 mL을 원심분리하여 1 mL의 R#1 용액을 넣고 saponification 시켰다. R#2 용액을 넣고 80°C에서 10분간 반응시키고 얼음에 넣어 온도를 빠르게 낮추어 주었다. 그 후, 1.25 mL의 R#3 용액을 넣고 10분간 위아래로 도치시켜 주고 하등액을 제거해 주었다. 마지막으로 3 mL의 R#4 용액을 넣고 5분간 inverting시켜 주고 top phase를 hypodermic 0.22 μm PVDF syringe filter (Millex-GV, Millipore, USA)를 이용하여 거르고, Gas Chromato-

Table 2. FAME extraction solvent component

R#1	R#2	R#3	R#4
sodium hydroxide (45 g) methanol (150 mL) deionized distilled water (150 mL)	6.00 N hydrochloric acid (325 mL) methanol (275 mL)	hexane (200 mL) methyl *tert*-butyl ether (200 mL)	sodium hydroxide (10.8 g) deionized distilled water (900 mL)

Table 3. Maximum and minimum average temperatures for each experimental group

	HL1	HL2	H0	H1	H2	HC	Outside temp.
Minimum temp. (˚C)	11.4	15.5	6.0	10.8	12.1	8.6	−5.0
Maximum temp. (˚C)	19.7	25.9	12.7	16.4	21.1	18.2	3.5

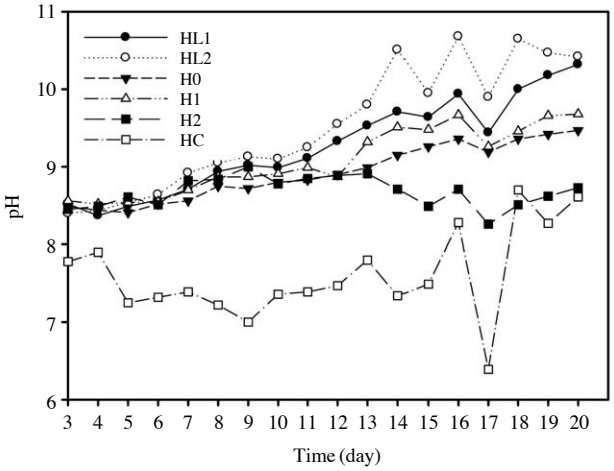

Fig. 2. pH change for each experimental group during the cultivation period.

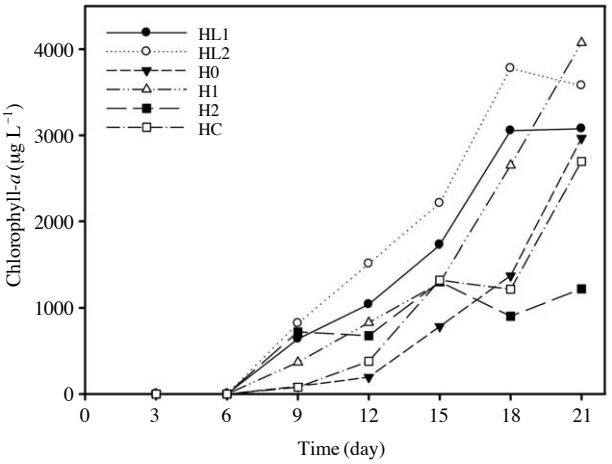

Fig. 3. Chlorophyll-*a* concentration change for each experimental group during the cultivation period.

graphy (GC-2010, Shimadzu, Japan)을 사용하여 분석을 실시하였다(Lepage and Roy 1984). Reaction 용액의 자세한 정보는 Table 2에 명시하였다.

결 과

1. 비닐하우스 삼중막의 효과

비닐하우스를 삼중으로 설치를 하고 실험기간 동안 배양액의 수온을 측정한 결과, 외기의 기온이 최저평균 −5.0˚C, 최고평균 3.5˚C이었던 데 비해, 히터를 설치하지 않아 가장 수온이 낮았던 실험구의 경우에도 수온은 최저평균 6˚C, 최고평균 12˚C를 유지하였다(Table 3). 이는 외기보다 평균 10˚C 정도 높은 온도상승 효과로서 삼중막 설치만으로도 상당한 보온 효과를 얻을 수 있음을 보여주었다. 그리고 고광도 조건에 반사필름을 설치한 HL2 실험구(히터 1개)는 최저평균 15.5˚C, 최고평균 25.9˚C로 가장 높은 온도를 보여주었으며, 두 개의 히터를 사용한 H2 실험구에 비해서도 3˚C 이상의 온도상승 효과가 있었다. 각 실험구별 pH의 변화를 보면, 이산화탄소를 1%로 공급한 HC 실험구에서만 7~8범위로 유지되고, 다른 실험구에서는 미세조류가 성장하면서 pH가 점점 증가하였다(Fig. 2). pH의 상승 정도는 미세조류의 성장과 대체로 비례 관계를 보여주었다. 미세조류가 광합성을 수행하는 낮 동안에는 pH가 상승하고, 호흡이 주된 대사활동이 되는 밤에는 pH가 감소하는 패턴이 매일 반복되었으며, 일별 변화폭은 약 0.3~0.8 내외였다.

2. 미세조류 바이오매스 측정

미세조류 바이오매스 변화를 살펴 보기 위해, 엽록소-*a* (Fig. 3)와 건조중량(Fig. 4)을 측정하였다. 엄밀한 의미

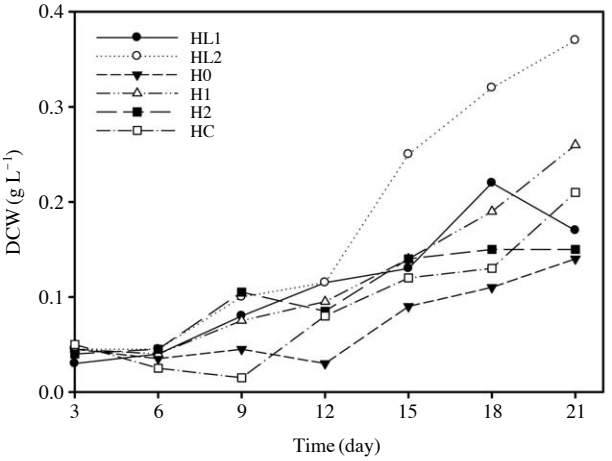

Fig. 4. Dry cell weight change for each experimental group during the cultivation period.

로 해석하면, 엽록소-*a*는 미세조류만의 생장을, 건조중량은 미세조류와 박테리아의 총합을 나타낸다. 가장 빠른 미세조류 생장을 보여준 실험구는 HL2였다(Fig. 3). 이 실험구는 배양 18일 차에 엽록소-*a*의 농도가 3,777 μg L^{-1}를 보여 주었고, 이후에 감소하였다. HL1의 경우는 HL2와 그래프가 같은 형태로 나타났지만 빛의 양이 HL2보다는 적은 이유로 엽록소가 최대 3,076 μg L^{-1}까지 상승하였다. H0 실험구는 온도유지를 위한 히터를 넣어 주지 않은 실험구로 배양기간 15일 까지 생장속도가 다른 실험구에 비해 현저히 낮다가 12일 이후부터 급격히 증가하였다. 동일한 저광도 조건에서 히터의 개수만 달리하여 온도 차이를 둔 H0, H1, H2 세 실험구에서, 9일째까지는 예상대로 온도가 가장 높았던 H2의 엽록소-*a* 농도가 가장 높았고, H0의 농도가 가장 낮았다. H0와 H1 사이에는 이러한 차이가 꾸준히 유지된 반면, 히터 두 개를 사용한 H2 실험구는 최소한 HL1 실험구에 상응하는 엽록소-*a* 농도를 예상했지만 배양 12일이 지나면서 상승 추세가 꺾이면서, 최종적으로 가장 낮은 엽록소-*a* 농도를 보였다. 이는 *Daphnia* sp.로 대표되는 동물플랑크톤이 H2 실험구에만 번성하기 시작한 시기와 일치한다. 1% 이산화탄소를 공급한 HC 실험구는 배양 기간 동안 뛰어난 생장을 보여주진 않았으나, 마지막 샘플 분석에서 엽록소의 양이 2,696 μg L^{-1}로 H0 실험구와 비슷한 증가를 보여주었다.

건조중량에서의 결과도 엽록소-*a*와 비슷한 양상을 보여주었다(Fig. 4). 가장 높은 건조중량 증가량을 보여준 것은 HL2 실험구로 0.37 g L^{-1}였다. 결과적으로 엽록소와 건조중량 데이터를 분석해 보았을 때 가장 높은 바이오

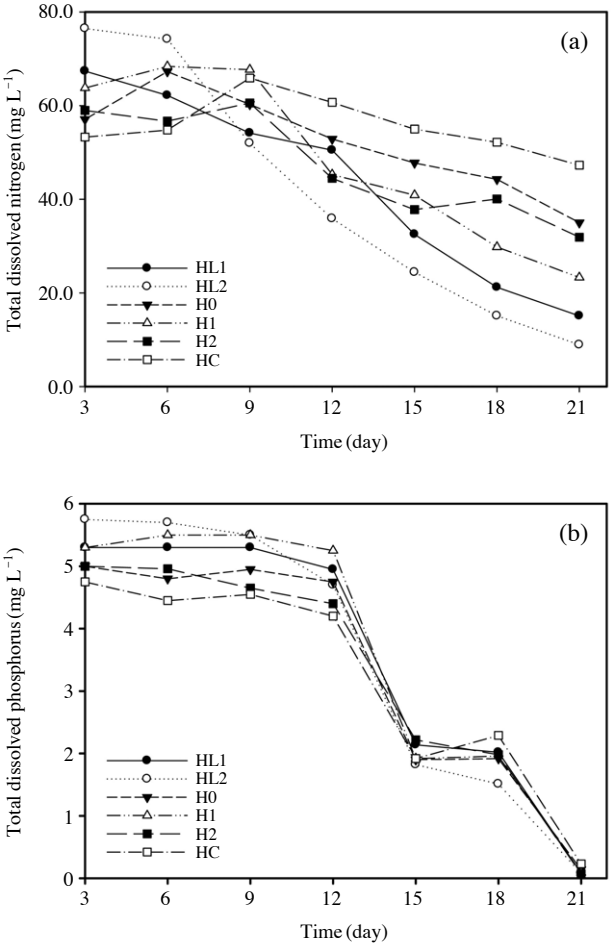

Fig. 5. Removal of nitrogen (a) and phosphorus (b) for each experimental group during the cultivation period.

매스 성장률을 보여준 실험구는 HL2 (high-light+반사필름) 실험구였다. 하지만, 건조중량의 값은 엽록소를 가진 미세조류뿐만 아니라 필터링 시 필터에 남아 있는 세균과 다른 고형물질까지 포함하는 값이기 때문에 엽록소의 데이터와 차이가 있을 수 있다.

3. 영양염류 제거효율

TDN과 TDP를 분석해본 결과 초기 TN 값(105 mg L^{-1})을 기준으로 가장 많은 질소원을 이용한 실험구는 HL2였고, 이 때의 제거율은 92%였다(Fig. 5a). HL2와 비슷한 감소율을 보여 준 HL1 실험구에서는 86%의 질소 제거효율을 보여주었다. 인의 경우에는 배양 12일까지는 거의 감소 효율이 보여지지 않았으나 12일에서 15일 사이에 거의 모든 실험구가 70%의 제거율을 보였으며 배양이 끝나는 21일차에는 모든 인 성분을 제거했음을 보

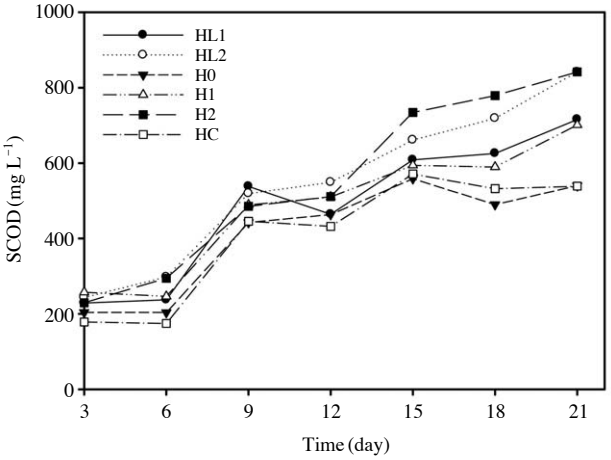

Fig. 6. Daily change of SCOD for each experimental group during the cultivation period.

여주었다(Fig. 5b).

4. Soluble chemical oxygen demand (SCOD) 변화

SCOD는 배양초기 6일까지 일정하게 유지되다가, 배양기간이 지날수록 점차 증가하였다(Fig. 6). SCOD의 증가양상은 모든 실험구에서 배양이 끝나는 시점까지 점차 증가하는 모습을 보여주었다. HL1 실험구와 HC 실험구는 9일에서 12일 사이에 SCOD가 약간 감소하였지만 그 이후에 다시 증가하였고, 가장 많은 SCOD 증가양상을 보인 실험구는 H2와 HL2 실험구였다. 반면에 HC 실험구와 H0 실험구에서는 배양 마지막을 기준으로 했을 때, SCOD 증가율이 가장 낮았다.

5. 지방산 성분구성

GC를 통해 지방산의 성분을 분석하였다. 가장 많은 비율을 차지하는 지방산은 리놀렌산(C18 : 3n3)이며, 리놀렌산은 6개의 실험구에서 모두 가장 많은 비율을 차지하였다. 비율은 40%에서 61%였다. 그리고 팔미트산(C16 : 0)는 18%에서 31%로 두 번째로 높은 비율을 차지하고 있다. 따라서 리놀렌산과 팔미트산이 가장 주된 지방산이었으며 반면에 아라키드산(C20 : 0), 리놀레산(C18 : 2n6c), 올레산(C18 : 1n9c), 스테아르산(C18 : 0), 팔미톨레산(C16 : 1), 미리스트산(C14 : 0)은 소수형태의 지방산이었다(Fig. 7). H0 실험구의 경우는 지방산조성이 다른 실험구와 현저히 다른 것을 보여주었다. 이러한 결과는 우점종의 차이에서 비롯된 것이라 사료된다(Fig. 8).

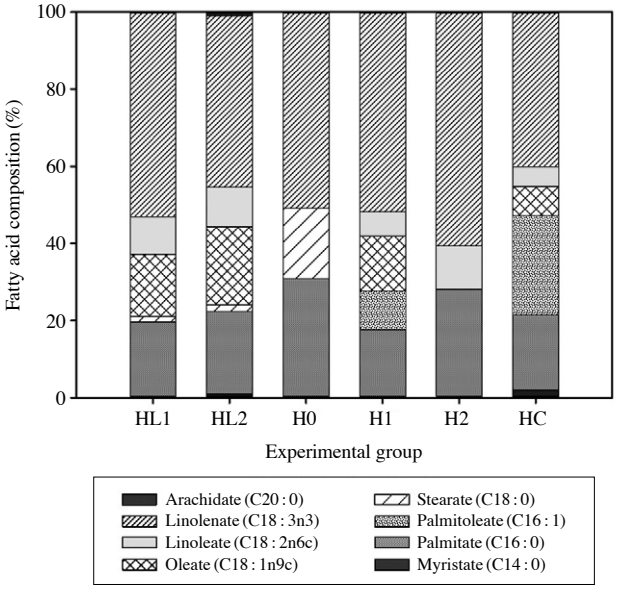

Fig. 7. Comparison of fatty acid composition between experimental groups.

실험구별 지방산의 성분을 분석해 보면 HL1과 HL2에서는 가장 많은 리놀렌산을 기준으로 올레산, 팔미트산, 리놀레산이 지방산성분의 주를 이루었다. H1, H2, HC도 비슷한 지방산 성분을 보여 주었으나, H2에서는 올레산과 팔미톨레산이 분석되지 않았다. 가장 저온이었던 H0 실험구에서도 리놀렌산이 가장 많은 비중을 차지하였으며 그 다음으로 팔미트산, 스테아르산 순으로 분석되었다.

6. 미세조류 종

수온이 가장 낮았던 H0 실험구는 다른 실험구들과는 다른 미세조류 종이 우점하였다. H0를 제외한 다른 실험구에서는 *Scenedesmus* sp. (Fig. 8a)가 우점하였으나, H0 실험구는 *Chlamydomonas* sp.라 추정되는 미세조류가 우점하고 있었다(Fig. 8b). 형태학 상으로는 명확하게 *Chlamydomonas* sp.라 단정짓기 어려우나, 18S rRNA 염기서열 분석 결과 *Chlamydomonas* sp.와 가장 가까운 유연관계를 보여주었다.

고 찰

본 연구를 통하여 겨울철 낮은 온도로 인해 미세조류가 성장하기 적합하지 않은 환경조건에서도 배양시설의

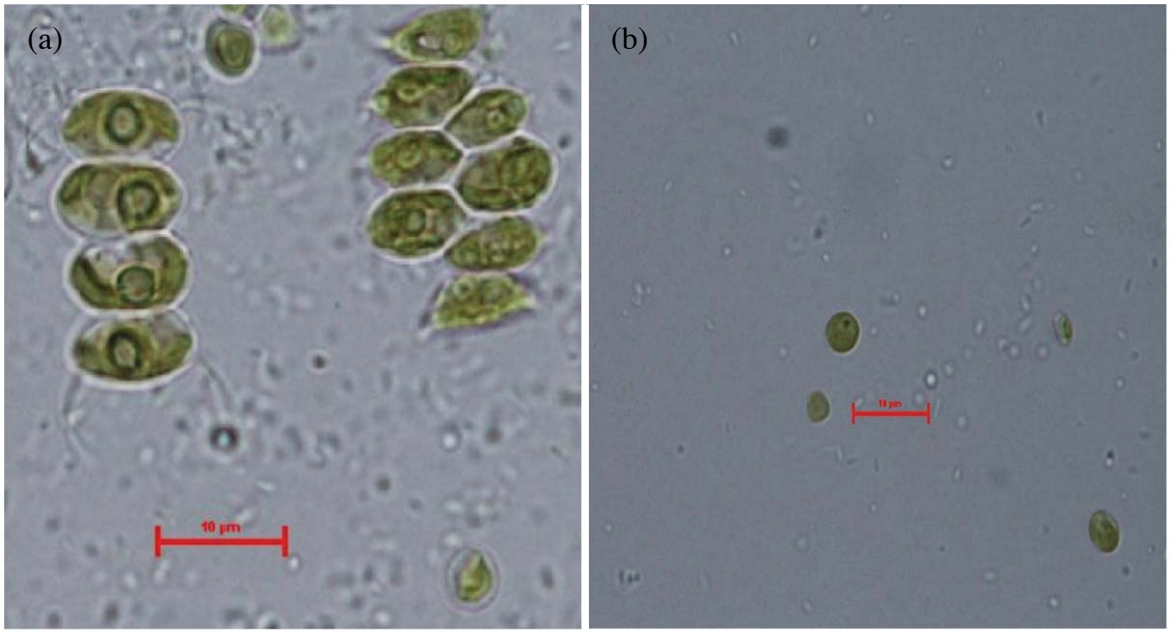

Fig. 8. (a) *Scenedesmus* sp. at the all experimental group except for H0. (b) *Chlamydomonas* sp. at the H0 experimental group.

개선으로 열의 손실을 최소화함으로써 미세조류를 배양할 수 있다는 점을 보여주었다. 열의 손실을 최소화하기 위하여 3중의 비닐하우스를 설치하였다. 그리고 다항목 수질측정기를 사용하여 수조의 온도를 측정해 본 결과, 비닐하우스 내 수조의 온도는 바이오매스가 가장 많이 자란 수조의 경우 평균최저 15°C이고 평균최고는 25°C였는데, 이는 충분히 미세조류가 자랄 수 있는 수온이다. 본 실험은 겨울철 가장 기온이 낮은 시기인 1월부터 2월까지 수행하였으며, 이때의 외기는 최저 영하 17°C를 비롯하여, 배양기간 대부분 영하의 날씨를 보여주었다. 하지만 비닐하우스 안의 온도는 지속적으로 영상의 온도를 유지하였고, 한 낮 최고 기온이 30°C 이상까지 올라가는 현상도 보여주었다. 따라서 3중 처리를 한 비닐하우스에서는 겨울철 영하의 기온에서도 미세조류가 성장하기에 적절한 수온을 유지할 수 있음을 보여주었다. 또한 온도뿐 아니라 겨울철 약해질 수 있는 광도를 최대로 높여 주기 위하여 거치대를 이용하여 투명한 배양조를 바닥으로부터 약 50 cm 띄어 놓고, 바닥에는 농업용 반사필름을 설치하여 투명의 아크릴수조의 바닥 면에서도 충분한 양의 빛을 받을 수 있도록 하였다. 반사필름을 설치한 HL2의 경우, 최고 25°C까지 수조의 온도가 상승하였으며, 같은 HL (high light) 조건에서 반사필름이 없는 HL1보다 평균 4～5°C 높은 수온을 보여주었다. 이렇게 가장 높은 수온을 기록한 실험구에서는 바이오매스 양도 가장 높은 것을 보여주었다 (Fig. 3). 반면, 빛의 양은 반사판을 설치한 실험구보다 약하지만 히터를 2개 설치한 실험구에서 성장이 잘 이루어지리라 예상했던 것과는 다르게 미세조류의 성장이 높게 일어나지 않았다. 이는 배양 중간에 성장하기 시작한 *Daphnia* sp. 때문이었다. 동물성 플랑크톤의 빠른 생장으로 인하여 미세조류가 동물성 플랑크톤의 먹이가 되어 바이오매스 양이 다른 실험구들보다 낮았다. 또한 가장 많은 바이오매스 증가량에 미치지는 못하지만, 히터를 설치하지 않은 H0 실험구에서도 늦기는 하였지만, 최종적으로는 결코 적지 않은 양의 미세조류가 성장하는 것을 확인하였다. 히터 하나를 설치한 고광도 조건의 HL1과 저광도 조건의 H1의 온도 차이가 1～3°C 내외였고, 반사필름 설치에 의해 4～5°C의 온도 상승효과를 기대한다면, 고광도 조건에서는 히터를 전혀 설치하지 않고도 반사필름만으로도 저광도 조건에 비해 약 5～8°C의 추가적 온도 상승으로 인해 약 11～20°C의 수온을 유지할 수 있음을 추정할 수 있다. 이는 겨울철에도 최소한의 비용으로 수온 유지를 통한 미세조류 배양이 불가능한 일이 아님을 보여주는 사례라고 하겠다.

H0 실험구의 최저온도는 6°C, 한낮 평균 최고온도는 12°C로 히터처리를 한 다른 실험구보다 월등히 온도가 낮았다. 하지만 미세조류의 바이오매스는 이산화탄소를 넣어준 HC 실험구를 배양 18일차에 역전하여 성장이 이

Table 4. Comparison of FAME productivity under various wastewater conditions

Microalgal species	FAME productivity ($g\ m^{-2}\ day^{-1}$)	Wastewater type	References
Rhizoclonium hieroglyphicum	0.21	Agricultural wastewater	Mulbry *et al*. 2008
Mixed culture	1	Domestic wastewater	Christenson and Sims 2012
Mixed culture	2.2	Domestic wastewater	Christenson and Sims 2012
Mixed culture	1.1	Domestic wastewater	Lee *et al*. 2013
Scenedesmus sp. (highest biomass productivity group, HL2)	2.4	Domestic wastewater	This study

루어 졌다. 이때의 HC 실험구의 평균 최저온도는 8°C 이고 최고온도는 18°C로 H0 실험구보다 수온이 높았지만 바이오매스는 H0 실험구가 더 높았다. 이러한 현상이 나타나게 된 원인은 HC 실험구의 경우, 최초 배양일부터 배양 12일차까지 규조류가 우점하였기 때문이며, 따라서 배양 12일차까지는 클로로필의 증가가 상대적으로 낮았다(Fig. 3). 그리고 배양 12일 이후부터 HC 실험구가 녹조류로 종천이가 일어났으며, 그 결과 HC와 이산화탄소 첨가 여부만 다른 H1 실험구에 비하여 이산화탄소의 공급을 해 주었음에도 느린 성장을 보여주었고, H0 실험구에 비하여 적응 기간이 짧았기 때문에 바이오매스가 역전된 것으로 판단된다.

폐수 중의 영양염류의 농도는 미세조류의 성장뿐만 아니라 영양염류 제거효율과 지질 축적에도 영향을 미친다(Aslan and Kapdan 2006; Goldberg and Cohen 2006). 본 연구에서의 N : P 원자비는 34.7 : 1로 해양 미세조류의 원자비를 설명한 Redfield ratio 16 : 1보다는 높은 편이다(Redfield 1933). 미세조류 배양에 사용하는 폐수의 N : P 원자비가 Redfield ratio에서 현저히 벗어날 경우, 미세조류 생장의 제한요소가 될 수 있는 영양소들을 미리 판단할 수 있다. 질소와 인의 원자비를 비교해 보면 질소가 인에 비해 상대적으로 풍부함을 알 수 있다. 이는 만약 인을 더 첨가해 준다면 미세조류의 생산성이 더욱 높아 질 수 있음을 시사한다고 할 수 있다. 실제로 미세조류를 폐수에서 배양하면서, 제한요소임을 판단하고 배양 중간에 인을 더 첨가해 주어서 미세조류 성장이 늘어났음을 확립한 연구가 있다(Lee *et al*. 2013). 제한요소 첨가로 인한 미세조류 생산성 향상에 관해서는 더욱 연구가 활발히 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 혐기성소화조 처리수를 최종방류수에 10%로 희석하여 사용하였다. 이 희석조건은 겨울철에 최적화된 실험조건이기 때문에 미세조류의 성장이 빠른 여름철에는 이 비율이 달라질 수 있다. 이는 앞으로 기온이 올라감에 따라 차후의 실험을 통해 증명해야 할 것이다.

모든 지질을 바이오디젤로 변환시킬 수 있는 것은 아니기 때문에 FAME는 바이오디젤의 생산의 지표로 이용되고 있다(Ratledge and Wilkinson 1988). Table 4에는 몇몇 최근 연구에서 폐수를 이용하여 미세조류를 배양하고, 그에 따른 지방산의 생산성과 본 연구에서의 지방산의 생산성을 비교하였다(Mulbry *et al*. 2008; Johnson and Wen 2010; Christenson and Sims 2013; Lee *et al*. 2013). 본 연구에서도 바이오디젤의 공급원료로서의 전환가능성이 높은 C16 : 0인 팔미트산과 C18 : ln9c인 올레산 같은 포화지방산이 포함되어 있으며, C18 : 3n3의 리놀렌산과 같은 불포화 지방산의 경우는 프로스타글란딘(prostaglandin, PG)과 같은 인간의 면역시스템을 조절하는 호르몬의 전구체(Kapoor and Huang 2006)로 사용이 가능하며, 인체 내 합성이 불가능하기 때문에 반드시 섭취해야 하는 지방산이다. 따라서 이를 미세조류에서 추출하여 고부가가치 대사산물을 창출할 수 있는 가능성을 본 연구를 통하여 입증했다. 또한 본 연구가 기온이 낮은 겨울철에 수행한 실험임을 감안한다면 바이오디젤 생산의 가능성이 충분함을 보였다고 할 수 있다.

수처리 측면에서 본 연구는 겨울철임에도 불구하고, 폐수 속 영양염류의 높은 제거율을 보여주었다. 대전광역시시설관리공단 내 하수종말처리장의 혐기성 소화조의 처리수는 매우 높은 질소와 인 그리고 COD농도(TN 664 mg L^{-1}; TP 54.5 mg L^{-1}; COD 1585 mg L^{-1})를 가지고 있다. 하지만 높은 농도의 폐수는 오히려 미세조류의 배양에 악영향을 미칠 수 있다는 사실을 예비실험을 통하여 알 수 있었다. 미세조류가 최대로 자라더라도 고농도의 영양염류를 전부 소모할 수 없으며, 고농도의 영양염류가 미세조류의 성장을 저해할 수도 있다. 따라서 고농도의 폐수를 미세조류가 이용하기에 적합한 최적의 조건을 찾는 것이 중요하다. 인은 12일까지 완만히 감소하다가 이후 급격히 감소하여 마지막 날에는 99% 제거되는, 2단계 현상을 보여주었다(Fig. 5b). 이런 현상이 일어난 이유는, 엽록소와 건조중량 그래프와 관련지어 고찰했을 때, 성장그래프가 배양 12일까지 조금씩 증가하다가 12일 이후에 급격하게 성장하는 모습을 보여주는 것

과 관련이 있는 것으로 보인다. 즉, 배양 12일까지 미세조류가 폐수에 적응하면서 성장하는 적응기를 거치고 그 이후로 높은 성장을 함으로써, 인의 제거율이 12일 이후부터 크게 향상되는 것으로 보인다. 그러나 질소는 배양이 끝날 때까지 천천히 감소하는 현상을 보여주었다. 이러한 이유는 질소는 인에 비해 충분한 영양염류이기 때문에 감소는 하지만 인보다는 감소율이 완만히 떨어지는 현상을 보인 것으로 추정된다. 질소의 최대 감소율은 가장 많은 성장을 보인 HL2 실험구에서 92%였다. 하지만 SCOD의 경우는 초기배양조건에서 점점 상승하는 현상을 보여주는데, 이는 미세조류가 성장하면서 유기물질을 배출하기 때문에 이런 현상이 나타난 것으로 보여진다. SCOD의 감소까지 방류수 기준에 맞추기 위해서는, 유기물 분해효율이 높은 박테리아의 비율이 좀 더 높아져야지만 가능할 것으로 사료된다. 본 연구에서는, 고농도의 유기성 폐수를 영양원으로 이용하여 미세조류를 배양함으로써, 기존의 수처리에 소모되는 막대한 비용을 바이오 유용물질 생산으로 전화시킬 수 있다는 가능성을 보여주었다. 추후 연구를 통해 SCOD까지 낮추어 준다면 더욱 유용한 기술이 될 것이다.

본 연구에서의 목표는 수온이 낮은 겨울철, 최소한의 비용으로 수온을 유지하면서 폐수를 이용하여 미세조류 바이오매스를 배양하고 동시에 질소, 인을 제거하는 것이었다. 태양광 이용을 극대화하면서 열의 손실을 최소화할 수 있는 배양조와 배양시설을 제작함으로써, 겨울철에도 충분히 차세대 대체에너지원으로서의 바이오매스 생산과 폐수처리가 가능함을 증명하였다.

적 요

우리나라는 겨울철에 미세조류가 성장하기에 적합하지 않은 기후조건을 가진다. 따라서, 차세대 바이오매스의 공급원료로서의 미세조류 배양을 겨울철에 이룩하기는 쉽지 않다. 본 연구에서는 적은 에너지를 이용하여 미세조류가 성장이 불가한 영외환경에서 미세조류를 성장시키기 위해서, 삼중막의 비닐하우스를 설치하였다. 또한 투명한 아크릴 재질로 수조를 제작하여 빛을 수조의 모든 면에서 받을 수 있게 함으로써, 빛의 이용성을 최대화하였다. 6가지의 다양한 실험조건을 설정하여 겨울철 영하의 기후조건에서 최소한의 비용으로 하수종말처리장 폐수를 사용하여 미세조류를 배양하였다. 또한 미세조류 바이오매스를 증가시킴과 동시에 환경오염의 원인이 될 수 있는 영양염류 성분 중 질소를 최대 92%, 인을 최대 99%까지 제거시켰다. 본 연구에서 바이오디젤의 원료가 될 수 있는 가장 주된 지방산은 리놀렌산(C18 : 3n3)으로 총 지질량의 최대 61%까지 차지했다. 지방산의 생산성은 2.4 g m^{-2} day^{-1}이었다. 결론적으로, 본 연구를 통하여 차세대 바이오매스 생산을 위한 미세조류 배양을 저온 시기에서도 이룩하였으며, 그에 따른 폐수처리에서도 좋은 성과를 이루었다.

사 사

본 연구는 환경부와 2012년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구과제입니다(No. 2012T100201665).

REFERENCES

APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. APHA, Washington, D.C., USA.

Aslan S and IK Kapdan. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 28:64-70.

Batten D, T Beer, G Freischmidt, T Grant, K Liffman, D Paterson, T Priestley, L Rye and G Threlfall. 2013. Using wastewater and high-rate algal ponds for nutrient removal and the production of bioenergy and biofuels. Water Sci. Technol. 67:915-924

Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25:294-306.

Christenson LB and RC Sims. 2012. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. Biotechnol. Bioeng. 109:1674-1684.

Goldberg IK and Z Cohen. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochemistry 67:696-701.

Graham LE and LW Wilcox. 2000. Algae. Prentice Hall, New Jersey.

Jeffrey SW and GF Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen Bd. 167:191-194.

Johnson MB and Z Wen. 2010. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:525-534.

Kapoor R and YS Huang. 2006. Gamma linolenic acid: an anti-

inflammatory omega-6 fatty acid. Curr. Pharm. Biotechnol. 7:531-534.

Lee S-H, C-Y Ahn, B-H Jo, S-A Lee, J-Y Park, K-G An and H-M Oh. 2013. Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N : P ratio in wastewater. J. Microbiol. Biotechnol. 23:92-98.

Lepage G and CC Roy. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J. Lipid Res. 25:1391-1396.

Mulbry W, S Kondrad and B Jeffery. 2008. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: Fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. J. Appl. Phycol. 20:1079-1085.

Olguin EJ. 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. Biotechnol. Adv. 30:1031-1046.

Oswald WJ. 2003. My sixty years in applied algology. J. Appl. Phycol. 15:99-106.

Ratledge C and SG Wilkinson. 1988. An overview of microbial lipids. pp. 3-22. In Microbial Lipid (Ratledge C and Wilkinson SG eds.). Academic Press London.

Redfield AC. 1933. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. pp. 177-192. In James Johnstone Memorial Volume (Daniel RJ. ed.). University Press of Liverpool.

Yang J, X Xu, Z Zhang, Q Hu, M Sommerfeld and Y Chen. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. Bioresour. Technol. 102:159-165.

Zhou W, Y Li, M Min, H Zhang, X Ma, L Li, Y Cheng, P Chen and R Ruan. 2012. Growing wastewater-born microalga *Auxenochlorella protothecoides* UMN208 on concentrated municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and energy feedstock production. Appl. Energ. 98:433-440.

Received: 27 August 2013
Revised: 28 February 2014
Revision accepted: 3 March 2013