

11-1543000
-001471-01

가축분뇨 혐기소화액을 이용한 바이오연료
미세조류 고밀도 배양 기술 개발

최종 보고서

2016

농림축산식품부

Development of high cell density cultures of microalga for the production
of bio-fuel using manure anaerobic digestate **R&D Report**

발간 등록 번호

11-1543000-001471-01

가축분뇨 혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도 배양기술 개발

최종보고서

2016. 12. 12.

주관연구기관 / (주)바이오이즈
협동연구기관 / 명지대학교
협동연구기관 / 극지연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축분뇨 혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도배양 기술 개발”(개발기간 : 2013. 08. 26 ~ 2016. 08.25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 12.

주관연구기관명 : (주)바이오이즈 김성천

협동연구기관명 : 명지대학교 산학협력단 서동선

협동연구기관명 : 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 윤호일

주관연구책임자: 김성천

협동연구책임자: 장덕진

협동연구책임자: 한세종

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313007-3	해당단계 연구기간	2015.08.26. ~ 2016.08.25	단계구분	3 / 3
연구사업명	중사업명	농림축산식품 연구개발사업			
	세부사업명	생명산업 기술개발사업			
연구과제명	대과제명	가축분뇨 혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도배양 기술 개발			
	세부과제명				
연구책임자	김성천	해당단계 참여 연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000 천원 민간: 100,000 천원 계: 400,000 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 54명 내부: 54명 외부: 0명	총연구개발비	정부: 900,000 천원 민간: 300,000 천원 계: 1,200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)바이오이즈 중앙연구소			협동기관명: 한국해양과학기술원 부설 극지연구소 명지대학교 산학협력단	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<p>바이오매스 생산성이 우수한 미세조류를 고밀도 연속 순환 배양 방식의 최적화 기술로 바이오매스 생산 시설유지비용, 설치 비용이 크게 감소 가축분뇨의 혐기성소화에서 발생하는 소화액을 사용한 새로운 수입원을 제시하여 가축분뇨 에너지화 사업의 경제성을 제고하고, 농촌의 환경사업 수익모델 창조하며 농촌 기반 지자체의 바이오-환경-에너지 융합 사업화를 통해 생산과정에서 발생하는 다양한 바이오 연료 생산 및 사료, 비료, 유용물질 등의 부가 산업을 연계 가능함. 새로운 미세조류 균주에 대하여 정성적, 정량적 지질 분석을 통하여 북극 담수 미세조류 ArF0004, ArF0006, ArF0022, ArF0024, ArF0032가 고농도 지질함유 균주로 선발을 통하여 저온에서도 바이오매스를 생산할 수 있음.</p>				<p>보고서 면수 234</p>	

<국문 요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오가스 생산시설의 소화액 (가축분뇨 혐기소화액)을 친환경적으로 정화할 수 있는 미세조류 바이오매스 개발 및 미세조류부터 바이오연료 생산 공정 개발. - 미세조류 고밀도 자동 배양 시스템을 통한 바이오연료 사업화 및 부가산물 활용 사업화 기반 구축. - 돼지 가축분뇨를 혐기소화한 후 색도를 제거한 미세조류 배양용 저급 농축산 용수의 제조 기술 개발. - 미세조류 배양에 요구되는 저급 농축산 용수를 공급하고 돼지 가축분뇨 혐기소화액의 생산을 위한 여러 가지 전처리 방법, 혐기소화공정 운전 조건, 혐기소화액의 후처리 방법과 관련된 기술을 개발, 확보. - 극지연구소 미세조류 배양실 보유종인 저온성 극지 미세조류 ArM0029와 생육가능 온도 및 염도조건이 넓은 고지질 함유 우량 미세조류 균주의 기본적인 생리 실험, 지질성분 조사. - 선별된 고지질 함유 우량 미세조류 균주를 대상으로 최적 배양배지 탐색 및 대사체, 유전체, 리피도믹스 분석 수행. - 선별된 미세조류 균주의 분석된 유전체 정보를 바탕으로 지방산 합성관련 유전자를 발굴하여 이를 대장균, 효모 또는 녹조 미세조류에 도입하여 재조합 단백질 발현 수행.
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오매스 생산성이 우수한 미세조류 개발. - 미세조류 고밀도 연속 순환 배양 방식의 최적화 기술개발. - 살아있는 바이오매스 순환 배양을 통해 전배양 시설 공정의 소형화가 가능하며 시설유지비용, 설치비용이 크게 감소. - 가축분뇨의 혐기성소화에서 발생하는 소화액을 사용한 새로운 수입원을 제시하여 가축분뇨 에너지화 사업의 경제성을 제고하고, 농촌의 환경사업 수익모델 창조. - 가축분뇨의 안정된 혐기소화를 통하여 오염부하 저감 및 재생에너지 생산 - 미세조류 배양에 적합한 혐기소화액 제공. - 기존 소화액을 액비화하는 과정에서 발생하는 비용 및 민원 해소. - 농촌 기반 지자체의 바이오-환경-에너지 융합 사업화를 통해 생산과정에서 발생하는 다양한 바이오 연료 생산 및 사료, 비료, 유용물질 등의 부가 산업을 연계 가능. - 친환경 신성장동력 사업으로 농가의 고용 창출로 농가에 실질적인 수익 증대 - ArM0029 미세조류 균주에 대한 온도조건 연구결과, 4 - 12℃ 구간에서 지속적으로 성장하는 것을 확인하였고, 최적배양배지는 담수배지인 것으로 분석됨 - Nile Red 시약 염색법에 의한 정성적 지질함유 여부 분석 시, 세포 전반에서 밝은 노란색으로 발색되어 지질 함유 여부를 확인함. 가스 크로마토그래피를 사용한 정량적 지질성분 분석시, C16:0 (palmitic acid), C18:1 (oleic acid), C18:3 (linolenic acid)의 함량이 높은 것으로 분석됨. - ArM0029 미세조류 균주의 LC-MS 분석 결과, phospholipid, triglyceride, diglyceride 성분이 대조군인 중온성 미세조류인 <i>Chlamydomonas</i> sp.에 비해 약 5배 이상 함유된 것으로 분석됨. - 극지연구소 극지 미세조류 배양실 내 미세조류 균주에 대하여 정성적, 정량적 지질 분석을 통하여 북극 담수 미세조류 ArF0004, ArF0006, ArF0022, ArF0024, ArF0032가 고농도 지질함유 균주로 선발되었음.

	<ul style="list-style-type: none"> - 선발 미세조류 균주 ArF0024에 대한 배양 최적화 모사 분석 중 elimination method에 의해서 유의확률 0.05 미만에서 모든 배지성분이 positive effect를 주는 것으로 파악됨. Plackett-Burman method에 의한 유의확률 0.05 미만에서 tris base, ammonium chloride, magnesium sulfate, acetic acid는 negative effect를 보인 반면, calcium chloride, potassium phosphate 성분은 positive effect를 보이는 것으로 분석됨. - 선발 미세조류 균주 ArM0029C에 대한 배양 최적화 모사 분석 중 elimination method에 의해서 유의확률 0.05 미만에서 tris base, ammonium chloride, magnesium sulfate, potassium phosphate, trace elements, acetic acid 성분이 positive effect를 나타내는 것으로 분석됨. Plackett-Burman method에 의한 유의확률 0.05 미만에서 potassium phosphate, trace elements는 negative effect를 보인 반면, ammonium chloride, magnesium sulfate는 positive effect를 보이는 것으로 분석됨. - 선발 미세조류 균주 ArF0024, ArM0029C를 대상으로 한 NGS (Next-generation sequencing) 방법에 의해 획득된 유전체 자료 중 지방산 합성에 관련된 유전자에 대한 전반적인 대사 경로를 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway를 통해 분석함. - ArF0024, ArM0029C를 대상으로 LC-MS 분석 수행한 결과 지방산으로 합성될 수 있는 diglycerol, triglycerol 등의 물질이 성장 가능 온도범위에서 높은 농도로 존재함을 확인함. - 북극 미세조류 균주 ArF0024 및 ArM0029C의 NGS방법에 의하여 각각 55,894개, 8,947개의 contig를 확보하였음. 이중 ArM0029C의 유전자 중 250개 이상의 지방산 합성관련 유전자가 발굴됨. - 선발 미세조류 균주 중 하나인 ArF0006의 유전자 정보 중 omega-6 지방산 합성효소 유전자를 발굴하였음. 이 유전자는 1,274 bp의 염기서열, 424개의 아미노산으로 구성됨을 확인하였고, 최종적으로 48.2 kDa의 단백질 크기를 나타내는 것으로 분석됨. 본 단백질을 대장균 내에서 발현시킨 결과 대조군에 비하여 C18:2 (linoleic acid) 지방산이 3배 이상 증가하였음. - 상기 단백질에 대하여 site-directed mutagenesis를 수행한 결과, 기존의 단백질 활성이 C18:1 (oleic acid) 지방산을 증가시키는 stearoyl-CoA desaturase의 활성으로 변환되는 것을 확인함.
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 미세조류 고밀도 자동 재배양 시스템을 통한 바이오연료 사업화 및 부가산물 활용 사업화 기반을 구축하여 신재생 에너지로 활용. - 가축분뇨 혐기소화액을 친환경적으로 정화할 수 있는 미세조류 바이오매스 및 바이오연료 생산 공정 구축 - 지속적으로 발생하고 있는 가축분뇨를 결합된 물리화학적처리공정을 이용하여 단기간 처리하여 방류할 수 있을 것으로 판단 - 처리된 혐기소화액을 이용하여 미세조류를 배양, 배양된 미세조류로부터 바이오디젤 생산가능. - 극지 미세조류 ArM0029는 본 과제의 목적에 부합할 정도로 높은 성장률을 보이며, 또한 비교적 고농도의 지질을 함유하는 것으로 분석되어, 향후 혐기소화액을 정화하면서 지질을 생산할 수 있는 균주로 유용하게 사용될 것으로 판단됨. - 극지연구소 미세조류 배양실 내의 모든 미세조류에 대한 배지별 성장률 분석 결

	<p>과, 다양한 염 농도 조건에서 생장 가능한 미세조류가 선발됨. 이 결과, 다양한 염도의 혐기소화액에서 배양할 수 있는 미세조류로 사용될 수 있을 것으로 판단됨</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선별된 북극 미세조류 균주의 높은 불포화지방산 내용과 함량은 바이오연료의 주요성분으로 사용될 수 있을 것으로 기대함 - 선별 미세조류 균주로부터 대량으로 획득된 유전정보 중 지방산 합성효소 관련 유전자를 지속적으로 획득하고, 이 유전자들을 지방산 합성 KEGG pathway에 기반하여 연구 시, 재조합 단백질에 의한 대장균, 효모 및 증온성 미세조류 등에서 대량으로 고품량 지방산 합성이 가능할 것으로 기대함 - 유전자의 의도적 돌연변이에 의해 단백질의 활성이 변화되고, 그에 따라 합성되는 주요 지방산 성분 및 농도가 변환되는 결과를 바탕으로, 단백질의 2차 구조에 기반한 연구를 추진함으로써 목적하는 지방산의 고농도 합성을 가능하게 할 수 있을 것으로 기대됨 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>미세조류</p>	<p>가축분뇨</p>	<p>혐기소화</p>	<p>지방산</p>	<p>고밀도배양</p>

<SUMMARY>

<p>Purpose & Contents</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Development of microalgal biomass which purifies piggery wastewater anaerobic digestates environmentally friendly for bio-gasification plant and microalgal biodiesel production process - Commercialization of bio-diesel using automatic high-cell-density microalgae re-culturing system and applications of its by-products - Technology development for producing low quality agro-livestock water for microalgae cultivation through anaerobic digestion and physicochemical processes for ammonia, color, COD reduction. - In this study, Development and optimization of technologies anaerobic digestion process for, its post-treatment methods, and microalgae cultivation process. - Analyses of physiology and fatty acid contents of ArM0029 and other microalgal candidates producing high amounts of the lipids in a wide range of growth temperatures and salt concentrations - Optimization of growth media and analyses for genetic information, cellular metabolites and lipidomics of the microalgal candidates showing high concentration of the lipids formation - Functional analyses of fatty acid desaturases in <i>E. coli</i>, yeast or mesophilic green microalgae by introducing recombinant DNAs
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Development of microalgae delivering high productivity of biomass - Development of an optimized technology for high-cell-density microalgae re-culturing process - Minimization of environmental pollution due to reduced water use and reuse of purified anaerobic digestion water - Reduction of facility maintenance and installation costs through the miniaturization using living biomass circulation culture system - Anaerobic digestate of piggery wastewater was presented as a new source of revenue. And it has created a new business model of rural business environment. - Through a stable anaerobic digestion of piggery wastewater renewable energy was producing and the pollution load was reduced. - It provided the anaerobic digestate for microalgae cultivation. - It solved the cost and public complaints that occur in the process of recycling the digestate of piggery wastewater. - It proposed possible to link the biofuel production, animal feed, fertilizer and useful materials. - It may be possible as a means of increasing the income of rural. - The optimal growth temperature of ArM0029 ranged from 4 to 12 °C and it was found that freshwater media was the optimal media. - Qualitative identification of bright yellow colors of lipid bodies in ArM0029 cells by Nile Red staining. Quantitative analysis of C16:0 (palmitic acid), C18:1 (oleic acid), C18:3 (linolenic acid) as high concentration of fatty acids in ArM0029 by gas chromatography.

	<ul style="list-style-type: none"> - The LC-MS analysis of ArM0029C which showed five times of phospholipid, diglyceride and triglyceride compared to those of mesophilic <i>Chlamydomonas</i> sp. as the control microorganism. - ArF0004, ArF0006, ArF0022, ArF0024 and ArF0032 were selected as good candidates based on fatty acid contents and yield by qualitative and quantitative assessment in KOPRI culture collection of polar microorganisms. - Tris base, ammonium chloride, magnesium sulfate and acetic acid showed negative effects on the ArF0024 growth whereas calcium chloride, potassium phosphate showed the positive effects. - Negative effect of potassium phosphate and trace elements, and positive effect of ammonium chloride, magnesium sulfate on the ArM29C growth under 0.05 of significance - The analysis of kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway of overall metabolism related to the genes for fatty acid enzymes obtained from next-generation sequencing (NGS) method - Identification of high concentration of diglycerols and triglycerols capable of being converted to the fatty acids in the culturable temperatures of ArF0024 and ArM0029C - Collection of 55,894 and 8,947 contigs in ArF0024 and ArM0029C by next-generation sequencing method, respectively. Selection of more than 250 genes related to the fatty acid synthesis for ArM0029C - Identification of the fatty acid desaturase (AChFAD6) that converts C18:1 (oleic acid) to C18:2 (linoleic acid) from the genetic database of ArF0006. <i>AChFAD6</i> encoding 424 amino acids (48.2 kDa of predicted molecular weight) increased over three times of C18:2 fatty acids in the induction of AChFAD6 in <i>Escherichia coli</i> compared to the negative control (vector-only <i>Escherichia coli</i>) - Modification of enzymatic activity of AChFAD6 by site-directed mutagenesis on amino acid substitution in transmembraneous region which confer the ability to convert C18:0 (stearic acid) from C18:1 (oleic acid)
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizing renewable energy to build a biodiesel by product utilization and commercialization based through recultivation of high-density automatic system of microalgae - Microalgae build biomass and biodiesel production process that can be purified to a sustainable livestock manure anaerobic digestive juice - Using combined physicochemical processes, continuously generated livestock wastewater can be treated in a short time. - Using treated anaerobic digestion solution, it is possible to cultivate microalgae and produce biodiesel from cultivated microalgae. - Selection of a good microalgal candidate ArM0029 for clarification of the anaerobic digested liquids and for production of the high concentration of the lipids. - Characterization of the physiological characteristics of ArM0029 that show high growth rate in the temperature range of 4 -12 °C and relatively high

	<p>concentration of the lipids in the microalgal cells</p> <ul style="list-style-type: none"> - Developing microalgal candidates showing high growth rate and diverse range of the salt concentration analyzed by qualitative and quantitative methods in order to clarify the digestion and produce the lipids - Possibility of massive production of target fatty acids in recombinant systems in various types of hosts such as <i>E. coli</i>, yeast and algae - The intentional modification of fatty acid enzyme activity by site-directed mutagenesis based on protein structure of fatty acid related genes 				
Keywords	Microalgae	piggery wastewater	anaerobic digestion	Fatty acid	high cell density cultures

<CONTENTS>

1. Overview	1
2. Current State of Affairs	20
3. Contents and Results	43
4. Achievement of Objective and Contribution in Field	202
5. Application Plan	205
6. Foreign Scientific Information Achieved during Research	209
7. Representative Research Results	218
8. References	223

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	20
3. 연구수행 내용 및 결과	43
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	202
5. 연구결과의 활용계획 등	205
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	209
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적	218
8. 참고문헌	223

제 1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

1. 바이오가스 생산시설의 소화액 (가축분뇨 혐기소화액)을 친환경적으로 정화할 수 있는 미세조류 바이오매스 개발 및 미세조류부터 바이오연료 생산 공정 개발.
2. 바이오매스 생산성이 우수한 미세조류 개발 및 고밀도 연속 순환 배양 방식의 최적화 기술 개발.
3. 미세조류배양에 적합한 가축분뇨 혐기소화 공정 기술 개발
 - 가. 혐기소화 기본조건(온도, pH, 체류시간)의 검토 및 최적화.
 - 나. 유기물 부하율이 메탄 생성 및 유기물 제거율에 미치는 영향 연구 및 최적 유기물 부하율 결정.
4. 혐기소화 전처리 및 후처리 기술 개발
 - 가. 가축분뇨 혐기소화 공정 안정화, 메탄생산수율 최대화 및 미세조류 성장 촉진을 위한 암모니아제거 기술 개발.
 - 나. 미세조류 성장속도 보전을 위한 가축분뇨 혐기소화액의 색도 제거 기술 확보.
5. 유기성 폐자원 바이오가스 생산시설의 소화액을 친환경적으로 정화할 수 있는 미세조류 바이오매스 개발 및 미세조류로부터 바이오연료 생산 공정 개발

2절. 연구개발의 필요성

1. 우리나라는 유기성폐기물 (음식물쓰레기, 유기성 슬러지, 축산폐수 및 분뇨 등)의 해양투기를 금지하는 런던협약에 가입, 2013년 1월부터는 음식물폐수와 분뇨배출 중단, 2014년 1월부터 산업폐수 및 폐수슬러지 해양투기 금지로 인하여 처리비용이 증가되고 있으며 농축산 폐수의 질소와 인 농도에 의하여 녹조 현상 및 부영양화의 문제가 지속되고 있음.
 - 가. 2011년 집계된 해양 투기량은 250만ton이며 이를 매립비용으로 환산시 약 3천억이며 매립장 포화로 인해 비용은 점차 증대 될 것으로 예상되어짐, 정부는 ‘해양투기 폐기물 제로화를 추진 중.
 - 나. 기존의 N, P처리 화학적 공법이 있으나 이는 2차 오염으로 호수 생태계의 건강성을 저해할 우려가 크고, 기초설비투자 등의 비용부담이 큼.

2. 지구 온난화 가속화 전망과 더불어 기후변화에 따른 환경대응이라는 시대적 요구에 따라, 저탄소 녹색성장의 필요성이 국제적으로 대두되고 있음. 2013년부터 기준 시점 (2000년) 배출량 대비 5% 감축의무가 부과될 경우, 축산부문에서는 축우의 경우 약 17만 두에 해당하는 30만 CO₂톤, 양돈은 돼지 약 103만 두에 해당하는 12만6천 CO₂톤, 닭은 약 4,570만수에 해당하는 5.6 ~ 5.9만 CO₂톤의 의무감축량이 할당될 것으로 예상되어 축산부문에 상당한 부담으로 작용할 것으로 예상.

가. 저탄소 녹색성장을 위한 주요 녹색기술은 바이오매스에서 신재생에너지를 생성하는 기술과 깊게 연관됨. 이를 위한 일환으로 생산능력이 수질에 크게 영향을 받지 않는 미세조류의 특성상 공공하수처리 시설 및 축산폐수를 이용한 배양을 통해 바이오디젤과 바이오 에너지 생산 및 이산화탄소 고정을 모두 해결할 수 있는 친환경 대체에너지로 주목받고 있음.

나. 이러한 목적을 위해서 미세조류를 배양하는 것도 하나의 주요 연구 분야임. 특히 극지 미세조류는 지질합성 속도가 빠르고 함량 (31 ~ 59 %)이 높은 것으로 알려져 있고 저온, 약광에서도 높은 성장률을 보여 우리나라의 계절적 변이에 유리함.

(1) 특히 가축분뇨 혐기소화액을 이용하는 경우에는 미세조류배양을 위한 별도의 비용이 소요되지 않고 질소와 인을 제거하여 수질오염을 처리하는 효과가 있기 때문에 농축산 폐수를 이용한 미세조류배양에 대한 관심이 높아지고 있음.

(2) 에너지와 식량 그리고 환경공해문제는 오늘날 당면한 범지구적 중대과제이며, 바이오매스는 에너지, 식료, 화학공업원료로서의 복합 이용이 가능하다. 합리적인 바이오매스 이용의 한 방법으로서 유기물폐자원의 혐기소화-미세조류 배양을 결합한 복합처리법이 유기성폐자원 처리와 더불어 지역 에너지와 식, 사료문제의 해결에 유익할 것으로 전망되고 있음.

3. 유기성폐자원 처리기술 및 사업화 현황은 그림 1 및 표 1과 같으며 일반적으로 가축분뇨 혐기소화액으로부터 영양염류를 제거하기 위하여 활성 슬러지법과 생물막법 등 다양한 물리적, 화학적 그리고 생물학적 방법들이 사용되어 왔으나, 상기 방법들을 단일 혹은 복합적으로 사용하였을 때 영양염류의 제거가 우수함에도 불구하고 운전비용과 조절의 어려움과 많은 화학약품의 요구와 과도한 슬러지의 발생 등의 단점이 있음.

가. N, P를 제거하기 위한 여러 가지 방법 중에서 생물학적 제거가 가장 선호되고 있음. 이는 ① 잠재적 처리 효율이 높고, ② 공정의 안정성과 신뢰도가 높고, ③ 공정운전이 비교적 쉽고, ④ 토지 소요 면적이 작고, ⑤ 비용이 적당하기 때문임.

나. 현재까지 주를 이루고 있는 유기성 폐기물 처리 방식은 활성슬러지공법인 생물학적인 처리가 주종을 이룸.

다. 2011년 말 유기성폐자원 처리 시설 용량은 총 43,424톤/일이며 일평균 처리실적은 36,668톤이며 가동률은 84.4%이며 저급 농축산 폐수는 90% 이상 사료화 또는 퇴비화 처리, 그러나 사료 품질이 낮고 판로가 한정되어있어 재활용 효과가 적음.

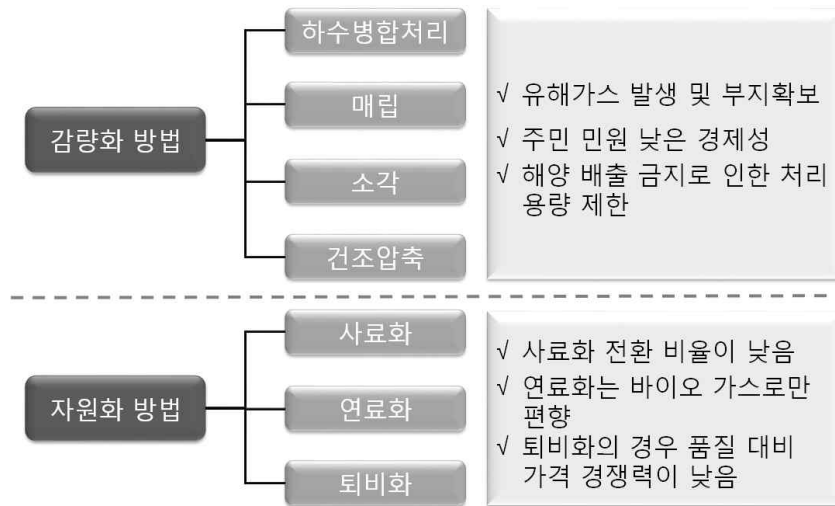


그림 1. 유기성 폐기물 처리 방법의 종류.

표 1. 국내 유기성 폐기물 상용화 기술 현황(한국환경자원공사, 2008).

구분	업체명	기술명	기술보유국	처리대상	처리량(톤)
전용소화	한라산업개발	MSWAS	한국	음식쓰레기	100
	서희건설	DRANCO	벨기에	음식쓰레기	298
	대우건설	DBS	한국	축산분뇨, 음식쓰레기	230
	삼성엔지니어링	BTA	독일	음식쓰레기	10
	태영	-	일본	음식쓰레기	-
	지엠이엔지	-	한국	음식쓰레기	70
	유니슨	-	독일	음식쓰레기	20
	효성에바라	-	한국	음식쓰레기	340
하수병합	한라산업개발	-	한국	음식쓰레기	40
통합소화	한라산업개발	-	한국	축산분뇨, 음식쓰레기	80

4. 2011년 현재 우리나라의 축산농가수는 222,937호이며 사육두수는 209,445,000두로서 가축 분뇨발생량은 127,985 m³/일에 이르고 있으며, 년도에 따라 다소 변동은 있으나 가축분뇨의 약 60%는 돼지, 15%는 젓소, 나머지 25%는 한우 농가에서 발생하는 것으로 파악되고 있음(표 2).

표 2. 가축분뇨 발생 및 처리 현황.

(단위:호, 천두, m³/일, %)

구분	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
축산농가수	125,198	135,100	174,197	181,001	189,666	212,143	222,937	
가축사육두수	148,532	147,072	158,213	171,965	179,219	208,274	209,445	
가축분뇨발생량	137,956	137,442	152,161	128,143	135,761	135,653	127,985	
가축분뇨 처리현황	가축분뇨처리 가구 계	49,905	59,584	64,542	66,418	71,050	72,998	80,368
	자원화 가구	43,584	47,709	58,297	60,328	63,236	65,688	69,260
	(자원화 구성비, %)	87.3	80.1	90.3	90.9	89	90	86
	정화처리 가구	2,743	1,971	1,441	1,359	1,658	1,366	763
	(정화처리 구성비, %)	5.5	3.3	2.2	2	2.3	1.9	1
	기타(위탁처리 등) 가구	3,578	9,904	4,804	4,731	6,156	5,944	10,345
	(기타 구성비, %)	7.2	16.6	7.5	7.1	8.7	8.1	13

<출처: 환경부 「가축분뇨 처리통계」>

5. 표 2에서 보는 바와 같이 11년도 전국가축분뇨 발생량은 '11년 128천 m³/일로 전년 (127,985 m³/일) 대비 감소하였는데, 이는 사육두수가 증가한 소(한우), 닭, 오리(를 제외한) 전체 축종의 사육두수 감소로 인한 원인으로 작용하였으며 특히 돼지 사육두수 감소가 가장 큰 영향을 미친 것으로 판단됨.

6. 축종별 분뇨발생량은 각각 젓소 (19천 m³/일 → 17천 m³/일), 소 (38 m³/일 → 42 m³/일), 말 (0.3천 m³/일 → 0.3천 m³/일), 돼지 (57천 m³/일 → 47천 m³/일), 양·사슴 (169 m³/일 → 142 m³/일), 닭·오리 (20천 m³/일 → 21천 m³/일), 개 (1.0천 m³/일 → 1.0천 m³/일)으로 나타남.

7. 신고, 허가 규모 이상 농가에서의 '11년도 분뇨처리방법별 현황은 자원화(퇴비, 액비) 및 정화처리율은 각각 전년도 90%에서 86%, 1.9%에서 1.0%로 감소하였고 위탁처리 등의 처리율은 전년도 8.1%에서 13.0%로 증가한 것으로 조사됨.

8. 가축분뇨에 대해서는 환경부와 농림부가 공동으로 "가축분뇨 관리 및 이용대책 ('04. 11)" 수립 후 계속 추진 중에 있으나, 가축분뇨는 수질오염원 중 가장 중요한 비점오염원으로서 관리되고 있으며, 특히 처리시설을 갖추지 않고 소규모로 전통적 방식으로 사육하는 가구가 많아 오염원 관리에 애로사항이 있음.

9. 특히 가축분뇨는 다른 폐수에 비하여 유기물질 및 영양소 (질소, 인)의 농도가 높아 (표 3), 유기물에 의한 직접적인 수질오염은 물론 질소·인에 의한 호소의 부영양화로 녹조 등 여러 문제를 유발하고 있고, 가축분뇨에 의한 농업용 저수지에 대한 오염 기여율이 24.8 ~ 28.7%에 달한다고 보고 있고, 생활폐수, 산업폐수에 비하여 발생량은 작으나 (전체의 0.9%) 오염부하량은 15.1% (BOD 기준)로 매우 높음(표 4).

표 3. 가축분뇨의 오염물질 조성.

축종	BOD		COD		SS		T-N		T-P	
	분	뇨	분	뇨	분	뇨	분	뇨	분	뇨
한우	26,539	6,686	71,610	7,696	152,482	1,412	2,614	4,801	602	25
젖소	18,294	5,455	52,765	8,089	102,889	593	2,575	3,401	457	13
돼지	61,359	4,976	61,140	5,174	180,667	694	6,790	3,281	2,152	106

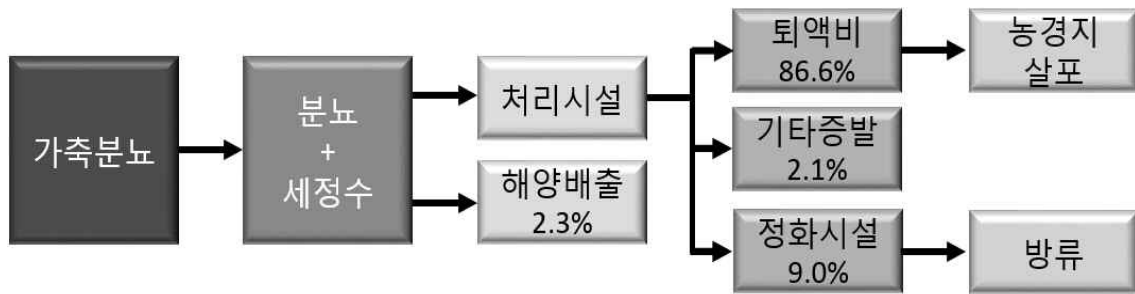
<출처: 한국관개배수 14: 110-120, 2007>

표 4. 가축분뇨의 오염발생량 및 오염 기여도.

구분	오염원	배출량(천톤/일)	오염부하량(톤/일)
생활오수	4,640만명	16,272 (76.3)	2,962 (44.7)
산업폐수	28,012개소	4,874 (22.8)	2,661 (40.2)
가축분뇨	10,375천두	200 (0.9)	1,000 (15.1)
계	-	21,346 (100)	6,623 (100)

<출처: 2011 NHERI 리포트 제156호 (2011. 11. 24)>

10. 2010년 발생한 가축분뇨 처리결과를 보면 4천28만6천톤 (86.6%)은 퇴·액비를 생산했고 107만톤(2.3%)을 해양에 배출했으며 415만 4천톤 (9.0%)은 정화처리 후 방류함(그림 2).



<출처: 2011 NHERI 리포트 제156호 (2011. 11. 24)>

11. 가축분뇨의 이상적인 처리법은 퇴·액비로 사용하는 것이지만 가축분뇨는 충분한 숙성 없이 퇴·액비로 사용시 악취가 발생하고 작물생산성을 저해하는 역효과를 초래, 이를 우려하는 농가들은 가축분뇨에서 생산된 퇴·액비 사용을 기피하는 경향이 있음.
12. 가축분뇨를 질소, 인산, 칼리 등 비료 성분을 경제가치로 평가할 경우 4,206억원으로 추정됨. 그밖에 작물증수와 환경오염 방지 등 효과까지 고려하면 경제가치는 1조원이상으로 퇴·액비가 화학비료의 많은 부분을 대체할 수 있음. 반면에 가축분뇨를 활용한 재생에너지 추출생산은 국내의 경우 아직 초기단계로 지금까지 경제성 부족과 시행착오로 상용화에 성공한 사례가 별로 없는 실정임. 가축분뇨에서 재생에너지를 추출해도 토양과 수질 오염을 유발하는 분뇨유기물은 그대로 잔존하여 환경오염문제 해소에는 기여도가 미미함.
- 가. 2010년부터 가축분뇨 에너지화사업 9개소 추진, 가축분뇨·농축부산물 등 유기성 폐자원을 이용, 바이오 에너지를 생산하고 남은 혐기소화액은 액비화하여 자원순환 촉진함.
- 나. 가축분뇨를 재생에너지로 생산, 상용화하기 위해서는 생산시설의 설치와 유지에 막대한 투자가 수반되어야함. 따라서 재생에너지의 실용화는 자원, 위생, 방역, 환경, 경제성 등을 종합하는 장기적이고 신중한 계획수립이 선행되어야 함.
- 다. 본 사업은 경제성 확보가 성공적인 추진의 관건임.
13. 최근 가축분뇨를 바이오가스로 생산하거나 열병합 발전에 이용하는 등 에너지화에 대한 관심 증가하면서, 가축분뇨 바이오가스 생산시설로 경기과주 공공이용시설과 충남 청양 여양농장이 가동 중이고, 홍성 농업기술센터는 돼지 2,000두에서 발생하는 분뇨를 혐기소화공정을 이용하여 메탄가스로 생산 (2000년 4월 ~ 2001년 3월) 한적 있음.
14. 고양시는 한국지역난방공사와 ‘에너지 분야 개발 및 활용에 관한 협약’을 체결하고 가축분뇨를 바이오가스로 생산, 화훼단지 난방용으로 공급 추진하였고, 모전양돈단지 (경기 이천), 운영농장 (충남 홍성), 경남 창녕, 경기 안성 시설에서 시운전하고 있음.

15. 그러나 재생에너지 생산을 위한 가축분뇨 활용은 국내의 경우 초기 단계로 경제성 부족과 시행착오로 아직 상용화 성공사례가 많지 않은 실정으로서 국내 현실을 감안한 기술의 개발과 보급이 필요한 상태임.
16. 가축분뇨 혐기소화의 가장 큰 문제점은 분뇨내 암모니아 농도가 높아 혐기소화 미생물의 활성을 저해하는 것이므로 이 문제를 극복하면 안정적인 혐기소화가 가능할 것으로 판단됨.
17. 가축분뇨에 미세조류를 직접배양하는 방법도 고려해볼 수 있으나 가축분뇨는 표 5에서 보는 바와 같이 총고형분 (Total solids)의 농도가 60 g/L에 육박하며, 용존유기물 (soluble COD)의 농도도 50 g/L 이며, 암모니아성 질소의 농도도 5 g/L에 가까워 미세조류를 배양하기에는 불가능하며, 혐기소화 등을 통하여 이들 물질의 농도를 낮추어야 가능함.

표 5. 가축분뇨의 일반적 조성(Zhang 등, J. Haz. Mater., 199-200: 36-42, 2012).

General feature (g/L)		Metal element (mg/L)	
pH	6.64	NA	606.65
Total solid	59.5	K	3956.82
Volatile solid	38.9	Ca	1775.03
TCOD	94.2	Mg	672.15
SCOD	54.2	Ag	0.017
Alkalinity as CaCO ₃	7.0	Cd	0.014
TKN	7.6	Co	0.119
NH ₄ ⁺ -N	4.95	Cr	0.169
Proteins	16.6	Cu	39.18
Lipids	2.30	Mn	24.93
Acetate	14.23	Mo	0.420
Propionate	4.35	Ni	0.454
iso-Btyrate	1.53	Zn	154.54
n-Btyrate	4.88	Fe	98.91
iso-Valerate	1.70	Al	41.28
n-Valerate	0.75		
Total VFA	23.57		

18. 가축분뇨의 전처리로서 호기성 생물학적 처리도 고려할 수 있으나, 높은 유기물 함량 때문에 적절한 산소공급이 현실적으로 불가능하여 가축분뇨와 같은 고농도 유기성 폐수에 대해서는 혐기소화가 이상적인 처리 방법임.
19. 따라서 가축분뇨를 일단 혐기소화하고 슬러지를 침전시킨 혐기소화액에서 미세조류를 배양하는 것이 타당함.
20. 현재 저급 농축산 용수에서 미세조류를 이용한 수질정화 및 바이오매스 생산은 활발하게 전 세계적으로 산화지 또는 HRAP 시설 등에서 이루어지고 있으나, 유기성폐자원의 바이오가스 생산시설에서 발생하는 소화액을 직접 이용하여 미세조류를 배양한 연구는 매우 제한적임.
21. 연구개발대상 기술의 차별성
- 가. 본 기술이 기존의 타 기술과 비교하여 뚜렷한 차별성은 ① 성상이 일정하지 않은 가축분뇨를 직접적으로 사용하지 않고 혐기소화로 처리하여 균질하고 적합화 되어진 상태의 배양액으로 전처리하여 미세조류의 먹이로 사용한다는 점, ② 다량의 유기용매나 기계적인 탈수, 건조, 분쇄의 후처리 공정이 아닌 milking이라는 기술로 초음파와 데칸을 사용하여 세포비파괴 추출을 한다는 점, ③ 살아있는 미세조류를 재순환 배양하여 생산수율을 높이는 점, ④ 국내의 계절적 기온차에 적합한 극지 개량형 극지미세조류 보유 및 선행연구에서 기술적 우위를 가지고 있으며 관련 특허 및 논문을 보유하고 있음.
- 나. 본 과제로 수행하고자하는 내용은 그림 3과 같으며, ① 그동안 부진했던 가축분뇨에 대한 혐기소화기술을 확보하여 오염부하를 저감하면서 재생에너지 (메탄)을 생산하는 기술을 확보하는 단계, ② 우리나라의 사계절에 효율적으로 적용 가능할 수 있도록 저온에서도 성장하며 고생산성인 미세조류를 선별하는 단계, ③ 미세조류를 혼합영양배양으로 대량배양한 후 세포비파괴 추출기술로 지방을 회수하고, 성장저해물질을 제거하며 살아있고 지방이 제거된 미세조류를 농축하는 단계, ④ 농축된 지방이 제거된 미세조류를 가축분뇨 혐기소화액에 고밀도로 접종한 후 가축분뇨 혐기소화액의 유기성탄소, 질소 및 인을 사용하여 배양하여 탄소고정 그리고 유기성 탄소, 질소 및 인을 제거하는 단계, 및 ⑤ 생산된 바이오매스인 미세조류로부터 세포비파괴추출기술로 지방을 회수하고 성장저해물질을 제거하고 살아있고 지방이 제거된 미세조류를 농축한 후, ⑥재접종하여 앞 단계를 되풀이하는 방법으로 미세조류를 이용한 가축분뇨 혐기소화액 처리 및 바이오연료를 생산하고자하며 세포비파괴 지질 추출기술로 지용성 물질을 추출하고 지용성 물질이 제거된 살아있는 미세조류의 바이오매스를 지속적으로 생산하고자한다'하는 것임

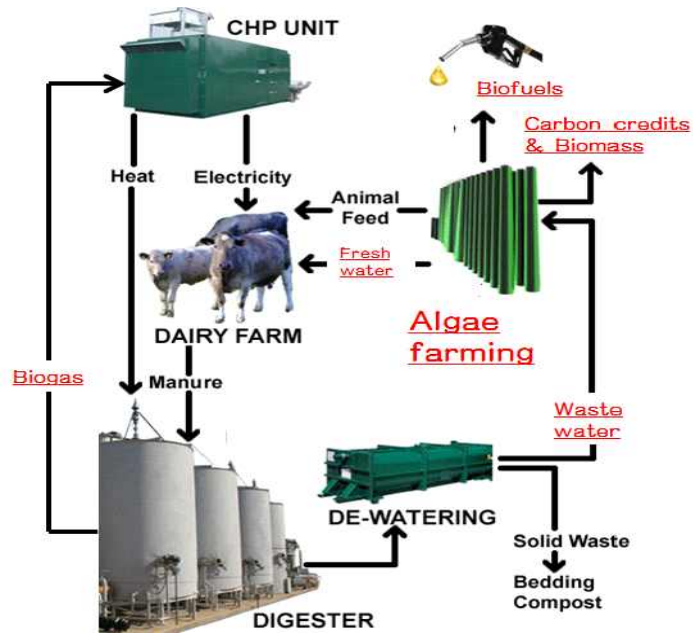


그림 3. 유기성폐자원 및 미세조류를 이용한 재생에너지 및 유용물질 생산의 흐름.

- 다. 혼합 혹은 종속 미세조류 배양시 밀도 제한에 따른 미세조류의 성장곡선이 정지기에 도달할 경우에 클로렐라는 성장을 저해하는 물질로 클로렐린을 분비함. 본 연구에서는 세포비파괴추출과정에서 이를 제거하여 재순환배양을 가능하게 하며 재순환배양에 따른 초고밀도배양이 가능하도록 하였음.
- 라. 특히 본 기술은 유기성폐자원 (가축분뇨)의 혐기성소화 바이오가스시설에서 얻어지는 소화액을 미세조류배양에 최적화를 하는 기술 (그림 3)과 가축분뇨 혐기소화액에서의 배양에 최적화 되어진 균주 선별 개량화 기술, 미세조류 연속순환 고밀도 배양 기술 및 세포비파괴추출 기술을 활용하여 미세조류 2차 대사산물을 포함한 지용성물질을 수확하는 방식으로 미세조류 바이오매스의 고밀도 배양이 가능하게 한 기술 개발임(그림 4).

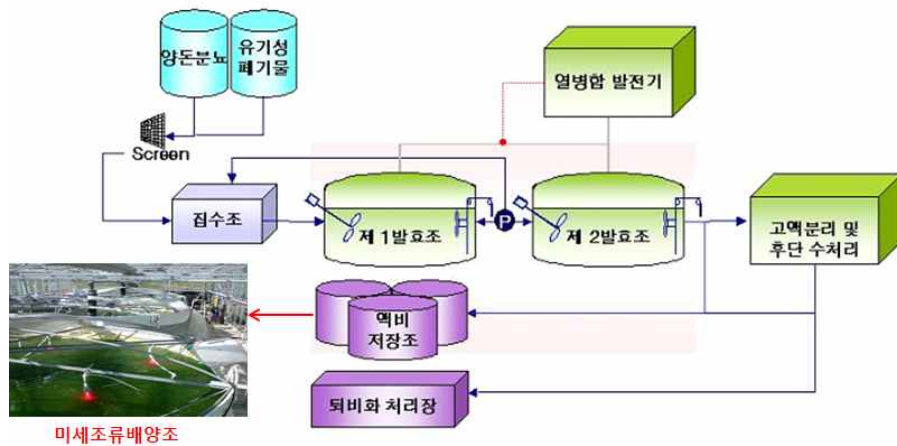


그림 4. 유기성폐자원을 혐기성소화한 후, 발생하는 액비를 이용한 미세조류 배양.

마. 본 연구의 미세조류 배양방법은 많은 양의 유기성탄소원, N, P을 필요로 한다는 점에서 유기성폐기물의 환경오염원인 유기성 탄소원, N, P를 영양염류 기질로 사용할 수 있으며, 미세조류에 의한 pH 증가로 인하여 암모니아 탈기와 P의 침전도 부가적인 효과로 기대할 수 있으며 미세조류는 생산성이 높아 대량의 바이오매스를 생산 가능함(그림 5).

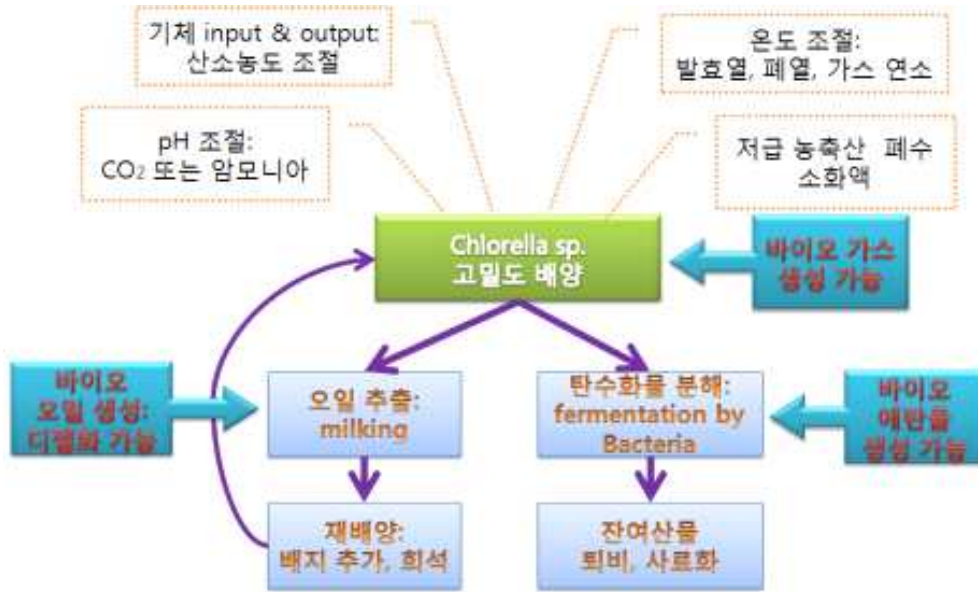


그림 5. 본 연구의 차별성: 오일 추출 milking 재순환배양.

22. 미세조류 유기성 탄소원, N, P처리 기법은 침전지 등 호수 수질 개선 대책과 병행하고, 소규모 오염처리에 이용될 수 있으며, 일부 조류는 수생 생태계의 먹이원이 되며 적녹조 발생의 원천을 봉쇄할 수 있음.
23. 유기성 폐기물 (저급 농축산폐수 및 분뇨, 음식물 쓰레기, 유기성 슬러지 등)을 가수분해 및 산생성 혐기성소화 공정으로 처리하면 유기성 소화액 및 바이오가스가 생산. 소화액 (저급농축산 용수)는 유기성 탄소원 (아세트산, 피루브산 등), N, P 성분 등이 대단히 높으므로 (그림 6, 7) 기존의 폐수처리 공법으로는 처리하기 어려우나 미세조류에서는 필수 영양성분이므로 배양 생산비용 절감 할 수 있음.

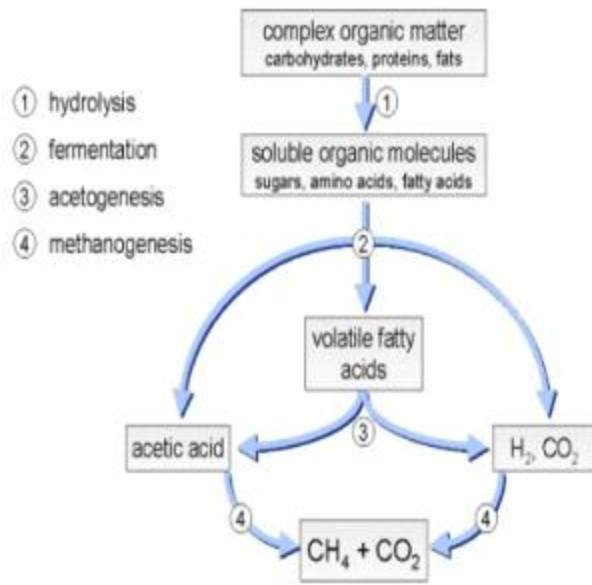


그림 6. 유기성 폐자원의 혐기성소화의 물질 흐름

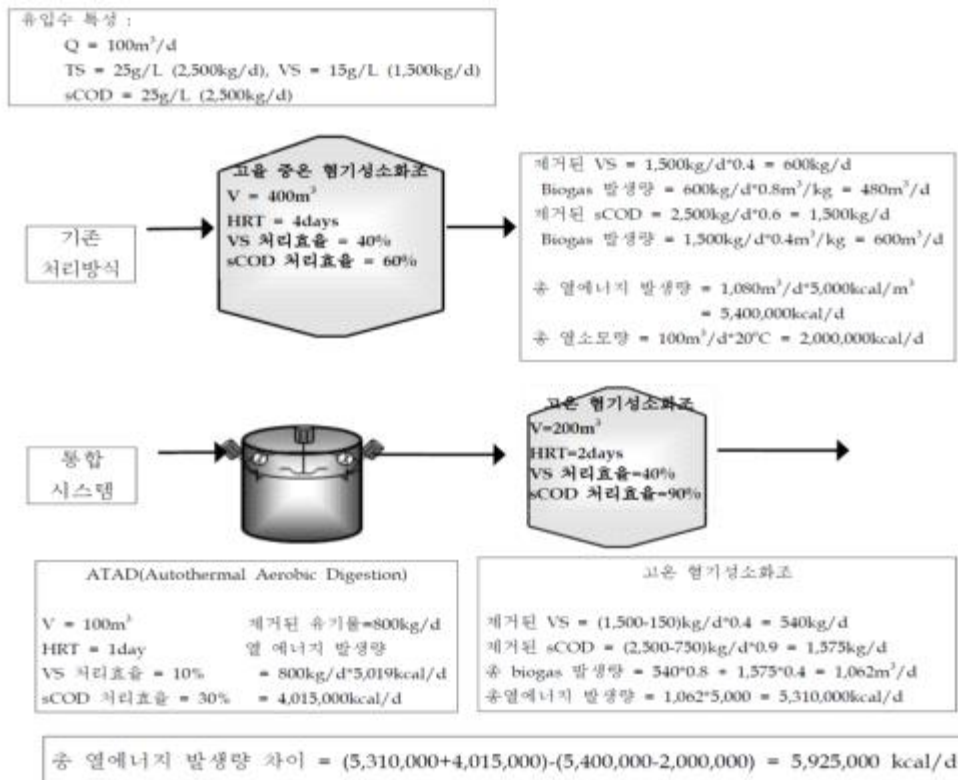


그림 7. 농산폐자원의 혐기성소화 바이오가스 생산시설에서 물질 및 에너지 흐름
<출처: 농림수산부 농림기술개발사업 보고서. 유기성 농산폐자원 처리 및 에너지 생산. 김중수, 2009.>

24. 저급 농축산 용소의 염분 함량에도 미세조류 고밀도 배양이 가능함. milking으로 미세조류를 세포비파괴기술로 지질을 추출할 경우, 영양분, 시간 및 에너지 등을 효율적으로 이용 가능, 탈수단계 불필요, 정제단계 간소화를 통한 비용 절감할 수 있으며 오일 및 바이오매스 생산을 증가시키고 미세조류 섭취자를 제어할 수 있는 장점이 있음.
25. 바이오에너지 및 바이오화학제품 원료인 바이오매스, 생리활성물질 및 어류의 먹이 등과 같은 유용한 생물자원 (biomass)을 생산할 수 있음. 또한 상기에서 생산되는 미세조류는 세포내 우량 단백질의 함량이 높아 고단백 가축사료로도 이용할 수 있음. 따라서 유기성 폐기물 발효시스템 및 미세조류 배양 시스템을 통합 운영한다면 유기성 폐기물을 처리하고 바이오가스 및 바이오매스를 대량 생산이 가능함(그림 8).
26. 미세조류의 바이오매스는 재자원화 공정처리를 통해 바이오디젤 등이 생산 가능하고, 이 에너지를 판매하거나 미세조류 N, P처리 시설 가동에 재이용할 수 있음.

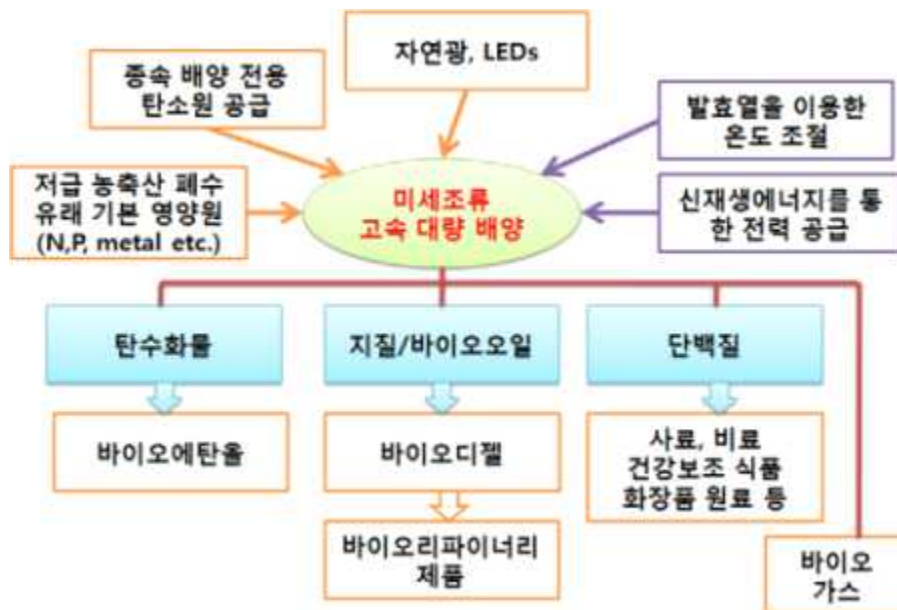


그림 8. 미세조류 고밀도 대량 배양 개념도.

27. 가축분뇨의 중온성 혐기성 소화공정 적용 시 기본적인 공정설계 인자에 대한 결과도 출출하기 위해서는 혐기소화 공정에서 소화 온도 변화, 온도 충격 (temperature shocks), 유입 기질 부하 (feed loadings) 변화에 따라 바이오가스 생성율과 바이오가스 내 메탄함량 변화에 미치는 영향에 대한 연구가 필요함.

28. 혐기성 소화의 운전에 이용되는 인자는 다음과 같음.

가. 유기물 부하량

- (1) 투입유기물량은 발효조 내에 단위 용량당 몇 kg의 유기물을 넣는 가로 나타내고, 균의 성질과 발효온도에 의하여 그 적정량이 결정.
- (2) 일반적으로 사용되는 설계변수로서 단위용적에 대한 유기물 부하율 (kg-VS/m³/days)로 표시
- (3) 중온소화시 1.3 ~ 1.8 kg-VS/m³/days, 고온소화시 1.5 ~ 6.5 kg-VS/m³/days

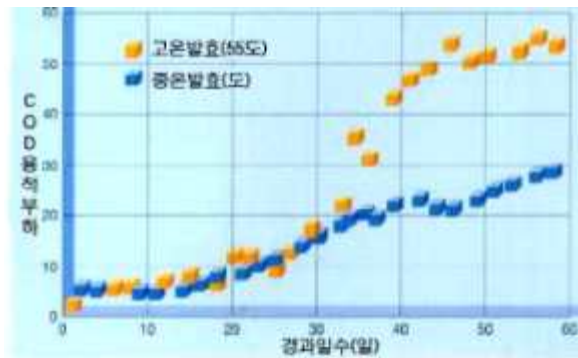


그림 9. 고온 및 중온발효에 있어서 경과일수에 따른 용적부하의 변동.

나. 영양조건

(1) 투입유기물 및 C/N비 및 C/P비

- (가) 투입유기물의 C/N비 (탄질소비) 및 C/P비 (탄소인비)는 메탄발효를 잘하기 위하여 중요한 요소.
- (나) 탄소는 미생물의 에너지공급원으로서, 질소와 인은 미생물의 아미노산, 단백질, 핵산등의 형성요소로서 가장 중요한 영양원.
- (다) C/N비와 탄소 1g당의 가스가 발생하는 량으로 가장 활발하게 혐기성반응이 일어나는 범위는 12 ~ 16.
- (라) C/N 비가 적은 유기물은 질소가 충분히 이용될 수 없기 때문에 과잉의 질소가 암모니아로 변화하고, 메탄발효 반응을 저해.
- (마) 인은 생체막과 ATP 등의 생명현상에 불가결한 원소로서 C/P비로서 100 ~ 500정도 필요.

(2) 미량요소

- (가) 미량요소로서 철은 제1상 및 제2상에서 각 균체내에서의 각종 산소의 형성에 필요함.
- (나) 철은 혐기성 소화조내에서 발생하는 황화수소에 의한 발효저해를 억제하고, 메탄균의 반응조 밖으로 유출을 억제하는 효과가 있음.
- (다) 니켈은 메탄발효단계에서 메탄균의 생리에 필요한 미량금속원소로 되어 있음.
- (라) 그 외의 미량요소로서 식물재배에 필요한 칼륨, 코발트도 필요함.

다. 접촉

- (1) 유기물과 미생물간의 적당한 접촉은 분해를 촉진시키는데 이는 혼합에 의하여 수행됨.
- (2) 기계적 혼합 및 소화가스의 재순환에 의한 혼합이 있음.

라. 온도 및 체류시간

- (1) 최적온도는 중온소화 30 ~ 37℃, 고온소화 50 ~ 55℃.
- (2) 소화에 요구되는 시간은 온도와 밀접한 관계가 있는데 중온소화시 25 ~ 30일, 고온소화시 10 ~ 15일.
- (3) 고온소화시 반응이 빠르고 보다 높은 가스를 생산가능 하지만 연료, 운영비, 고장의 발생이 많은 단점이 있음.

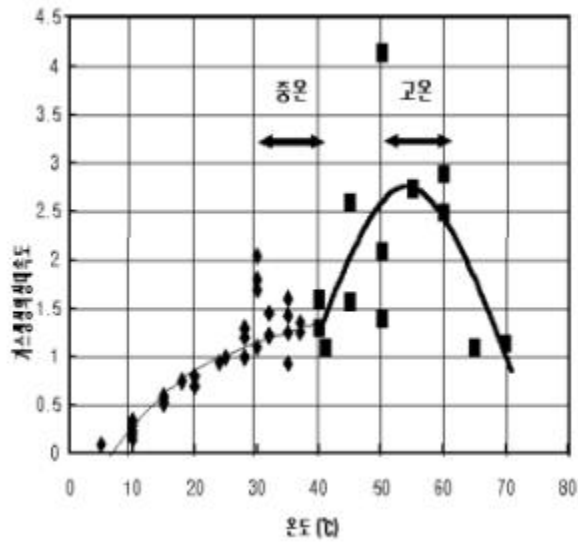


그림 10. 온도변화에 따른 가스 생성량의 상대속도.

바. pH

- (1) 평형상태의 pH는 6.5 ~ 7.5, 최적 pH는 7.2 ~ 7.4.
- (2) pH가 6.5 이하일 경우 산 생성 세균과 메탄생성 세균의 균형이 깨어져 scum 등의 발생이 많아지고 gas 발생량이 줄어듦.
- (3) pH의 저하는 유기물의 부하가 갑자기 높아질 때 발생하게 되는데 산 생성 세균의 유기물 분해에 의한 유기산 생성속도는 빠른 반면 유기산을 이용하여 메탄가스를 생산하는 메탄생성 세균의 유기산 분해속도는 느리기 때문에 유기산이 축적되어 pH가 하락.
- (4) pH가 하락하면 메탄생성 세균의 활성이 떨어져 CH₄ 생성물이 급격히 하락.
- (5) 일반적으로 유기산의 농도가 2,000 mg/L을 넘을 때 pH가 급격히 하락.

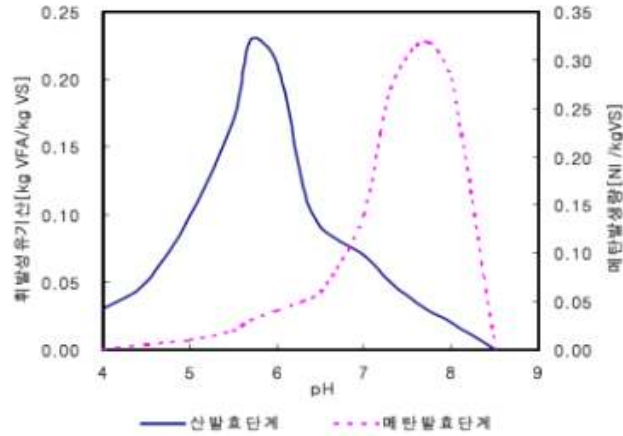


그림 11. 산발효조와 메탄발효조의 최적 pH조건.

사. 알카리도 (Alkalinity)

- (1) 혐기성소화에 있어서 알카리도는 주로 혐기성분해 과정에서 발생하는 암모니아의 중탄산염에 의한 것.
- (2) 소화조에 투입되는 슬러지의 질, 질소산화물의 양 및 소화의 정도에 의해서 변화함.
- (3) 소화액의 완충능력은 알카리도에 의한 것으로 유기산이 증가하면 다음식과 같이 반응.



- (4) 알카리도를 측정하면 pH치의 측정보다도 쉽게 변화를 감지할 수가 있음.

아. 가스발생량 및 구성

- (1) COD 1 kg당 0.35 m³의 CH₄ 생산.
- (2) 발생가스는 CH₄ 60%, CO₂ 30%, H₂S 1%, 기타 N₂, H₂, O₂가스가 포함됨.
- (3) 발생가스의 열량 5,000~7,000 kcal/m³.
- (4) CO₂ 함량이 35% 이상일 경우 소화기능에 이상이 있음.

표 6. 단상 혐기성반응기에 의하여 실제가동 된 소화조의 유기물 종류에 따라 가스발생량.

대분류	종류	가스발생량 (Nm ³ /kg)	메탄함유량 (%)	전처리	온도
농업 폐기물	벼짚	0.48	75	알카리처리	중온
	왕겨	0.20	60	없음	중온
	밀감외피	0.89	59	없음	30℃
	대두콩 껍질	0.48	60	효소처리	중온
	배추	0.71	60	없음	30℃
	양파	0.77	66	없음	30℃
기타	톱밥	0.12	58	알카리처리	30℃
	종이	0.81	75	가용화처리	32℃
	미역	0.40	67	없음	중온
	굵은 미역	0.52	52	없음	중온
	플랑크톤 A	0.25	60	없음	35℃
	플랑크톤 B	0.20	60	없음	35℃
	플랑크톤 C	0.31	61	없음	35℃
폐기물	우분뇨	0.1 ~ 0.3	60 ~ 70	없음	중온
	돈분뇨	0.4 ~ 0.6	60 ~ 70	없음	중온
	계분	0.3 ~ 0.5	-	없음	중온
	분뇨	0.4 ~ 0.5	-	없음	중온
	하수오니	0.5 ~ 0.7	-	없음	중온
	잔반	0.88	65	가용화처리	32℃

(5) 폐기물과 분뇨 중에 포함되어 있는 유기물은 탄수화물, 단백질, 지방임.

(6) 이들을 구성하는 원소가 사전에 알고 있는 것이라고 한다면, 다음과 같은 식에 의하여 메탄발생량을 산출하는 것이 가능함.

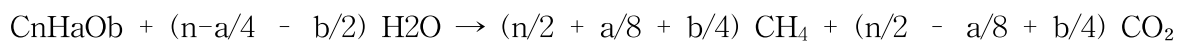


표 7. 가축분뇨로부터 메탄가스의 발생량 계산 예.

축종	분배설량(kg/ 두(필).일)	고형물 (kg/두(필).일)	유기물 (kg/두(필).일)	메탄가스발생량		필요한 발효조용적(kg/두(필))
				(L/kg투입원료량)	(L/두(필).일)	
소	30	4.5	3.6	200 ~ 350	720 ~ 1,260	1.8
돼지	2.5	0.625	0.5	300 ~ 500	1500 ~ 250	0.15
닭	0.12	0.03	0.0225	300 ~ 600	6.75 ~ 13.5	0.0072

자. 독성물질

- (1) 혐기성소화의 저해물질로서는 중금속류, 시안, 페놀 등의 독물, 강산, 강알카리, 강산화제 등이 있으며, 가용성의 동, 아연, 니켈 등은 저농도라도 혐기성 처리에 저해물질로써 작용함.
- (2) 고농도의 암모니아도 소화기능을 저해.
- (3) 암모니아 독성은 암모늄이온 농도와 pH상승의 양쪽에 기인하는 것으로 NH₃가 pH 7.4 ~ 7.6 이상에서 1,500 ~ 3,000 mg/L이거나, pH에 관계없이 3,000 mg/L 이상 되면 방해작용함.
- (4) 소화조에서의 독성물질은 영양물질로 간주되는 물질로서 과잉일 때 독성물질로 작용하는데 그 농도는 sulfides 200 mg/L 이상, 암모늄 1,700 ~ 4,000 mg/L, Na 5,000 ~ 8,000 mg/L, P 4,000 ~ 10,000 mg/L, Ca 2,000 ~ 6,000 mg/L 등.
- (5) 중금속은 황을 첨가하면 침전 제거 가능함.

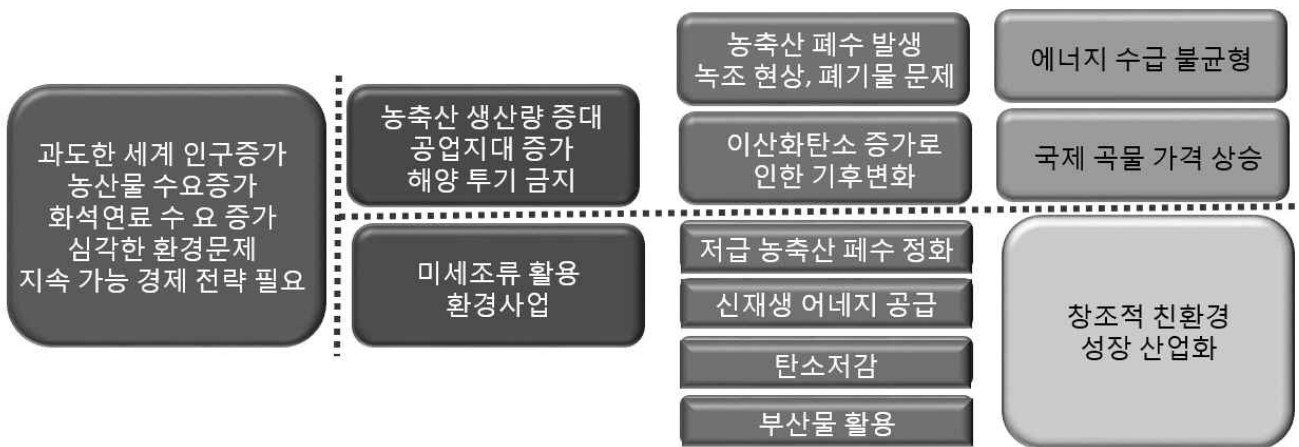


그림 12. 미세조류 활용 환경 사업의 필요성.

3절. 연구개발 범위

1. 바이오매스 생산성이 우수한 미세조류 개발.
 - 가. 지질함량 60%이상 (DW 기준), 중온성 클로렐라 1회 분열시간을 기준으로 선별 (중온 조류 및 저온종의 개량품종 - 저온생장 고지질 축적 미세균주 ArM0029 활용 및 우수 조류들의 선별).
 - 나. 가축분뇨 바이오가스 생산시설의 소화액 (가축분뇨 혐기소화액)을 영양염류로 사용.
 - 다. 미세조류 연속순환 고밀도 배양으로 생산되는 바이오매스를 N deficiency stress method 를 이용하여 지질 함량 60% 이상 증대.
 - 라. 생산성이 우수하고 저온 배양이 가능한 클로렐라 및 *Chlamydomonas* 선별.
2. 미세조류 고밀도 연속 순환 배양 방식의 최적화 기술 개발.
 - 가. 30 g DW/m³/d 이상의 바이오매스 생산 가능 기술.
 - 나. 미세조류 세포비파괴 추출 방법을 이용한 고밀도의 미세조류 재순환 배양.
 - 다. 연속순환 배양을 통한 최적화 혼합 배양 시 생산 수율 50 g DW/m³/d이상 달성 가능.
3. 미세조류배양에 적합한 가축분뇨 혐기소화 공정 기술 개발.
 - 가. 혐기소화 기본조건 (온도, pH, 체류시간)의 검토 및 최적화.
 - 나. 유기물 부하율이 메탄 생성 및 유기물 제거율에 미치는 영향 연구 및 최적 유기물 부하율 결정.
4. 혐기소화 전처리 및 후처리 기술 개발.
 - 가. 가축분뇨 혐기소화 공정 안정화, 메탄생산수율 최대화 및 미세조류 성장 촉진을 위한 암모니아 제거 기술 개발.
 - 나. 미세조류 성장속도 보전을 위한 가축분뇨 혐기소화액의 색도 제거 기술 확보.
5. 미세조류로부터 바이오연료 생산 공정 구축 및 산업화.
 - 가. 지방산치단체 축산분뇨 처리 시설을 이용한 에너지화 실증.
 - 나. 지방산치단체의 기존 바이오디젤 생산 업체와 연계 생산 공정 구축 및 사업화.
6. 배양 후 농축산용수 수질개선 장치 구현
 - 가. 혐기소화액 처리 친환경적인 생물학적 처리를 통한 인, 질소 제거 후, 폐수방류 기준치 이하의 수처리 시스템 구축.
 - 나. 배양수 처리 후, 물순환 재이용을 통한 수자원 최대한 재활용 시스템.
7. 부하변동에 따른 혐기소화 조건의 최적화 및 소화 성능 평가.
8. 여러 가지 암모니아 제거 기술 개발 및 최적 기술 적용을 통한 가축분뇨의 암모니아 농도 조절.

9. 색도물질은 염소, 오존, UV 등을 이용하여 색도제거 기술 개발.
10. 암모니아 제거 전처리, 혐기소화, 색도제거 후처리를 결합한 전공정의 가동 및 운전 최적화.
11. 전처리 (암모니아 제거), 혐기소화, 후처리 (색도제거) 공정의 통합을 통한 전공정 확립.
12. 통합공정 설치, 운전, 및 trouble shooting을 통한 최적화.
13. 통합공정의 성능평가 (오염물질 제거능, 메탄 생성능 등).
14. 혐기소화 pilot plant 가동 및 성능평가를 통한 가축분뇨 처리능 및 에너지 생산성 자료 확보.
15. 통합공정의 설계 인자 및 운전 기준 작성.
16. 농축산폐수에서 통계적 기법을 이용한 ArM0029 및 선별 미세조류의 배양 최적화 모사. 선별 미세균주의 대사체, 유전체 분석 및 오믹스 정보 비교 분석.
17. 저급 농축산 폐수를 활용한 미세조류 연속순환 고밀도 배양의 원천기술 확보를 위하여 2차년도에 미세조류 유전자 work 결과를 토대로 유용 유전자원 및 유용물질 발굴, 형질전환기법을 이용한 분자생물학적 균주개량의 기반을 확립.

제 2장. 국내외 기술개발 현황

1절. 국내현황 및 문제점

1. 현재, 가축분뇨 혐기소화액 처리하기 위한 경제성평가를 위하여 축산폐수, 음식물 폐기물, 분뇨 등을 처리하는 시장을 조사하였음(표 8).

표 8. 폐기물 통계 외 유기성 폐기물 발생 현황.

(단위: 톤/일)

구분	축산폐수	분뇨	음폐수	합계
일평균 발생량	131,335	46,581	8,225	186,141

<주: 2006년 기준임>

<출처: 한국환경자원공사, Waste-to-Energy Report(vol.1), 2008.10월>

2. 음식물류 폐기물의 재활용은 1997년부터 사료화와 퇴비화가 추진되어 사료화는 1998년 73.1%에서 2004년 47.6%로 매년 감소하고 있음. 퇴비화는 1998년 26.6%에서 2004년 42.4%로 증가추세에 있고. 이 외에도 하수병합 등으로 약 10%가 재활용되고 있음(그림 13).



자료: 환경부, 폐기물 에너지화 종합대책, 2008.5월

그림 13. 유기성 폐기물 자원화 사업별 환경성·경제성 분석(한국환경자원공사, 2008).

3. 2011년 말 유기성폐자원 처리 시설 용량은 총 43,424톤/일이며 일평균 처리실적은 36,668톤이며 가동률은 84.4%, 음식물쓰레기와 축산분뇨는 90% 이상 사료화 또는 퇴비화처리, 그러나 사료 품질이 낮고 판로가 한정되어 있어 재활용 효과가 적음.
4. 국내 하수슬러지처리 설비 시장은 2010년 1,500억원에 불과하나, 과거 해양투기 방식에서 자원으로 재활용하는 방식으로 변화하고 다양한 설비 수요도 확대될 것으로 보여 2015년 까지 연평균 10% 이상의 고성장세를 지속할 전망.

5. 폐기물 에너지화 시장의 경우, 2005년부터 2010년까지 세계 연평균 증가율의 2배인 6%의 성장률을 나타내어 2010년 기준으로 전세계 시장의 1.9%에 해당하는 50억 달러/년의 시장 규모를 보유하고 있는 것으로 보고됨(에너지관리공단, 2007).
6. 그동안 해양투기 되었던 하수슬러지의 연료화가 성공적으로 이루어질 경우 연간 20만톤의 석탄 절감으로 347억원의 수입대체 효과와 91억원의 탄소배출권을 확보 연간 약 438억원의 경제적 효과가 기대됨.
7. 국내의 축산폐수처리설비의 설치비는 4,650 ~ 7,913백만원 정도 이었으며, 톤당 처리단가는, 1,463 ~ 31,880원/m³으로 나타났음.
8. (주)포스코건설, (주)GS건설, (주)동부건설, (주)효성에바라환경 등의 대기업들이 2000년대 중반부터 시장에 본격적으로 진출. (주)에코페트로시스템, (주)동명알피에프, (주)성진유화, (주)21세기리싸이클링 등과 같은 20여개의 소규모 기업체가 기술개발과 실용화 보급을 주도하고 있음.

표 9. 국내 유기성 폐기물의 발생 및 처리 현황.

폐기물 종류 (통계년도)	발생량	처리 현황									
		퇴비화 액비화	사료화	공공 처리	매립	연료화	소각	바이오 가스화	재활용	해양 투기	기타
음식물쓰레기 (2011년)	12,777 (톤/일)	4,669	7,149				394				14
축산분뇨 (2010년)	136,000 (m ³ /일)	119,000		17,000							
하수슬러지 (2010년)	8,438 (톤/일)				926	653		1,492	1,741	3,600	26

<출처: 음식물류 폐기물 처리시설 운영 현황, 2012; 환경통계연감, 2010; 하수도통계, 2010>

9. 미세조류를 이용한 농축산 폐수 및 유기성 폐기물 처리에 관련된 국내 시장은 아직 미형성되어 있으며 현재 유사한 유기성 폐기물 처리 및 축산 분뇨 처리 관련 시장 통계값도 미흡하여 정확한 파악이 어려움.
10. 국내에서 재생에너지 생산을 위한 가축분뇨 활용은 국내의 경우 초기 단계로 경제성 부족과 시행착오로 아직 상용화 성공 사례가 많지 않은 실정으로서 농촌진흥청에서 2002년 ‘가축분뇨처리 및 바이오가스 이용기술’을 충남 성환에 적용한 바 있으나 현재는 가동 중단상태에 있고, 국회 국정 감사에서는 “2011년 정부 폐기물 에너지화 사업이 예산만 투입하고 별다른 성과가 없다”고 비판된 바 있음.

11. 여기에는 여러 가지 요인이 있겠으나, 숙련된 운전을 요하는 혐기소화에 적합한 전문인력이 부족하고, 가축분뇨의 혐기소화 저해 요인에 대한 연구가 부족하며, 초기 투자비에 대한 부담 등이 주요 원인이며, 혐기소화 후 남은 혐기소화액의 처리에 대한 방안 (예, 액비로 활용)이 확실치 않은 점도 혐기소화 보급의 장애 요인임.
12. 미세조류를 이용한 수질정화에 관한 주요 연구로서는 부착조류에 관한 연구는 하천수의 유기오염이나 영양상태 판정 (Choi and Chung, 1990; 김 등, 1992; 최와 정, 1995; 이와 김, 1996). 그 외의 부착조류의 현존량 및 turnover rate 측정 (김, 1975), 인공매질에 따른 부착조류의 부착능 (조, 1994), 하천내 부착조류의 이입속도 및 기질 특이성 조사 (정 등, 1996), 하상 부착조류의 일차생산성 (신과조, 1998)이 조사된 바 있으며 부착조류와 식물플랑크톤 및 박테리아의 증식속도와 인 흡수능 및 경쟁이 비교·고찰 (황과 공, 1999). 김 등 (2001)은 식물 플랑크톤을 영양염류 제어에 이용한 실내연구를 통해 2일간의 배양기간에 TKN 88%, 무기인 70 ~ 80%의 제거율을 보고하였고 이러한 제거는 식물플랑크톤 생체량 (Chl-a)의 급속한 증가와 일치.
13. 일반적인 폐수처리 방법을 대신하여 미세조류를 이용하는 처리 시스템이 유기물 제거 방법의 대안으로 제시(공석기 외, 1997; 김성빈 외, 1998; 최정우 외, 2000).
14. 미세조류의 인공적 성장조절이 가능하다면 수질오염 중에서 특히 부영양화 현상을 일으키는 영양물질의 제거에 매우 효율적일 것으로 판단(공석기 외, 1997). 미세조류는 고농도의 유기물을 함유한 폐수로부터 N, P 성분을 흡수하여 성장할 수 있기 때문에 이들을 이용한다면 N, P를 제거함과 동시에 어류의 먹이 등과 같은 유용한 바이오매스를 생산 가능(최정우 외, 2000). 상기에서 생산되는 미세조류는 세포내 우량 단백질의 함량이 높아 고단백 가축사료로도 이용 가능. 그러나 과다 증식한 미세조류를 회수하지 않으면 노쇠화하고 세포가 파괴되어 다시 유기물로 환원되므로 미세조류의 기계적인 회수방법이 요구.
15. 농어촌공사에서는 미세조류를 이용한 농촌지역 고농도 오염물질의 수질개선 효과를 평가하기 위해 2011년 5월부터 2011년 11월까지 미세조류 생산 시설을 운영하였음(그림 14). 연구대상지는 전북 부안군 계화면에 위치한 계화조류지 유입부이며, 실험 대상수는 계화 간척지로 알려진 대규모 농경지역으로부터 발생하는 농경배수, 계화 하수처리장 방류수, 부안군 위생처리장 방류수가 유입되고 있는 오염하천수와 계화 하수처리장, 부안군 위생처리장의 협조로 각 처리장의 방류수 처리수를 직접 취수하여 활용하였음. 실험에 사용한 하수처리장 및 위생처리장 처리수의 평균 TN농도는 각각 8.913 mg/L, 226.9 mg/L, TP 농도는 1.003 mg/L, 1.996 mg/L로 하천수 TN 3.907 mg/L, TP 0.318 mg/L 에 비해 상당히 높은 수준을 보였다. 연구기간 동안 총질소와 총인의 수질개선 기능을 평가한 결과 총질소의 경우 평균 76.2%, 최대 94.4%, 총인의 경우 평균 81.7 %, 최대 91.6%로 수질개선 효율이 상당히 높은 수준을 보였으며, 특히, 무기영양염의 경우 평균 87.6 ~ 100 %, 최대 100%로 대부분의 무기영양염이 제거되어 유기영양염의 무기화 공정을 추가한다면 총인과 총질소의 처리효율역시 100 %로 향상될 수 있을 것으로 보고함.



그림 14. 계화조류지에 위치한 미세조류 배양시설과 하수/위생처리수의 적용방안.

16. 미세조류 대량배양용 반응기는 크게 개방형과 밀폐형으로 분류 가능.

가. 수로형 연못 형태의 개방형 반응기

(1) 장점: 경제성과 반응기 청소 시 용이.

(2) 단점: 배양 조건 제어의 어려움, 장시간 미세조류 성장의 어려움, 낮은 생산성과 큰 면적을 필요로 함.

나. 밀폐형 반응기는 원통형과 평판형으로 구분

(1) 원통형 반응기

(가) 장점: 넓은 광조사 면적과 우수한 생산성 및 상대적으로 저렴한 비용.

(나) 단점: 산소축척, 막힘 현상, 관의 벽 두께 증가, 광합성 저해 현상.

(2) 평판형 반응기는 바이오 질량 생산에 소비되는 에너지 감소와 짧은 산소 경로 특징으로 최근 활발한 연구가 진행 중 임.

다. 본 연구에서 진행중인 수직 원통형 반응기는 높은 물질 전달율, 우수한 혼합성, 낮은 에너지 소비율, 높은 대량 생산 가능성 및 적은 전용 면적이 장점 있음. 하지만 대형화 시 광조사면적의 감소, 복잡한 형상의 제작 등이 단점임.

17. 바이오이츠 바이오연료 생산 공정

- 가. 배양 및 바이오연료 생산공정을 대규모로 운영하기 위해서는 미세조류의 배양, 수확 및 지질추출 단계 등 관류배양 및 세포비파괴 추출기술, cell settler를 이용하여 이를 해결.
- 나. 바이오이츠는 각 공정단계를 모듈화하여 통합하여 자동화 운영이 가능한 시스템으로 대규모 바이오연료인 미세조류 지질을 추출하는 integrated system을 개발하였음(그림 15).

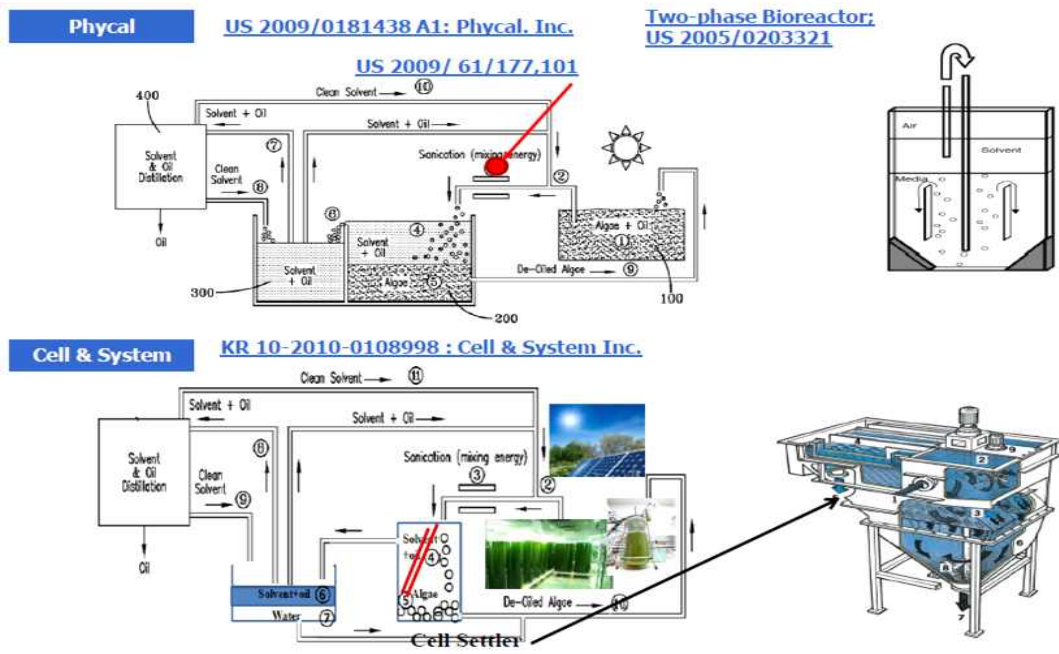


그림 15. 미세조류를 종속영양 혹은 혼합영양으로 배양하고 milking하여 지질을 추출한 후, 지질정제처리 시설로 이송하여 바이오디젤을 제조하며 지질이 제거된 살아있는 미세조류는 관류배양을 하는 설비 등으로 구성된 integrated system임.

다. 바이오이즈는 혼합영양배양으로 고밀도인 미세조류배양액을 세포비파괴추출기술로 살아 있는 미세조류를 분리하고 있는 순환배양하여 고밀도배양하고 수확된 지질 및 미세조류 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 기술을 개발하였으며 그 결과는 “미세조류 배양에 의한 바이오디젤 및 발효산물 생산방법 및 장치 (등록번호 제1012444690000호)” 및 “세포배양을 통한 세포 및 지용성물질의 생산 방법 및 장치 (등록번호 제 1012511910000호)”로 특허 등록 하였음(그림 16).

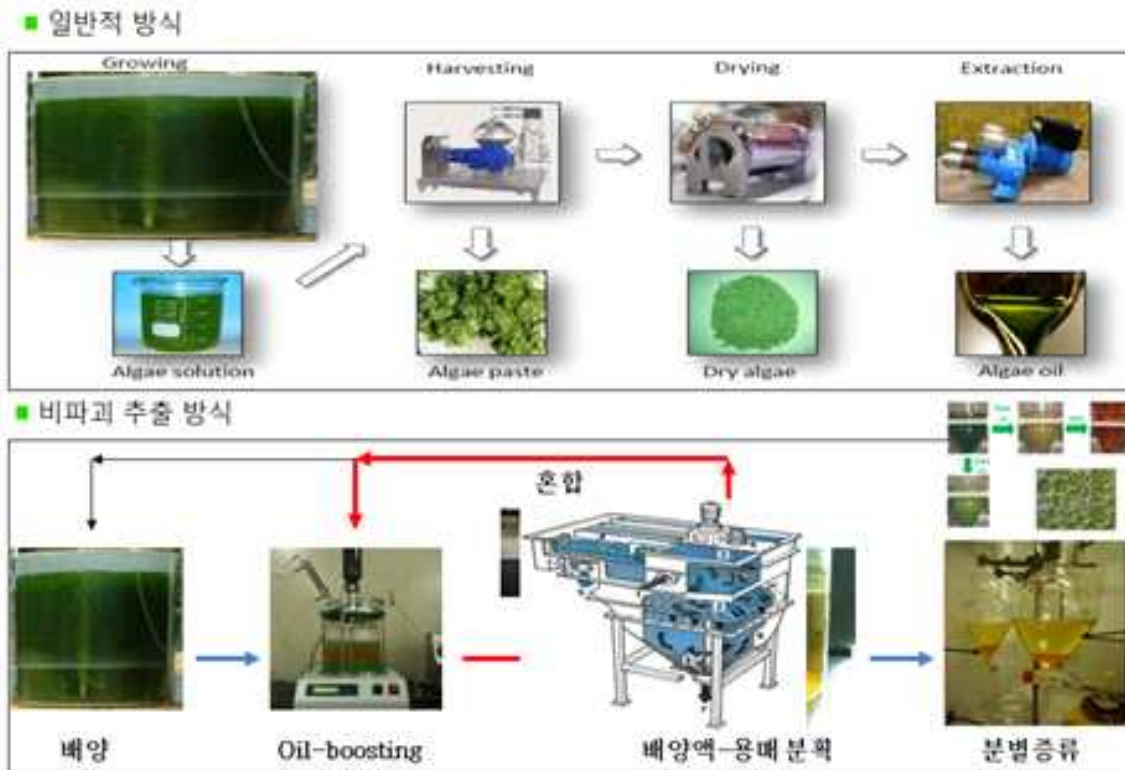


그림 16. 당사의 세포비파괴지질추출기술에 의한 지질 및 살아있는 미세조류 수확 및 순환배양의 개념.

라. 혐기소화액을 이용한 미세조류 배양기술: 혐기소화액에서 배양한 미세조류를 이용하여 지용성물질 및 미세조류 바이오매스를 생산하는 기술을 개발하여 “유기성폐기물의 미세조류배양에 의한 바이오가스, 지용성물질 및 미세조류의 생산 방법 및 장치 (등록번호 제 1011949420000호)” 특허 등록하였음(그림 17).

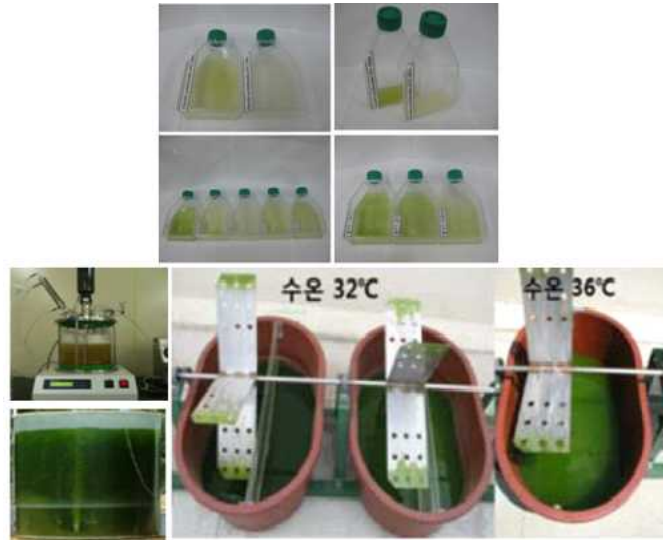


그림 17. 혐기성소화액에서 배양한 클로렐라.

마. 본 과제 제출 당시에는 “관류배양 및 세포비파괴 추출기술, cell settler를 이용한 integrated system”을 제시하였으나 본 사업의 성과로 “배양 및 세포비파괴추출을 연속적으로 구현하는 system”을 개발하고 이를 구현하는 방법을 제시하고 있음.

바. 미세조류의 배양 및 milking 시스템은 온도조절 모듈, 혼합모듈 및 노즐모듈로 구성되어 대형화된 발효장치를 기반으로 설계 및 제조가 가능함.

- (1) 온도조절 모듈: 장치내의 온도를 모니터링하여 그 결과로 노즐모듈을 제어하여 일정한 온도를 유지하게 하는 기능으로 중온성 미세조류 및 저온성 미세조류 모두 특정 최적온도에서 배양이 가능.
- (2) 혼합 모듈: 배양 및 milking시에 용액을 균질하게 혼합하는 기능이 있으며 일정한 회전수를 유지하는 기능.
- (3) 노즐 모듈: 온도조절 용액을 공급하는 통로 역할을 하는 노즐과 배양 및 milking에 필요한 용액을 공급하고 생산물 및 폐기물을 회수하는 기능.

18. 2014년 제4차 신재생에너지 보급 계획을 통해 국내 총 신재생에너지 공급량 중 바이오에너지의 비중을 1.2배로 확대 도모. 바이오에너지/신재생에너지 (총 공급량) : (2012년) 15.2% → (2020년) 18.8% 으로 설정함(전은진 & 한수현, 2014).

가. 국내의 바이오 연료 보급 정책은 바이오 디젤부터 시작되었으며, 2015년 7월부터 바이오 디젤 및 바이오 에탄올의 연료혼입 의무화 제도 (RFS)를 시행함. 2007년 9월 재정부 및 관계부처 합동으로 제1차 바이오 디젤 중장기 보급계획을 통하여 최초로 바이오 디젤 중장기 로드맵 및 혼합비율 목표를 제시하였음. 이후 2010년 제2차 바이오 디젤 중장기 보급계획을 통해 RFS제도 도입을 추진, ‘신에너지 및 재생에너지 개발 이용·

보급 촉진법'을 개정한 결과, 2015년 7월부터 시행됨(산업통상자원부, 2014).

- 나. 국내 바이오에너지 R&D 투자액은 2009년 이후 연평균 8.16% 증가하여, 2012년 기준 약 857억원 규모에 도달하였음. (구)교육과학기술부 및 (구)지식경제부가 바이오 에너지 R&D에 가장 많은 투자를 진행하였으며 각각 기초 연구 및 개발연구 단계 중점 수행중임. 연구개발단계별 투자규모를 살펴보면 기초연구에 가장 많이 투자되고 있으며, 그 다음 개발연구, 응용연구 순으로 투자됨. 출연연, 대학, 중소기업 순으로 연구수행비중이 높으며, 출연연은 전 연구개발단계에 걸쳐 골고루 수행하는 반면 대학은 기초연구에, 중소기업은 개발연구 집중하고 있음(전은진 & 한수현, 2014).
- 다. 국내 보급 중인 수송용 바이오 연료의 대부분인 80%를 차지하는 것은 바이오에탄올로서 수송부분에서 중요한 역할을 하고 있음. 바이오에탄올은 곡물인 옥수수, 사탕수수, 밀 등으로부터 생산되고 있으며 최근 에탄올 생산이 가파르게 증가함에 따라 원료의 부족 문제를 가지는데, 이와 같은 사용의 증가는 식량 자원 부족의 문제를 야기함. 지속적인 에탄올 생산을 위해 비식용원료를 이용한 목질계 바이오매스 활용 기술개발이 추진되고 있음(유기돈, 2008).
- 라. 국내에서는 2002년 5월부터 수도권과 전라북도 소재 정부 지정 주유소 140여 곳에서 일반 차량을 대상으로 BD20 (바이오디젤 20% 혼합 경유) 형태로 시범 보급이 시작되었음. 2006년 7월부터 바이오디젤 보급지역은 전국으로 확대되었고, 보급형태는 BD5와 BD20으로 이원화되었음(환경부, 2007).
- 마. BD5는 정유사가 바이오디젤 생산자로부터 바이오디젤 (BD100)을 공급받아 제조하여 기존 석유제품의 유통망 (전국 주유소)을 통해 전 경유 차량에 판매하고 있음. BD20은 바이오디젤 생산자가 혼합 제조하여 자가 정비시설과 자가 주유 취급소를 갖춘 관리가 가능한 사업장 (버스, 트럭, 건설기계)에 직접 보급 판매하고 있음(환경부, 2007).
- 바. 정부는 바이오디젤의 중장기 보급 로드맵을 2007년에 발표하였고, 동 보급 계획에 따르면 2008년부터 국내 정유사가 경유에 혼합하는 바이오디젤 함량을 매년 0.5% 씩 높여 2012년에는 시중에서 판매되는 경유 중 바이오디젤 함량이 3%까지 높아지도록 하였음 (유기돈, 2008).
- 사. 국내의 바이오디젤은 약 2% 정도를 차지하고 있으며, 바이오에탄올은 아직 제대로 보급되지 않고 있음. 바이오디젤의 주요 원료로는 대두유 또는 팜오일이 사용되고 있으나, 미세조류를 이용한 생산연구가 많은 정부부처에서 이루어짐으로써 2020년까지는 미세조류를 이용한 상용화가 될 것으로 예측됨. 바이오에탄올의 경우 2006년 바이오에탄올 보급을 위한 실증연구가 시작되었으며 2007년 9월 에탄올 혼합연료의 실차 주행 연구를 착수(유기돈, 2008).
- 아. 목질계 바이오매스는 당질계 (사탕수수, 사탕 무등) 또는 전분질계 원료 (쌀, 밀 또는 카사바 등)와 달리 미생물에 의해 거의 분해되지 않는 리그닌이 둘러싸고 있어 에탄올 생산 원료로 활용하기 위해서는 리그닌과 당 성분인 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 등으로 분리하는 전처리가 필요함. 각국에서는 바이오매스별 전처리 기술과 당화기술을 확보하기 위한 기술을 개발하고 있음(이진석, 2013). KAIST 이상엽 교수팀은 2013년에 대장균을 이용하여 짧은 사슬 알칸 (short-chain alkane) 형태의 바이오가솔린을 생산하는 연구결과를 Nature에 보고하였음. 먼저 fadE 유전자를 제거하여 베타산화 (β -oxidation)을 차단하고, 3-옥소아실-아실운반단백질 합성효소를 코딩하는 FabH는

fadR 유전자 제거를 통해 향상시켰음. 최종적으로 580.8 mg/L의 농도로 짧은 사슬 알칸(short-chain alkane)을 생산할 수 있었음(Choi and Lee, 2013).

표 10. 국내 기업별 주요 현황(전은진 & 한수현, 2014).

분야		기업명	주요 기술개발 및 사업화 활동
바이오 알코올	바이오 에탄올	창해에탄올	2006년 국내 최대 규모의 바이오에탄올 증류, 탈수 설비를 독자 개발하고 바이오에탄올 관련 기술 꾸준히 개발 바이오 연료물질 및 바이오 화학물질 제조방법으로 미국, 중국, 브라질, 인도네시아, 태국 등 해외 5개국에 특허 출원
		바이올시스템즈	홍조류에서 바이오에탄올을 만드는 실증 공장을 세계 최초로 준공
		퓨넥스	경기도 평택시 포승 공단에 바이오에탄올 연료유 생산 및 저장 공장을 완공
	바이오 부탄올	GS 칼텍스	2007년 바이오연료 개발을 위한 연구를 시작한 이래 바이오 부탄올 상업화에 매진
		SK이노베이션	바이오부탄올 중심으로 2세대 바이오연료 생산기술 개발 주력
바이오디젤		SK케미칼	국내 최대 바이오 디젤 생산 기업(생산능력 12만톤/년)
		단석산업	연간 8만톤 생산하며 최하급 폐식용유를 바이오디젤 원료인 정제유로 변환하는 정제설비 (연산 6만톤)을 건설 중
		애경유화	바이오디젤 상업화에 이어 바이오디젤 부산물로 발생하는 비정제 글리세린을 활용하여 공업용/식품용 정제 글리세린을 연간 1만톤을 제조하는 시설을 완공
		M에너지 (구. 가야에너지)	비균질 복합고체축매를 이용한 차세대 바이오디젤 생산기술 개발

2절. 해외현황 및 기술개발 동향

1. 농생명소재 세계 시장규모는 2010년 1,250억 달러에서 2020년 2,500억 달러로 성장 전망(그림 18).

(단위: 십억 달러)

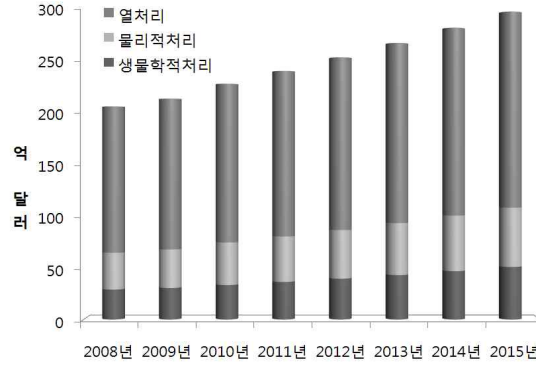


그림 18. 농생명소재 세계 시장규모.

<출처: M&M, Global waste to Energy Technologies Market, 2010>

2. M&M은 세계 폐기물 에너지화 시장이 2008년 약 207.5억 달러에서 ‘2015년 299.8억 달러로 성장하며, 2010년 ~ 2015년까지 연평균 성장률이 5.5%에 이를 것으로 전망.

3. 2015년 열처리 기술 시장이 전체 시장의 약 63.7%를 차지하고, 2010년 ~ 2015년 생물학적 기술 시장의 평균 성장률이 8.8%로 물리적 기술 및 열처리 기술에 비해 성장률이 높을 것으로 전망.

4. 1990년대 이후 세계 환경시장은 지속해서 증가하고 있고 EBI에 의하면 세계 환경 시장은 2000년 5,440억 달러에서 2010년 7,967억 달러로 연간 10년간 연평균 약 3.9%씩 증가하였으며, 2011년에서 2020년까지 연평균 성장률이 약간 둔화하여 약 3.2%씩 증가하고 2020년에는 세계 환경시장이 약 1조 865억 달러에 이를 것으로 전망(그림 19).

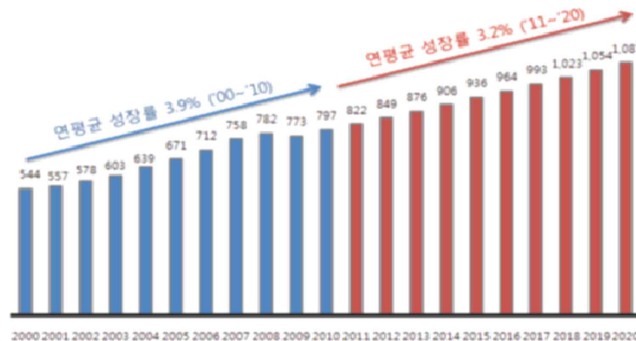


그림 19. 세계 환경시장 규모 및 성장 전망(2000 ~ 2020).

<출처: EBI. INC.San Diego. Calif.2009 내부자료>

5. 환경 시장과는 별개로 가공하지 않은 미세조류의 바이오매스 국제시장의 규모는 현재 매년 US\$ 1.25 bill (1,250억원, 1\$ / 1,000원)정도이며 40% (500억원) 이상이 동남아시아 시장에서 거래되고 있음.
6. 대부분은 open pond나 race way방법으로 생산되어 온 미세조류이며, 순수배양 (배양기)에 의해 생산된 미세조류는 open pond나 race way에서 생산된 미세 조류에 비하여 최소 kg 당 10배의 가격으로 판매되고 있지만 제한된 공급 물량으로 아직 정상적인 공급과 수요의 거래가 형성되지 않고 있으며 공급과 함께 전량 (100%)이 판매되고 있는 실정임.
7. 본 기술 개발을 통해 환경 사업 뿐 아니라 미세조류 원료 및 다양한 연계사업 진출 시 많은 분야에서 시장 대체 효과를 가져올 수 있음.
8. 미세조류를 이용한 수질정화에 관한 주요 연구로서는 부영양 하천에서의 생물막내 조류의 비율과 성장량 측정 (Aizaki, 1978, 1979, 1980), 부착매질을 설치한 순환수로에서의 하천 수 유기물 제거 (Tachibana et al., 1988; Okada et al., 1984) 보고.
9. 일반적인 폐수처리 방법을 대신하여 미세조류를 이용하는 처리 시스템이 유기물 제거 방법의 대안으로 제시 (Arauzoet et al., 2000; Aziz and Ng., 1993; Carberry and Greene, 1992; Graggs et al., 1997; Lau et al., 1995; Mihalyfalvy et al., 1998; Rectenwald and Drenner, 2000).
10. 트라비소 등과 탬 등은 폐수의 영양염류를 제거하기 위해 조류를 고정화하여 실험 (Tam and Wong, 2000; Travieso et al., 1996).
13. 네덜란드 Ingrepro사는 하수, 농장 및 산업 폐기물 (식료품 회사, 감자산업)로부터 바이오 가스를 생산하고, 이후 남은 영양분을 조류 생산에 활용하며, 이로 인해 생산된 algal biomass는 일차적으로 제트연료를 생산하는 원료로 사용하고, 기타는 플라스틱으로부터 사료성분에 이르는 제품 개발에 적용하고 있음.
14. 영국 Redcar에 소재한 공정혁신센터는 Arup사와 함께 조류 대량배양기술개발 연구에 합의하고, 기존의 전력공급처와 폐기물 관리 시스템을 집적하는 방안을 강구하고 있다.
17. 해외 미세조류를 이용한 폐수처리 사업현황은 표 11과 같으며 대표적인 미세조류를 이용한 폐수처리의 New Zealand National Institute of Water & Atmospheric Research (NIWA)는 High Rate Algae Pond (HRAP)를 이용하여 폐수처리와 동시에 미세조류 바이오매스를 생산. NIWA의 연구는 공학적 측면에서 실용적 생산에 초점을 맞추어 연구. HRAP의 폐수 처리 효율은 Waste Water Treatment (WWT)보다 좋고 pH<8로 유지하여 algae/bacteriasymbiosis를 유지하는 것이 가능함. HRAP에서 조류 생산성은 18 g/m²이며 CO₂를 첨가하면 생산성이 증가. 뉴질랜드의 Christ church에는 세계에서 가장 큰 규모로 5ha (4 × 1.25 ha)의 HRAP설비(그림 20).

표 11. 해외 미세조류 사업 현황 및 기술.

HRAP	location	Areal productivity(g/m ² /d)		Surface area(m ²)	Total volume(m ³)
Commercial production	Hawaii	40	-	-	-
		29.7	-	-	-
		26	-	48	5.8
		30	-	9.2	1.1
		37.5	-	9.2	1.1
	New Mexico	14	-	100	22.5
		21	-	100	22.5
	Israel	12.9	-	2	0.3
California	18.4	14.8	100	-	
Wastewater treatment	Israel	33	-	120	-
		35	-	150	-
	New Zealand	25	16.8	32	8
	Philippine	15.3	11.9	100	-
	Scotland	18	-	13	-
	Spain	2.7 ~ 14.8	9.9 ~ 11.5	1.54	-
	Kuwait	15	-	12	-



그림 20. New Zealand의 High Rate Ponds.

18. 미국 California Polytechnic State University의 Dr. Lundquist는 미세조류를 이용한 폐수처리에 대해 연구. California주의 폐수처리 규정은 $N < 2 \text{ mg/L}$, $P < 0.1 \sim 0.5 \text{ mg/L}$, BOD (organic compounds) $< 10 \text{ mg/L}$ 로 설정. 폐수처리 비용은 $\$7 \sim 12 \text{ million capita l/100,000}$ 명으로 추정되었으며, 미세조류를 이용한 폐수처리시 C : N : P ratio의 조정이 중요함을 강조 (Dr. Rhee의 N : P ratio 논문 인용). NH_3 는 75 ~ 90% 제거. Bioflocculation은 처리 효과만 좋으나 고생산가 임(그림 21).



그림 21. California, Napa의 산화지.

19. Virginia대학 연구팀은 미세조류에게 더 많은 이산화탄소와 유기물을 공급하면 무게로 40% 이상 오일 수율을 증대. 즉 가장 비싼 처리 비용이 드는 고형폐기물의 처리를 가능하게 하고 추가적으로 대기보다 30 ~ 40배 더 높은 이산화탄소를 함유한 석탄발전소의 배기가스 내 이산화탄소를 감축 가능(Alternative Energy Today, 2008).
20. Phycal 사는 미세조류에 대한 milking을 이용하여 바이오디젤 및 메탄가스를 생산하는 Biorefinery 개념을 실현. Phycal 사는 2010년 7월에 미세조류를 수로지에서 배양하고 milking으로 지질을 추출하고 잔사 바이오매스를 메탄가스 등의 바이오에너지를 생산하는 파일롯트 공장 설립 및 운전을 목적으로 미국 DOE로부터 24 M\$를 지원.
21. 미국의 Algae 주요 회사는 아래와 같으며 이외에도 200개 이상의 기업들이 algae에서 bio diesel 및 bio plastic 과 같은 석유화학제품, 화장품 및 건강보조식품 등을 생산하고 있음.
- 가. Exxon Mobile은 Synthetic Genomics Incorporated의 algae biofuel 생산에 6억 달러 투자하여 파트너십 체결.
 - 나. Chevron은 NREL과 2007년 Algae에서 jet-fuel & bio diesel 등의 oil을 생산하기 위한 전략적 제휴.
 - 다. Shell 또한 2007년 하와이에서 하와이대학, HR Biopetroleum과 Cellana라는 JV설립하여 algae bio diesel 생산.
 - 라. 2009년 8월 BP는 algae로 부터 영양보조제를 생산하는 Martek Bioscience에 1억 달러 투자.
 - 마. Conoco-Phillips 역시 2008년 C2B2가 algae에서 biofuel 생산하도록 자금 지원.
 - 사. Bill Gates의 투자회사 Cascade Investment는 algae bio diesel을 생산하는 Sapphire Energy에 1억 달러 투자.

- 아. 뉴저지주에 소재한 전력회사인 NRG Energy와 GreenFuel사는 발전소에서 나오는 폐 CO₂를 이용해 조류를 생산하고, 압착을 통해 지질을 생산하여 바이오디젤 원료로 사용하고 나머지 부산물은 동물사료나 기타 물질로 전환하고자 함.
- 자. New Mexico에 소재하고 있는 CEHMM (The Centre of Excellence for Hazardous Materials Management)은 석유 정유사에서 배출되는 폐수를 활용하여 야외의 “oval-shaped “raceway” type ponds에서 조류를 배양함.
- 차. 2009년 5월 미국 미네소타 대학 연구팀과 Metropolitan Council 공동연구에서는 농축된 폐수에서 추가적인 영양분 없이 성장할 수 있는 조류 종을 선별, 활용하여 바이오연료를 생산하는 통합공정을 개발하였음.

22. 2000 ~ 2007년 수송용 바이오에탄올 생산량은 연평균 19% 증가하여 2007년 605억 L에 이르고 있으며 2012년에는 1,493억 L로 증가가 예상되고, 바이오디젤의 경우 기간 연평균 60%씩 증가하여 2007년 102억 L에 달하며 2012년에는 311억 L로 증가가 예상됨. 현재까지 생산되는 바이오에너지는 전 세계적으로 전체 수송연료의 1% 정도를 차지하는 수준이나 2030년에는 최대 5%까지 증가하고, 수송용 바이오에너지의 수요 증대에 따른 바이오에너지 생산 플랜트 수요 증가로 2030년까지 전 세계 바이오에너지 플랜트 시장 수요는 약 200조원이 될 것으로 전망됨(이진석, 2015).

23. 바이오에너지 생산을 위한 국가별 노력은 해당 국가의 부존자원과 밀접하게 연관되어 있는데, 예를 들어 바이오에탄올의 원료로 미국은 옥수수, 브라질은 사탕수수를 이용하는 비중이 매우 높고, 독일은 EU국가 중에서 유채씨를 이용해서 바이오디젤을 가장 많이 생산하고 있음. 목재자원이 풍부하여 관련 산업이 발달한 스웨덴과 핀란드는 다른 EU 회원국들과 달리 목재 및 펄프 제지 공정에서 발생하는 바이오매스를 에너지 생산에 많이 이용하고 있음(배정환, 2006).

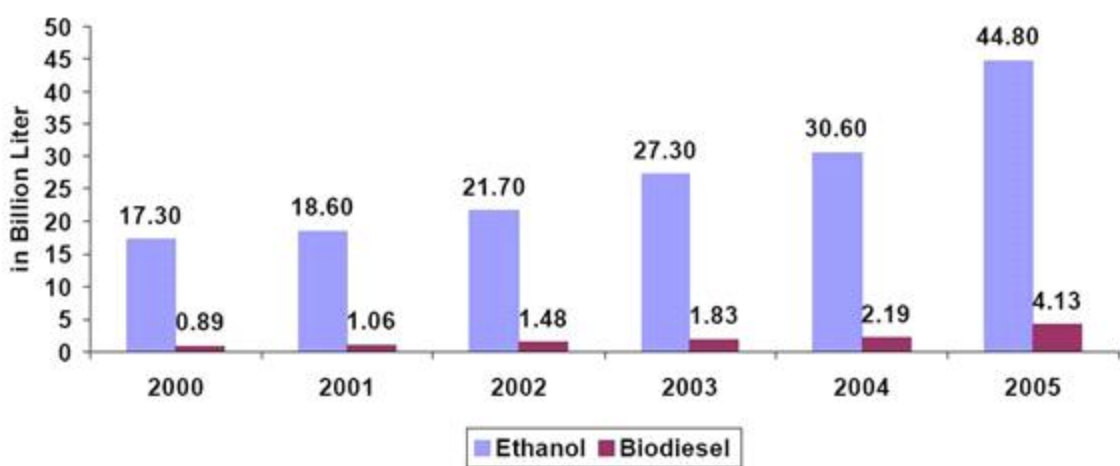


그림 22. 에탄올 및 바이오디젤 세계 생산량 통계 (단위: Billion Liter, 기간: 2000 ~ 2005)(지식경제부, 2012).

가. 미국

현재 세계 1위의 바이오 에탄올 생산국 (연간 약 50억 갤런)으로, 전 세계 총 생산량의 약 70% 수준 (Pike Research, '12) 환경에 대한 관심과 세금 공제 혜택에 힘입어 바이오 디젤 시장은 연평균 성장률 91%를 기록하며, 생산량이 2010년까지 1.5×10^9 갤런 (5.7×10^9 L), 2012년까지는 8.0×10^9 갤런 (3.0×10^{10} L)까지 증가할 것으로 예상됨. 2022년까지 360억 갤런의 바이오연료를 소비한다는 목표를 설정하였고, 그중 210억 갤런은 기존 옥수수 기반 에탄올 이외의 바이오연료로 채운다는 계획을 수립함. 미국은 바이오 에너지의 주원료가 옥수수이며 최근 고구마로 검토 중이며, 에탄올 생산량 1990년대에 34억 L 에서 2007년에는 250억 L 까지 증가하였고, 비식용 셀룰로오스계 작물을 이용한 에탄올 생산을 추진하기 위해 저가의 셀룰라아제 생산기술, 전처리, 고효율 미생물 개발에 주력하고 있음. 또한 식물, 해조류를 이용한 열분해, 고압의 수소화 등으로 고체 바이오매스 연료에서 직접적으로 바이오원유를 생산하는 기술을 개발 중임(이진석, 2015).

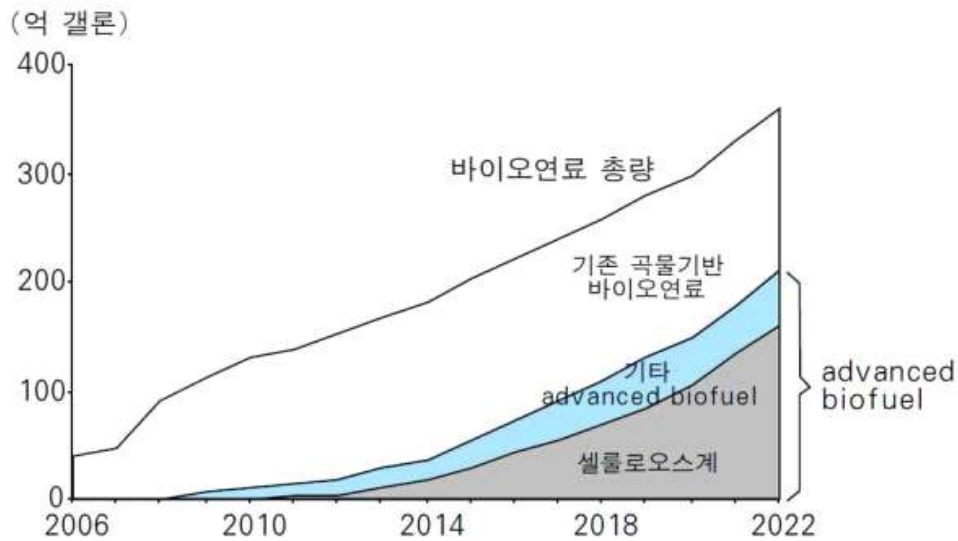


그림 23. 미국의 바이오연료 보급 계획(지식경제부, 2012).

나. 브라질

세계에서 바이오에탄올 상용화율이 가장 높은 브라질은 사탕수수를 주원료로 바이오에탄올을 연간 245억 L 를 생산하며 미국에 이어 세계 제2위 수준임. 1980년대부터 브라질 내 절반 이상의 차량이 95% 에탄올 (E95)로 운행되며, 현재 브라질 내 가변연료차량 (FFV) 이 전체 차량의 50% 이상이고, 25% 이상의 무수에탄올 배합을 의무화하고 있음(산업통상자원부, 2014).

다. 캐나다

바이오디젤 보급의 초기 단계로 BrampTons 지역 내의 137대의 버스에 BD20을 사용 중임. 정부는 기후변화협약에 대비하여 유체유로부터 2010년까지 연간 5×10^8 L, 2020년까지 1×10^9 L의 바이오디젤 생산을 추진 중임(지식경제부, 2012).

라. 일본

교토시는 연간 3,000톤 규모의 바이오디젤 생산 공정을 가동 중이며, 청소차량 및 시내 버스에 대해 BD100과 BD20을 시험 운전 중임. 정부차원에서는 2007년 바이오디젤의 품질 기준안을 마련하였으며, BD5 사용을 추진 중임. 일본은 Cool Earth를 기조로 바이오매스 일본 종합전략을 수립하여 다양한 종류의 바이오매스를 이용한 친환경에너지 기술을 개발하고 있으며, 300개 지역에 바이오매스타운 건설 계획공표하고 곡물 이용보다는 자원형, 폐기물 등 이용한 바이오에너지 생산 및 해외 plantation을 통한 에너지 작물 확보 및 생산기술 개발 연구에 박차를 가하고 있음. 후쿠시마 원전사고 (2011년) 이후 원자력 의존도 개선을 위하여 바이오매스 활용을 통한 분산형 발전체제로 전환 모색. '일본재생 기본전략 (2011)'을 통해 일본재생의 근간으로서 혁신적 에너지·환경 정책 재설계함. 일본신에너지·산업기술종합개발기구 (NEDO), 과학기술진흥기구 (JST) 등의 지원 하에 혁신적 차세대 연료 개발 및 바이오 에너지 상용화 연구 추진 중임. 2014년 현재 바이오매스에너지기술개발 및 바이오매스 에너지의 지역자립시스템화 실증사업 과제 지원 중 (NEDO). 첨단 저탄소화 기술개발사업 (ALCA) 등을 통해 바이오매스의 비약적 증산, CO₂부터 직접 에너지 및 물질 생산 가능한 기술기반 확립, 미생물을 활용한 고효율 에너지 생산 등 연구 과제를 지원하고 있음 (JST)(전은진, 한수현, 2014).

마. 중국

2005년 폐식용유로부터 9.6×10^7 리터 규모의 바이오디젤이 생산되었으며, 최근 경유 시장이 가솔린 시장의 두 배로 커진 이후로 바이오디젤에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있음. 광활한 경작지 및 다양한 기후대로 인하여 바이오매스 생산량 및 다양성에서의 우위 보유함. 중국은 재생에너지 이용을 촉진하기 위하여 재생에너지법 (中華人民共和國可再生能源法)을 제정함. 2010년 바이오매스 액체 연료 생산량 목표는 200만 톤 수준에 불과하였으나 2020년에는 2010년 대비 5배가량 수준인 1,000만 톤으로 상향함(전은진, 한수현, 2014).

바. 유럽

EU는 2010년까지 이산화탄소 배출량을 1990년 배출량 대비 8%를 감축해야 하는 의무를 지니고 있으며, 이를 위해 수송용 바이오연료의 공급을 늘리기 위해 적극적으로 노력하고 있음 (보급 목표량이 2003년부터 2010년까지 18배 증가). EU의 경우 바이오디젤을 가장 많이 생산하는 지역으로, 바이오에탄올 보다도 바이오디젤 위주의 생산이 이루어지고 있음. 이러한 이유는 가솔린에 대한 무거운 세금 부과 및 디젤 엔진의 연비 효율 향상 등으로 인하여 운전자들의 디젤 차량의 선호도가 상승하였기 때문임. 독일은 초본계, 목질계 및 폐기물 이용한 다양한 바이오에너지 생산 연구를 추진하고 있으며, 특히 유채를 중심으로 하는 바이오디젤 생산 체제 구축 및 바이오디젤용 다수성 유채 품종 개발 연구는 세계적인 수준이며, 2010년까지 총에너지 소비의 약 9% 수준의 바이오에너지 공급 확대를 위한 연구개발과 기술보급에 총력을 기울이고 있음. 유럽은 억새, 스위치그래스, 코드그래스, 코끼리 풀 등 섬유질계 바이오에너지용 원료작물 품종개발 및 육종기술 개발과 생산, 수거 시스템 개발을 통해 가격 경쟁력있는 원료 확보에 주력하고 있는데, 특히 1934년부터 일본 등 동아시아에서 억새 유전자원을 수집하여 고생산성 C4 비식량 바이오에너지 자원으로 'LOTTUM' 등 3배체 개량억새 (*Miscanthus X giganteus*)를 다수 육성하였음. 영국은 신재생 에너지 목표 비중 (15%) 달성을 위해 신재생에너지 의무

사용 제도, 수송용 신재생 연료 의무 혼합제도 (RTFO), 재생에너지 열원프로그램 등 운영. 세계 최초로 바이오 연료에 대한 지속가능성 관리를 위해 교통부 산하에 신재생연료청 (Renewable Fuel Agency) 설치(2007)(지식경제부, 2012; 전은진 & 한수현, 2014).

3절. 국내의 미세조류를 이용한 바이오연료시장 현황 및 전망

1. 국내 미세조류를 이용한 바이오연료 기술개발 현황

- 가. 국내에서의 미세조류 대량생산 연구는 그동안 개별적 연구의 차원에서 시도된 바는 있지만 본격적인 연구개발은 2002년 한국생명공학연구원 (KRIBB)에서 21세기프런티어 연구개발사업의 일환으로 ‘이산화탄소 저감 및 처리기술개발사업’을 수행했던 것이 처음이라고 할 수 있음. 이후 여러 부처에서 유사한 연구사업을 추진 중에 있는바 한국생명공학연구원, 한국해양과학기술원, 한국에너지기술연구원, 인하대 등이 미세조류 배양 및 바이오디젤 전환분야에서 선도적 위치에 있다고 할 수 있음(지식경제부, 2012).
- 나. 국내의 바이오에너지 관련 기술개발은 1988년부터 현재까지 126건의 정부지원 연구개발이 진행되었고, 조류를 이용한 바이오에너지 생산 관련해서는 최근 2 ~ 3년에 산학연 공동연구로 집중적인 연구개발이 이루어지고 있음. 국내에서 진행되고 있는 기술개발의 경우 조류생산과 연료추출에 집중되어 있으며, 바이오매스를 생산 공정 관련 시스템 기술 분야에 대해서는 아직 초보적인 단계의 연구가 이루어지고 있는 상황임(전은진 & 한수현, 2014).
- 다. 하·폐수처리장에서의 미세조류 대량생산 연구는 비단 미세조류를 대량으로 생산하는 데에 그치는 것이 아니라 하수 고도처리의 목적도 겸하고 있으며 여기에서 생산되는 미세조류는 원칙적으로 고가의 부산물을 확보하기 어려운 algae-bacteria complex 형이기 때문에 특별한 연구 목표와 연구 경험이 요구됨(지식경제부, 2012).
- 라. 지식경제부 신재생에너지기술개발사업(2007-2010)에서 수행된 ‘미세조류에 의한 바이오디젤 원료 (biocrude) 양산기술 연구개발 ((주)바이오트론)’, 전력산업연구개발사업(2007-2010)에서 수행하였던 ‘발전소 환경개선을 위한 미세조류 탄소고정화 (MBCF) 기술개발 ((주) 이노비드)’, 농림수산식품부의 ‘미세조류 이산화탄소 고정기술 적용을 위한 대량배양 시스템 개발 및 해양생물산업 관련 실용화 기반구축(부경대 등)’, 교육과학기술부의 21세기 프런티어 연구개발사업의 이산화탄소 저감 및 처리기술개발사업 (2002 ~ 2012)에서 수행된 ‘생물학적 전환에 의한 이산화탄소 고부가 생물제품 기술개발 (한국생명공학연구원, 성균관대)’ 등의 과제를 통해 미세조류를 통한 바이오 디젤 생산 핵심기술을 확보하는 성과를 거두었음(이상필 & 김희식, 2013).

표 12 . 조류를 이용한 바이오 에너지 생산 관련 국내 기술개발 현황(지식경제부, 2012).

기관명	광생물 반응기	조류형태	주요 연구내용	세부내용
인하대학교	옥외개방형 Raceway	- 해조류 - 미세조류	바이오디젤, 바이오에탄올 생산	- 미세조류 최적화배양조건, 수확기술 - 지질 추출 기술, 바이오 디젤 전환 기술 - 해조류 선정, 개량, 전처리 기술 - 당화 및 발효공정 기술
한국해양연구원	활용 無	- 거대해조 - 환경유해생물 (녹조현상) - 미세조류	바이오에탄올, 바이오 디젤 생산	- 종선별, 대량배양기술(배양배지개발등) - 당/지질 함량고밀도화 기술 - 전처리기술 - 당화발효, 균주 및 융합공정 개발,부산물활용 - 전처리소형공정단계 완료 후 실증 단계
한국생명공학연구원	10톤 규모 오픈시스템	스피루리나	미세조류 돌연변이 제조 바이오 디젤 생산 실증화	- 스피루리나 돌연변이를 만들어 이산화탄소 고정율 13% 증가 - 미국 재생에너지연구소가 개발한 미세조류 이용 배양기술과 유사한 수준 - 적생 LED 이용 올레익산 1.5배 증가 - 미생물 응집제 이용 조류 수거 90% 달성
성균관대학교	100L 급 광 반응기 (원통형)	다양한 형태의 미세조류이용	대사공학을 이용한 CO2 전환효율 증가 광반응기의 설계 및 운전 최적화	- CO ₂ 전환 효율 50% 이상 - 카로티노이드 대량생산을 위한 1톤 규모 세포배양공정 실증 - 카로티노이드 물질 합성
(주)바이올시스템즈	원통형 광반응기	홍조류	바이오 에탄올 생산	- 발효설비, 당화설비(반연속식) - 해조류 전처리 기술(물리화학, 생물학, 중간체 생산기술, 유기산 생산기술)

2. 국외 미세조류를 이용한 바이오연료 기술개발 현황

- 가. 현재 미세조류 기반의 바이오연료 생산에 대한 연구개발과 투자에 발맞추어 많은 벤처 기업들이 창업되고 있음. 미국의 Algenol Biofuels, Solix Biofuels, Sapphire Energy 및 Solazyme사 등은 담수조류를 이용하여 성공적으로 상업적인 바이오에탄올 / 디젤 생산에 돌입하였으며 이스라엘의 Seambiotic사는 해수조류를 이용해 공장배기가스 (flue gas)를 포집하여 (capture) 바이오디젤을 생산하는 설비를 성공적으로 구축하였음. 또한 성장에 있어 수질에 크게 영향을 받지 않는 미세조류의 특성상 각 지역의 공공하수처리 시설에서 질소 및 인 제거와 동시에 부산물로서 바이오에너지 재료물질의 생산이 가능하다는 장점이 있음. 미세조류의 지질함량은, 미세조류의 종 (species) 및 세포주에 따라서 건조중량 (dry weight) 대비 지질함량이 1%에서 85%까지로 다양하며, 지방산의 사슬길이(chain length)도 C10에서 C24까지 분포되어 있는 것으로 나타났음. 미국 메릴랜드주 Patuxent River에서는 Algal Turf Scrubber® (ATS) 시설의 운영으로 제곱미터 (m²)당 하루 250 mg 질소와 45 mg 인을 제거하고 있으며 수확한 조류로부터 제곱미터 당 하루 23 ~ 54 mg 지방산 (fatty acid)을 생산하고 있음(이상필 & 김희식, 2013).
- 나. 미국 국립재생에너지연구소 (NREL)에서는 약 300종의 지질이 많은 미세조류를 분리하였음. 바이오디젤 생산을 위해서 지질함량 뿐만 아니라, 성장속도, 생산성을 고려하여야 함. 지질함량은 배양환경에 따라 차이를 보이는데, *Chlorella protothecoides*의 경우 독립영양상태로 증식할 때의 지질함량은 14.5%이지만 종속영양상태로 증식할 때는 55%로 증가함. 최근 최대 지질함량이 20% 이상이고, 지질 생산성이 40 mg/L/day를 상회하는 미세조류로 *Chlorella protothecoides*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella salina*, *Ellipsoidion* sp., *Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Neochloris oleoabundans*, *Pavlova salina*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Scenedesmus* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Chlamydomonas* BAFj5 등이 보고되었음(Choi & Lee, 2013).
- 다. 미세조류를 이용하여 이산화탄소를 저감하고 바이오연료의 재료가 되는 미세조류의 균체를 확보하기 위해 생물반응기를 제작하고 유기성 폐수를 이용하여 미세조류 바이오매스를 생산하기 위한 기술 개발이 활발함. 효모 균주인 *Rhodotorula glutinis*와 미세조류 *Chlorella vulgaris*를 산업폐수를 이용하여 함께 배양하며 성장률과 Lipid 함량의 변화를 관찰하였으며, 최적 배양조건 탐색으로 바이오매스 생산율 (4.63 ± 0.15 g/L)과 지질생산율(2.88 ± 0.16 g/L)로 미세생물 복합체 (MOC)의 가능성을 제시하고 있음. 각 기술회사들의 기술개발을 위한 전략은 다양한데, 호주 또는 중국을 중심으로 Seambiotics, MBD, Phycal, Cellana 등은 발전소의 배기가스를 저감하기 위해서 발전소, 전기제조 power station등과 JVC를 형성하여 공동으로 미세조류 사업을 키우고 있으며, Algae Tech., Phycal, Aurora Algae등은 지역 오폐수를 활용하여 미세조류 오일을 생산하는 전략을 취하고 있음(지식경제부, 2012).
- 라. 미세조류 대량 생산 시스템 개발 관련 연구는 미세조류의 배양에 관한 연구와 광생물반응기의 개발 두 분야로 요약될 수 있으며, 주목할 것은 미세조류의 배양에 관한 기술의 경우 대형 플랜트 기술에 대한 연구개발이 추진되고 있음(지식경제부, 2012).
- 마. 하·폐수처리장에서의 미세조류 배양은 전통적으로 세 방향에서 추진되어 왔는데, 하수처리공정에서 영양염류 제거에 중점을 두는 3차 처리 공정의 한 대안으로 간주하여 미세조류를 활용하는 방식 (oxidation pond)과 영양염류 제거는 물론 유기물 제거까지도

목표로 하여 하·폐수처리장의 2차처리 공정을 대신하는 방식 (HRAP; High Rate Algal Pond), 그리고 독특한 광반응기 (photoreactor)를 채용하여 high-tech으로 미세조류를 대량으로 생산하는 방법의 3가지로 구분할 수 있음. 최근 하·폐수처리장에서의 미세조류 생산에 관심이 모아지면서 종래의 oxidation pond (산화지) 공법에서는 그동안 문제가 되던 미세조류의 효율적인 회수기법에 대한 연구가 중점적으로 이루어지고 있으며, HRAP 공법에서는 보다 효율성 있는 미세조류 생산 공정의 개발에 박차를 가하고 있음. 이와 함께 유럽에서는 네델란드 스키폴 공항부지에 대규모의 미세조류 생산용 호수를 설치하는 계획이 가시화되고 있음(지식경제부, 2012)

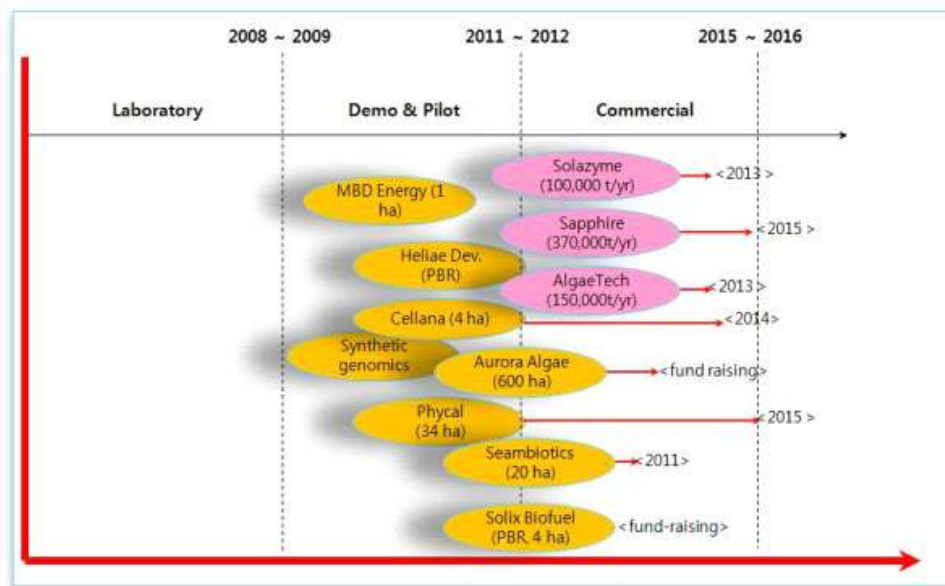


그림 24. 국제 미세조류 기술개발 회사들의 연도별 기술개발 계획(이상필 & 김희식, 2013).

바. 미세조류 개량 연구 동향

(1) 미세조류 지질대사 연구

(가) 미세조류 몇몇 종들은 체내 지질 함량을 건중량의 50% 이상 합성할 수 있으며 (Chisti 2007; Hu et al. 2008), 이 지질의 많은 부분들은 바이오디젤의 원료인 트리아실글리세롤 (triacylglycerols, TAGs)로 생성할 수 있음. 이 TAGs는 트랜스에스테르화 과정을 통해 생산되는 에너지 밀도가 높은 바이오디젤 (Schuchardt et al. 1998; Kang et al. 2010), 그린 항공기 연료 및 그린 가솔린 (수소화 과정과 촉매 분해반응의 혼합 처리 과정에 의해 생산) 등으로 쉽게 변형될 수 있어서 에너지 원료 소재로 기대를 모으고 있음(강도형, 2012). 미세조류의 지방산 및 중성지방 TAG (triacylglycerol)의 생합성 경로에 대한 연구는 아직 초기단계이다. 고등식물에서 지질대사 관련 유사 유전체가 미세조류에도 존재하는 것으로 알려졌다. 지질관련 유전자의 특성을 살펴보면 미세조류 지방산 및 TAG 합성의 기본적인 대사과정은 동일하지만 차이점도 존재함. 미세조류의 경우 이산화탄소 고정과정에서 TAG 합성 및 축적이 하나의 세포에서 일어나지만 육상식물은 지질의 합성과 축적이 다른 조직이나 기관에서 일어남. 또한 미세조류는 지방산을 합성하여 육상식물보다 훨씬 다양한 종류의 지질을 생산함. 미세 조류에서 탄소수가 16 ~ 18개의 지방산을 주로 합성하

는 것으로 나타나지만, 탄소 수 6부터 24까지 다양하게 나타날 수 있음. 미세조류에서도 TAG 생합성은 케네디경로 (Kennedy pathway)에 의해 일어나는데, 이외에 다른 대사경로에 의한 TAG 합성 (acyl-CoA-independent synthesis) 경로가 존재할 것으로 추정됨. 중성지질 인 TAG 합성은 세포주에 따라 다른 양상을 보이지만, 성장환경에 의해서도 차이가 날수 있음. 최적 성장조건에서는 생산된 지방산이 주로 막지질 (membrane lipid) 합성에 사용되어 세포 분열과 증식을 위해 주로 사용되므로 많이 합성을 하지 않지만 성장환경이 좋지 않거나 스트레스 조건에서는 에너지원으로 저장된 글루코스를 생존에 필요한 지방산, TAG 축적에 사용됨. 스트레스 조건이 계속되면 세포내 단백질도 TAG 합성에 사용되어 전체 지질의 80%에 이르기 도 함(이상필 & 김희식, 2013).

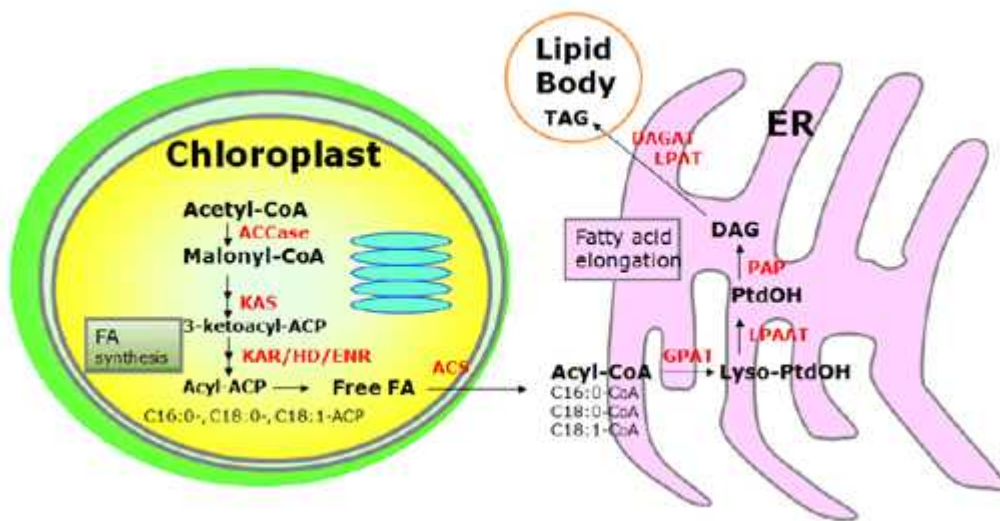


그림 25. 미세조류 지질 생합성 경로 (정원중, 2012).

(나) *C. reinhardtii* 전분결핍 변이체인 *sta6*와 *sta7*의 연구결과 ADG-글루코스 피로포스 포리라제 (ADG-glucose pyrophosphorylase) 또는 이소아밀라제 효소 유전자의 변이에 의해 전분합성이 억제되어 TAG 합성이 크게 증가함. 또한, *Chlorella pyrenoidosa*의 전분결핍 변이체에서는 다중불포화지방산양이 증가함. 탄소사슬의 길이나 이중결합의 수 등의 지방산 조성을 변형시켜 적합한 바이오디젤을 생산할 수 있음(정원중, 2012). 한국생명공학연구원 (KRIBB) 김희식 박사 연구팀은 미세조류의 혼합영양상태에서 지질함량을 늘리는 관련 유전자를 분석함. 질소결핍 조건과 혼합영양 조건에서 지방함량의 변화를 보였고, 지방산 합성관련 유전자 (BCX1: Acetyl-CoA carboxylase, MCT1: S-malonyl transferase), TAG합성 관련유전자 (ACS2: Acetyl-CoA synthetase, DGTT4: diacylglycerol O-acyltransferase) 등의 발현량 변화를 qRT-PCR을 통해 관찰함. 그 결과, 질소결핍 상태에서 BCX1 과 MCT1의 발현량이 감소되었으며, 질소결핍과 혼합영양 아래에서 ACS2와 DGAT4의 발현량이 증가함. ACS2는 모든 조건 (아세트이트 첨가, 질소 결핍/충분)에서 발현량 증가, 그리고 DGTT4는 아세트이트 첨가 조건에서 발현량이 높게 증가하는 양상을 보였는데, 이는 첨가 한 아세트이트가 TAG 합성의 제한요소로 생각됨. ACS2

에 의하여 세포질에서 아세테이트가 아세틸 코엔자임 A로 전환되고, 이어서 유리 지방산과 결합하여 사슬이 긴 아세틸코에이가 생성되어 케네디경로 (Kennedy pathway)를 통해 TAG가 합성되는 것으로 추정됨(이상필 & 김희식, 2013).

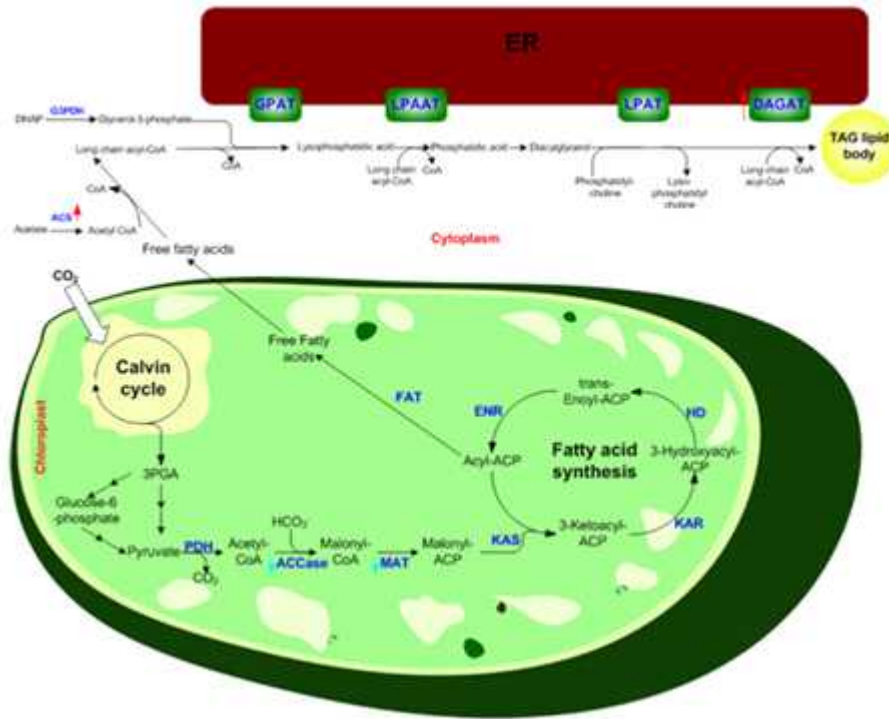


그림 26. 지질 분해 합성 경로(Ramanan et al., 2013).

(2) 미세조류 유전적 연구

(가) 미세조류의 유전적 개량기술을 이용하여 고부가가치 물질을 생산하는 연구가 진행 중이며 상업적으로 이용되고 있음. 미국의 PhycoBiologics사에서는 어류용 경구백신, 기능성 펩타이드, 항체, 효소 등 20여 종류의 고부가가치 유용 단백질을 생산하는 미세조류를 개발하여 이용하고 있다. 미세조류 중에서는 *C. reinhardtii* 의 분자유전학적 연구가 가장 많이 진행되어, 외래유전자 발현과 유전자 조절기술 등이 개발되어 있음. 현재까지 녹조류 (chlorophyta), 홍조류 (rhodophyta), 규조류 (diatoms), 유글레나 (euglenids), 와편모조류 (dinoflagellates) 등의 많은 조류에서 유전자 전달시스템이 개발되었음. 미세조류 세포내로 유전자를 도입하는 방법에는 유전자총 (gene gun), 유리구슬 (glass beads) 교반법, 전기천공법 (electroporation), Agrobacterium 방법 등이 개발되어 있지만, 균주별 특성에 따라 효율의 차이가 있으므로 균주의 특성에 따라 적절히 이용되어야 함(이봉수 외, 2013).

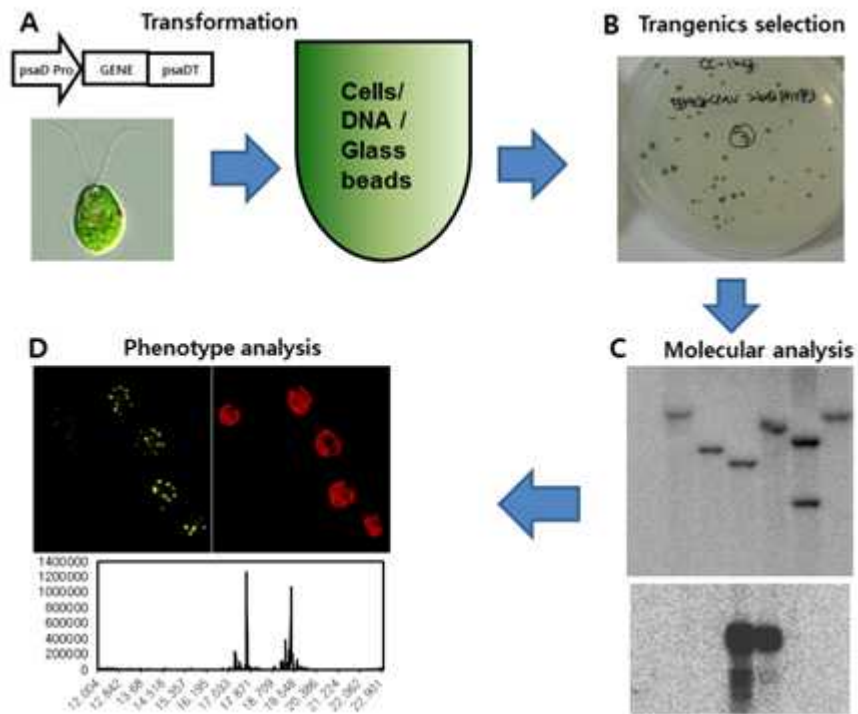


그림 27. Glass beads를 이용한 미세조류 형질전환기술(정원중, 2012).

제 3장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 연구수행내용 및 결과

1. 혐기소화액 성장분석

- 가. 미세조류 배양방법은 많은 양의 유기성 탄소원, 질소, 인 등을 영양원으로 공급을 필요로 하여 가축분뇨의 환경오염원으로 작용하는 유기성 탄소원, 질소, 인 등을 영양염류 기질로 사용할 목적으로 가축 분뇨에 함유하고 있는 성분을 분석하였음.
- 나. 협동연구기관인 명지대학교에서 분뇨를 혐기성 소화하여 얻은 소화액의 성상을 분석하였음.
- 다. 가축 분뇨의 성분 분석은 pH와 EC는 pH와 EC미터 (Istec-460CP)로 측정하였으며, 유기물함량은 Tyurin법으로, 무기성분 분석을 위해 황산과 과산화수소로 산분해한 후에 전질소는 Kjeldahl 증류법으로, P, K, Ca, Mg, Na, 및 Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn은 ICP (Inductively Coupled Plasma, JY-70C) 발광분석기로 분석하였음(NIAST, 2000).
- 라. 가축분뇨액의 유기물 함량, N, P 등 다량원소 및 Fe 등 미량원소 분석을 하였으며, 각각의 평균값과 및 최대, 최소값을 조사함(표 13). 분석 결과 대부분의 분석항목에서 농도편차가 큰 것으로 나타나고 있으며, 균질도가 매우 낮은 것으로 확인됨.
- 마. 미세조류 배양에 사용되는 배지와 비교를 하였을 경우 B, Co, Mo 원소를 추가로 공급을 하고 미세조류 배양의 최적 조건을 비율에 맞게 조절하면 가축분뇨 혐기 소화액을 활용할 수 있을 것으로 판단.

2. 혐기소화액 혐기성 소화 조건 확립

- 가. *Chlorella vulgaris*의 기본배지는 BG11 (Blue-Green Medium) 배지를 사용하여 유지하면서 본 과제에 사용하였다. 기본배지의 성분은 1 L 당 NaNO_3 (15 g), stock solutions 2 ~ 8 (10 ml), stock solution 9 (1 ml) 임. Stock solutions 2 ~ 8은 500 ml 당 각각 K_2HPO_4 (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.75 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.8 g), Citric acid (0.3 g), Ammonium ferric citrate green (0.3 g), EDTANa_2 (0.05 g), Na_2CO_3 (1 g) 이며, Stock solution 9는 1 L 당 H_3BO_3 (2.86 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22 g), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.39 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08 g), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05 g) 임.
- 나. *Chlorella vulgaris*의 혼합영양배양은 1 L 당 KH_2PO_4 (0.7 g), K_2HPO_4 (0.3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 mg), Urea (0.1 g), glucose (40 g), thiamine hydrochlorise (10 μg), Arnon' A solution (1 ml)의 배지에서 pH 6.3, 25°C, 15000 lux 형광등에서 배양하였음. Arnon' A solution은 1 L 당 H_3BO_3 (2.9 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.8 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08 g), MoO_3 (0.018 g) 임.
- 다. 본 연구에 사용하는 혐기성소화액은 협동연구기관인 명지대학교에서 가축분뇨를 혐기성 소화하여 얻은 소화액을 원액으로 사용함. 그 조성은 표 13과 같음.
- 라. 명지대학교에서 혐기성 소화액이 미세조류 배양에 미치는 영향 및 최적의 혐기성 소화액에 대한 연구를 수행하였음.

표 13. 혐기성 소화액의 정상 분석.

Parameter	Piggery wastewater			
	Ahn <i>et al.</i> (2006)	Hansen <i>et al.</i> (1998, 1999)	Lei Jahng <i>et al.</i> (2011)	가축분뇨정상 (용인레스피아)
pH	6.37 ± 0.10	7.62 ± 0.02	6.60 ± 0.20	6.3
TS (wt.%)	6.18 ± 0.04	-	5.64 ± 0.34	4.74
VS (wt.%)	4.45 ± 0.02	4.5 ± 0.1	3.69 ± 0.22	3.47
VS/TS ratio	0.72	-	0.65 ± 0.01	0.73
Total COD (g/L)	130.8 ± 3.0	-	92.8 ± 1.3	83
Soluble COD (g/L)	59.7 ± 0.9	-	53.2 ± 0.9	42.7
TKN (g/L)	7.3 ± 0.1	6.6	7.31 ± 0.22	-
TN (g/L)	-	-	-	4.2
TP (g/L)	-	-	0.50 ± 0.14	2.1
Ammonia-N (g/L)	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.91 ± 0.06	3.84
Phosphorus-P (g/L)	-	-	-	0.35

- 마. 미세조류 배양에 최적의 혐기소화액을 확인하기 위해 증류수 및 BG11 배지로 희석한 혐기성소화액에서 배양한 미세조류의 생체량 분석을 하였음.
- 바. 먼저 증류수와 BG11으로 희석 혐기성소화액으로 고체배지를 만들고 *Chlorella vulgaris* 을 도말하여 관찰하였음. BG11 배지 원액 및 5배 희석된 혐기성소화액에서 미세조류는 성장하여 콜로니를 형성하지 못 하였으며 (그림 28), 10배 희석한 실험구에서 성장하여 콜로니를 형성하였음(그림 29).

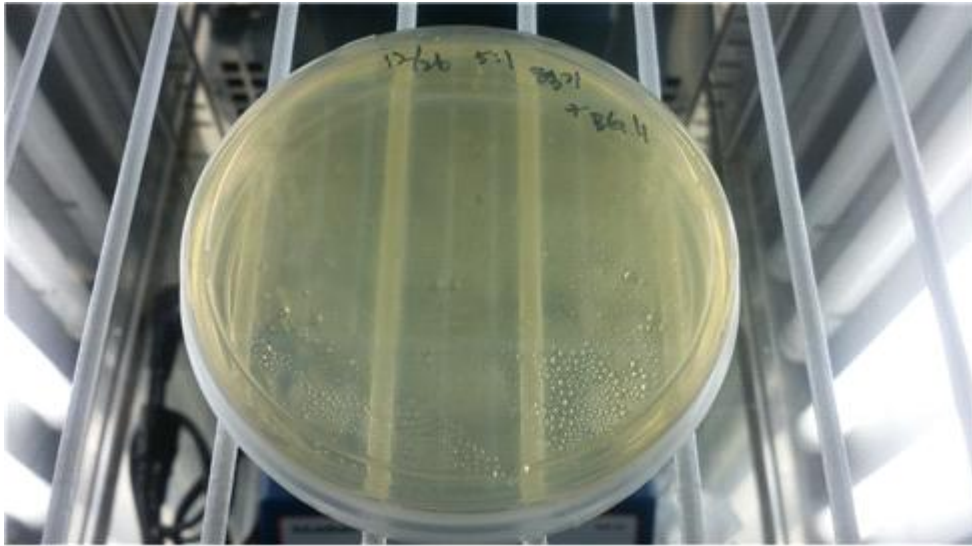


그림 28. 소화액을 BG11 배지로 5배 희석한 고체배지에 미세조류를 도말하여 배양한 결과.

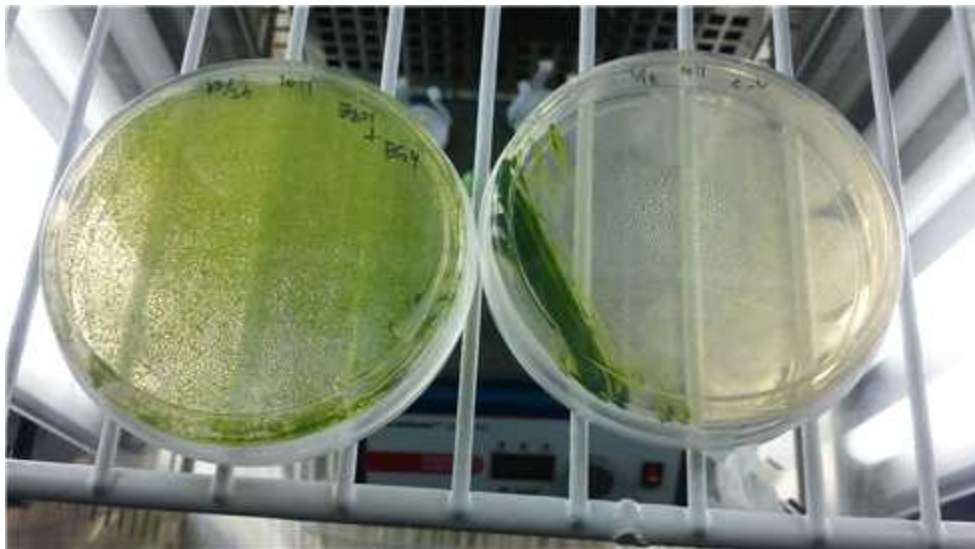


그림 29. 소화액을 BG11 배지로 10배 희석한 고체배지에 미세조류를 도말하여 배양한 결과.

- 사. 미세조류 배양의 최적 혐기성소화액을 결정하기 위해 미세조류의 생체량 분석은 100 ml 삼각플라스크에서 혐기소화액을 DW 및 BG11로 100 배 및 1000배 희석하여 총 4종의 액체배지에서 수행하였음.
- 아. 미세조류 배양에서 사용된 분석으로 미국 Standard Method에 준하여 hemocytometer를 이용한 cell counting을 하였음.
- 자. 대조구는 기본배지인 BG11을 사용하고 배양온도 25°C, 광주기는 L : 14 - D : 10 임. BG11 대조구를 포함한 4대의 실험구의 *Chlorella vulgaris* 초기 접종 농도는 $7.3 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ cells/ml 임.
- 차. 대조구는 배양 12일차에 2.0×10^6 cells/ml이고 배양 12일차까지 관찰한 결과, 혐기소화액을 DW로 100배 희석한 실험구는 초기 접종이후 *Chlorella vulgaris*가 성장하지 않았음. 다른 실험구와 비교하여 DW로 1000배 희석한 실험구 (DW1000)가 4.6×10^6 cells/ml로 *Chlorella vulgaris* 생체량이 많았음. DW 100배 희석한 실험구 (DW100)를 제외한 나머지 3가지 실험구는 대조구보다 생체량이 많았음. 혐기소화액을 BG11 배지로 100배 희석한 실험구 (BG100)는 1000배 희석한 실험구 (BG100)보다 5일차까지는 생체량이 낮았지만 8일차부터는 1.4배 높게 나타남(그림 30 및 표 14).

표 14. 희석한 혐기성소화액에서 배양한 *Chlorella vulgaris*의 세포수 분석.

	1일차 (cells/ml)	3일차 (cells/ml)	5일차 (cells/ml)	8일차 (cells/ml)	10일차 (cells/ml)	12일차 (cells/ml)
대조구	8.3×10^4	2.5×10^5	2.1×10^6	2.3×10^6	2.4×10^6	2.0×10^6
DW100	1.0×10^5	6.9×10^4	4.5×10^4	-	-	-
DW1000	7.3×10^4	1.0×10^6	3.5×10^6	4.2×10^6	4.2×10^6	4.6×10^6
BG100	1.1×10^5	2.9×10^5	1.4×10^6	4.1×10^6	3.6×10^6	3.7×10^6
BG1000	8.3×10^4	5.1×10^5	2.4×10^6	2.9×10^6	2.5×10^6	2.5×10^6

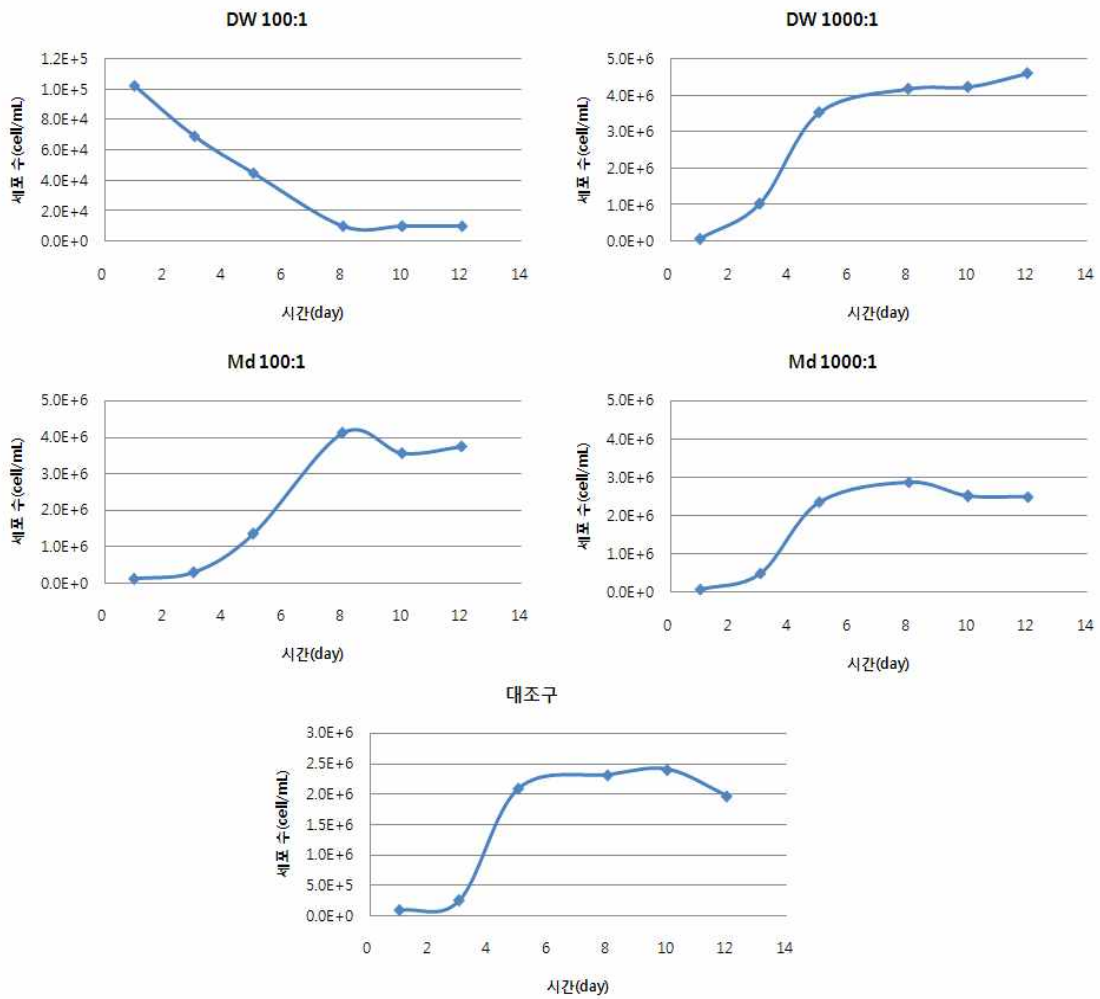


그림 30. 희석한 혐기성소화액에서 배양한 *Chlorella vulgaris*의 세포수 분석.

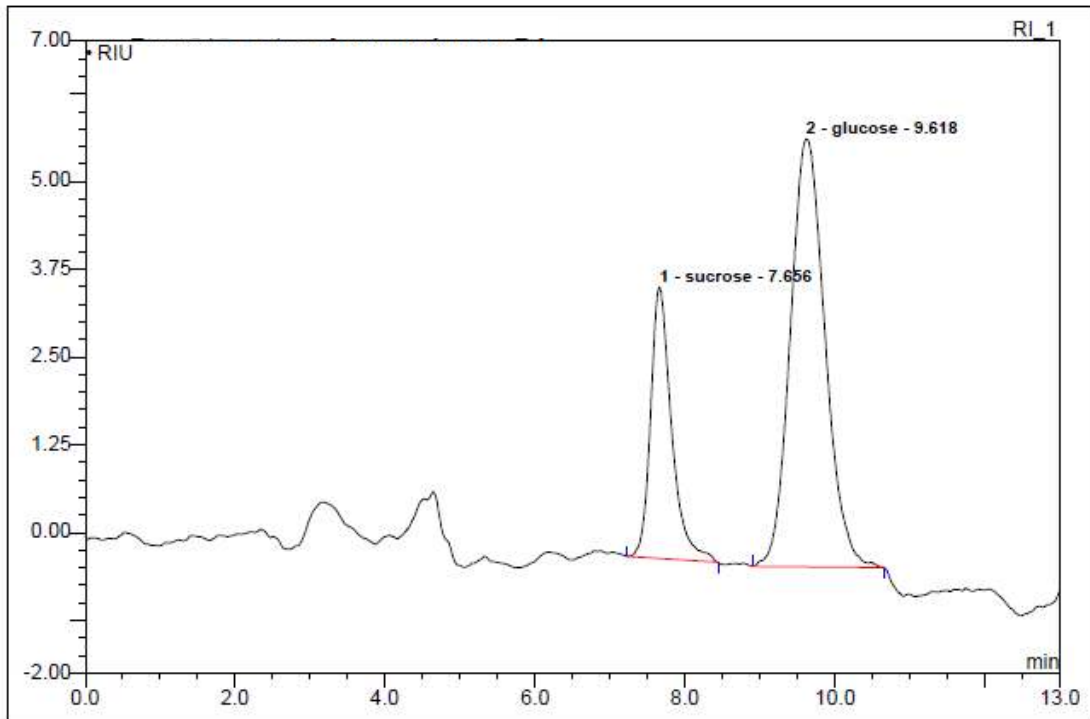
카. 따라서 본 실험결과로 음식물 혐기성 소화액과 달리 혐기성소화액 원액에서 *Chlorella vulgaris*는 배양할 수 없으며 혐기성소화액을 희석한 결과 배양이 가능하였으며 혐기소화액을 DW로 희석한 것보다는 적절한 무기물질을 포함한 배지로 희석하여 *Chlorella vulgaris*를 배양하는 것이 효율적임을 알 수 있었음.

3. 소화액에 따른 미세조류의 유리당, 아미노산 및 지방산 분석

가. BG11 기본배지로 100배 희석된 혐기성소화액에서 배양한 *Chlorella vulgaris*의 유리당, 아미노산 및 지방산 분석 결과는 다음과 같음.

나. 유리당 분석은 Dionex ultimate 3000 (USA / pump, autosampler, oven)을 이용하였으며, Detector는 Shodex RI-101 (japan), column은 Sugar-pak (Waters, 300 × 6.5 mm)을 사용하여 실시함. 표준품은 Junsei, Sigma 사의 제품을 구매하여 이용함.

다. 분석 전처리는 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상등액을 제외하고 남은 미세조류 시료를 건조시켜 샘플을 준비하였으며 그 결과 Fructose는 검출되지 않았으며, Sucrose는 87.409 g/kg, Glucose는 200.865 g/kg으로 검출되었음(그림 31).

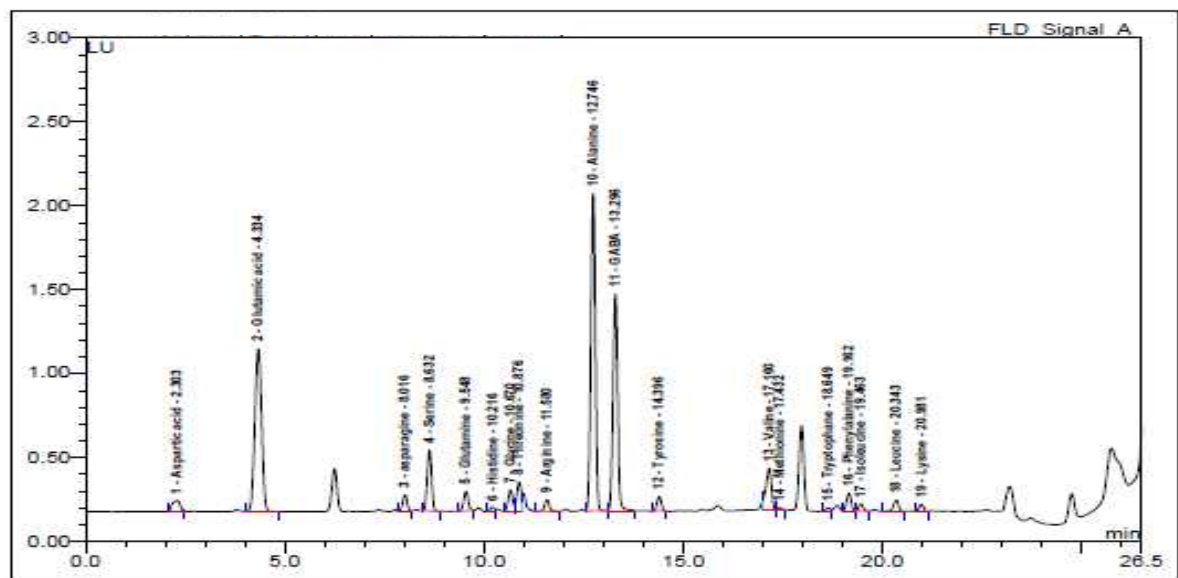


No.	Ret.Time min	Peak Name	Height • RIU	Area • RIU*min	Rel.Area %	Amount mg/kg	Type
1	7.66	sucrose	3.866	1.254	27.74	87408.628	BMB*
2	9.62	glucose	6.093	3.267	72.26	200864.882	BMB*
Total:			9.959	4.521	100.00	288273.510	

그림 31. *Chlorella vulgaris*에서 유리당 분석결과.

라. 아미노산 분석은 유리당과 동일한 Dionex ultimate 3000 (USA / pump, autosampler, oven)을 사용하여 실시였으며, Detector는 FL Detector와 UV Detector를 단계적으로 이용하였고, 표준물질은 1 nmol/ μ l Amino acids 17종 standard를 10, 100, 500, 1000 pmol/ μ l 농도로 희석하여 사용함.

마. 전처리는 원심분리하여 수확한 시료 일정량을 70% EtOH에 넣은 후 1시간 초음파 추출하고 24시간 상온에서 추출 후 0.2 μ m 필터 후 분석하였으며 그 결과 Glutamic acid가 1619.099 mg/L로 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로 Alanine, GABA 순으로 검출되었음. 뼈, 피부, 근육조직의 성장에 많이 필요하여 필수 아미노산 중 하나인 leucine은 47.005 mg/L으로 검출되었고, 폐사 증가의 원인이 되는 methionine은 13.534 mg/L로 가장 낮게 검출됨(그림 32).



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height LU	Area LU*min	Rel.Area %	Amount mg/kg	Rel.Amount %
1	2.30	Aspartic acid	0.066	0.014	1.71	105.3657	2.15
2	4.33	Glutamic acid	0.971	0.189	22.49	1619.0985	33.10
3	8.02	asparagine	0.095	0.012	1.37	78.3268	1.60
4	8.63	Serine	0.363	0.047	5.55	228.7615	4.68
5	9.55	Glutamine	0.117	0.015	1.83	100.6672	2.06
6	10.22	Histidine	0.027	0.004	0.43	88.9006	1.82
7	10.67	Glycine	0.126	0.016	1.94	55.5224	1.14
8	10.88	Threonine	0.174	0.025	2.97	139.5920	2.85
9	11.58	Arginine	0.070	0.009	1.12	66.5349	1.36
10	12.75	Alanine	1.891	0.244	29.04	1001.4987	20.48
11	13.30	GABA	1.291	0.175	20.83	855.0135	17.48
12	14.40	Tyrosine	0.085	0.011	1.27	84.1411	1.72
13	17.16	Valine	0.250	0.041	4.83	180.6082	3.69
14	17.43	Methionine	0.018	0.002	0.29	13.5340	0.28
15	18.65	Tryptophane	0.019	0.003	0.31	24.8158	0.51
16	19.16	Phenylalanine	0.104	0.014	1.64	90.3515	1.85
17	19.46	Isoleucine	0.041	0.005	0.62	25.8836	0.53
18	20.34	Leucine	0.066	0.009	1.12	47.0050	0.96
19	20.98	Lysine	0.041	0.006	0.66	85.6988	1.75
Total:			5.815	0.841	100.00	4891.320	100.000

그림 32. *Chlorella vulgaris*에서 아미노산 분석결과.

- 바. 지방산 분석은 GC Agilent 7890A (Agilent, USA) 기기에서 DB-23 (Agilent, 60 mm × 0.25 mm × 0.25 μm) column을 이용하여 실시하였으며, Detector는 FID (280°C, H₂ 35 ml/min, Air 350 ml/min, He 35 ml/min)을 사용함.
- 사. 시료 전처리는 일정량 원심분리하여 수확한 시료를 Teflon cap이 있는 튜브에 넣고 Methylation mixture (MeOH : Benzen : DMP : H₂SO₄ = 39 : 20 : 5 : 2)를 340 μl, heptane 200 μl를 넣어 흔든 후 80°C에서 2시간 추출과정을 거친다. 추출 후 상은 냉각하여 형성된 두 층 중 상층액을 추출하여 GC로 분석하였으며 그 결과 Oleic acid가 305.95 mg/g으로 가장 높았으며 linoleic acid (125.40 mg/g), Palmitic acid (119.25 mg/g), stearic acid (49.50 mg/g), α-linolenic acid (19.65 mg/g) 외에 다른 지방산들은 1.0 mg/g 이하로 낮게 검출되거나 검출되지 않았으며 총 지방산 양은 639.79 mg/g이었음(그림 33 및 표 15).

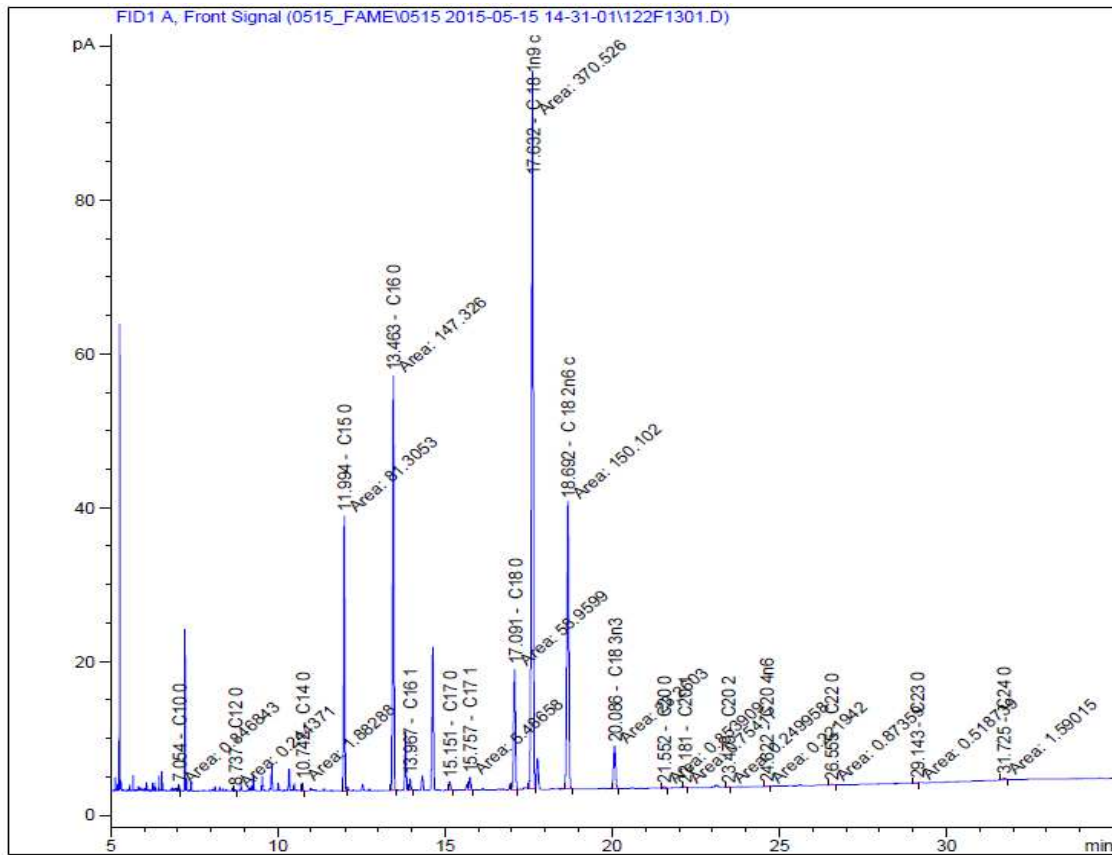


그림 33. *Chlorella vulgaris*에서 지방산 분석결과.

표 15. *Chlorella vulgaris*에서 지방산의 분석결과.

지방산	농도 (mg/g)	지방산	농도 (mg/g)
Butyric acid	0.00	Linoleic acid	125.40
Caproic acid	2.09	γ -linolenic acid	0.00
Caprylic acid	0.00	α -linolenic acid	19.65
capric acid	0.55	Arachidic acid	0.70
Undecanoic acid	0.00	Cis-11-eicosanoic acid	0.75
Lauric acid	0.20	Cis-11,14-eicosanoic acid	0.15
Tridecanoic acid	0.00	Cis-8,11,14-eicosanoic acid	0.00
Myrisric acid	1.55	Heneicosanoic acid	0.00
Myristoleic acid	0.00	Arachidonic acid	0.15
Cis-10-pentadecanoic acid	0.00	Cis-11,14,17-eicosanoic acid	0.00
Palmitic acid	119.25	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	0.00
Palmitoleic acid	3.55	Behenic acid	0.80
Heptadecanoic acid	3.10	Erucic acid	0.00
Cis-10-heptadecenoic acid	4.55	Cis-13,16-docosadienoic acid	0.00
Stearic acid	49.50	Tricosanoic acid	0.45
Elaidic acid	0.00	Lignoceris acid	1.45
Oleic acid	305.95	Docosahexaenoic acid	0.00
Linolelaidic acid	0.00	Nervonic acid	0.00
Total			639.79

4. 지질함량 높이기 위해 숙성조건 설정

BG11 배지에서 독립영양 배양한 미세조류를 수확하여 10^6 cells/ml로 질소원 결여된 BG11 배지에서 숙성하면서 12, 24 및 72시간에 수확하여 지질함량을 분석한 결과 숙성전 28% 지방산이 24시간 처리한 후부터 63%로 증가하였음. 이 데이터는 건중량 기준 농도 (mg/g) 단위이며, 표 15를 바탕으로 산출하였음.

5. 미세조류 비과피 추출

가. 유기용매를 사용한 추출

- (1) 유기용매를 통한 오일 추출방법은 “like dissolving like”라는 화학의 기본 개념을 적용한다. 소수성의 긴사슬을 가진 지방산들의 상호반응 때문에, 중성 지방은 반데르발스 힘으로 한쪽에서 다른 쪽으로 이끌리게 되고 세포질에서 구상체를 형성하게 됨.
- (2) 미세조류 세포가 헥산이나 클로로폼 과 같은 무극성의 유기용매에 노출이 되면, 이 유기용매가 세포막을 뚫고 세포질로 들어가게 됨.
- (3) 그 후 반데르발스 힘을 이용하여 중성지방과 결합.
- (4) 유기용매-지방의 복합체를 형성하게 되고 형성된 복합체는 농도 기울기에 의해 세포막을 통해 확산.
- (5) 형성된 복합체는 농도 기울기에 의해 세포막을 통해 확산.
- (6) Cell 주변을 쌓고 있는 평형 유기용매로부터 외부 유기용매로 이동하게 되면서 결과적으로 중성지방은 세포 밖으로 추출되고, 무극성 유기 용매에 용해됨.

나. Cell 주변을 둘러싸고 있는 평형 유기용매 필름은 유기용매와 세포벽의 상호작용으로 인해 형성이 됨.

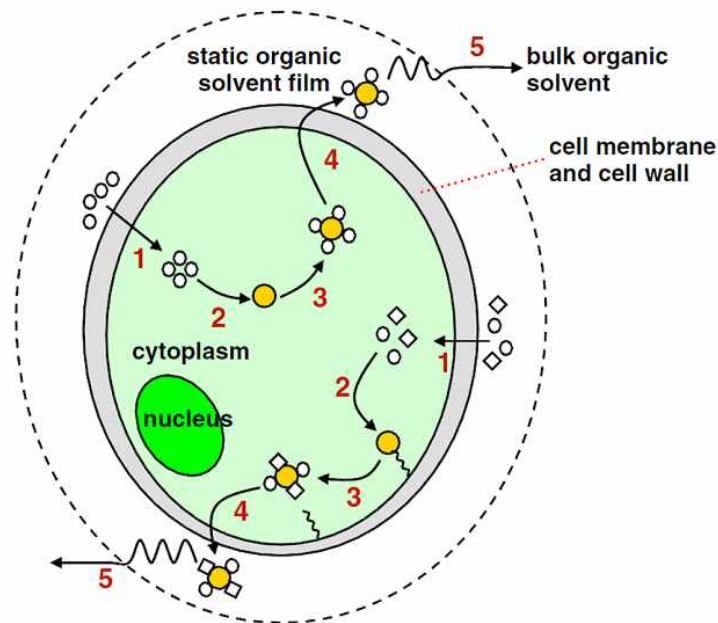


그림 34. 유기용매 추출법 기본 개념.

<출처: Kates M. (1986) Amsterdam: Elsevier Science Publisher>

다. 모듈단위 비과피추출 시스템

고밀도배양 순환시스템은 미세조류를 배양하는 혼합영양배양장치, 유기용매와 배양액을 혼합하고 milking의 효율을 향상시키는 초음파발생장치, milking된 용액을 수용액 층과 유기용매 층으로 분획하는 분획장치, 분획된 유기용매 층을 분별 증류하는 증류장치 등의 모듈 단위로 구성되어 *Chlorella vulgaris*를 혼합영양배양하면서 연속적으로 milking을 하고 유용 물질을 생산하는 시스템이다(그림 35).

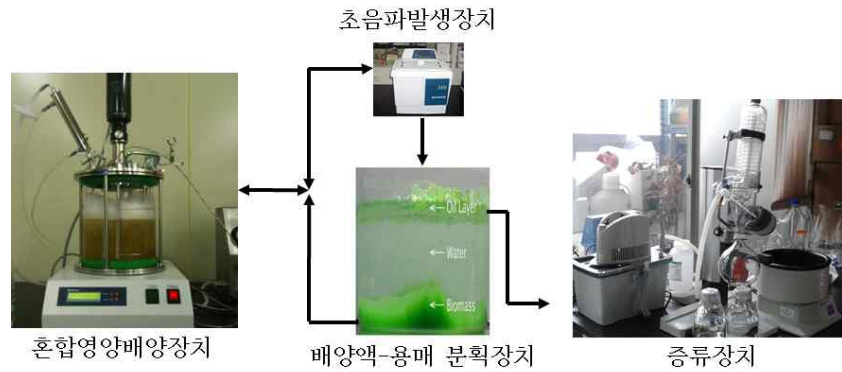


그림 35. 모듈단위 비과피추출 시스템.

라. 세포에 미치는 지용성물질 추출용매의 효과

(1) 미세조류를 배양, 유기용매를 배양기 표면부위로 이동시키며 유기용매 입자가 배양용액에 분산되면서 미세조류와 접촉하고 미세조류로 들어와 미세조류 지용성 물질과 접촉한 후, 일정 크기인 과립이 되고 세포 밖으로 배출되어 유기용매 층으로 상승. 이런 과정을 일정한 속도로 연속적으로 운영하며 미세조류 지용성물질 추출 및 성장저해물질 제거(그림 36).

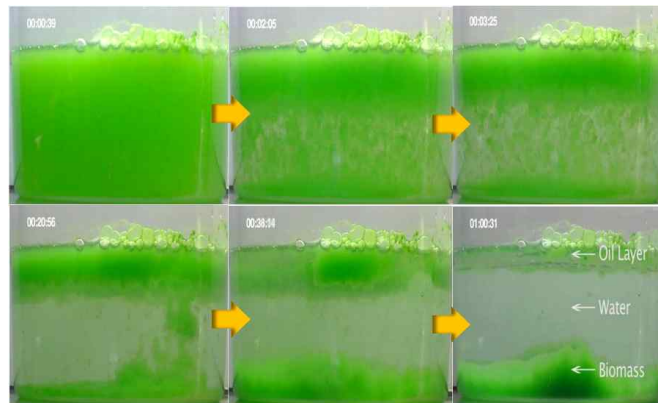


그림 36. milking 실험 층 분리.

- (2) 지질추출용매는, 지용성물질에 대해 선택성이 높고, 생물학적으로 적합하여 세포 활성화에 커다란 손실 없이 세포와 접촉할 수 있는 용매로서, 일반적으로 옥탄올 개수 (log P_{oct}, 옥탄올 물 분할 계수의 로그)가 5이상이다 (Dodecanone은 이 규칙에서 예외이다). 옥탄올 개수 4 ~ 5인 용매 중에 헥산 (hexane), 헵탄 (heptane)은 세포에 유독하고, 데칸올 (decanol), 다이펜틸 에테르 (dipentyl ether)는 세포에 무해하다. 사용되는 지질추출용매는, C4-C16 탄화수소 1개 이상을 포함할 수 있고, C10, C11, C12, C13, C14, C15 또는 C16 개의 탄화수소를 포함.
- (3) 본 기술은 각 기관 별로 현재 실험실 수준에서 세부 선행 연구 수행하고 있으며 본 과제의 일차년도는 lab scale의 실증, 이차년도는 공정 확립 및 기술 확립, 삼차년도는 1톤 규모로 pilot scale의 공정 설비와 실제 운용하고 각 단계에서 설비 구축 및 기체 농도 및 기질부하, HRT, 충격부하 등의 운전변화에 따른 안전성 평가 및 시스템 최적화 등을 수행함.
- (4) 본 기술의 사업화를 위해 지자체와 긴밀한 연계하여 지역 중소기업 및 연구기관, 지역연관 사업소 등의 협력이 필요하며 현재 본 연구를 위한 과제 연구단은 산·학·연으로 구성되어 기존 축산 폐수 처리 시설을 통하여 열병합 발전소를 소재하고 있는 지방자치단체와 공동 준비 및 과제 계획을 설립하였으며 한국해양과학기술원 부설 극지연구소의 미세조류 균주 관련 기술과 노하우, 데이터 기반 구축과 명지대학교의 축산분뇨 혐기발효 관련 연구 축적과 주관기관 바이오이즈의 미세조류 배양 기술과 milking 기술을 이용하여 기술 확립 및 사업화 진행함.
- (5) *Chlorella vulgaris* 배양용액에 C10 내지 C16 알칸 (alkanes)의 지용성물질추출용매를 5 : 1비율로 5분간 처리한 후, 분획된 *Chlorella vulgaris* 배양용액 1 ml을 1/100,000배 희석하여 1.5% 아가 플레이트에 도말하여 형성된 콜로니를 계수하여 지용성물질추출용매가 *Chlorella vulgaris*의 생존에 미치는 영향을 평가하였음.
- (6) 그 결과 지용성물질추출용매가 세포의 생존에 아무런 영향이 없었음을 알 수 있음(그림 37).

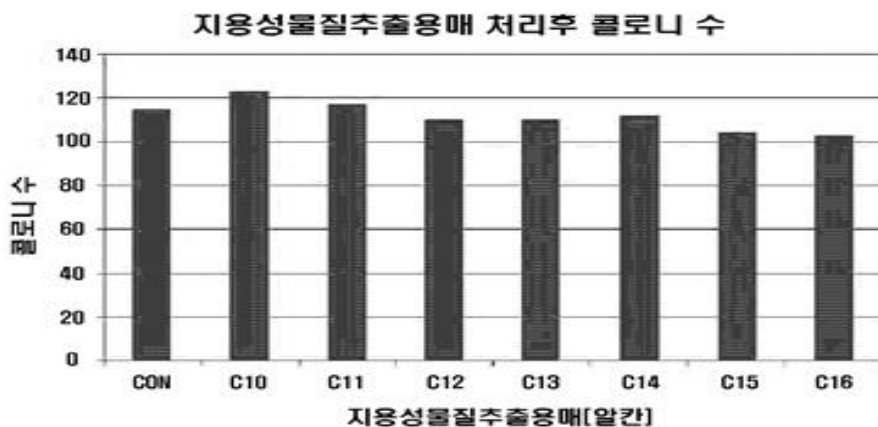


그림 37. 지용성물질추출용매가 *Chlorella vulgaris*의 생존에 미치는 영향.

다. 세포의 숙성 및 지용성 물질-용매의 분획

- (1) 5 L의 배양장치에서 교반속도, 150 rpm, 조도 15,000 lux 하 혹은 암반응 하에서 *Chlorella vulgaris*를 로그구간까지 배양한 후, 여과방식의 세포농축장치가 구비된 세포 농축장치에서 500 g/L로 농축하였고, 세포숙성장치에서 농축된 *Chlorella vulgaris*를 제한영양소원이 포함되지 않으면서 포도당만 5%가 되게 첨가한 숙성용액에서 24시간동안 숙성하였음.
- (2) 또는 상기 숙성용액을 대신하여 상기 유기성폐수를 공지된 물리화학적 혹은 생물학적 처리방법으로 질소농도가 100 mg/L 이하가 되게 질소원을 제거하여 세포를 숙성하였음.
- (3) 질소원이 제거된 약산인 유기성폐수는 지용성물질의 함량이 증가되도록 세포를 숙성시키고, 지용성물질을 용해하는 지용성물질추출용매가 숙성된 상기 세포 속으로 용이하게 투과하여 지용성물질을 용이하게 용해할 수 있도록 세포를 변화시킴.

라. 세포의 지용성물질 추출에 미치는 지용성물질추출용매 및 초음파진동분쇄의 효과

- (1) *Chlorella vulgaris*의 성장율이 로그구간에 있는 세포배양용액과 헥산 (hexane)과 데칸 (decane) 용매 (지용성물질추출용매)를 5 : 1비율로 5분간 처리한 후, 수조에서 2초간 40 kHz로 진동 분쇄하였고, 지용성물질추출용매로 추출된 지용성물질은 비누화되었으며 유리 지방산을 C17을 표준으로 하여 LC-MS 분석하여 측정하였음(그림 38).
- (2) 지방산이 5분간의 지용성물질추출용매 혼합과 추가적인 2초간의 진동 분쇄로 추출되었고, 데칸 (decane) 용매 사용 시 짧은 진동 분쇄가 지용성물질 추출 정도를 75% 정도 증가시켰음.

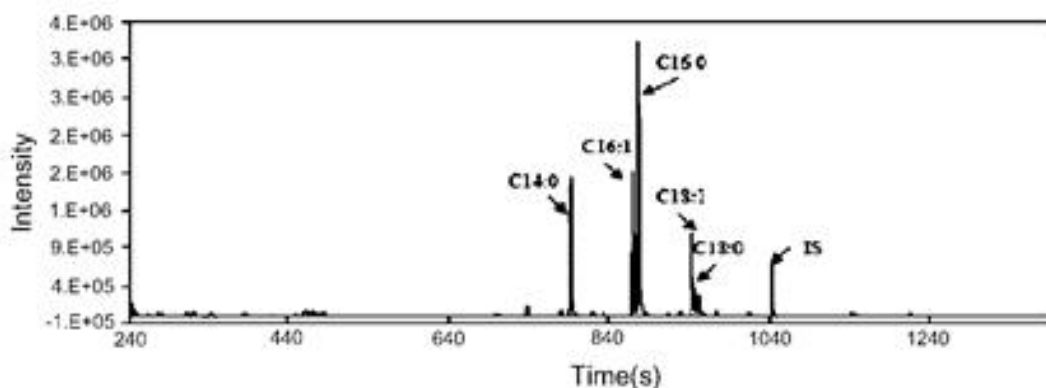


그림 38. 지용성물질추출용매로 추출된 지용성물질을 LC-MS 분석한 결과.

마. 지방산 함량 분석

- (1) 추출된 미세조류 오일의 총 지방산 함량을 측정하기 위해 수정된 direct trans-esterification 방법을 사용하였음(Lepage, G. and Roy, C. C., 1984).
- (2) 추출 오일 각각 10 mg을 test tube에 넣고 클로로포름-메탄올 (2 : 1, v/v) 2 ml을 넣은 뒤 vortex mixer로 10분간 섞어주고 내부 표준물질인 heptadecanoic acid-chloroform solution (Sigma-Aldrich, 500 µg/L) 1 ml을 넣고 메탄올 1ml와 황산 0.3 ml을 넣어 줌.
- (3) Vortex mixer로 10분간 섞어준 뒤 100°C 항온조에서 10분간 반응시킨 후 상온에서 충분히 식혀주고, 식힌 test tube에 증류수 1 ml을 첨가한 뒤 vortex mixer로 5분간 섞은 후 원심분리기 (4,000 rpm, 10분)에서 원심분리하고 층분리 된 용액 중 아래층을 주사

기로 뽑고 필터로 여과 후 vial에 1 ml을 넣고 가스 크로마토그래피 (Agilent 7890)로 분석 함.

- (4) 외부 표준물질로 Mix RM3, Mix RM5, GLC50, GLC70 (Supelco)을 사용하여 지방산의 정량 분석을 수행하였음(그림 39).

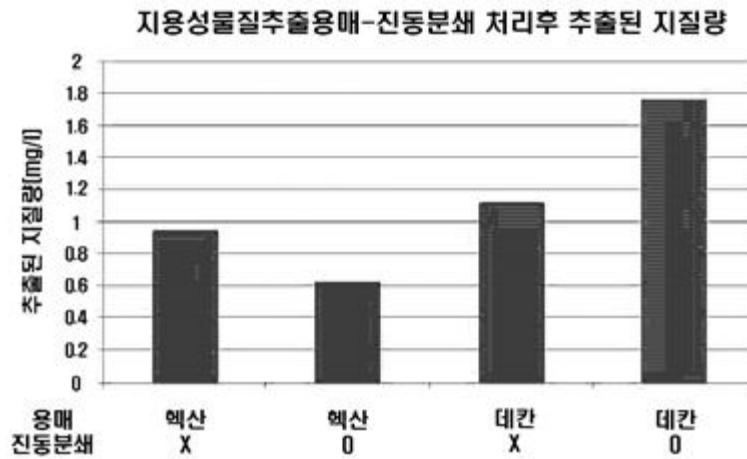


그림 39. 세포의 지용성물질 추출에 미치는 지용성물질추출용매 및 초음파진동분쇄의 효과

6. 혐기소화액 활용 미세조류 연속순환 고밀도 배양 scale up을 위하여 전처리 시스템을 pilot scale 시스템화/다양한 형태의 바이오연료 (가스, 오일 등) 생산 기술 개발

가. 기존 10 ml, 100 ml 배양에서 scale up 하여 그림 40과 같은 5 L milking-배양기에서 milking 및 연속배양 실험을 진행함. 5 L 배양기에서 미세조류를 접종하여 1차 배양을 한 후 유기용매를 첨가하여 milking을 한 후, 유기용매 증 및 미세조류를 90%를 수확 하였으며 5 L 배양기에 남아있는 10% 미세조류에 혼합영양배지를 첨가하여 2차 배양 하였고 7일 후에 다시 milking 하고 3차 배양을 하였음(그림 40).



그림 40. 5 L 배양 및 milking 기능을 보유한 milking-배양기.

- 나. *Chlorella vulgaris*의 혼합영양배양은 1 L 당 KH_2PO_4 (0.7 g), K_2HPO_4 (0.3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 mg), Urea (0.1 g), glucose (40 g), thiamine hydrochloride (10 μg), Arnon' A solution (1 ml)에서 수행하였으며, Arnon' A solution 은 1 L 당 H_3BO_3 (2.9 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.8 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08 g), MoO_3 (0.018 g) 임.
- 다. 연속배양시 milking 조건 설정을 위한 소규모 milking 실험은 기본배지인 BG11에서 배양한 미세조류 배양액을 Decane으로 2, 5 및 10배로 희석하여 Decane 비율에 따른 미세조류 성장변화를 조사하였음. 1분간 250 rpm으로 교반 시키고 0, 10 및 30분 간격으로 유기용매층 분리한 후 미세조류층 1 ml 샘플하여 총량 10 ml로 정치배양하여 세포수를 모니터링 하였음.
- 라. 초기 접종농도 계수결과 평균 4.3×10^6 cells/ml이고, 2 ~ 3일 간격으로 샘플하여 계수, 관찰하였음. 그 결과 전체 실험구에서 대조구보다 성장속도가 높게 나타남. Decane으로 2배 희석 실험구에서 층분리 시간이 늦은 실험구일수록 미세조류 개체수가 최대 1.2×10^8 cells/ml로 높았음. Decane으로 5배 희석한 실험구는 수확시점에 따라 성장변화가 일정하지 않았으며, Decane으로 10배 희석한 실험구는 수확시점에 관계없이 최대 세포수가 1.0×10^8 cells/ml, 1.1×10^8 cells/ml 으로 유사하였음(그림 41 및 표 16).

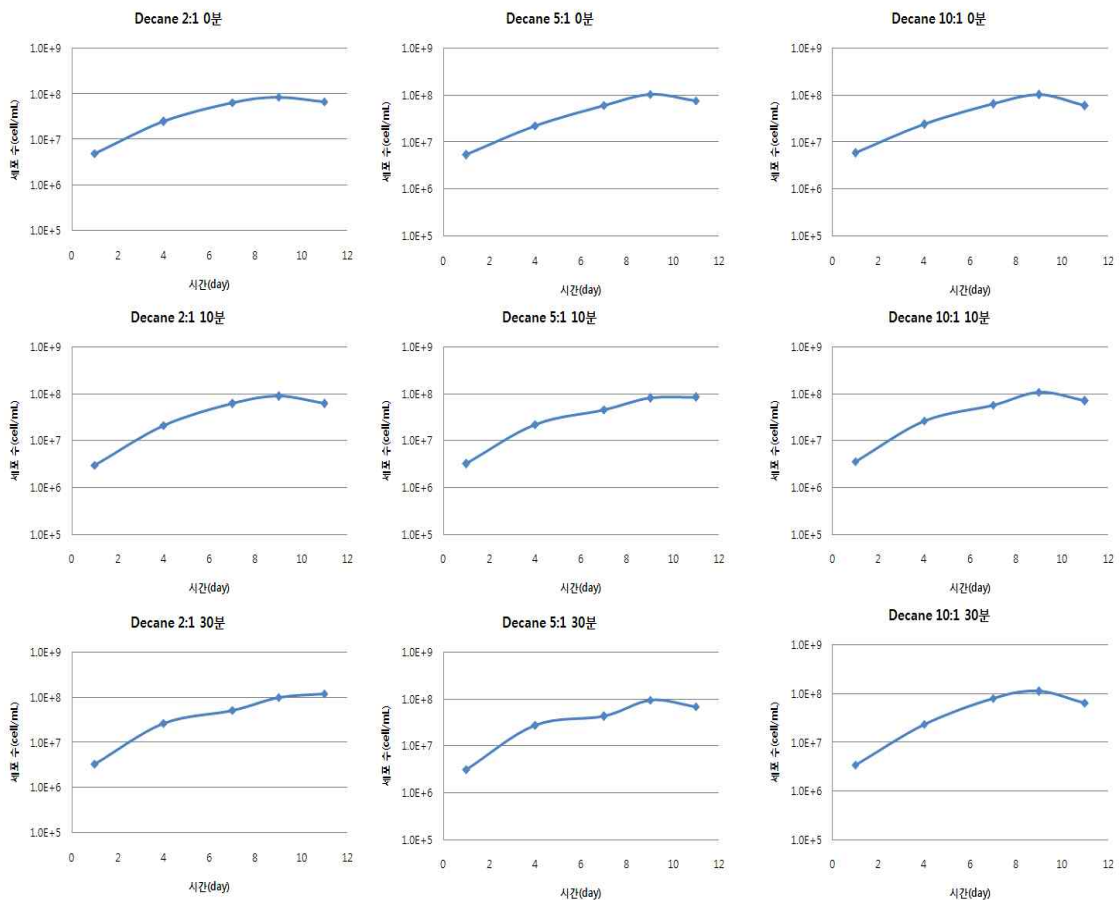


그림 41. milking에서 유기용매의 희석 및 수확시점에 따른 생체량.

표 16. milking에서 유기용매의 회석 및 수확시점에 따른 생체량.

실험구		1일차 (cells/ml)	4일차 (cells/ml)	7일차 (cells/ml)	9일차 (cells/ml)	11일차 (cells/ml)
회석	충분리 시간					
2배	0분	4.9×10^6	2.5×10^7	6.6×10^7	8.5×10^7	6.7×10^7
	10분	3.0×10^6	2.1×10^7	6.2×10^7	8.9×10^7	6.1×10^7
	30분	3.4×10^6	2.7×10^7	5.2×10^7	1.0×10^8	1.2×10^8
5배	0분	5.5×10^6	2.3×10^7	6.2×10^7	1.1×10^8	7.7×10^7
	10분	3.2×10^6	2.2×10^7	4.6×10^7	8.1×10^7	8.4×10^7
	30분	3.1×10^6	2.8×10^7	4.3×10^7	9.5×10^7	6.8×10^7
10배	0분	6.0×10^6	2.4×10^7	6.6×10^7	1.0×10^8	6.0×10^7
	10분	3.7×10^6	2.7×10^7	5.8×10^7	1.1×10^8	7.0×10^7
	30분	3.5×10^6	2.4×10^7	8.2×10^7	1.1×10^8	6.5×10^7
대조구		6.5×10^6	2.7×10^7	5.7×10^7	9.9×10^7	6.7×10^7

- 마. 본 실험결과를 기초하여 연속 배양시 Decane으로 5배 희석하여 10분간 250 rpm에서 교반한 후 10분간 유기용매 층을 분리하는 milking 조건을 설정하였음.
- 바. 연속배양실험은 혼합영양배지 2 L에 초기 접종을 4.8×10^6 cells/ml로 한 후 200 rpm으로 교반하면서 1차 배양하며 접종 후 1 ~ 2일 간격으로 계수하였으며, 성장이 종료된 시점에서 Decane으로 5배 희석하여 10분간 250 rpm에서 교반하고 10분간 유기용매층을 분리한 후 유기용매 층과 미세조류가 포함된 1.5 L 배양용액을 수확하고 남아있는 500 ml 미세조류가 포함된 배양액에 1.5 L 혼합영양배지를 첨가하여 2차 배양을 실시하였음. 2차 배양의 성장이 종료된 시점에서도 동일한 과정으로 3차 배양을 실시하였음(그림 42).

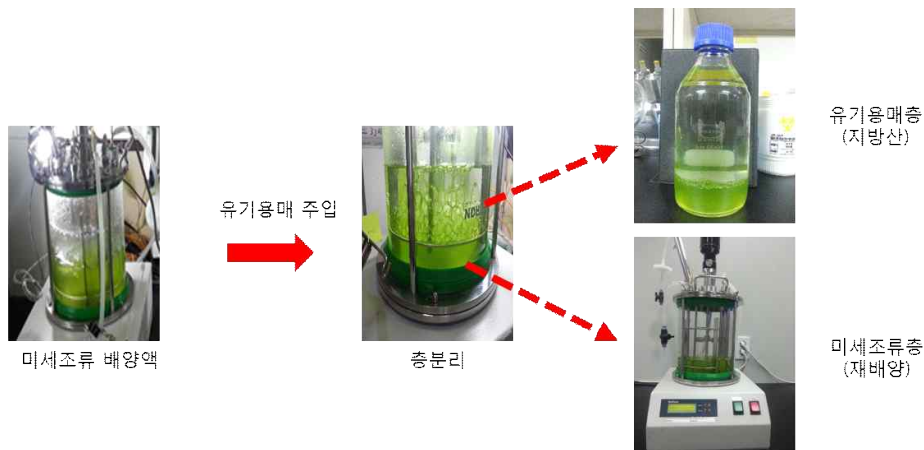


그림 42. 미세조류 연속배양실험.

사. 1차 배양 시 미세조류의 성장이 두드러지게 잘 나타나며 2차 배양에서도 지속적으로 성장하지만 1차 배양과 비교하여 최대세포수가 적음을 확인할 수 있었음. 3차 배양에서는 4일차까지 서서히 성장하였으며 전체적으로 1, 2차 배양과 비교하였을 때 최대 세포수는 현저히 적었음(그림 43 및 표 17). Decane을 이용한 milking이 2차 배양까지는 적용이 가능하다고 판단되나 3차 배양에서는 미세조류가 타격을 받아 성장의 한계가 나타나는 것으로 판단됨.

표 17. 미세조류의 연속배양에 따른 세포수.

	1일차 (cells/ml)	2일차 (cells/ml)	3일차 (cells/ml)	4일차 (cells/ml)	7일차 (cells/ml)	8일차 (cells/ml)
1차 배양	2.2×10^7	2.7×10^7	5.1×10^7	9.8×10^7	1.66×10^8	1.74×10^8
2차 배양	6.4×10^7	6.8×10^7	7.3×10^7	8.6×10^7	1.01×10^8	1.13×10^8
3차 배양	6.8×10^7	7.3×10^7	7.9×10^7	9.4×10^7	9.2×10^8	-

아. milking 기술을 이용한 미세조류의 연속배양 실험 결과로 지방산은 1차 milking으로 약 94% 정도 수확하였으나 2차 배양에서 미세조류는 비전형적인 미세조류 배양곡선 (그림 43)임을 알 수 있었으며, 3차 배양에서는 생장율이 저조하여 milking에 의한 세포 손상을 예측할 수 있음.

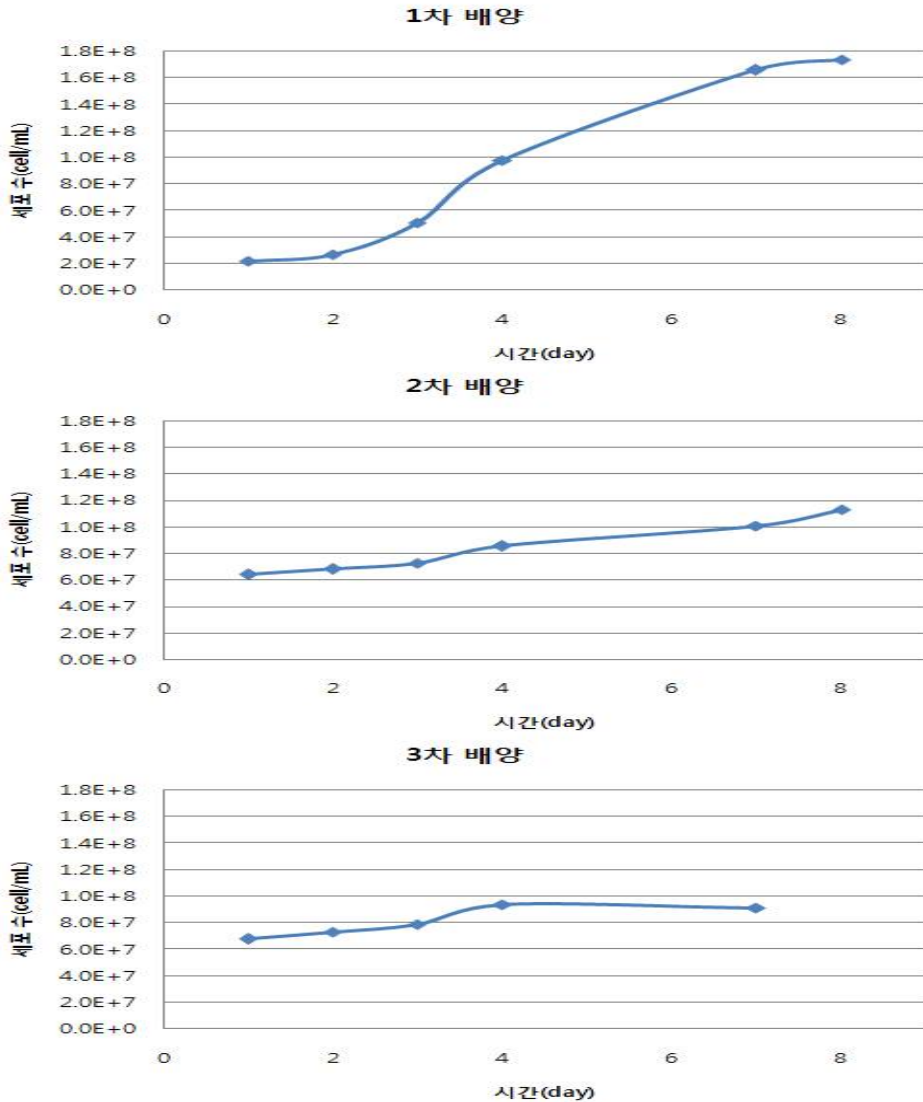


그림 43. 미세조류의 연속배양에 따른 세포수.

- 자. 따라서 본 연속배양의 실험결과를 기초하여 연속배양 시, 유기용매의 종류, Decane의 희석 비율, 교반 시 회전수 및 시간 등의 milking 조건을 검토하여 미세조류에 손상이 없는 최적의 milking 조건을 설정할 필요가 있음.
- 차. milking 전후 미세조류 및 유기용매 층을 수확하여 전처리한 후 (그림 44), 지방산을 분석한 결과 milking 전 미세조류 639.79 mg/g, milking 후는 34.55 mg/g이며 유기용매층에는 604.10 mg/g이 존재하여 milking으로 94.4% 지방산이 유기용매 층으로 배출됨을 알 수 있었음(표 18).



그림 44. milking 후 수확한 미세조류 증 및 유기용매 증을 분석하기 위해 전처리한 결과.

표 18. milking 후 수확한 미세조류 및 유기용매 층의 지방산을 분석한 결과.

지방산	미세조류		테칸 (mg/g)
	밀킹 전 (mg/g)	밀킹 후 (mg/g)	
Butyric acid	0.00	0.00	0.00
Caproic acid	2.09	0.00	2.20
Caprylic acid	0.00	0.00	0.00
capric acid	0.55	0.67	0.70
Undecanoic acid	0.00	0.00	0.00
Lauric acid	0.20	0.12	0.20
Tridecanoic acid	0.00	0.12	0.00
Myrisric acid	1.55	0.10	1.45
Myristoleic acid	0.00	0.00	0.00
Cis-10-pentadecanoic acid	0.00	0.00	0.00
Palmitic acid	119.25	7.85	112.60
Palmitoleic acid	3.55	0.62	3.35
Heptadecanoic acid	3.10	1.03	2.95
Cis-10-heptadecenoic acid	4.55	0.00	4.35
Stearic acid	49.50	0.86	46.30
Elaidic acid	0.00	0.00	0.00
Oleic acid	305.95	11.95	288.45
Linolelaidic acid	0.00	0.00	0.00
Linoleic acid	125.40	5.01	118.80
γ -linolenic acid	0.00	0.00	0.00
α -linolenic acid	19.65	5.91	18.55
Arachidic acid	0.70	0.08	0.70
Cis-11-eicosanoic acid	0.75	0.13	0.60
Cis-11,14-eicosanoic acid	0.15	0.00	0.20
Cis-8,11,14-eicosanoic acid	0.00	0.00	0.00
Heneicosanoic acid	0.00	0.00	0.00
Arachidonic acid	0.15	0.00	0.20
Cis-11,14,17-eicosanoic acid	0.00	0.00	0.00
Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	0.00	0.00	0.00
Behenic acid	0.80	0.09	0.75
Erucic acid	0.00	0.00	0.00
Cis-13,16-docosadienoic acid	0.00	0.00	0.00
Tricosanoic acid	0.45	0.00	0.40
Lignoceric acid	1.45	0.00	1.35
Docosahexaenoic acid	0.00	0.00	0.00
Nervonic acid	0.00	0.00	0.00
Total	639.79	34.55	604.10

7. 순환배양전후한 배양액의 수질분석

- 가. 혐기성소화액으로 순환 배양 전후한 배양액의 영양염을 확보하여 영양염을 분석하여야 하나 미세조류 배양의 최적화된 혐기성소화액을 결정하지 못한 상태이기 때문에 BG11 배지로 100배 희석한 혐기성소화액에서 미세조류를 배양하면서 영양염의 변화를 관찰하였음.
- 나. 배양액의 영양염은 HUMAS 수질분석 kit를 사용하였으며 TN (HS-TN-L,H), NO₃ (HS-NO₃-CA), NH₃ (HS-NH₃-L,H), TP (HS-TP-L,H) 총 4종의 항목을 분석하였음.
- 다. BG11 배지로 100배 희석한 혐기성소화액에서 미세조류를 배양한 후 초기 영양염 농도와 12일 후 영양염 농도를 비교하여 미세조류의 영양염 흡수능력을 분석하였으며 초기 *Chlorella vulgaris* 접종농도는 9.0×10^4 cells/ml 임.
- 라. 평균 1일차 분석 결과 TN 298.8 mg/L, NO₃ 27.2 mg/L, NH₃ 24.7 mg/L, TP 0.90 mg/L 나왔으며, 12일차 분석결과는 TN 294.3 mg/L, NO₃ 25.5 mg/L, NH₃ 18.4 mg/L, TP 0.78 mg/L 로 나타났다. 감소율은 TN 6.25 %, NO₃ 25.51 %, NH₃ 15.1 %, TP 13.33 %임 (그림 45 및 표 19). 전체적으로 낮아지는 경향을 보였으며 이는 초기 *Chlorella vulgaris* 접종농도가 낮은 것으로 인한 결과로 판단됨.

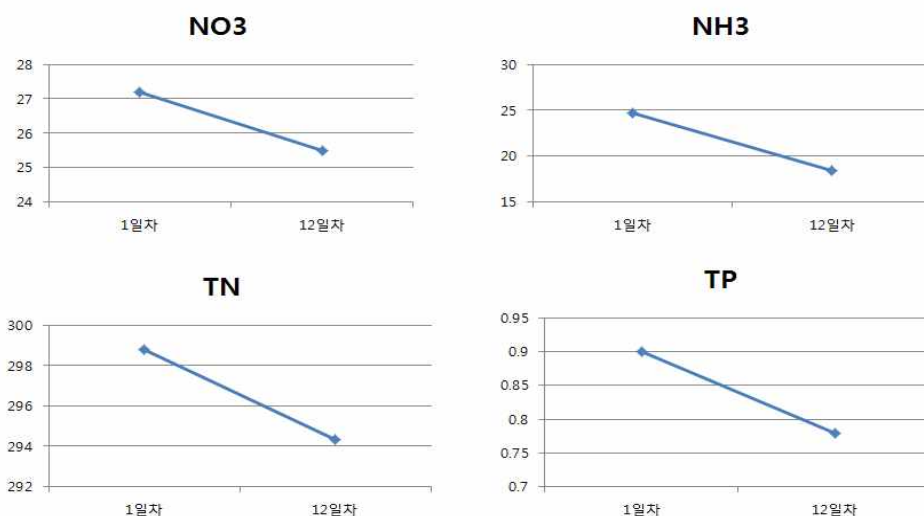


그림 45. 미세조류 배양액의 수질분석 결과.

표 19. 미세조류 배양액의 수질 분석 결과.

	1일차(mg/L)	12일차(mg/L)	감소율(%)
NO ₃	27.2	25.5	6.25
NH ₃	24.7	18.4	25.51
TN	298.8	294.3	1.51
TP	0.9	0.78	13.33

8. 미세조류 자동화 순환배양 및 수확 시스템 개발

가. 두 개의 배양기를 연결하여 보다 효율적으로 미세조류를 고밀도로 배양 할 수 있으며 배양부터 milking까지의 모든 생산 공정을 자동화하였음(그림 46).



그림 46. 자동화 순환배양 및 수확 시스템.

나. 미세조류 자동 재배양 시스템 개발로 생산 시간 및 단가를 크게 낮출 것으로 판단됨.
 다. 다양한 형태의 바이오연료(가스, 오일 등) 생산성을 향상 시킬 수 있음.



그림 47. 자동화 순환배양 및 수확 시스템 흐름도.

라. *Chlorella vulgaris*를 초기 접종 농도 1×10^6 cells/ml 2L를 자동화 순환배양 시스템에서 배양하여 배양 6일차에 *Chlorella vulgaris* 건중량 측정 결과 평균 건중량 0.572 g/L로 나타났음 (그림 48 및 표 20).

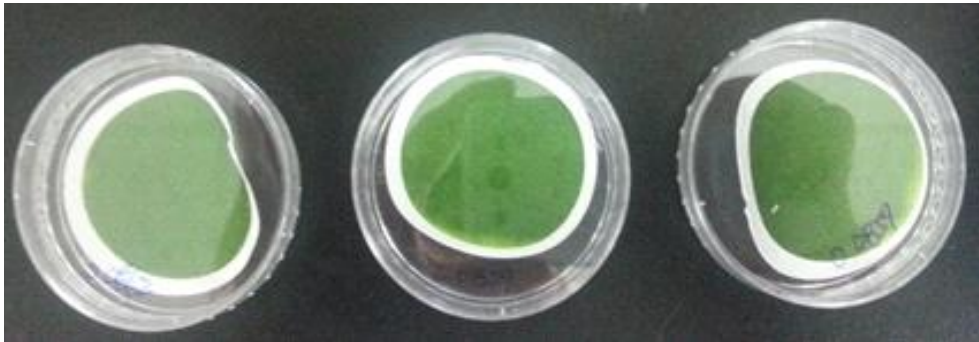


그림 48. *Chlorella vulgaris* 건중량 측정.

표 20. *Chlorella vulgaris* 건중량 측정 결과.

미세조류 수확한 후 여과지(a)	여과지(b)	a-b	건중량(mg/mL)
0.1428	0.0862	0.0566	0.566
0.1435	0.0859	0.0576	0.576
0.1435	0.0859	0.0576	0.576

9. 부하변동에 따른 혐기소화 조건의 최적화 및 소화 성능 평가

가. 전처리된 가축 분뇨의 혐기소화 기본조건(pH, 온도, HRT, SRT) 확립

- (1) 본 연구는 용인시 처인구 포곡읍에 위치한 용인레스피아에서 가축분뇨를 공급받아 실험을 진행하였음.
- (2) 용인레스피아에서 공급받는 가축분뇨의 경우 고정된 하나의 농가가 아닌 매번 다른 농가에서 공급받아 오기 때문에 성분분석을 진행하였으나 크게 성상의 차이는 존재하지 않았음(표 21).
- (3) 공급 받을시 매번 20 L 크기의 말통 2개에 40 L씩 공급받았으며, 보관과정 중 혐기소화가 일어나거나 기타 변질을 막기 위해 4°C냉장고에 보관하고 보관과정 중 변질 여부를 확인하기 위해 이틀에 한번 성분분석을 진행하였음.

표 21. 가축분뇨 정상 및 비교.

Parameter	Piggery wastewater			
	Ahn et al. (2006)	Hansen et al. (1998,1999)	Lei Jahng et al. (2011)	가축분뇨정상 (용인레스피아)
pH	6.37 ± 0.10	7.62 ± 0.02	6.60 ± 0.20	6.3
TS (wt.%)	6.18 ± 0.04	-	5.64 ± 0.34	4.74
VS (wt.%)	4.45 ± 0.02	4.5 ± 0.1	3.69 ± 0.22	3.47
VS/TS ratio	0.72	-	0.65 ± 0.01	0.73
Total COD (g/L)	130.8 ± 3.0	-	92.8 ± 1.3	83
Soluble COD (g/L)	59.7 ± 0.9	-	53.2 ± 0.9	42.7
TKN (g/L)	7.3 ± 0.1	6.6	7.31 ± 0.22	-
TN (g/L)	-	-	-	4.2
TP (g/L)	-	-	0.50 ± 0.14	2.1
Ammonia-N (g/L)	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.91 ± 0.06	3.84
Phosphorus-P (g/L)	-	-	-	0.35

- (4) 가축분뇨의 처리로는 호기성 생물학적 처리도 고려할 수 있으나, 높은 유기물 함량 때문에 적절한 산소공급이 현실적으로 불가능하기 때문에 가축분뇨와 같은 고농도 유기성 폐수에 대해서는 혐기소화가 가장 이상적인 처리 방법임.
- (5) 소화조 1개에서 일어나는 단일 1상 혐기소화조로 가축분뇨를 공급해주는 저장조, 혐기소화가 일어나는 소화조, 혐기소화 후 슬러지를 침전시키는 침전조, 혐기소화조에서 발생하는 가스를 포집하는 가스포집조로 구성되어 있음(그림 49, 50 및 표 22).



그림 49. 저장조(좌), 소화조(중), 침전조(우).



그림 50. 전체 모식도.

표 22. 반응기 크기 및 운전 조건.

Parameter	Size	Temperature	Rpm
Storage	ID 29 cm × H 39 cm	-	72
ADReator	ID 38 cm × H 46 cm	37°C	50
Settling tank	ID 18 cm × H 20 cm	-	-
Gas collector	ID 19 cm × H 52 cm	-	-

나. 가축분뇨와 혐기소화의 분석방법

- (1) 분석방법으로는 TS(Total solids), VS(Volatile solids)는 APHA Standardmethod에 의해 도기에 시료를 넣어 전기로 105°C에서 4시간 건조 방냉 후 무게 측정, 전기로 550°C에서 30분간 작열 방냉 후 무게 측정하여 측정하였음.
- (2) TCOD와 TN, TP는 아무 처리도 하지 않고, SCOD와 NH₄⁺-N, PO₄³⁻-P는 원심분리 후 상등액만을 가지고 absorption photometry방법을 이용하여 그림 51과 같은 HACH 회사의 kit를 DR2500을 이용하여 측정하였음(그림 51 및 표 23).



그림 51. KitBox(좌), DR2500(중), CODheator(우).

표 23. COD, TN, TP, NH₄⁺-N, PO₄³⁻-P의 측정 Kit범위.

Category	Reange	Principle
COD (HR)	100 ~ 1500 mg/L	Absorption photometry
TN (HR)	10 ~ 150 mg/L	Absorption photometry
TP (HR)	1 ~ 100 mg/L	Absorption photometry
NH ₄ ⁺ -N (HR)	0.4 ~ 50 mg/L	Absorption photometry
PO ₄ ³⁻ -P (HR)	0.02 ~ 2.5 mg/L	Absorption photometry

(3) VFA(Volatile Fatty Acid)측정항목으로는 표 24와 같은 성질을 갖는 Acetic acid, Propionic acid, n-Butyric acid, Iso-Butyric acid, n-Valeric acid, Iso-Valeric acid이고 Internal Standard 물질로는 2-ethylbutyric Acid를 사용하였음.

표 24. VFA측정 항목의 Specific gravity, Molecular weight, Boiling point.

실험	VFA	Specific gravity (g/ml)	Molecular weight (g ^{mol} ⁻¹)	Boiling point (°C)
VFA (Volatile Fatty Acid)	Acetic Acid CH ₃ COOH	1.0491	60.05	118 ~ 119
	Propionic Acid CH ₃ CH ₂ COOH	0.9900	74.08	141
	Butyric Acid CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	0.9595	88.11	164
	valeric Acid C ₅ H ₁₀ O ₂	0.9300	102.13	186 ~ 187
Internal Standard	2-ethylbutyric Acid C ₆ H ₁₂ O ₂	0.9260	116.16	193 ~ 196

(4) Stationary phase과 시료의 화학적 친화력 및 boiling point에 의한 분리가 일어나는 gas chromatography의 FID(Flame Ionization Detector)를 검출기를 사용, GC-FID의 조건은 다음 표 25와 같음.

표 25. VFA 측정시 GC-FID 설정 조건.

VFA 측정시 GC-FID 설정 조건	
Column의 종류	HP-INNOWAX (30 m length × 250 μm ID × 0.25 μl DF)
Oven의 온도	80°C to 200°C
Injector의 온도	200°C
Detector의 온도	220°C
Carrier Gas의 종류 및 속도	Helium gas, 40 ml/min
Injection의 부피	5 μl

(5) GC-FID를 이용하여 VFA (Volatile Fatty Acid)의 측정을 하기 위해서는 VFA의 표준 곡선이 필요하므로 internal standard용액 2-ethylbutyric acid을 사용하였고 Acetic acid, Propionic acid, n-Butyric acid, Iso-Butyric acid, n-Valeric acid, Iso-Valeric acid 각각 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ppm, 2-ethylbutyric Acid는 1000 ppm으로 고정인 용액을 만들어 GC-FID로 측정하여 농도별 모든 peak의 면적을 internal standard물질 기준으로 계산하여 graph를 작성함으로 VFA 항목들의 양을 정량하였음 (그림 52, 53).

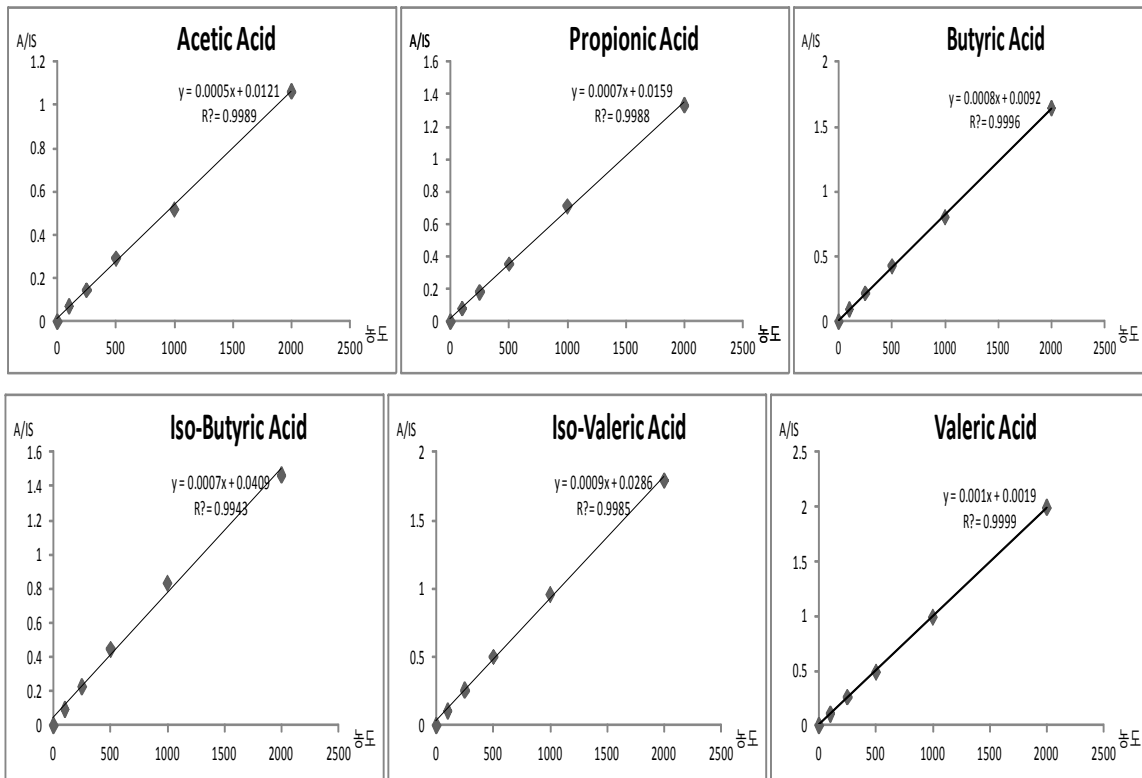


그림 52. GC-FID를 이용해 VFA의 standard curve.

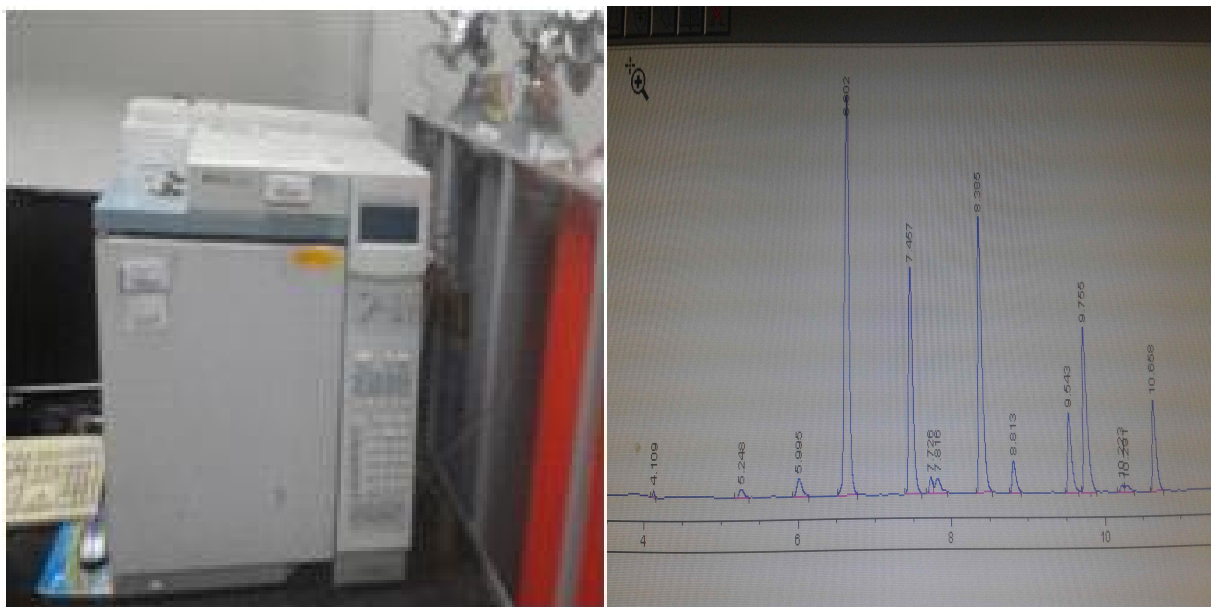


그림 53. GC-FID(좌), GC-FID를 이용해 VFA 측정시 모습(우).

(6) Biogas 측정방법으로는 그림 54와 같은 수중포집방법을 사용하여 발생량을 측정하였고 biogas 분석법으로는 VFA와 마찬가지로 gas chromatography를 사용하였으나 검출기는 TCD (Thermal Conductivity Detector)를 사용하였음(그림 54).



그림 54. Biogas 수중포집.

(7) GC-TCD의 조건은 다음 표 26과 같음.

표 26. Biogas 측정 시 GC-TCD 설정 조건.

Biogas 측정시 GC-TCD 설정 조건	
Column의 종류	HP-PLOTQ (30 m length × 320 μm ID × 20 μl DF)
Oven의 온도	35°C to 100°C
Injector의 온도	60°C
Detector의 온도	200°C
Carrier Gas의 종류 및 속도	Helium gas, 20 ml/min
Injection의 부피	50 μl

(8) GC-TCD를 이용하여 biogas 측정시 측정 항목은 CO₂, CH₄, N₂이며 측정하기 위해서는 Biogas의 표준곡선이 필요함으로 CO₂, CH₄, N₂ 각각 5, 10, 15, 20, 30, 100%인 Gas팩을 만들어 GC-TCD로 측정하여 %별 모든 peak의 면적을 계산하여 graph를 작성함으로 biogas 항목들의 양을 정량하였음(그림 55, 56).

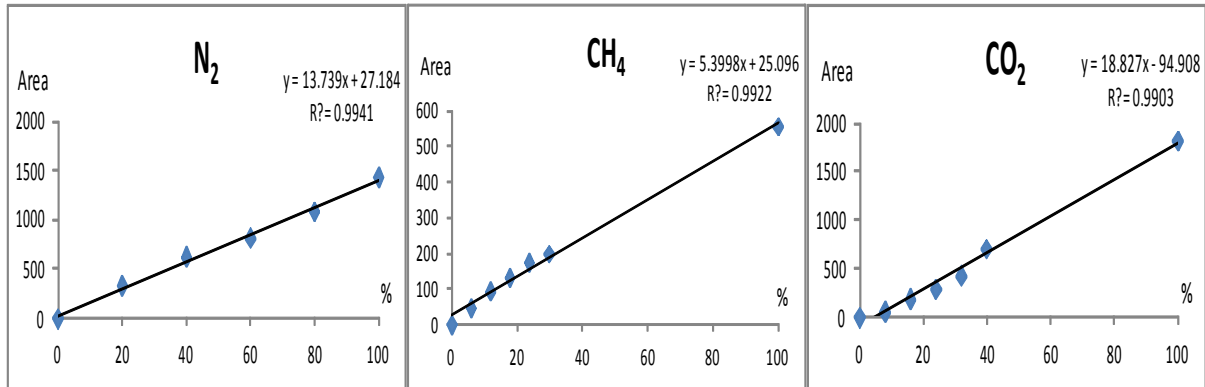


그림 55. GC-TCD를 이용해 Biogas의 standard curve.

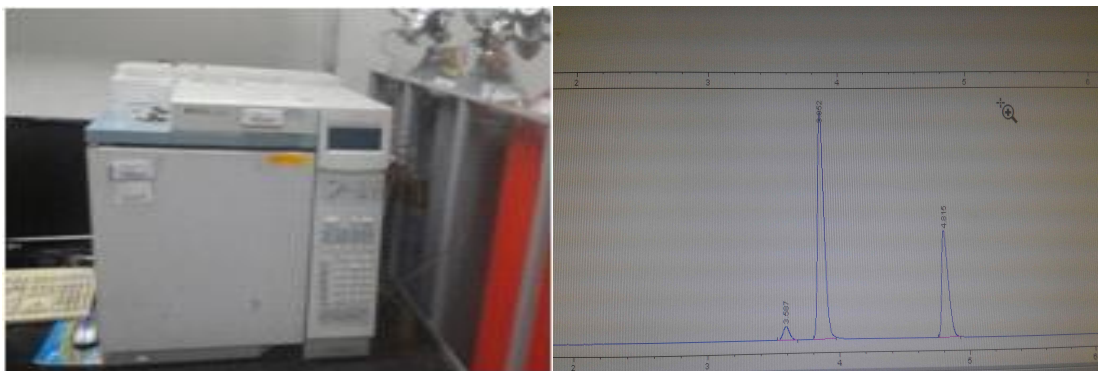


그림 56. GC-TCD(좌), GC-TCD를 이용해 Biogas 측정시 모습(우).

다. 고형분 감량률, COD 제거율, TSS 제거율, VSS 제거율, TN, TP 제거율 평가

- (1) 제거율평가를 위해 혐기소화 과정의 공정 간에 성분들의 변화를 성분들의 수치와 제거율, 제거속도로 나타내며 influent는 저장조, AD는 anaerobic digestion으로 혐기소화조, effluent는 침전조를 나타내고 feeding의 의미는 용인레스피아에서 가축분뇨를 새로 공급받아 혐기소화조에 주입 할 때 마다 차수를 표시한 것임.
- (2) 171일간의 각 반응조에 유출량과 혐기소화조의 제거율, 침전조의 제거율, 혐기소화조와 침전조가 이어지는 전체 제거율을 나타냈으며 제거율 기준은 혐기소화조 기준으로 작성하였음.
- (3) TS 양은 저장조에서 370.94 g/L 유출, 혐기소화조에 199.29 g/L 유출, 침전조에서 75.18 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 47.02%, 침전조의 제거율 평균은 57.6%, 전체 제거율 평균은 77.12%를 달성(그림 57 및 표 27)했으며 VS양은 저장조에서 251.29 g/L 유출, 혐기소화조에 112.8 g/L 유출, 침전조에서 27.27 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 53.52%, 침전조의 제거율 평균은 74.81%, 전체 제거율 평균은 87.61%를 달성하였음(그림 58 및 표 27).

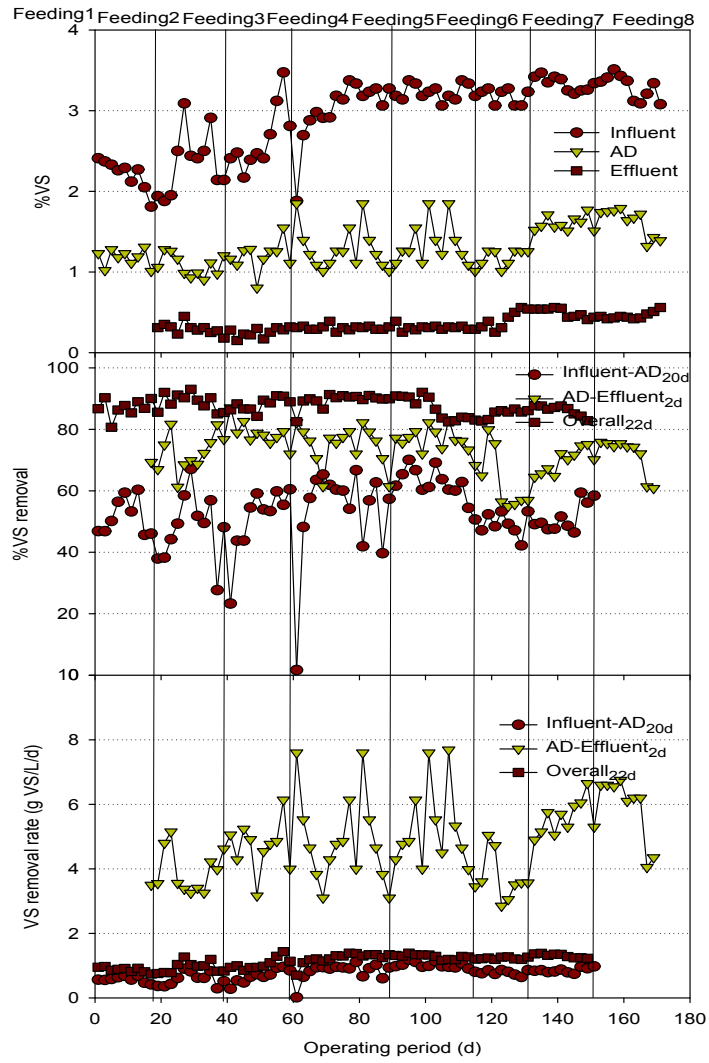


그림 57. TS removal performance of the anaerobic digestion of piggy waste.

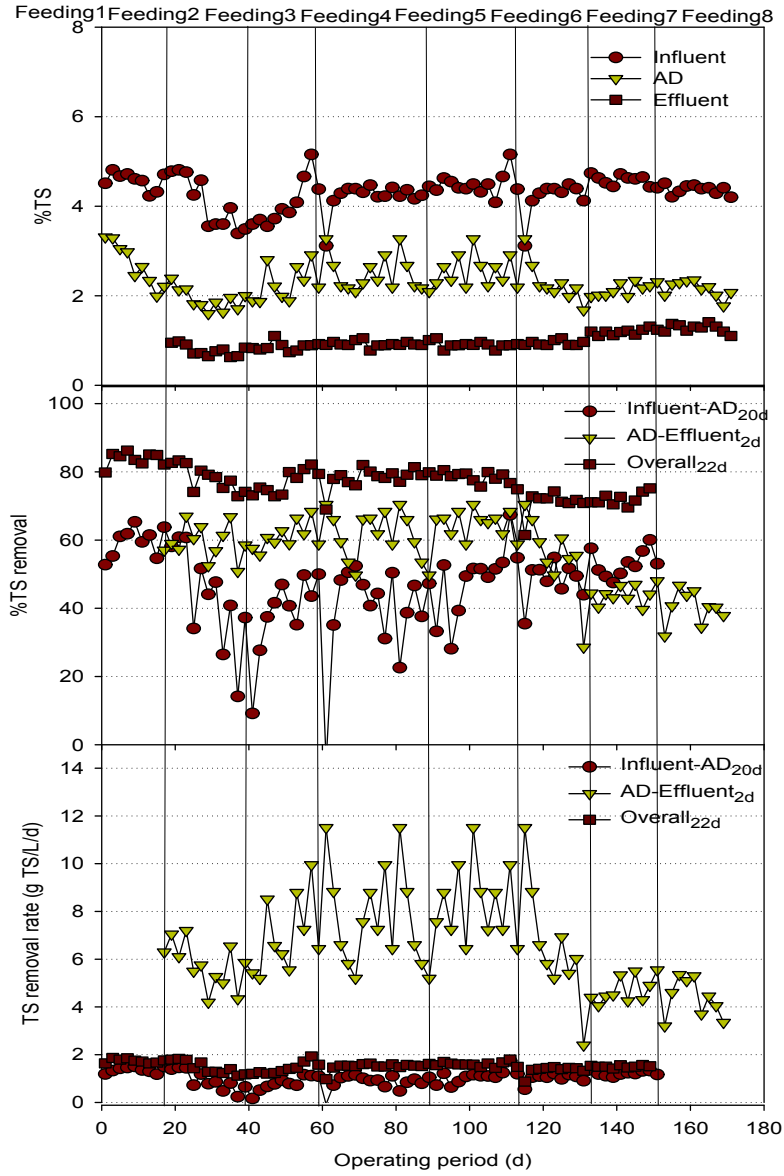


그림 58. VS removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

표 27. TS 및 VS 문헌비교.

Parameter	Jehoon Lee (2012)	Griffin et al (1997)	Hill and Bolite (2000)
TS Removal	62.1	53	41
VS Removal	69.2	54	51

(4) TCOD양은 저장조에서 6218.04 g/L 유출, 혐기소화조에 1663.39 g/L 유출, 침전조에서 486.51 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 70.04%, 침전조의 제거율 평균은 67.38%, 전체 제거율 평균은 90%를 달성(그림 59 및 표 28) 했으며 SCOD양은 저장조에서 2586.43 g/L 유출, 혐기소화조에 229 g/L 유출, 침전조에서 225.49 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 86.01%, 침전조의 제거율 평균은 15%, 전체 제거율 평균은 89.66%를 달성하였음(그림 60 및 표 28).

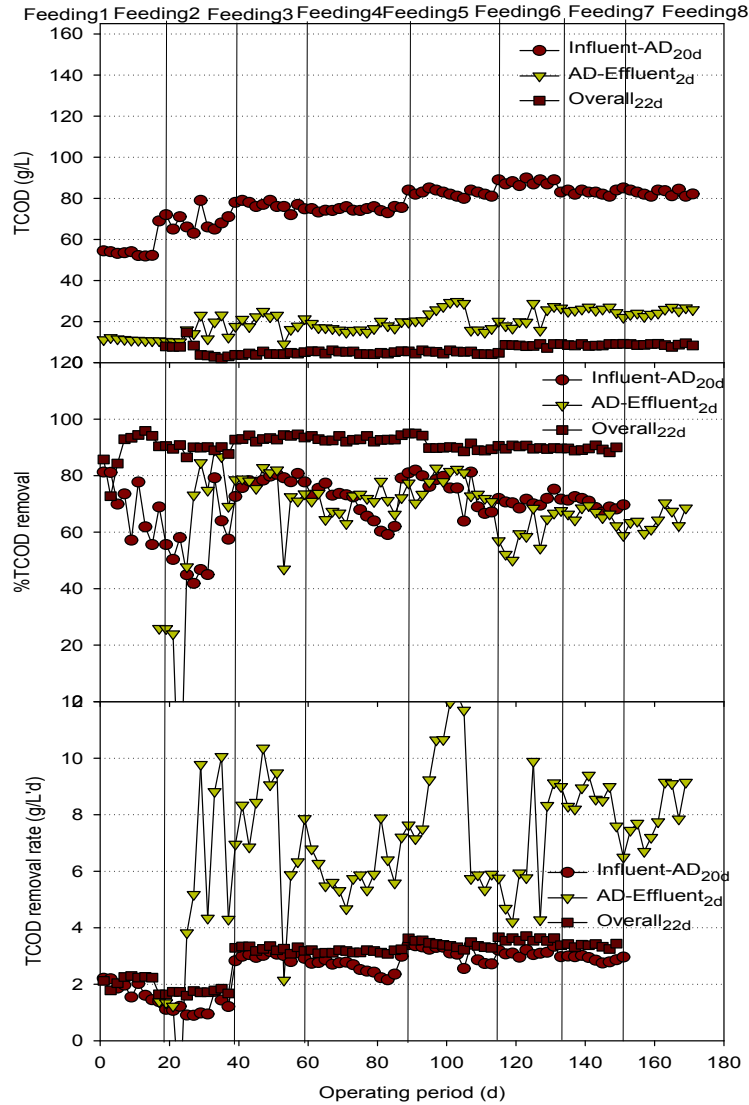


그림 59. TCOD removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

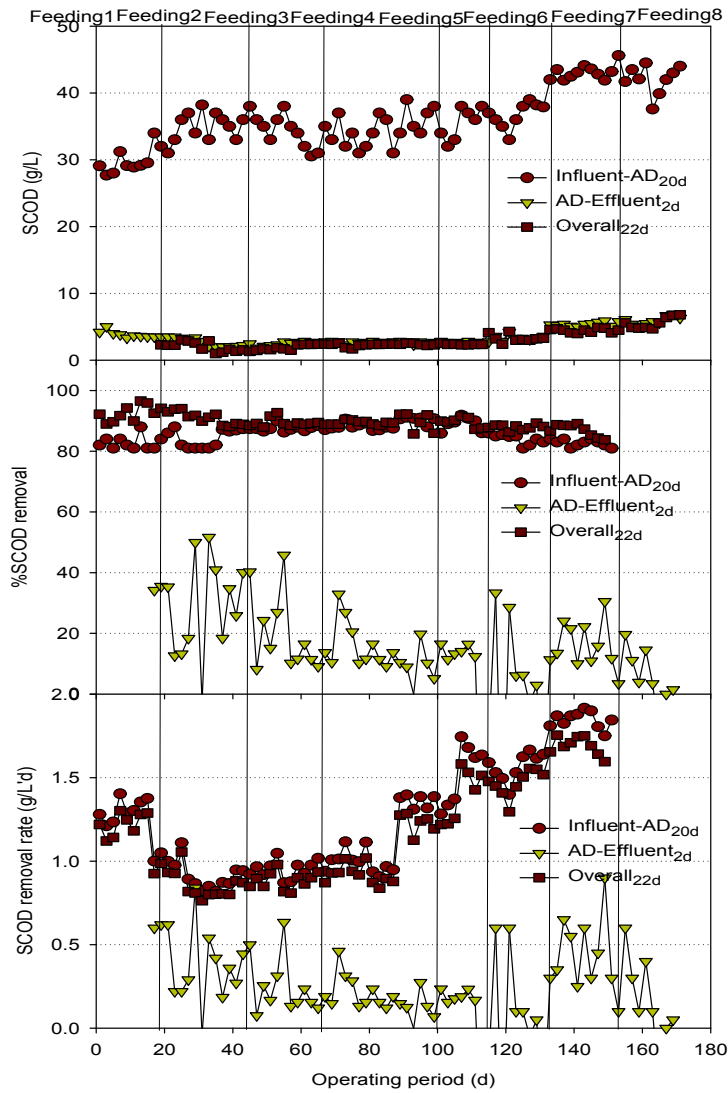


그림 60. SCOD removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste

표 28. TCOD 및 SCOD 문헌비교

Parameter	Guangqing Liu at al. (2014)	Moonil Kim at al. (2011)	Jehoon Lee (2012)
TCOD Removal	79 ± 2	78.2	85.1
SCOD Removal	72 ± 2	75.6	96.6

(5) TN양은 저장조에서 435.12 g/L 유출, 혐기소화조에 385.85 g/L 유출, 침전조에서 270.74 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 8.44%, 침전조의 제거율 평균은 22.29%, 전체 제거율 평균은 29.25%를 달성(그림 61)했으며 TP양은 저장조에서 180.39 g/L 유출, 혐기소화조에 142.95 g/L 유출, 침전조에서 109.73 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 18.05%, 침전조의 제거율 평균은 16.27%, 전체 제거율 평균은 32.11%를 달성하였음(그림 62).

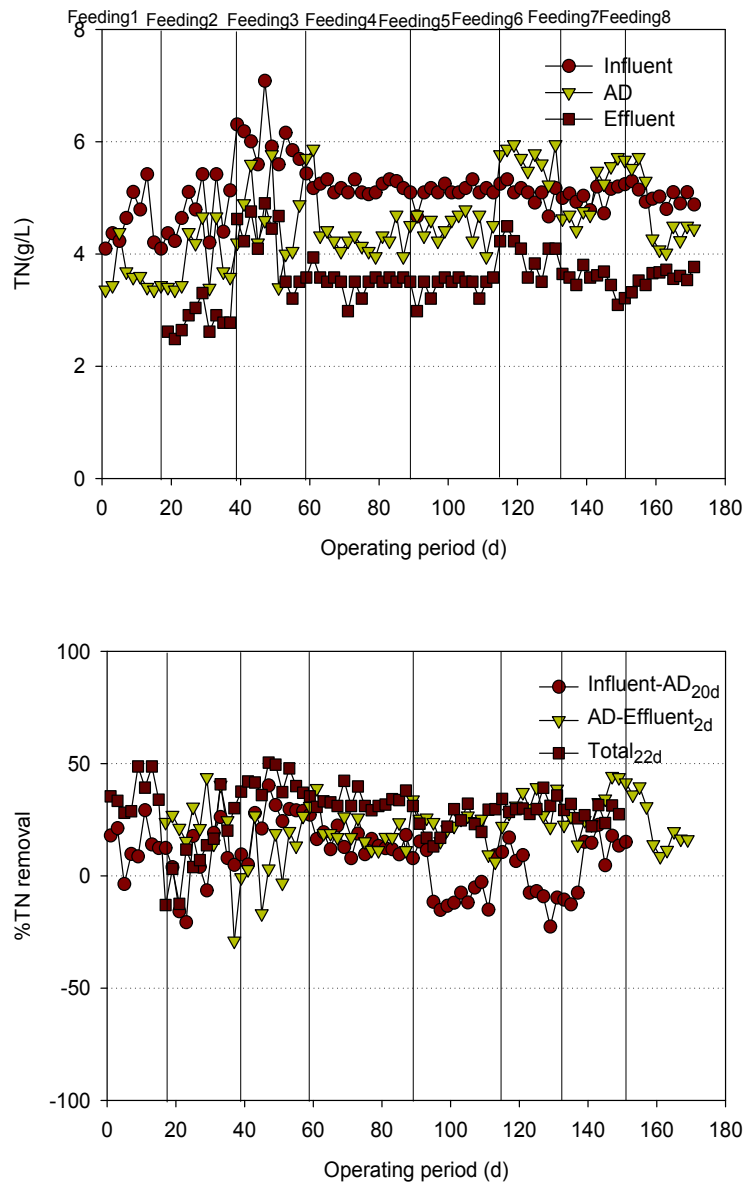


그림 61. TN removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

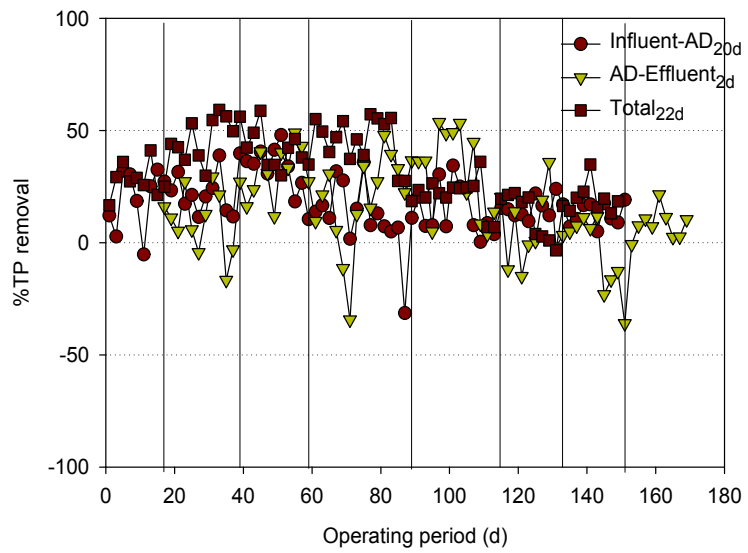
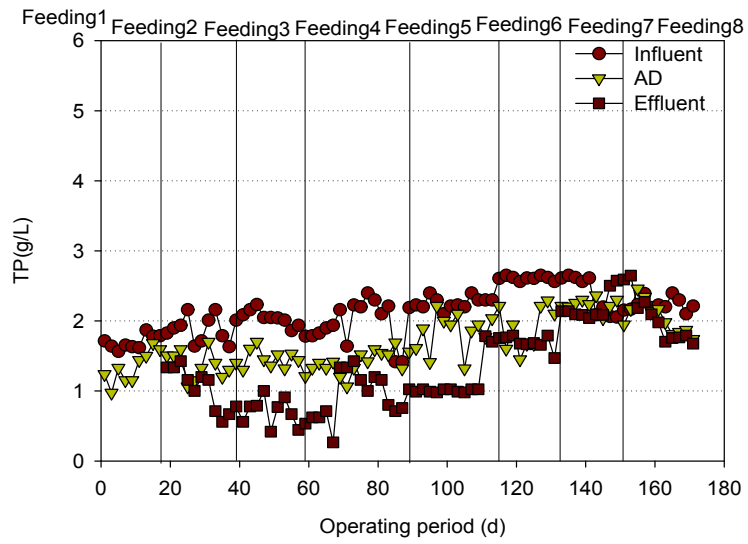


그림 62. TP removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

(6) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 양은 저장조에서 316.624 g/L 유출, 혐기소화조에 249.79 g/L 유출, 침전조에서 222.21 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 16.74%, 침전조의 제거율 평균은 8.4%, 전체 제거율 평균은 20.22%를 달성(그림 63)했으며 PO_4^{3-}P 양은 저장조에서 23.53 g/L 유출, 혐기소화조에 16.73 g/L 유출, 침전조에서 13.25 g/L 유출되었고 혐기소화조의 제거율 평균은 26.85%, 침전조의 제거율 평균은 13.52%, 전체 제거율 평균은 32.21%를 달성하였음(그림 64).

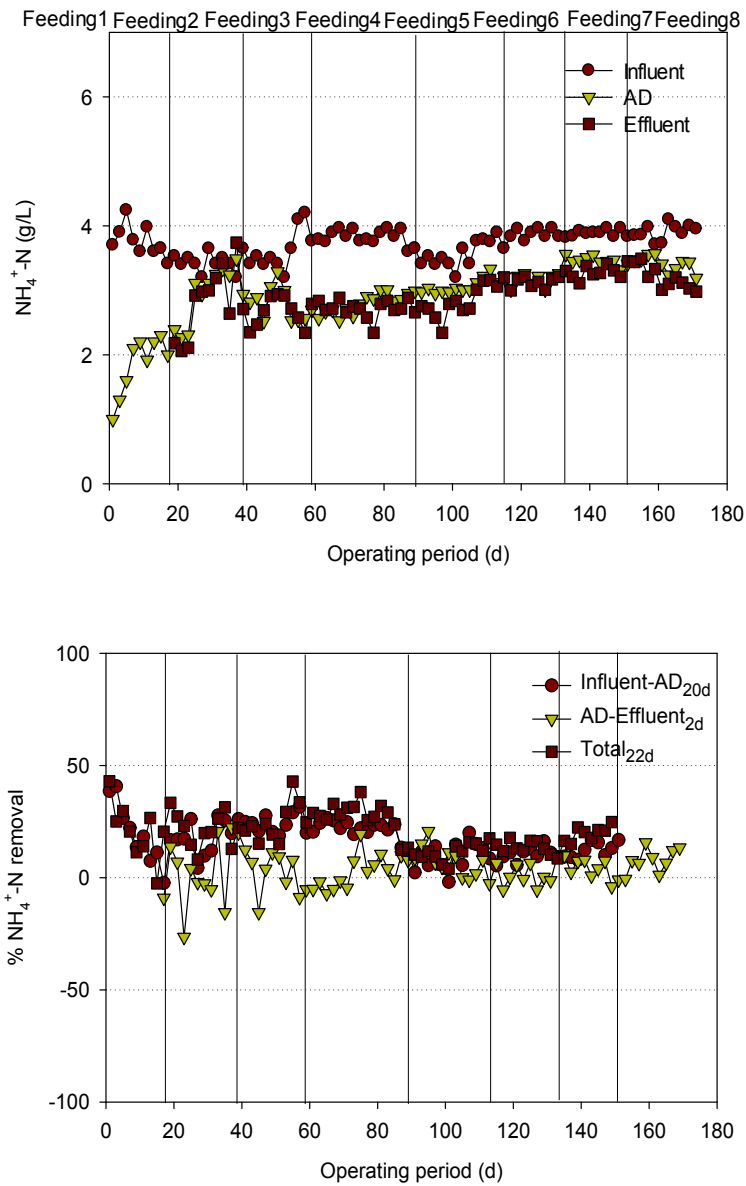


그림 63. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

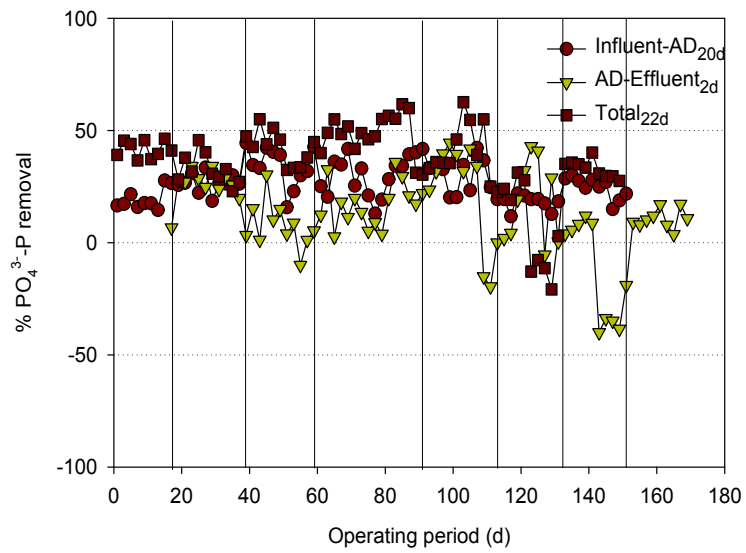
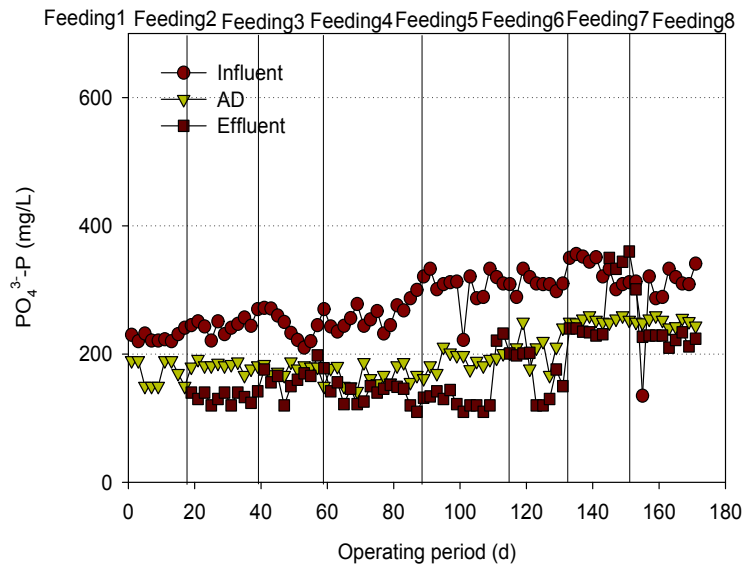


그림 64. PO₄³⁻-P removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

(7) VFA 양은 저장조에서 Acetic acid 1501.51 g/L, Propionic acid 640.51 g/L, n-Butyric acid 514.51 g/L, Iso-Butyric acid 63.64 g/L, n-Valeric acid 89.68 g/L, Iso-Valeric acid 140.79 g/L, Total VFA 2950 g/L 유출, 혐기소화조에 Acetic acid 261.721 g/L, Propionic acid 121.32 g/L, Total VFA 383.05 g/L 유출, 침전조에서 Acetic acid 206.71 g/L, Propionic acid 85.37 g/L, Total VFA 292.09 g/L 유출되었고 혐기소화조의 Total VFA 제거율 평균은 74.4%, 침전조의 Total VFA 제거율 평균은 17%, Total VFA의 전체 제거율 평균은 79.02%를 달성하였음(그림 65, 66 및 표 29).

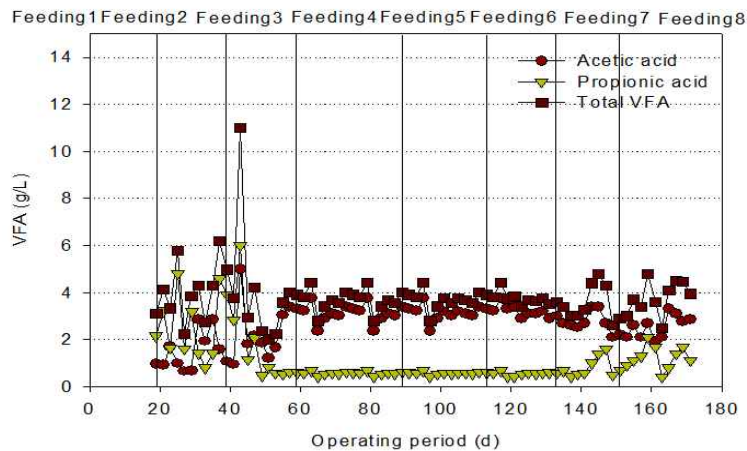
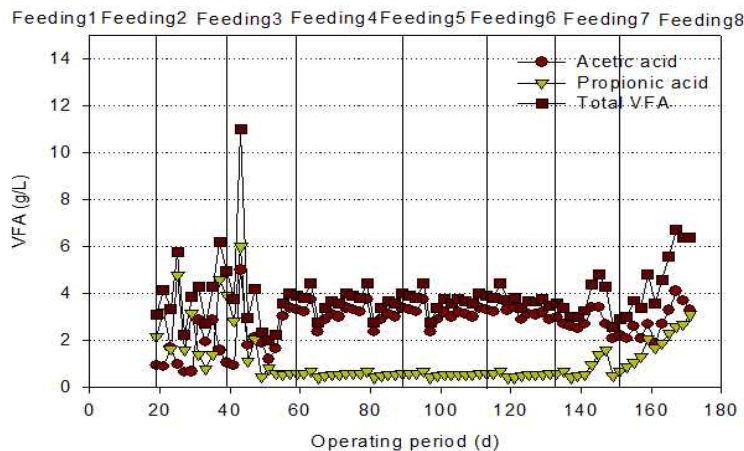
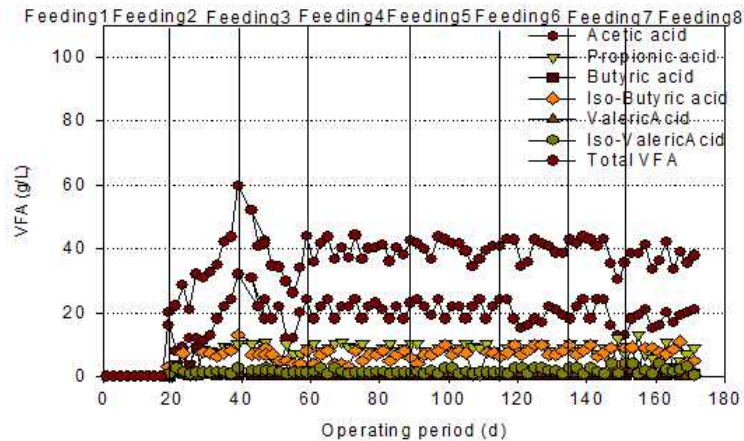


그림 65. 저장조(위), 혐기소화조(중), 침전조(아래) VFA 변화.

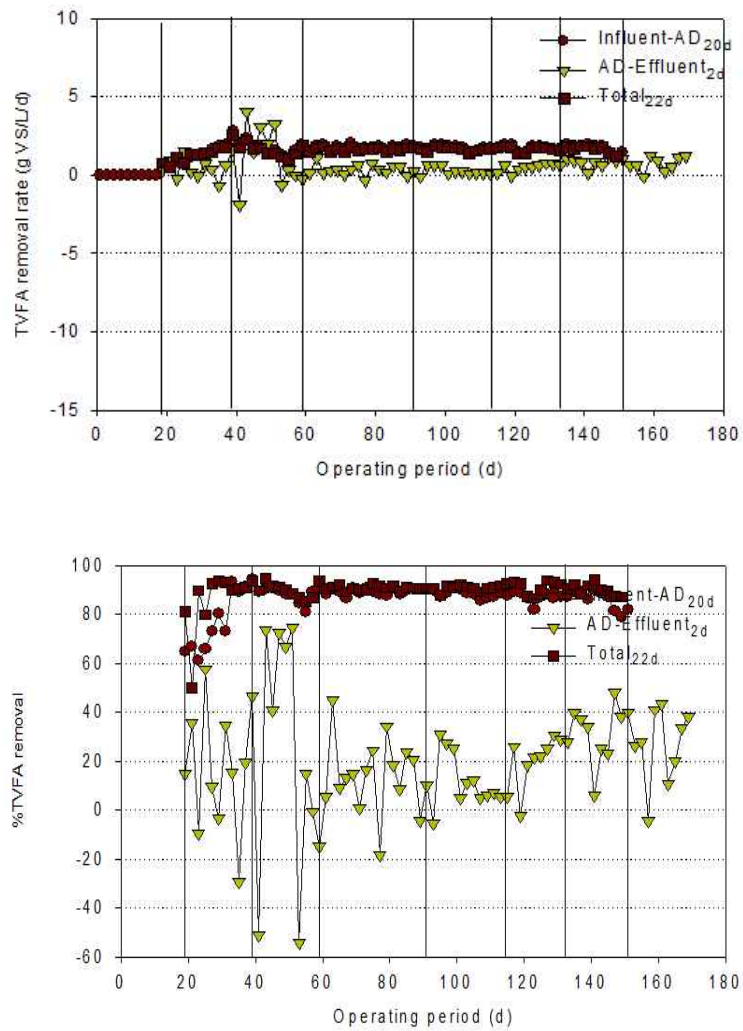


그림 66. VFA removal performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

표 29. VFA 문헌비교.

Parameter	Ahn et al. (2006)	Hansen et al. (1998,1999)	Lei Jahng et al. (2011)	평균
Acetate (g/L)	22.02 ± 0.2	11.0 ± 0.5	14.23	17.79
Propionate (g/L)	5.2 ± 0.1	-	4.35	7.37
iso-Butyrate (g/L)	-	-	1.53	0.75
n-Butyrate (g/L)	6.41 ± 0.1	-	4.88	5.74
iso-Valerate (g/L)	-	-	1.70	0.9
n-Valerate (g/L)	-	-	0.75	1.52
Total VFA	36.7 ± 0.1	11.0 ± 0.5	27.44	33.47

라. 메탄생산속도 및 메탄 함량의 정량 평가

- (1) Biogas의 전체 발생량은 2,988.19 L이고 그 구성비 발생량은 CH₄가 2063.72 L, CO₂가 184.05 L에 해당되며 CH₄ production rate 988 ml/L·day, CH₄ yield 210 ml CH₄/g COD_{add}, CH₄ yield 400 ml CH₄/g VS_{add}를 달성하였음(그림 67, 68 및 표 30).

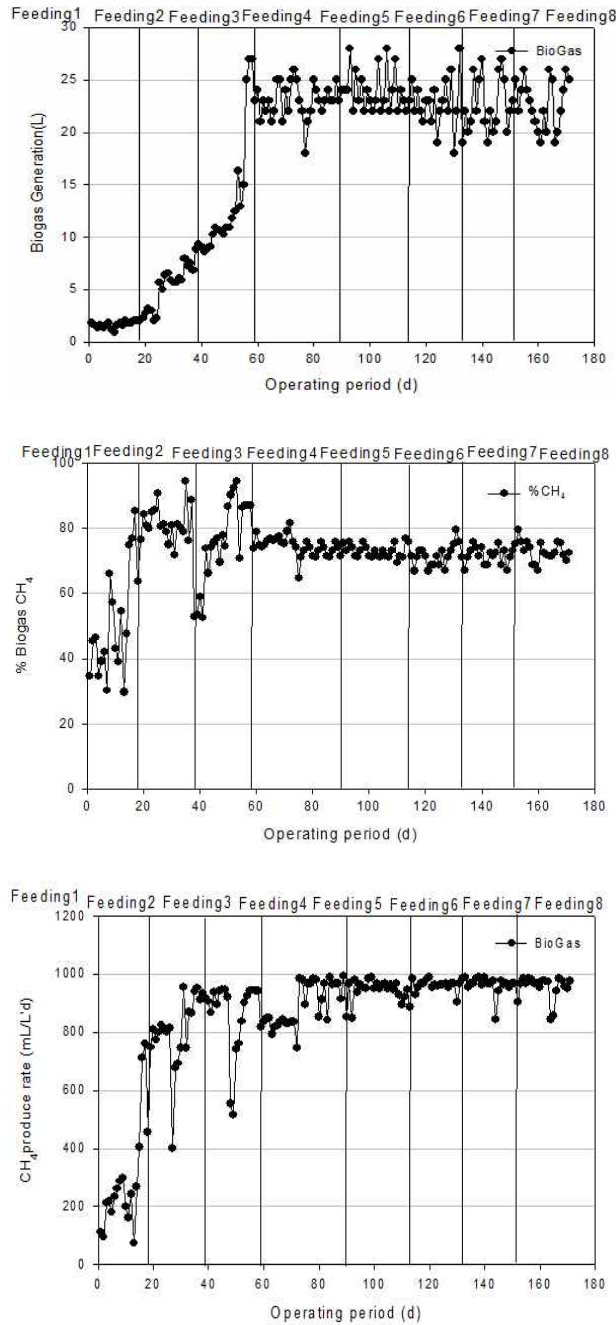


그림 67. Biogas발생량(위), % Biogas CH₄(중), CH₄ Produce rate(아래).

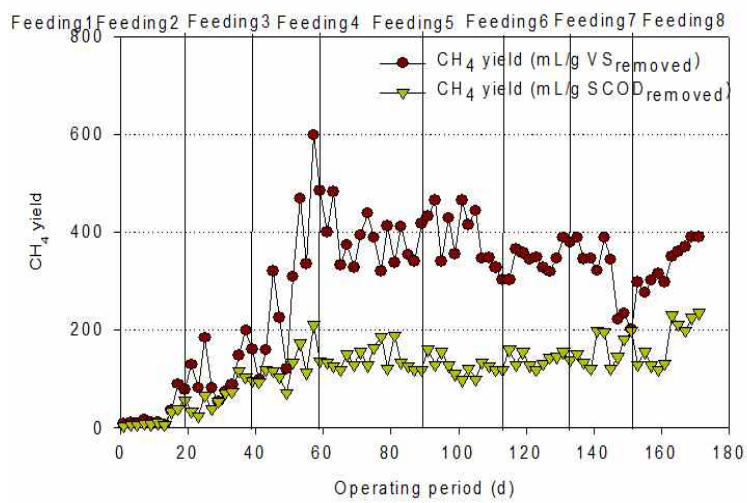
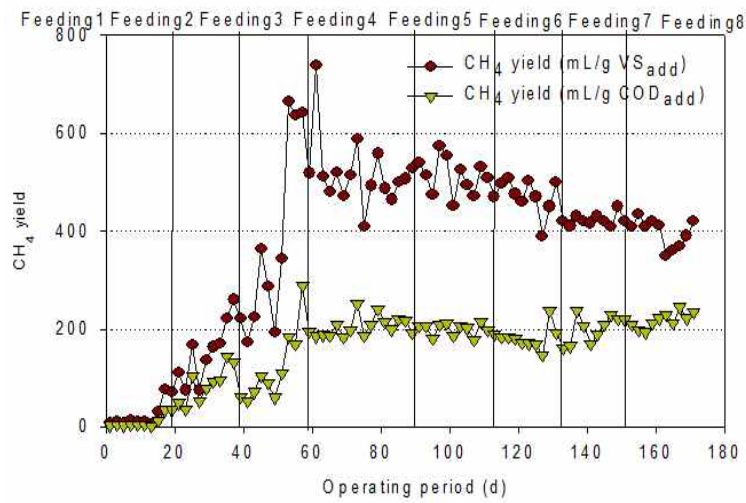


그림 68. Biogas performance of the anaerobic digestion of piggery waste.

표 30. Biogas CH₄ 산출량 문헌비교.

Parameter	Hansen et al. (1998)	Lei Jahng et al. (2011)	This study
CH ₄ production rate (ml/L·day)	1,100	1,000	988
CH ₄ yield (ml CH ₄ /g CODadd)	-	262	210
CH ₄ yield (ml CH ₄ /g VSadd)	362 ± 45	342 ± 73	400

마. 혐기소화슬러지 발생량 및 안정화도 평가

- (1) 각 반응조 간인 저장조와 소화조, 소화조와 침전조간의 유속은 1 L/d로 설정 하였고 소화조의 HRT는 20 day, 침전조의 HRT는 1 day로 37°C 중온소화로 진행하였음.
- (2) 저장조와 혐기소화조 침전조로 연속흐름으로 구성되어있고 혐기소화조 내에서 발생하는 biogas는 가스 수중 포집기에 의해 포집되어짐.
- (3) 다음 흐름도는 각 반응조의 성분들을 위 분석방법들을 이용하여 분석한 결과들의 평균을 표시하여 물질수지도를 작성하였고 이를 토대로 각 반응조와 전체 반응공정의 제거율 및 메탄 생성수율을 계산하여 최종적으로 혐기소화를 평가하였음(그림 69).

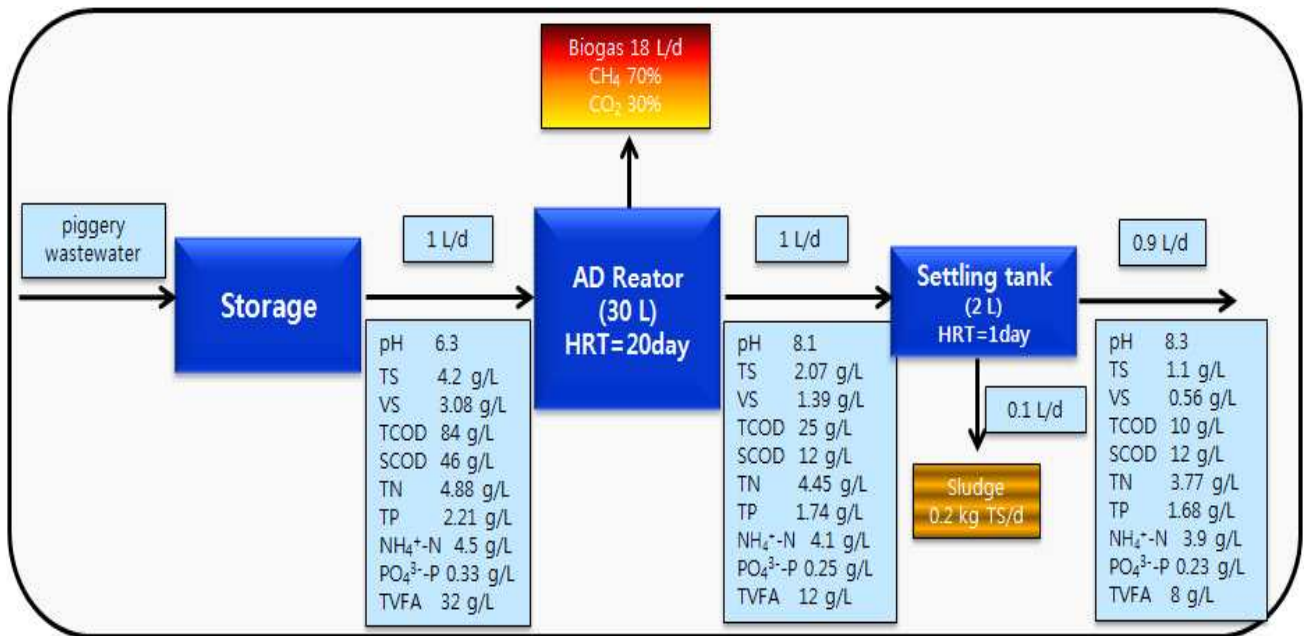


그림 69. 혐기소화조 구성도 및 물질의 흐름.

10. 암모니아 제거

가. 축산폐수의 악취의 주성분으로 알려지고 있는 암모니아는 그 농도가 120 ~ 4,500 mg/L로서 대부분의 경우에 혐기성 소화공정의 미생물에 저해작용을 하기에 충분하고 미세조류를 배양함에 있어 고농도가 아닌 적절한 농도를 요구함.

나. 탈기를 이용한 암모니아 제거기술 개발

- (1) 헨리의 법칙(그림 70)과 암모니아 자연분해 그림 70에 의해 암모니아를 제거 시키는 방법으로 이상기체 법칙 만약 기체가 전혀 없는 증류수가 담겨 있는 용기가 대기 중에 노출되어 있다면, 산소, 이산화탄소, 질소와 같은 기체 화합물들은 기체와 물의 결계를 가로질러 용액으로 유입됨.

$$P = K_c \cdot C$$

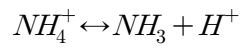
P : 가스의 부분압력

K_c : Henry상수

C : 기체의 molar농도

그림 70. Henry's law equilibrium

(2) 암모니아스트리핑 조작은 암모니아가 녹아있는 폐수에 공기를 불어넣으면 액체속의 암모니아가 대기 중으로 방출하게 되고 이때 폐수 중에서 유리 NH_3 와 NH_4^+ 는 수중에서 평형상태로 존재(그림 71)하며 평형의 이동은 폐수의 pH와 온도에 의해 결정되는데 수중의 암모니아 및 암모늄 이온 분포에 미치는 pH와 온도의 영향은 그림 72를 참고 하였음.



$$\frac{[NH_3]}{[TNH_3]} = 1 + \frac{10^{-pH}}{10 - (0.0918 + \frac{2729.92}{T(K)})}$$

그림 71. The ammonia dissociation

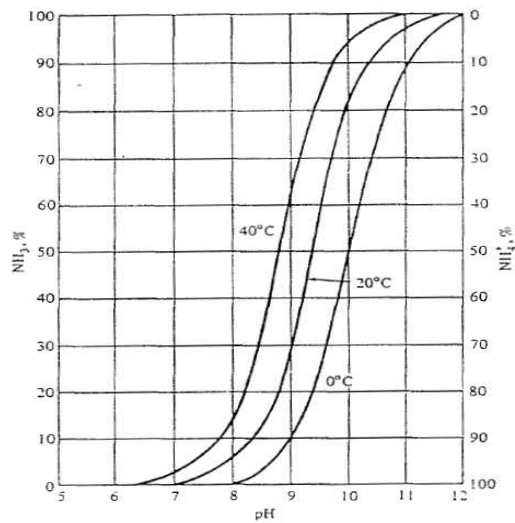


그림 72. Effect of pH and temperature on distribution of ammonium ion and ammonia on the water.

(3) 온도는 37°C, 공기주입량 1vvm, 1 L 반응조 5개에 가축분뇨 500 ml를 각각 채운 후, 40% NaOH용액을 주입하여 Control (원수pH), pH 7.2, pH 9, pH 10, pH 11의 반응기를 만들고 0 hr, 2.5 hr, 5 hr, 7.5 hr, 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr 동안 총 48 hr동안 측정하여 pH에 따른 암모니아성 질소 농도 감소효율을 비교 실험하였음(그림 73 및 표 31).

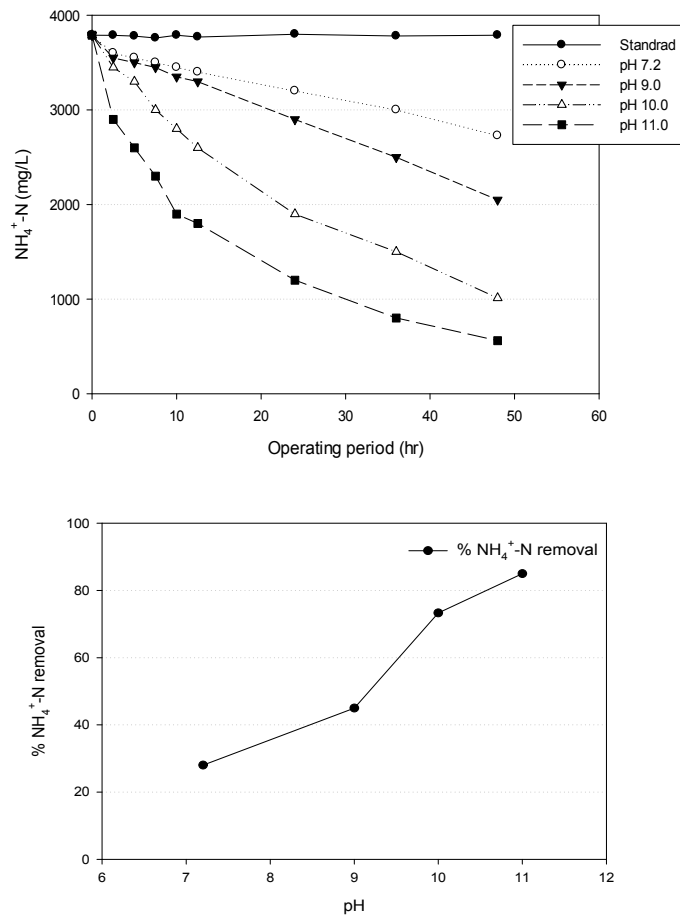


그림 73. 시간에 따른 암모니아 농도 변화(위), pH에 따른 암모니아 제거율(아래).

표 31. pH에 따른 암모니아성 질소 농도 변화를 위한 실험 조건.

Parameter	Temperature	pH	Aeration rate
Control	37°C	-	-
Sample1	37°C	7.2	1 LL ⁻¹ min ⁻¹
Sample2	37°C	9.0	1 LL ⁻¹ min ⁻¹
Sample3	37°C	10.0	1 LL ⁻¹ min ⁻¹
Sample4	37°C	11.0	1 LL ⁻¹ min ⁻¹

(4) 온도는 37°C, pH는 원수 pH (6.4), 1L반응조 5개에 가축분뇨 500 ml를 각각 채운 후, control은 공기를 주입하지 않고(No Air), 나머지는 1 vvm, 2 vvm, 4 vvm, 10 vvm의 반응기를 만들고 0 hr, 2.5 hr, 5 hr, 7.5 hr, 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr 동안 총 48 hr 동안 측정하여 공기주입량에 따른 암모니아성 질소 농도 감소효율을 비교 실험하였음 (그림 74 및 표 32).

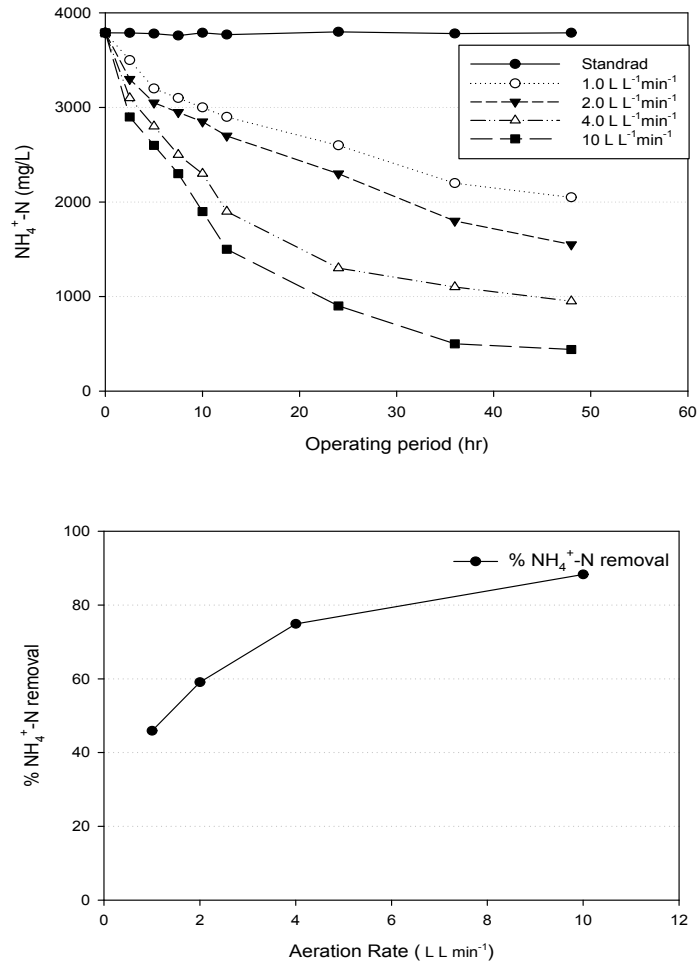


그림 74. 시간에 따른 암모니아 농도 변화(좌), 공기주입량에 따른 암모니아 제거율(우).

표 32. 공기주입량에 따른 암모니아성 질소 농도 변화를 위한 실험 조건.

Parameter	Temperature	pH	Aeration rate
Control	37°C	-	-
Sample1	37°C	9.0	1 $\text{LL}^{-1}\text{min}^{-1}$
Sample2	37°C	9.0	2 $\text{LL}^{-1}\text{min}^{-1}$
Sample3	37°C	9.0	4 $\text{LL}^{-1}\text{min}^{-1}$
Sample4	37°C	9.0	10 $\text{LL}^{-1}\text{min}^{-1}$

- (5) pH와 공기주입량에 따라 암모니아 스트리핑한 시료를 0.02N HCl용액을 이용하여 pH 7.7 ~ 7.8로 맞추고 160 ml vial에 시료 25 ml, 슬러지 25 ml씩을 추가·혼합하여 50 ml로 하여 질소 주입을 5 ~ 10분간 한 후 37°C, 120 rpm으로 맞춘 shaking incubator에서 2주일이상 혐기소화를 진행하고 발생하는 biogas는 GC-TCD를 이용하여 측정하였음(그림 75).

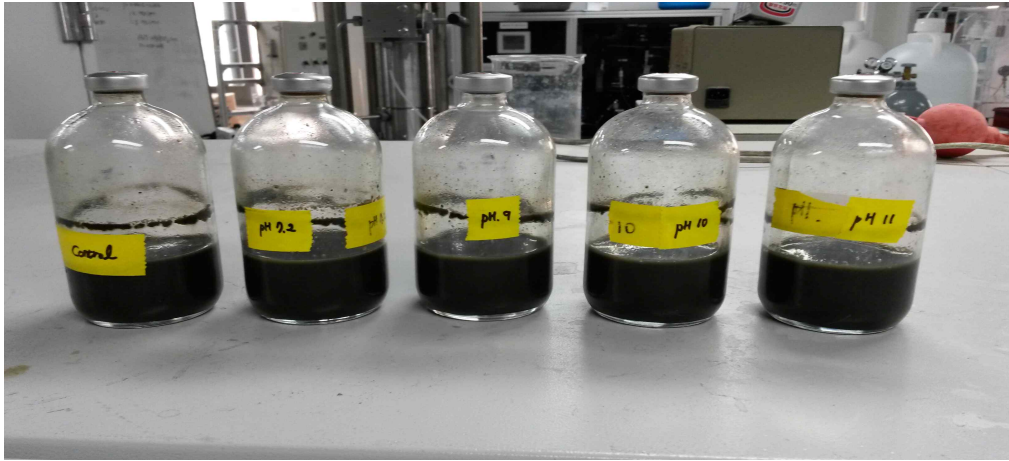


그림 75. pH와 공기주입량에 따라 암모니아 스트리핑한 시료와 슬러지 혼합 Vial.

(6) pH에 따른 암모니아성 질소 농도 감소효율을 비교 실험에서 혐기소화가 효율적으로 진행되고 있는지 확인하기 위해 biogas를 분석하였을 때 biogas 축척량이나 CH₄ production rate (mL/L·day), CH₄ yield (mL CH₄/g COD_{add}), CH₄ yield (mL CH₄/g VS_{add}) 항목들을 보면 pH 10.0과 pH 11.0이 같게 증가되다가 pH 10.0이 가장 높은 효율을 나타내었음(그림 76).

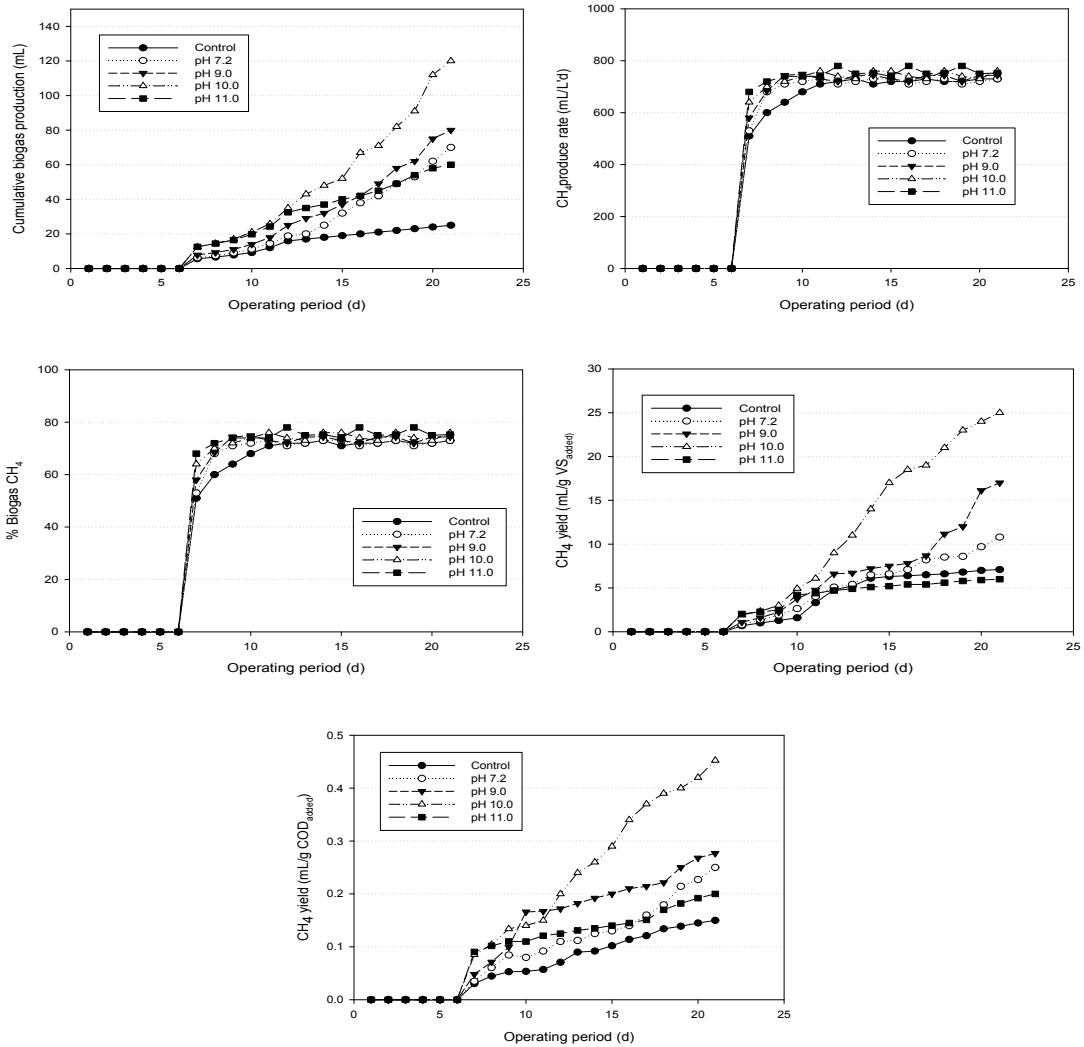


그림 76. pH에 따른 Vial 혐기소화 실험의 Biogas 분석.

(7) 공기주입량에 따른 암모니아성 질소 농도 감소효율을 비교 실험에서 혐기소화가 효율적으로 진행되고 있는지 확인하기 위해 Biogas를 분석하였을 때 Biogas 축적량이나 CH_4 production rate ($\text{mL/L}\cdot\text{day}$), CH_4 yield ($\text{mL CH}_4/\text{g COD}_{\text{add}}$), CH_4 yield ($\text{mL CH}_4/\text{g VS}_{\text{add}}$) 항목들을 보면 $4 \text{ LL}^{-1}\text{min}^{-1}$ 과 $10 \text{ LL}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이 같게 증가되다가 $10 \text{ LL}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이 가장 높은 효율을 나타내었음(그림 77).

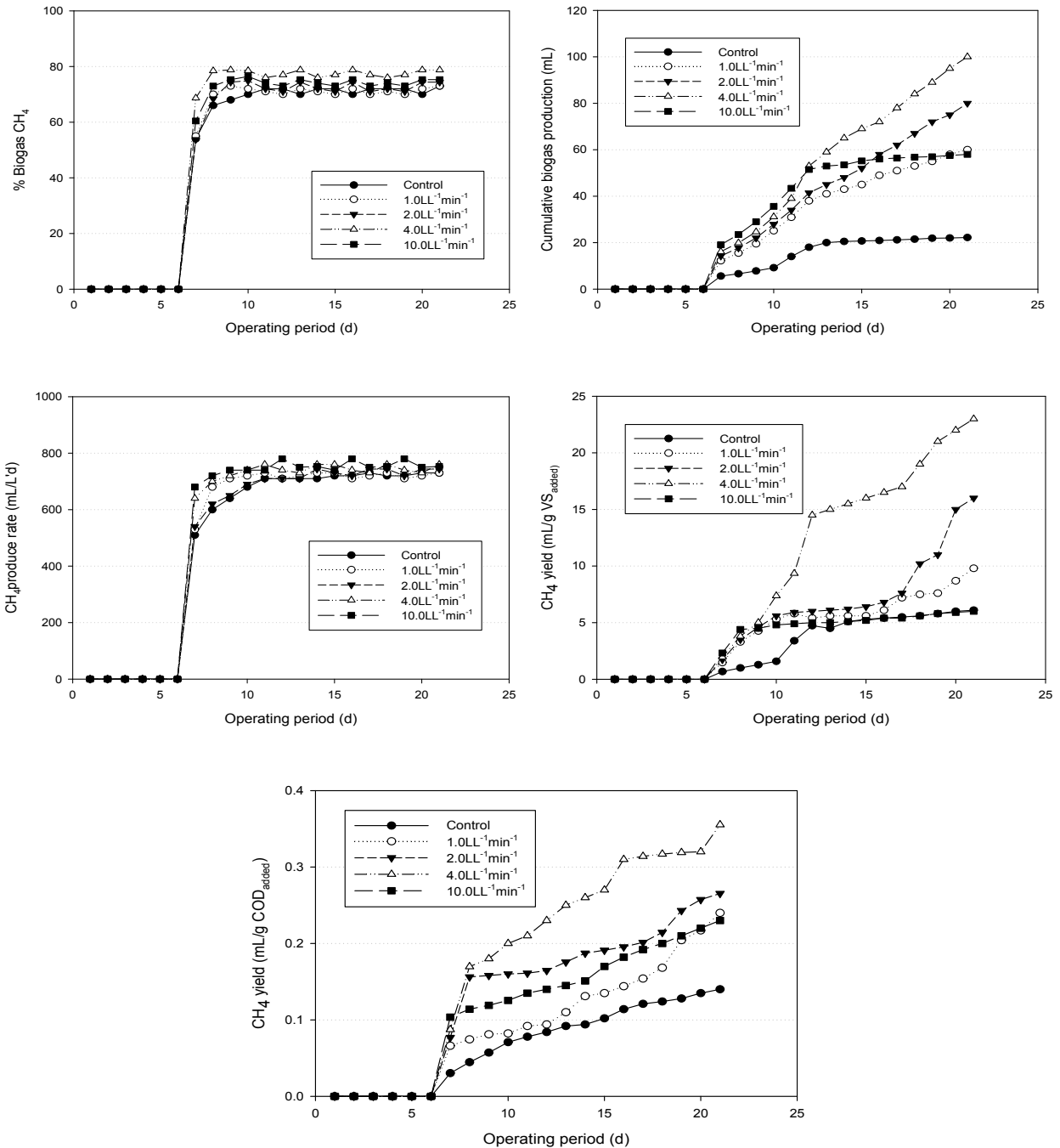


그림 77. 공기주입량에 따른 Vial 혐기소화 실험의 Biogas 분석.

다. 염소를 이용한 암모니아 제거기술 개발

- (1) 염소소독을 할 경우 파괴점 염소처리를 실시하는 이유는 파괴점 이하의 염소주입에서는 살균력이 약한 결합잔류염소가 주로 존재하므로 파괴점 이상까지 염소를 주입하여 결합잔류염소를 질소, 이산화질소가스로 분해하고 소독력이 강한 유리 잔류염소가 나타나도록 하기 위함임(그림 78 및 표 33).

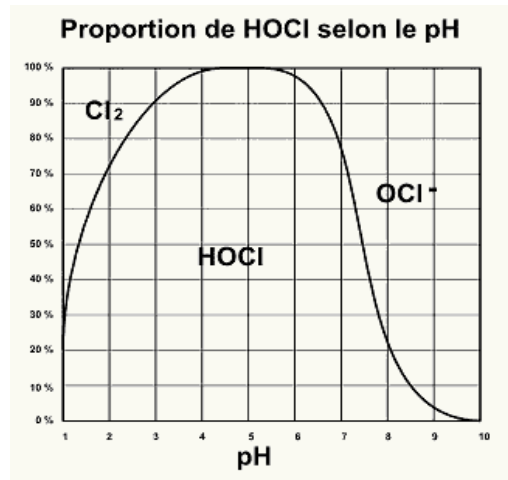
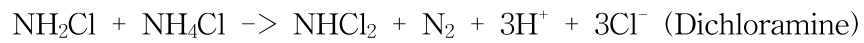
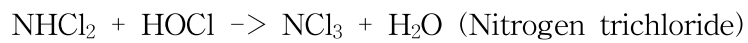
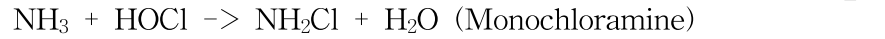
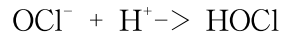
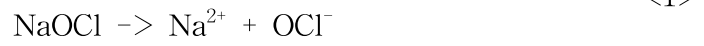


그림 78. 염소 주입 시 용액 내 pH에 따른 HOCl의 비.

표 33. 염소주입시 pH에 따른 염소형태.

pH	염소형태
0 ~ 2	Cl ₂
2 ~ 5	Cl ₂ , HOCl
4 ~ 5	HOCl
5 ~ 9	HOCl, OCl ⁻
9 ~	OCl ⁻

(2) 염소에 물을 용해시키면 물과 반응하여 차아염소산 (HOCl)이 발생하고 차아염소산이 암모니아, 아민류, 아미노산 등과 반응하여 클로라민을 생성함.



$$3 \text{ (35.34 g)} / 2 \text{ (14g)} = 3.80 \text{ g of Cl} / 1 \text{ g of NH}_3\text{-N} \quad \langle 4 \rangle$$

$$\text{Cl}_2 : \text{NH}_3\text{-N} = 7.6 : 1$$

(3) 온도는 24°C, 반응조 5개에 가축분뇨 500 mL를 각각 채운 후, 40% NaOH용액을 주입하여 pH를 7.5로 조정, NaOCl용액을 주입하여 염소와 암모니아의 비를 1배, 5배, 10배, 15배, 20배로 설정하고 0.5 hr, 1 hr, 1.5 hr, 2.0 hr, 4 hr동안 총 4 hr동안 측정하여 염소와 암모니아 비에 따른 제거율 비교 실험하였음(그림 79 및 표 34).

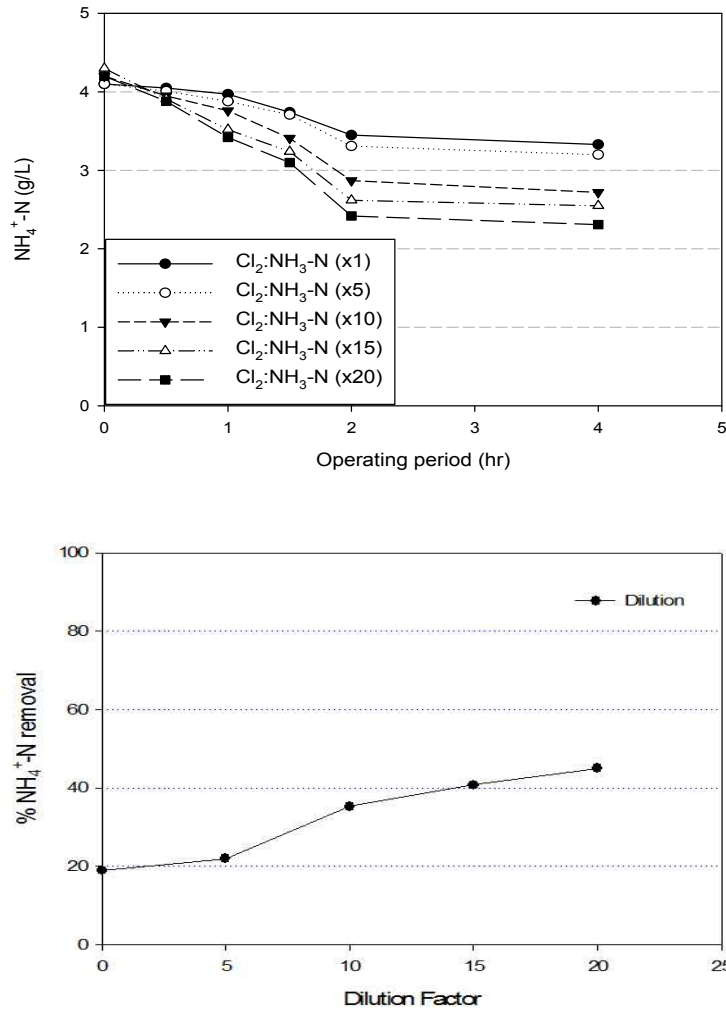


그림 79. 시간에 따른 암모니아농도 변화(위), 염소비에 따른 암모니아 제거율(아래).

표 34. 염소와 암모니아 비에 따른 제거율 비교 실험 조건.

Parameter	Temperature	Cl ₂ : NH ₃ -N ratio
Control	24°C	1
Sample1	24°C	5
Sample2	24°C	10
Sample3	24°C	15
Sample4	24°C	20

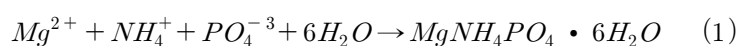
- (4) 염소와 암모니아 비는 일반적 이론으로 7.6 : 1이나 염소가 암모니아 이외에도 염소를 소비하는 NO_2^- , Fe^{2+} , Mn^{2+} 과 무기물, 불포화 탄화수소 등 다양한 물질의 존재로 인해 이론상 필요량보다 더 과량 필요함으로 이번실험에는 비를 1배, 5배, 10배, 15배, 20배로 설정하였음.
- (5) 염소와 암모니아의 비가 20배인 경우 암모니아제거율이 45%가장 높았으나 COD와 같은 유기물의 제거율 또한 높음으로 암모니아뿐만 아니라 유기물을 제거하는데 대부분 염소를 소비하였음(표 35).

표 35. 염소와 암모니아 비에 따른 제거율.

Parameter	chlorine	chlorine	chlorine	chlorine	chlorine
	dosage (×1)	dosage (×5)	dosage (×10)	dosage (×15)	dosage (×20)
	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)
TCOD (g/L)	7.19	26.92	50.06	56.07	77.91
SCOD (g/L)	5.25	11.89	32.58	47.42	60.09
TN (g/L)	24.14	26.32	29.31	31.58	33.33
TP (g/L)	16.00	20.40	22.08	23.48	28.75
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (g/L)	18.78	21.95	35.24	40.70	45.00
PO_4^{3-}P (g/L)	7.73	8.18	8.57	9.52	10.00
VFA (g/L)	5.29	22.99	65.90	24.12	31.89

라. Struvite 형성을 통한 암모니아 제거기술 개발

- (1) Struvite는 magnesium ammonium phosphate hexahydrate ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MAP)로서 백색의 결정 분말형태이며 상황에 따라 큰 단일 결정, 미세한 결정, curds 나 gelatin 형태의 모습을 띄고 비중은 1.7이며 산성에서는 가용성이나 알칼리 pH에서는 매우 불용성임.
- (2) Struvite는 수중에서 다음의 (1) 반응에 의해 형성되며, $[\text{Mg}^{2+}]$, $[\text{NH}_4^+]$, $[\text{PO}_4^{3-}]$ 농도의 곱이 struvite의 용해도적 (K_{sp})보다 크면 침전하기 시작하며, 폐수의 포화인덱스 (saturation index, SI)를 식(2)를 이용하여 계산했을 때 SI 값이 양이면 struvite가 형성될 수 있음을, 0이면 평형상태로서 struvite가 침전되거나 용해되지 않으며, 음이면 struvite가 형성될 수 없음을 나타냄(Merryl, 1994).



$$SI = \log_{10} \left(\frac{[\text{Mg}^{2+}][\text{NH}_4^+][\text{PO}_4^{3-}]}{K_{sp}} \right) \quad (2)$$

- (3) 또한 struvite 형성반응에서 pH가 상승하면 ortho-P의 농도가 올라가는 반면 Mg^{2+} 와 NH_4^+ 의 농도는 낮아지므로 struvite 형성에 최적인 pH가 존재하게 되는 바, 최적 pH는 대개 pH 7 ~ 11이고 struvite의 용해는 pH 9.0 근처에서 최소이므로 대략 struvite 형성 반응의 최적 pH는 pH 9.0 근처임.
- (4) Struvite 생산 공정의 경제성은 ① magnesium source의 구입 가격, ② struvite의 판매 가격, ③ 소화액의 ortho-P의 농도, ④ ortho-P의 제거율 등에 의해 결정되며 일반적으로 magnesium source ($MgCl_2$, $Mg(OH)_2$ 등)의 구입 가격이 경제성에 가장 큰 영향을 미치므로 순수 magnesium 화합물외의 저렴한 magnesium 공급원이 이용 가능하다면 매우 바람직하고, 부가적으로 생산된 struvite를 농업용 비료 등으로 판매하기 위해서는 struvite에 유해 물질 (중금속 등)이 함유되지 않아야 함.
- (5) Struvite의 형성을 위해서 사용하는 반응기로는 그림 80과 같은 유동상 반응기가 흔히 사용됨.

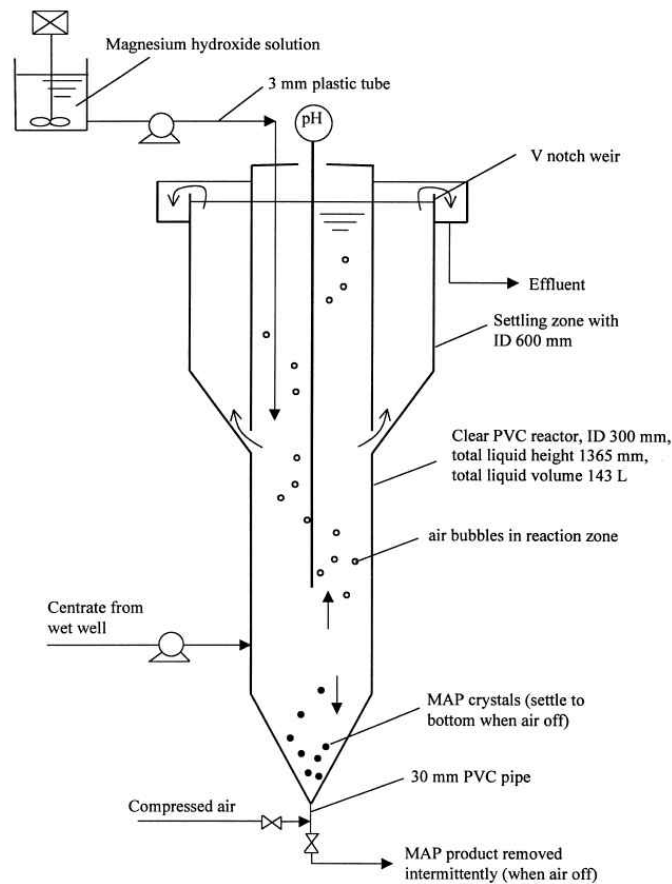


그림 80. Struvite 형성반응을 위한 유동상 반응기(Munch와 Barr, 2001).

- (6) 그러나 struvite 형성을 통한 암모니아제거는 초기 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도가 지나치게 높고 struvite 형성에 필요한 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 의 농도도 낮으며 과량의 Mg^{2+} 이 필요로 하게 됨에 따라 암모니아제거 효율이 지나치게 낮을 것으로 예상됨.
- (7) Struvite 형성 문헌에서 많이 사용되고 있는 visual minteq 3.1이라는 프로그램을 이용하여 가축분뇨의 성상을 넣고 struvite 형성되는 양을 계산하여 암모니아 제거 효율 계산하였음(그림 81 및 표 36).

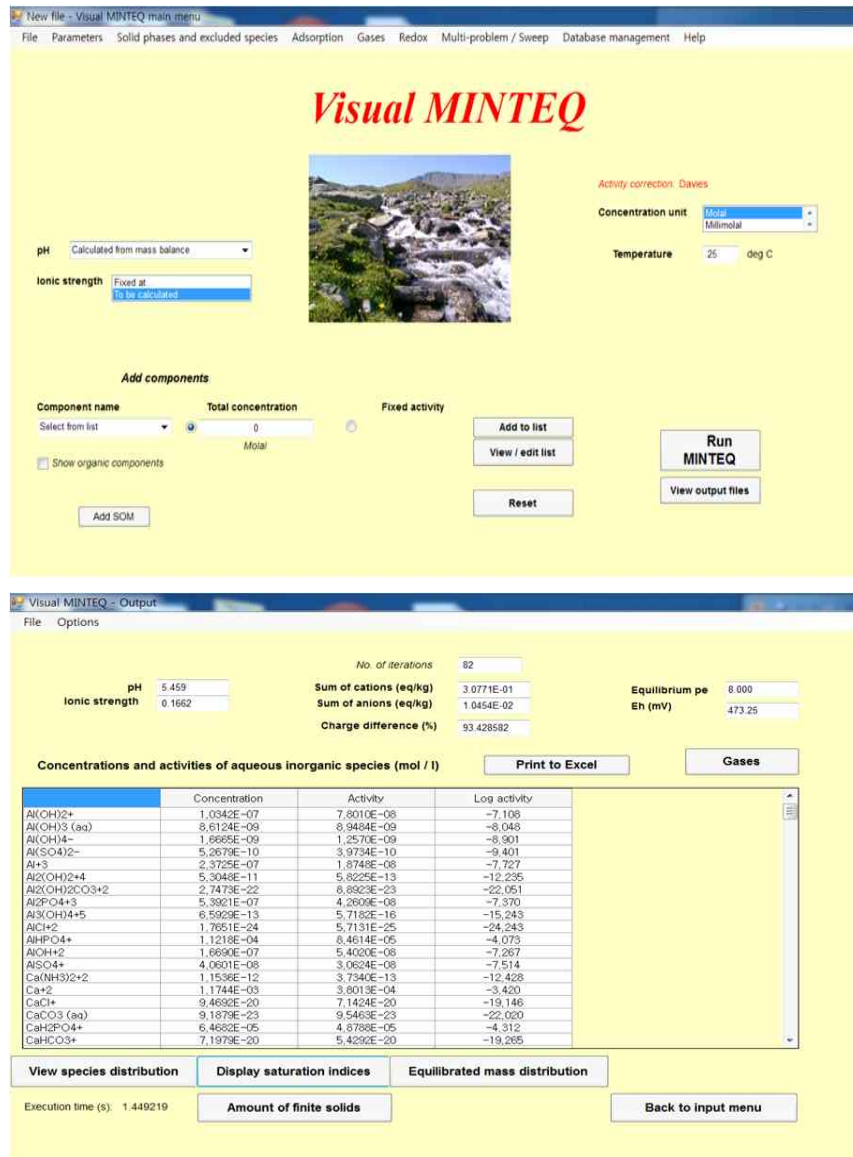


그림 81. Visual MINTEQ 실행 전 조건화면(위), 실행 후 결과화면(아래).

표 36. 염소와 암모니아 비에 따른 제거율 비교 실험 조건.

Visual MINTEQ 3.1 특징	
조건화면	결과화면
<ul style="list-style-type: none"> · Speciation, solubility equilibria, sorption의 equilibrium 모델 계산 · pH, Ionic strength, 온도, 농도 입력 · 제공하는 무기물질 152종, 유기물질 51종 제공 · 침전가능 물질 720개 제공 	<ul style="list-style-type: none"> · 변화한 pH, Gas의 부분압 · 각 speciation의 농도, activity · 녹아 있는 물질의 분배도 · 침전물질의 saturation index, 침전물질의 양 · 각 물질의 침전된 양과 녹아 있는 양 · 엑셀로 출력 가능

(7) Visual MINTEQ 프로그램을 이용하여 암모니아제거를 위한 가축분뇨의 Struvite 형성은 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 가 아닌 NH_4^+ , PO_4^{3-} 의 몰비로 이루어지기 때문에 NH_4^+ , PO_4^{3-} 로 계산하여 실험을 진행하였고 Mg^{2+} 의 양은 몰비로 최대 효율에 해당하는 PO_4^{3-} 의 1.2배 양을 주입 하였고 Mg^{2+} 을 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 양으로 환산할 경우 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 양은 2875.33 mg/L에 해당되며 모든 결과는 NH_4^+ , PO_4^{3-} 농도로 일관적으로 표시하였음(표 37).

표 37. Visual MINTEQ 가동 결과.

구분 (mg/L)	유입된 양	용존된 양	침전된 양
PO_4^{3-}	1120	272.72	847.28
NH_4^+	4680	4519.06	160.95
Mg_2^+	343.91	127.01	216.9

- (8) Struvite 침전을 통한 암모니아 제거율은 3.5%밖에 나오지 않았으며 초기 암모니아 농도가 높고 struvite가 형성되는 암모니아 분자의 분자량이 낮고 인의 량도 부족하며 추가적으로 Mg^{2+} 의 양을 넣어 줄 경우 경제적으로 고려해야 되기 때문에 암모니아 제거 방법에 있어서 비효율적인 방법임(표 38).

표 38. Visual MINTEQ을 이용한 Struvite 침전을 통한 암모니아 제거.

구분(%)	Struvite 침전에 의한 제거율
PO_4^{3-} 제거율	75.6%
NH_4^+ 제거율	3.5%
Mg_2^+ 제거율	63.06%

마. 3가지 방법의 비교를 통한 최적방법의 선정

- (1) 암모니아스트리핑의 경우 pH 10에서의 암모니아 제거율이 76%이었음.
- (2) 염소파괴점 주입의 경우 염소와 암모니아의 주입비를 20 : 1로 한 경우 암모니아 제거율이 45%이었음.
- (3) Struvite 형성의 경우 Mg^{2+} 이 PO_4^{3-} 의 1.2배 주입한 경우 암모니아 제거율은 3.5%이었음.
- (4) 암모니아 제거방법에서는 암모니아스트리핑의 제거율이 염소파괴점 주입보다 2배 이상 높으며 염소파괴점 주입 시 염소가 암모니아만을 제거하는데 사용되는 것이 아니라 대부분 유기물을 제거하는데 사용됨으로 암모니아스트리핑이 더 적절함.
- (5) 또한 struvite 침전을 통한 암모니아 제거율은 3.5%밖에 나오지 않았으며 초기 암모니아 농도가 높고 struvite가 형성되는 암모니아 분자의 분자량이 낮고 인의 량도 부족하며 추가적으로 Mg^{2+} 의 양을 넣어 줄 경우 경제적으로 고려해야 되기 때문에 암모니아스트리핑이 더 적절함.

12. 염소, 오존, UV 등을 이용한 색도제거 기술 개발

가. 오존을 이용한 색도제거기술 개발

- (1) 오존의 분해 메커니즘으로 오존은 공기 중 산소, 혹은 순 산소를 이용하여 가스 상태로 발생시키는데 오존을 수 처리에 응용할 경우 액상에 용해시켜 사용지만 액체상태에서 잔류오존은 매우 불안정하여 짧은 시간에 분해되어 20℃에서 반감기는 20 ~ 30 min 정도임.
- (2) 오존의 분해속도는 pH에 크게 영향을 받는데 이것은 수산화기 (OH^-)에 의하여 오존이 스스로 분해될 수 있는 특성 (self-decomposition)을 가지고 있기 때문이고 오존은 산성에서는 비교적 안정하지만 염기성으로 갈수록 분해속도가 빨라지게 됨. 이는 오염물질이 없는 수용액 상태에서도 수산화기에 의하여 분해가 되기 시작하는데 중간 생성물질로 과산화수소 radical ($HO_2 \cdot$)과 초과산화물 radical ($O_2 \cdot$)을 형성하며, 이들은 다시 오존 분자와 반응하여 오조나이드 radical ($O_3 \cdot$)의 중간경로를 거쳐 OH radical ($OH \cdot$)을 생성함.

- (3) 그림 82에 나타난 바와 같이 오존은 수산화기 외에 자연수에 함유되어 있는 각종 무기 금속이 은이나 유기물에 의해서도 분해가 시작되며, 순환반응을 거쳐 여러 라디칼을 생성함. 그 중 대표적인 것이 OH radical로써 중산물질로 생성된 OH radical은 오존 자체보다 높은 산화전위를 가지며 (2.80 volt), 거의 모든 유기물과 매우 빠른 속도로 고르게 반응하는 특징을 가지고 있음.
- (4) 오존산화 시 유기물이 제거될 수 있는 경로는 그림 83에서 나타낸 바와 같이 오존분자에 의하여 직접적으로 제거될 수 있는 직접경로 (Direct reaction pathway)와 OH radical에 의하여 분해되는 간접경로 (indirect reaction pathway)로 구분되어짐. 오존을 수 처리에 응용 할 경우 처리 수에 오존분자와 반응성이 강한 물질이 많이 존재한다면 직접경로에 진행될 수 있도록 하고, 오염물질과 오존의 반응이 상대적으로 느릴 경우 간접경로의 특성을 살려 OH radical의 생성을 증가시킬 수 있도록 조건을 조성하는 것이 효율적임.

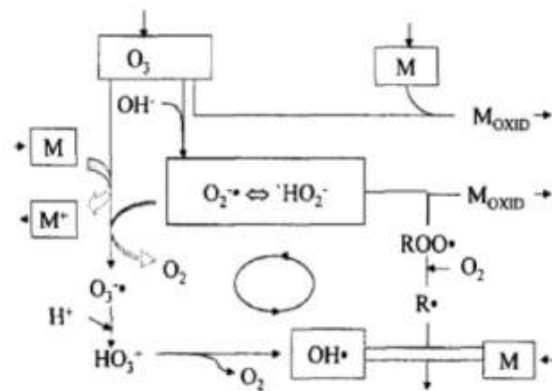


그림 82. 오존의 분해경로.

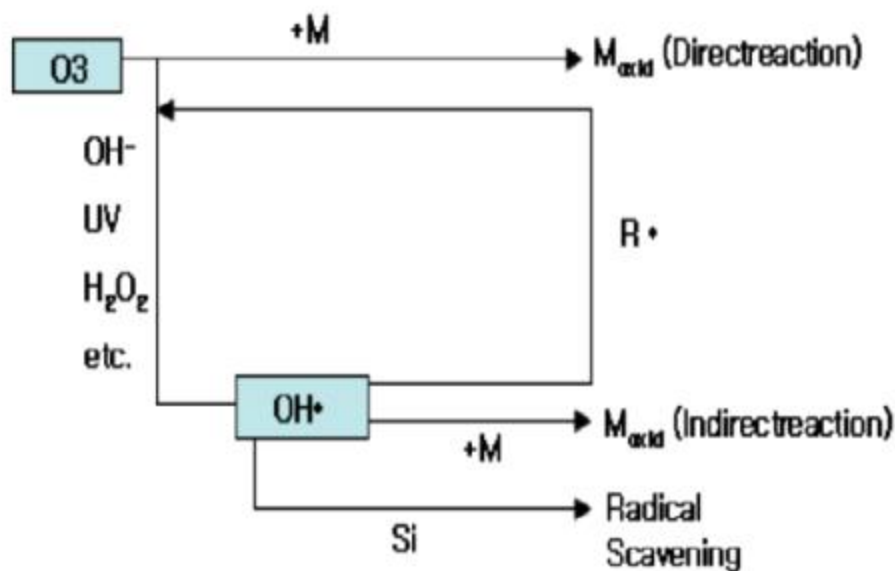
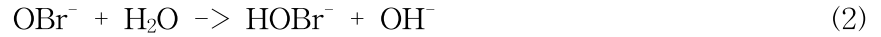
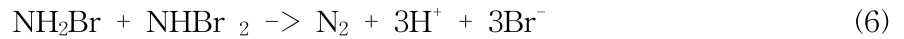
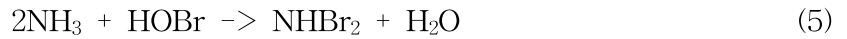


그림 83. 오존에 의한 유기물 분해경로.

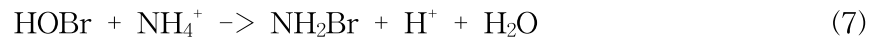
- (5) 오존 유기물, 색도뿐만 아니라 암모니아도 제거 할 수가 있는데 수중에 Br⁻ 존재하는 경우 오존은 식(1), (2)와 같이 반응을 진행함.



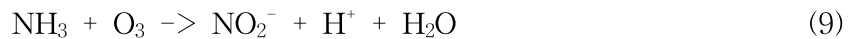
따라서 수중에 오존은 식(3), (4)를 거쳐 식(5), (6)과 같이 탈질반응이 일어나 암모니아가 질소로 제거가 진행됨.



식(7), (8)은 Br⁻의 영향에 의한 질산화반응으로 암모니아가 제거되는 식임.



식(9), (10)은 Br⁻의 영향이 아닌 오존 자체 내에 질산화반응에 의하여 암모니아가 제거되는 반응임.



따라서 브롬이온 (Br⁻)이 존재하에 암모니아성 질소와 브롬이온 (Br⁻)은 질산화와 탈질 반응을 일으키고 오존에 의한 직접적인 질산화반응에 또한 일어나 암모니아성 질소도 제거가 진행됨.

- (6) 실험 조건의 경우 오존발생기 LAB-S (오존텍, 한국)를 이용하여 혐기소화액에 산소대비 100 ppm으로 주입하였음. 반응조 (ID 10 cm × H 20 cm)에 혐기소화액 500 ml를 채운 후 오존을 주입하였음. 이때 실 오존 주입량은 6.6 g/h로, 온도는 24℃, pH는 8.0 ~ 8.5로 유지하였음.
- (7) 색도는 74.4%로 제거되었고 유기물은 33.7% 제거되었음. 특이점은 TN과 암모니아성 질소의 제거되는 현상이 나타났음(그림 84 및 표 39). 이는 오존자체내의 질산화반응과 Br⁻의 영향으로 탈질반응이 일어나 제거되어진 것으로 판단되어짐. 이를 바탕으로 미세조류성장에 저해가 되는 암모니아성질소와 색도를 한 과정을 통해 동시에 제거 할

수 있다는 가능성을 제시해 주었음. 또한 염소처리와는 달리 잔류오존은 매우 불안정하여 짧은 시간 (20 ~ 30min)내에 분해되어 추가적인 잔류오존 제거과정이 필요하지 않는 장점을 가지고 있음.

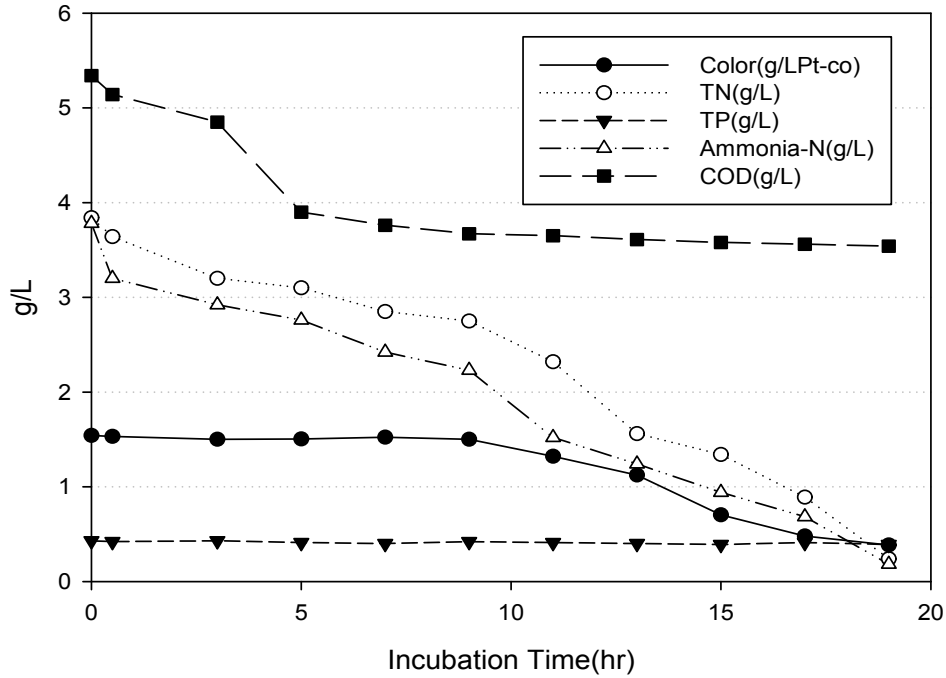


그림 84. 오존주입에 의한 혐기소화액의 성상 변화.

표 39. 오존주입에 의한 암모니아성 질소 및 색도 제거율.

Parameter	SCOD	TN	TP	NH ₄ ⁺ -N	Color
	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)
ozonation	33.7%	85%	9.3%	82%	74.4%

나. NaOCl을 이용한 색도제거기술 개발

- (1) 두 번째 색도제거 방법인 염소주입을 이용한 색도 제거를 진행하였음. 염소는 기체상태 (Cl₂) 또는 고체 (Ca(OCl)₂, NaOCl)의 이온 생성물 상태로 물속에 주입된다. NaOCl의 물에서 반응은 식(1)과 같음.

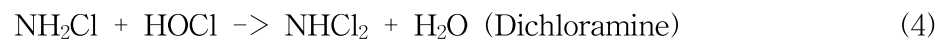


차아염소산과 차아염소산염 이온은 식(2)와 같은 관계가 있으며 온도에 의하여 지배받음.



HOCl과 OCl⁻의 합을 유리 잔류염소라 하며, 주요 살균제 역할을 함.

- (2) 저 농도에서 염소는 미생물의 세포 속으로 침투하여 미생물을 죽이며, 효소 및 원형질과 반응을 진행함. 비교적 높은 농도에서는 세포벽의 산화로 미생물이 파괴가 됨. 공정에 영향을 미치는 인자들은 염소의 형태, pH, 농도, 접촉시간, 미생물 형태, 온도 등이 있음. 차아염소산이 차아염소산염 이온보다 거의 2배정도 살균력이 큼. 강력한 산화제인 염소는 환원상태에 있는 거의 모든 물질들과 반응함. 반응하는 물질들은 보통 Fe²⁺, Mn²⁺, H₂S, NH₃ 및 유기물 등이 존재함. 이러한 산화될 수 있는 물질들은 염소가 살균제로 작용하기 전에 미리 염소를 소비해 버림. 이와 같이 소비된 염소량은 실험적으로 구해야하며, 이는 물속에 함유된 산화될 수 있는 물질의 성질과 양을 정확히 알기 어려움.
- (3) 수중에 암모니아성 질소가 존재하는 경우 차아염소산염 이온이나 차아염소산과 반응하여 식 (3) (4), (5), (6)과 같이 중간생성물을 생성함.

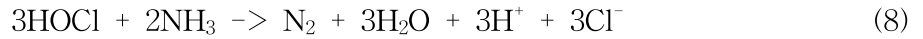


이러한 반응은 pH, 온도, 염소투입 농도 대 암모니아성질소 농도의 비에 따라 좌우됨. 식(7)과 같이 계산하면 암모니아성 질소 1 ml/L에 대해 염소투입농도는 7.6 ml/L를 투입하면 암모니아성 질소가 제거됨. 염소는 산화제로서 물속의 유기물량이나 환원성 물질의 포함정도에 따라 그 비율이 크게 달라 질 수 있음.

$$3 \text{ (35.34 g)} / 2 \text{ (14 g)} = 3.80 \text{ g of Cl} / 1 \text{ g of NH}_3\text{-N} \quad (7)$$

$$\text{Cl}_2 : \text{NH}_3\text{-N} = 7.6 : 1$$

일정량의 염소를 주입 할 때까지는 결합잔류염소는 반대로 감소하여 거의 0으로 저하하면서 암모니아성 질소가 식 (8)과 같이 질소가스 (N₂)로 변해 공기 중으로 비산되어 제거됨.



이 점을 지나서 계속 염소를 주입하면 주입량에 비례하여 유리잔류 염소량이 증가하는데 유리잔류 염소량과 파괴점과의 곡선에서 유리잔류 염소가 나타나기 시작하는 점을 파괴점 혹은 불연속점 이라고 함.

- (4) Chlorination의 조건은 다음과 같이 실험을 진행하였음. 온도는 24°C, pH 7.5, 주입용액으로는 NaOCl을 사용하였음. NaOCl 용액을 통해 염소와 혐기소화액 비를 10 : 1로 주어 주입하였음. 색도의 경우 1500 mg Pt-Co/L에서 615 mg Pt-Co/L까지 65%가 제거되었음. 그러나 염소의 경우 색도뿐만 아니라 유기물과 질소 등 다른 성분들이 대부분 제거되었음. 특히 유기물의 제거율은 63.4%로 색도와 거의 비슷한 제거율을 나타냈음 (그림 85 및 표 40). 또한 염소주입으로 인하여 잔류염소가 발생되었음. 이 발생한 잔류염소가 미세조류에 미치는 영향을 파악하고 성장의 저해가 된다면 제거 과정이 추가적으로 필요함.

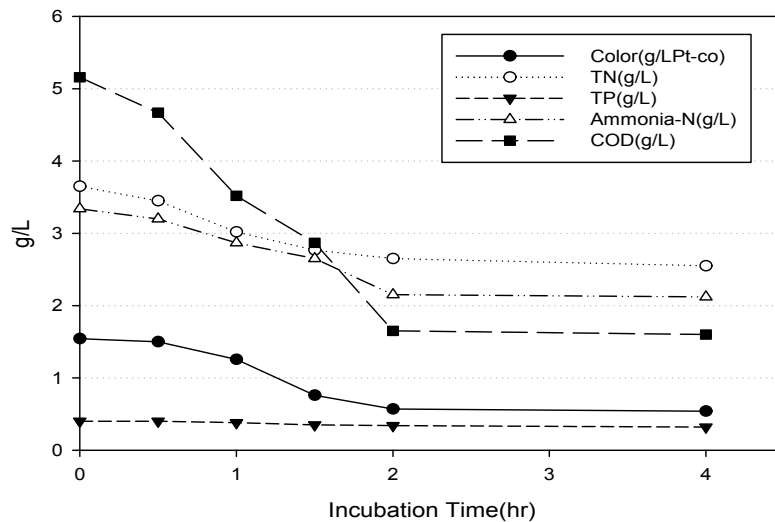


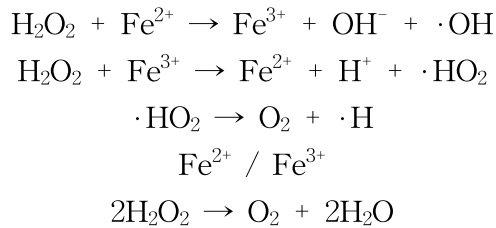
그림 85. 염소주입에 의한 혐기소화액의 성분 제거.

표 40. 염소주입에 의한 색도 및 유기물 제거율.

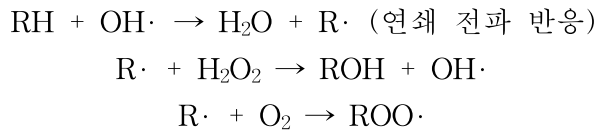
Parameter	SCOD	TN	TP	NH ₄ ⁺ -N	Color
	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)	Removal (%)
Breakpoint chlorination	63.4	29.5	19.5	37	65

다. Fenton산화법인 H₂O₂를 이용한 색도제거기술 개발

- (1) 펜톤산화 공정은 과산화수소 (H₂O₂)와 2가 철염 (Fe²⁺)의 펜톤시약 (Fenton's reagent)을 사용하여 반응 중 생성되는 OH radical (OH·)의 산화력으로 산업폐수나 오염토양 중의 오염물질을 처리하는 기술로 펜톤시약은 1894년 영국의 화학자 Fenton에 의해서 처음으로 발견되었고 펜톤산화에 대한 반응 메카니즘은 Haber and Weiss (1934)에 의하여 제안되었으며, 그 후 Barb et al. (1951)은 이를 수정하여 완성시킴. 펜톤산화 반응은 유기물이 존재하지 않을 때에는 Haber-Weiss cycle이라 불리는 연쇄반응을 일으키며 이는 다음과 같음(그림 86).



- (2) 폐수 중에 유기물 (RH)이 존재하여 OH radical과 반응할 경우 다음 식에서 보는 바와 같이 유기물 radical이 생성되어 연쇄반응이 일어남.



- (3) 펜톤산화 반응에 의해 유기물이 산화 분해될 때 철 이온은 Fe²⁺와 Fe³⁺ 사이를 순환하고 촉매 기능을 가진 Fe²⁺는 과산화수소에 의해 Fe³⁺로 산화되면서 OH radical을 생성시키고 이렇게 생성된 OH radical은 유기물에 전파되어 유기물 radical (R·)을 만들며 이 유기물 radical은 Fe³⁺을 다시 Fe²⁺로 환원시키면서 자신은 결국 산화 분해됨(그림 87).
- (4) 그러나 유기물 radical에 의해 Fe³⁺이 Fe²⁺로 환원되지 않는다면 Fe³⁺의 농도가 높아져 Fe²⁺를 추가적으로 공급하지 않을 경우 산화 반응이 중단되고 이는 유기물이 전파 반응에 효율적인 것이라면 적은 양의 촉매가 사용되지만 그렇지 않을 경우에는 많은 양의 촉매가 필요함을 의미함.

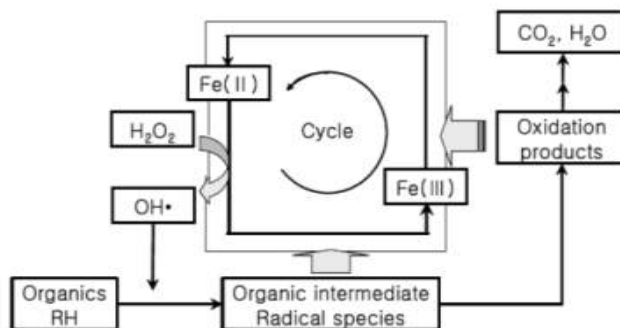


그림 86. 펜톤산화 반응 메커니즘.

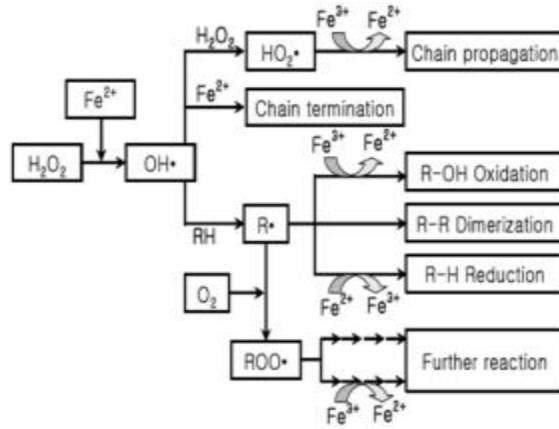


그림 87. 펜톤산화에 의해 생성된 OH radical의 유기물 분해 및 중간생성물과의 반응 경로

(5) 온도는 24°C, pH 3 ~ 3.5, pH주입용액으로는 H₂SO₄ (1 + 2)용액을 사용하였다. H₂O₂ 30 ~ 35%을 사용하였고 Fe²⁺은 FeSO₄ · 7H₂O시약을 주입하였다. H₂O₂와 Fe²⁺ 비를 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 2 로 주어 주입하였음. 색도의 경우 주입비율이 1 : 1일 때 가장 높은 제거율을 나타냈으며 이때의 색도의 농도는 2,832 mg Pt-Co/L에서 1,042 mg Pt-Co/L 까지 63.6%가 제거되었음(그림 88 및 표 41). 그러나 색도뿐만 아니라 유기물과 같은 다른 성분들이 대부분 제거되었음. 특히 유기물의 제거율은 55.4%로 색도와 거의 비슷한 제거율을 나타냄(그림 89 및 표 42).

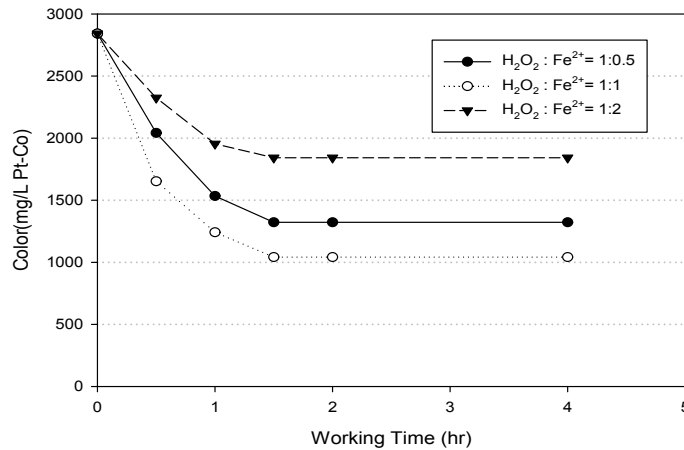


그림 88. 펜톤산화법 주입비에 의한 색도 제거율.

표 41. 펜톤산화법 주입비에 의한 색도 제거율.

Parameter	H ₂ O ₂ : Fe ²⁺ = 1 : 0.5	H ₂ O ₂ : Fe ²⁺ = 1 : 1	H ₂ O ₂ : Fe ²⁺ = 1 : 2
	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)
Color Removal	53.4	63.6	34.6

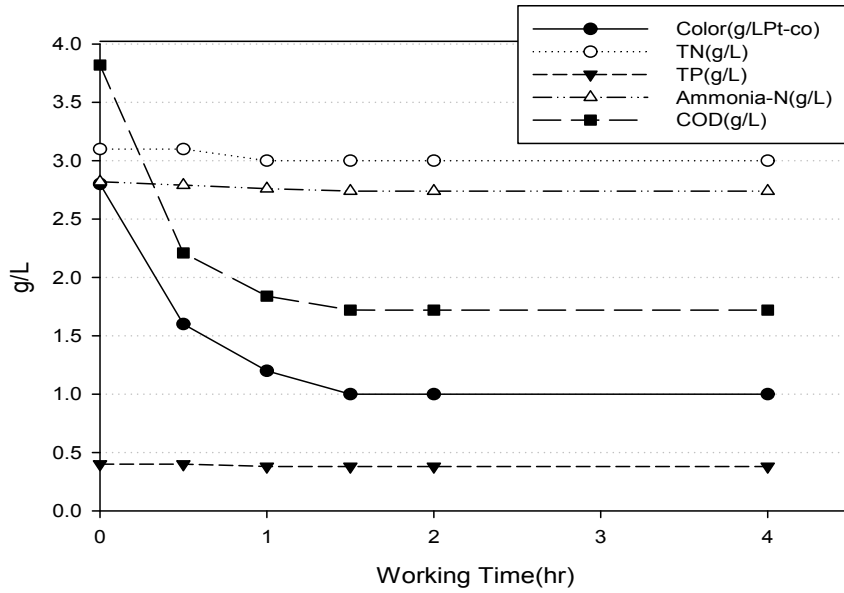


그림 89. $H_2O_2 : Fe^{2+} = 1 : 1$ 일때의 성분 제거.

표 42 $H_2O_2 : Fe^{2+} = 1 : 1$ 일때의 성분 제거율.

Parameter	SCOD	TN	TP	NH_4^+-N	Color
	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)	Removal(%)
Fenton method	55.4	3.3	5.1	2.8	63.6

라. 색도가 미세조류 성장에 미치는 영향과약

- (1) 색도가 미세조류 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였음. 색도제거 방법 중 염소처리로 할 경우 잔류염소가 발생하여 영향을 주기 때문에 오존을 통하여 색도와 암모니아를 제거한 험기소화액을 사용하였음.
- (2) 험기소화원액과 10배, 20배 희석한 액에 오존 처리 후 미세조류 배양을 실시하였음. 그 결과 그림 90과 같이 색도가 짙은 원액 처리에서는 성장하지 못하였음. 10배, 20 배 희석한 처리 수에서 역시 색도가 짙은 10배의 경우가 성장속도가 낮았고 20배의 경우가 성장속도가 더 높았음. 색도의 영향뿐만 아니라 오존처리과정에서 충분한 유기물해주지 못하여 다른 처리과정과 비교하면 성장속도가 낮았다고 판단됨(그림 90 및 표 43).

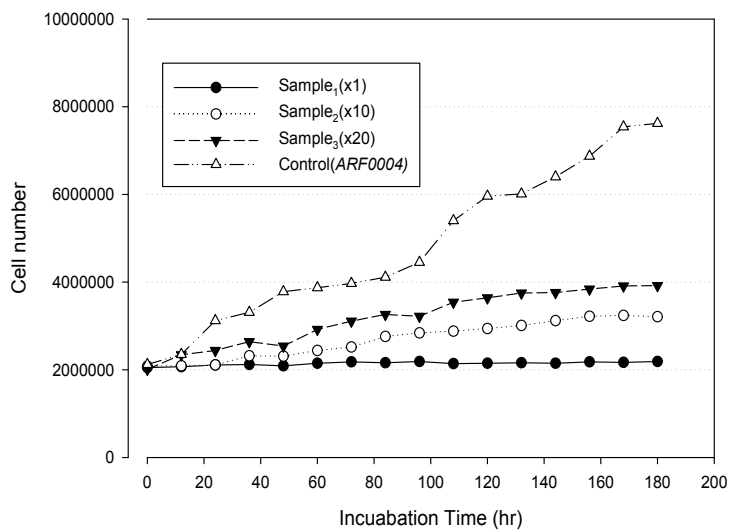
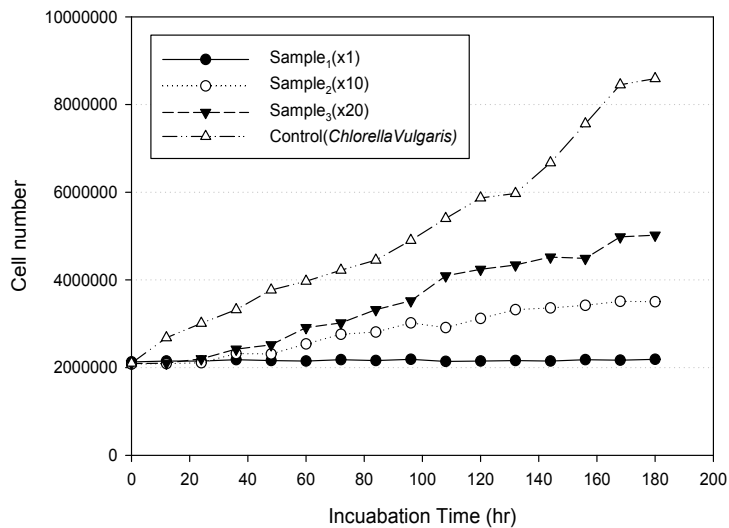


그림 90. Ozonation 처리가 된 험기소화액에 미세조류 배양 (위 -25℃, 아래 -12℃).

표 43. 오존처리에 의한 미세조류 사용 배지의 농도 및 성장 계수 비교.

Parameter	BOLDS BASAL MEDIUM (BBM)	Blue-Green Medium (BG11)	오존처리에 의해 미세조류 저해요인 제거된 혐기소화액		
			A ₁ (×1)	A ₂ (×10)	A ₃ (×20)
Total N(g/L)	0.04	0.2405	0.76	0.082	0.051
색도 (mg/LPt-CO)	-	-	392	51	29
<i>Chlorella vulgaris</i> (μ) 혐기소화액	-	-	-	0.0036	0.0055
ArF0004(μ) 혐기소화액	-	-	-	0.0028	0.0052

마. 잔류 산화제가 미세조류 성장에 미치는 영향 파악

- (1) 혐기소화액에 ammonia stripping과 chlorination을 통하여 암모니아 및 색도를 제거하여 잔류염소가 발생했음. 이 처리 수에 발생한 잔류염소가 미세조류 성장에 미치는 영향을 알기 위해 진행하였음.
- (2) 혐기소화 회석액의 배양농도까지 제거한 처리 수의 성분은 표 44와 같음. 혐기소화액에 ammonia stripping과 chlorination을 진행한 결과 제거율은 표 45와 같음.

표 44. 암모니아 및 색도가 제거된 혐기소화액의 성상.

Parameter (Sample)	Soluble COD (g/L)	TN (g/L)	TP (g/L)	Ammonia-N (g/L)	Phosphat-P (g/L)	Color(mg /LPt-Co)	
Piggery wastewater	5.16	3.3	0.57	3.2	0.25	1478	
Piggery wastewater (×10)	0.492	0.31	0.059	0.31	0.026	145	
Treat ment	Breakpoint chlorination	0.194	0.24	0.042	0.21	0.021	64
	Air-stripping	0.371	0.11	0.052	0.067	0.023	109
	Breakpoint chlorination + Air-stripping	0.182	0.102	0.041	0.063	0.02	61

표 45. 잔류염소가 제거된 혐기소화액의 제거율.

Parameter (Removal, %)	Soluble COD	TN	TP	Ammonia-N	Phosphat-P	Color
Breakpoint chlorination	60.57%	22.58%	28.81%	32.26%	19.23%	55.86%
Air-stripping	24.59%	64.52%	11.86%	78.39%	11.54%	24.83%
Breakpoint chlorination + Air-stripping	63.01%	67.10%	30.51%	79.68%	23.08%	57.93%

(3) 색도의 경우 목표 수치인 33 ~ 76 mg/LPt-Co보다 좀더 낮은 61 mg/LPt-Co까지 제거하였다. 암모니아 농도의 경우 목표 수치인 0.062 ~ 0.153 g/L에 해당되는 0.063 g/L까지 제거하였음. 이 혐기소화액 처리수에 미세조류를 배양한 결과 미세조류는 그림 91과 같이 성장 하지 못하였음.

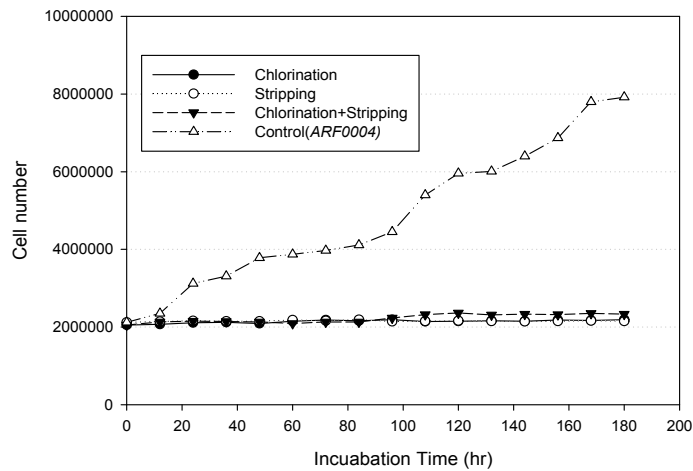
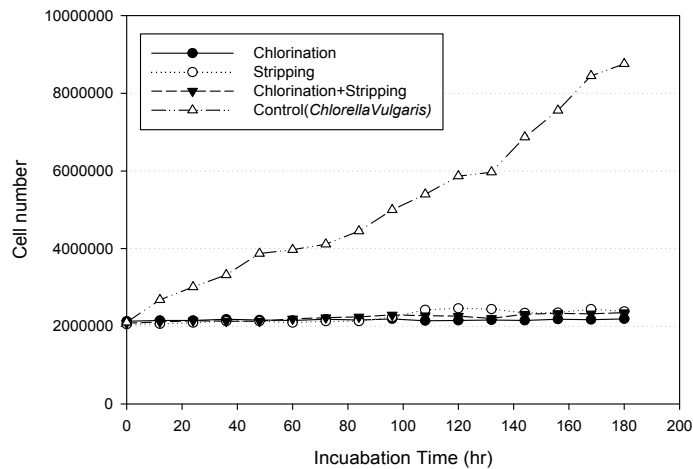


그림 91. 잔류염소를 제거한 혐기소화액에 미세조류 배양 (위-25℃, 아래-12℃).

- (4) chlorination처리과정에서 발생한 잔류염소에 의해 미세조류 성장이 저해를 주었다고 생각함.
- (5) 염소처리과정에서 발생한 잔류염소가 미세조류 성장을 저해하는 것을 알게 됨에 따라 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 진행하였음.
- (6) 염소처리로 인해 발생한 잔류염소를 제거하기 위해 활성탄을 사용한 경우 제거효율은 5.2%, 12.3%, 24.4%, 36.5%, 36.8%로 낮았다. 이 잔류염소가 존재하는 혐기소화액에 미세조류를 배양한 경우 대부분이 성장하지 않았음(그림 92).

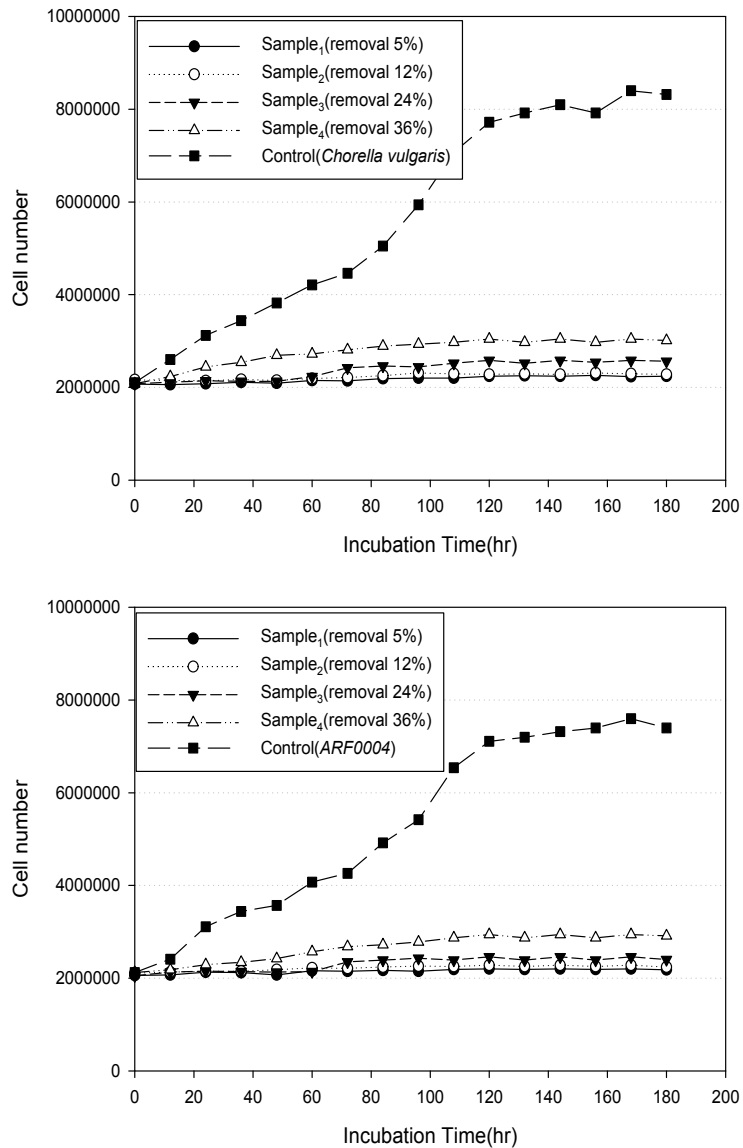


그림 92. 잔류염소를 활성탄에 의해 제거한 혐기소화액에 미세조류 배양 (위 -25℃, 아래 -12℃).

- (7) 환원제로 Na_2SO_3 를 이용한 경우 제거효율은 12.7%, 62.4%, 89.2%, 93.2%, 94.3%로 높은 제거효율을 나타냈음. 이 잔류염소가 존재하는 혐기소화액에 미세조류를 배양한 경우 제거율이 낮은 배지는 성장하지 못하였음.
- (8) 잔류염소의 제거율이 62%와 90%일 때 *Chlorella* sp. ArF0004는 μ 값 0.0025, 0.0040을, *Chlorella vulgaris*는 μ 값 0.0037, 0.0051를 달성했음(그림 93 및 표 46). 따라서 잔류염소의 산화력은 미세조류 성장에 저해가 됨.

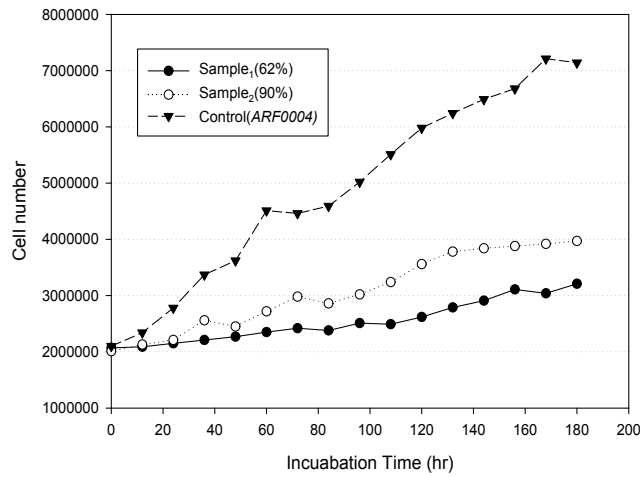
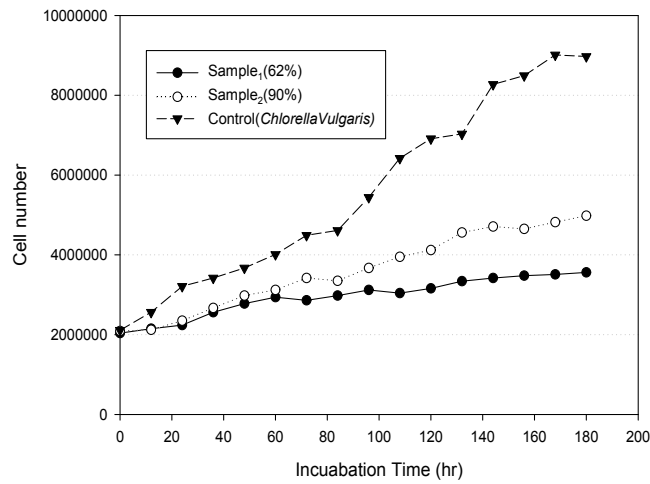


그림 93. 잔류염소를 환원제에 의해 제거한 혐기소화액(10 배 희석)에 미세조류 배양 (위-25°C, 아래-12°C).

표46. 혐기소화액에 배양한 미세조류의 성장속도 비교.

Parameter	Basic expierment		혐기소화액					잔류염소가 제거된 혐기소화액		
	12℃	25℃	S ₁ (×1)	S ₂ (×10)	S ₃ (×20)	S ₄ (×50)	Control	A ₁ (×1)	A ₂ (×10)	A ₃ (×20)
	190hr	190hr	180hr	180hr	180hr	180hr	180hr	-	180hr	180hr
ArF0004(μ) BBM	0.0066	0.0022	-	-	-	-	-	-	-	-
ArF0004(μ) BG11	0.0068	0.0038	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i> (μ) BG11	0.0023	0.0075	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i> (μ) 혐기소화액	-	-	-	-	0.0053	0.0059	0.0084	-	0.0051	0.0058
ArF0004(μ) 혐기소화액	-	-	-	-	0.0050	0.0056	0.0068	-	0.0040	0.0054

바. 잔류산화제 제거기술 확립(활성탄을 이용한 잔류염소의 제거)

(1) 활성탄에 의한 잔류 염소제거를 실시하였음. 온도는 24℃에서 control을 두고 활성탄을 1 g, 5 g, 10 g, 15 g, 20 g으로 나누어 주입하였음. 결과는 20 g 주입한 경우에서 잔류염소는 36.8% 밖에 제거되지 않음. 일부 잔류염소는 제거되었으나 SCOD가 42.1% 제거되면서 대부분 유기물로 제거되었음(그림 94 및 표 47). 따라서 활성탄을 이용하여 잔류염소를 선택적으로 제거하기에는 다른 물질들이 제거되기 때문에 무리가 있다고 판단하였음. 활성탄 주입법 이외에 가능한 방법으로는 이온교환수지, UV, 환원제 등 방법이 있으나 가장 실용적인 환원제 방법을 선택하여 진행하였음.

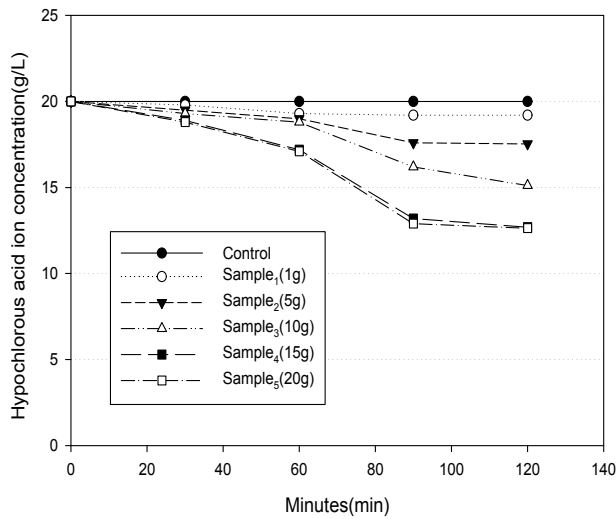


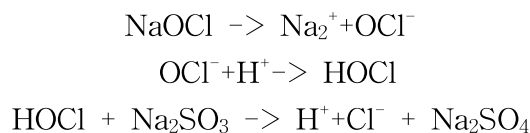
그림 94. 활성탄 주입량에 의한 잔류염소의 제거.

표 47. 활성탄 주입량에 따른 잔류염소와 유기물 제거율.

Parameter	Sample ₁ (1 g)	Sample ₂ (5 g)	Sample ₃ (10 g)	Sample ₄ (15 g)	Sample ₅ (20 g)
OCl ⁻ Removal(%)	5.2	12.3	24.4	36.5	36.8
SCOD Removal(%)	7.9	15	23.5	35.8	42.1

사. 잔류산화제 제거기술 확립(환원제를 이용한 잔류염소의 제거)

(1) 염소주입에 사용된 용액 NaOCl이 반응하면 산화력을 지닌 HOCl을 생성함. 이 HOCl을 제거하기 위해서 환원제인 Na₂SO₃를 주입하여 제거하기 위해 실험을 진행하였음.



(2) Na_2SO_3 는 환원제로 Na_2SO_4 가 되려는 성질이 강해, 이를 이용하여 HOCl 의 O를 제거함으로써 미세조류 성장에 저해가 되는 산화력을 갖은 HOCl 을 제거하였음. 온도는 24°C 에서 control을 두고 Na_2SO_3 를 1 g, 5 g, 10 g, 15 g, 20 g으로 나누어 주입하였음. 결과는 20 g 주입한 경우에서 잔류염소는 94%가 제거되었음(그림 95 및 표 48) 이는 잔류염소 제거 과정에 활성탄을 사용한 것 보다 효율적인 제거율을 보였음.

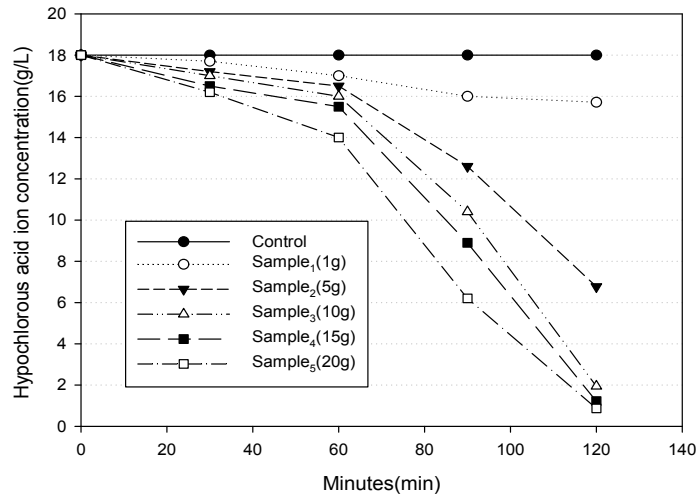


그림 95. 환원제 주입량에 의한 잔류염소의 제거.

표 48. Na_2SO_3 주입량에 따른 잔류염소 제거율.

Parameter	Sample ₁ (1 g)	Sample ₂ (5 g)	Sample ₃ (10 g)	Sample ₄ (15 g)	Sample ₅ (20 g)
OCl^- Removal(%)	12.7	62.4	89.2	93.2	94.3

13. 암모니아 제거 전처리, 혐기소화, 색도제거 후처리를 결합한 전 공정의 가동 및 운전 최적화

가. 전처리 후처리 결합한 전체 공정의 가동

- (1) 표 49와 같이 혐기소화 후 암모니아 제거와 색도 제거를 진행한 경우와 전처리로 암모니아 제거, 혐기소화를 거쳐 후처리로 색도 제거를 진행한 경우로 구분하여 실험을 진행함.

표 49. 전처리 후처리 순서에 따른 전체 공정.

전처리 공정 (A2D process)			후처리 공정 (ABC process)		
암모니아 제거	혐기소화	색도제거	혐기소화	암모니아 제거	색도 제거
batch test			reactor test		

나. 혐기소화 후 후처리로 암모니아와 색도제거를 진행한 경우

- (1) 가축분뇨를 혐기소화 후 암모니아 제거과정으로 air stripping을 진행하고 색도제거로 염소 처리를 진행하였음.
- (2) 표 50과 같이 가축분뇨의 성분들이 혐기소화와 air stripping, 염소처리를 통해 단계별로 제거되어졌음.
- (3) 최종적으로 SCOD 42.7 g/L, TN 4.2 g/L, TP 2.1 g/L, Ammonia-N 3.84 g/L, Posphat-P 0.35 g/L, Color 2512 mg/L Pt-Co인 가축분뇨가 전 공정을 거쳐 SCOD 1.91 g/L, TN 1.09 g/L, TP 0.4 g/L, Ammonia-N 0.65 g/L, Posphat-P 0.19 g/L, Color 621.8 mg/L Pt-Co인 혐기소화액을 생산하였음.

표 50. 암모니아 및 색도가 제거된 혐기소화액의 성상.

Parameter (Sample)	Soluble COD (g/L)	TN (g/L)	TP (g/L)	Ammonia-N (g/L)	Phosphat-P (g/L)	Color (mg /LPt-Co)
가축분뇨	42.7	4.2	2.1	3.84	0.35	2512
혐기소화액	5.16	3.3	0.57	3.2	0.25	1478
Treatment	Air-stripping	3.89	1.17	0.50	0.22	1111
	Breakpoint chlorination	2.03	2.55	0.41	0.20	652.4
	Breakpoint chlorination + Air-stripping	1.91	1.09	0.40	0.65	621.8

(4) 표 51은 각 공정 단계별 성분들의 제거율이며 SCOD, TN, TP, Ammonia-N, Phosphat-P, Color가 혐기소화공정에서는 87.1%, 21.4%, 70.2%, 16.6%, 24%, 38.5%를 달성하였고 염소처리 과정에서는 60.57%, 22.58%, 28.81%, 32.26%, 19.23%, 55.86%를 달성하였음. Air stripping과정에서는 24.59%, 64.52%, 11.86%, 78.39%, 11.54%, 24.83%를 달성하였음.

표 51. 암모니아 및 색도가 제거된 혐기소화액의 제거율.

Parameter (Removal, %)	Soluble COD	TN	TP	Ammonia-N	Phosphat-P	Color
혐기소화공정	87.1%	21.4%	70.2%	16.6%	24%	38.5%
Breakpoint chlorination	60.57%	22.58%	28.81%	32.26%	19.23%	55.86%
Air-stripping	24.59%	64.52%	11.86%	78.39%	11.54%	24.83%
Breakpoint chlorination + Air-stripping	63.01%	67.10%	30.51%	79.68%	23.08%	57.93%

다. 전처리로 암모니아 제거, 혐기소화, 후처리로 색도제거를 진행한 경우

- (1) 가축분뇨의 고농도 암모니아를 제거하기 위하여 암모니아 스트리핑을 진행하고, 혐기소화를 진행하였음.
- (2) 가축분뇨를 암모니아 스트리핑하여 고농도의 암모니아를 제거한 후, 원활한 혐기소화를 진행하기 위하여 기존의 혐기소화액과 1:1의 비율로 혼합함으로써, 혐기성 소화공정의 메탄생성세균을 식중하였음. 또한, 암모니아 스트리핑 과정 중 스트리핑을 제외한 동일조건으로 처리된 가축분뇨도 함께 혐기소화를 진행하였음.
- (3) 암모니아 스트리핑으로 암모니아가 제거된 가축분뇨와 혐기소화를 진행하기 위하여 암모니아 스트리핑 후 혐기소화액과 혼합된 시료의 정상분석 결과는 표 52에 표기하였음.
- (4) 전처리 공정 (A2D process)의 경우, SCOD 41.9 g/L, TN 5.2 g/L, TP 0.9 g/L, Ammonia-N 4.7 g/L, Color 16,567 Pt-Co인 가축분뇨를 암모니아 스트리핑 공정을 거쳐 SCOD 35.9 g/L, TN 2.2 g/L, TP 0.8 g/L, Ammonia-N 0.9 g/L, Color 10,500 Pt-Co까지 처리하고 혐기소화액을 혼합하여 혐기소화를 진행하고 있음.
- (5) 표 53는 전처리 공정의 암모니아 스트리핑에 의한 가축분뇨 성분들의 제거율이며, TN, Ammonia-N, Color가 혐기소화공정 전 58.3%, 81.1%, 36.62% 제거되었음. 암모니아 스트리핑을 하지 않고 pH 10.1, 37°C에서 12시간 동안 반응한 가축분뇨의 경우 TN, Ammonia-N, Color가 17.9%, 24.7%, 10.5% 제거되었음.

표 52. 암모니아가 제거된 가축분뇨 및 전처리 공정의 혐기소화 전 가축분뇨의 성상.

	Piggery manure	<i>ABC process</i> (후처리 공정)			<i>A2D process</i> (전처리공정)		
		Anaerobic digestate(1)	Ammonia Stripping	Ammonia Stripping (2)	Control _No stripping (3)	(1) + (2)	(1) + (3)
pH	7.5	8.5	9.6	9.1	9.8	7.7	7.6
Total solid (TS, g/L)	97.4	98.0	98.0	94.5	97.4	96.8	93.5
Volatile solid (VS, g/L)	30.5	6.9	6.9	36.4	29.4	17.7	15.8
Total chemical oxygen demand (TCOD, mg/L)	80,933	15,300	14,163	78,600	67,300	52,967	36,850
Soluble chemical oxygen demand (SCOD, mg/L), 0.2 μ m Filter	41,867	4,137	4,000	35,900	31,500	23,467	14,800
Total nitrogen (TN, mg/L)	5,200	3300	433	2,167	4,267	3,067	4,100
Ammonia-N (NH ₃ -N, mg/L)	4,703	3,217	273	887	3,543	2,190	3,247
Nitrate-N (NO ₃ -N, mg/L)	153	15	4	14	22	16	16
Total phosphate (TP, mg/L)	856	70	68	767	500	129	385
Color (120 color, Pt-Co)	16,567	6,700	6,267	10,500	14,833	9,400	9,667

표 53. 전처리 공정에 의한 가축분뇨의 암모니아 및 색도 제거율.

Parameter (Removal, %)	A2D process (전처리공정)	
	Ammonia Stripping	Control_No stripping
Total chemical oxygen demand (TCOD, mg/L)	2.88	16.84
Soluble chemical oxygen demand (SCOD, mg/L), 0.2 μ m Filter	14.25	24.76
Total nitrogen (TN, mg/L)	58.33	17.94
Ammonia-N (NH ₃ -N, mg/L)	81.14	24.67
Nitrate-N (NO ₃ -N, mg/L)	90.85	85.62
Total phosphate (TP, mg/L)	10.47	41.61
Color (120 color, Pt-Co)	36.62	10.47

라. 미세조류의 성장

- (1) 가축분뇨 혐기소화액에 배양할 미세조류는 *Chlorella vulgaris*와 *Chlorella* sp. ArF0004를 사용하였음. 경제성을 위하여 온도에 방해 받지 않는 조류를 고려하였음. 여름철 일반 상온 (25°C)에서 성장 가능한 *Chlorella vulgaris*를 선정, 겨울철 저온 (12°C)에서 성장 가능한 *Chlorella* sp. ArF0004를 선정하였음. 이 미세조류들을 혐기소화액에 배양하기 전에 일반적인 배지에 배양하였음. 이는 추후 혐기소화액에 배양하여 성장하는 data와 비교하기 위해 진행하였음. *Chlorella* sp. ArF0004는 12°C에서 BBM (Bolds Basal Medium)에 배양하였고 *Chlorella vulgaris*는 25°C에서 BG11 (Blue-Green Medium)에 배양할 실시하였음.
- (2) 조류선정의 이유인 온도에 따라 성장여부를 확인하기 위해 실험을 실시하였음. 미세조류의 성장여부는 성장곡선 μ 값을 구하여 비교하였음.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \frac{1}{x} dx = \mu dt, \int \frac{1}{x} dx = \int \mu dt, \ln x = \mu t + C, e^{\ln x} = e^{(\mu t + C)}, x = x_0 e^{\mu t}$$

$$x = x_0 e^{\mu t}, \ln x = \mu t + \ln x_0, \ln x - \ln x_0 = \mu t$$

- (3) 그 결과 *Chlorella* sp. ArF0004는 BBM배지에 배양했을 때 12°C에서의 μ 값은 0.0066, 25°C에서의 μ 값은 0.0022를 달성함. *Chlorella vulgaris*는 BG11배지에 배양했을 때 12°C에서의 μ 값은 0.0046, 25°C에서의 μ 값은 0.0075를 달성했음(그림 96). 따라서 *Chlorella* sp. ArF0004는 저온에서 성장이, *Chlorella vulgaris*는 여름철에도 성장이 가능함. 또한 *Chlorella* sp. ArF0004보다 *Chlorella vulgaris*이 성장률이 조금 더 높은 것을 나타냈음.

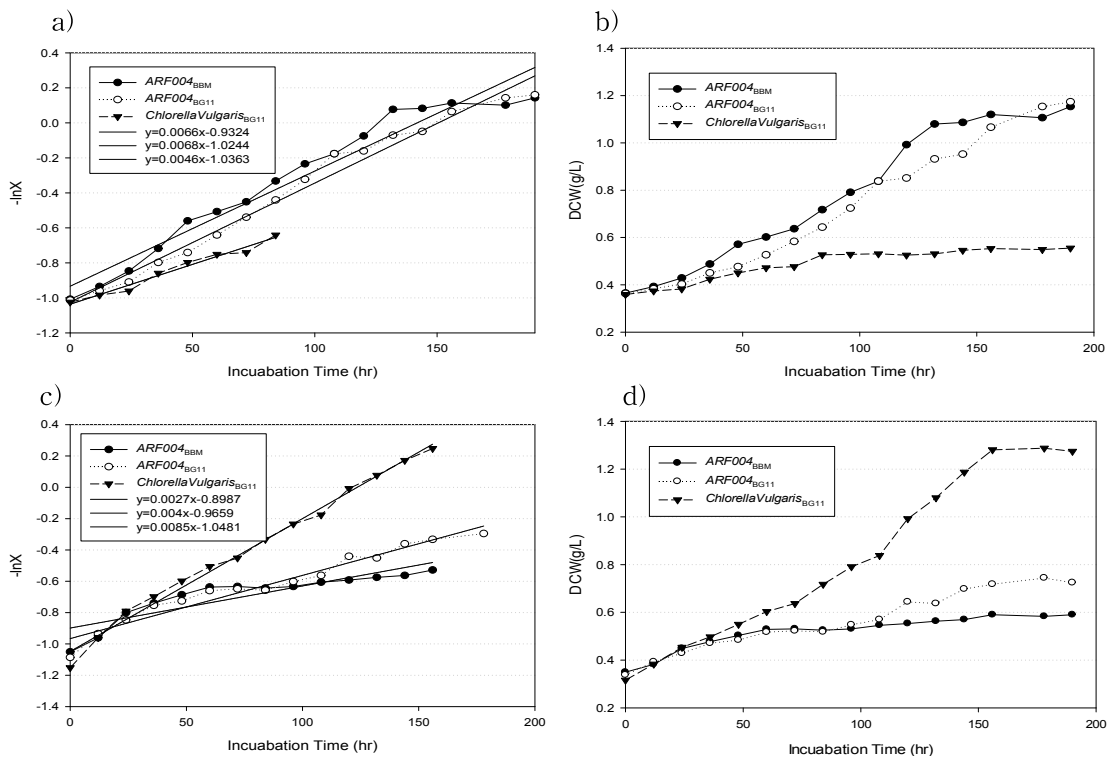


그림 96. 미세조류의 온도별 성장. a)와 b) -12 °C, c)와 d) -25 °C.

마. 가축분뇨에 미세조류 배양

- (1) 혐기소화액에 미세조류를 배양하기 전에 가축분뇨에 미세조류를 배양하는 실험을 진행하였음. 가축분뇨의 원액과 10배, 20배, 50배, 100배 희석액에 미세조류를 배양하였음. 그 결과 control을 제외한 모든 조건에서 미세조류는 성장하지 못하였음(그림 97 및 표 54).
- (2) 이는 혐기소화액에서 미세조류가 성장한다면 혐기소화과정에서 미세조류의 성장을 저해하는 미지의 요인이 제거되었다는 의미함.
- (3) 가축분뇨 원액은 유기물이 고농도이기 때문에 미세조류가 성장하지 못했다고 말할 수 있으나 10배에서 100배까지 희석하여 배양한 경우는 유기물의 농도 또한 적절하게 희석되었음.
- (4) 따라서 유기물의 농도가 희석에 의해 감소된 가축분뇨액에서 미세조류가 성장하지 못한다는 것은 유기물뿐만 아니라 가축분뇨 내에도 미지의 미세조류 성장 저해요인이 존재한다는 것을 나타냄.

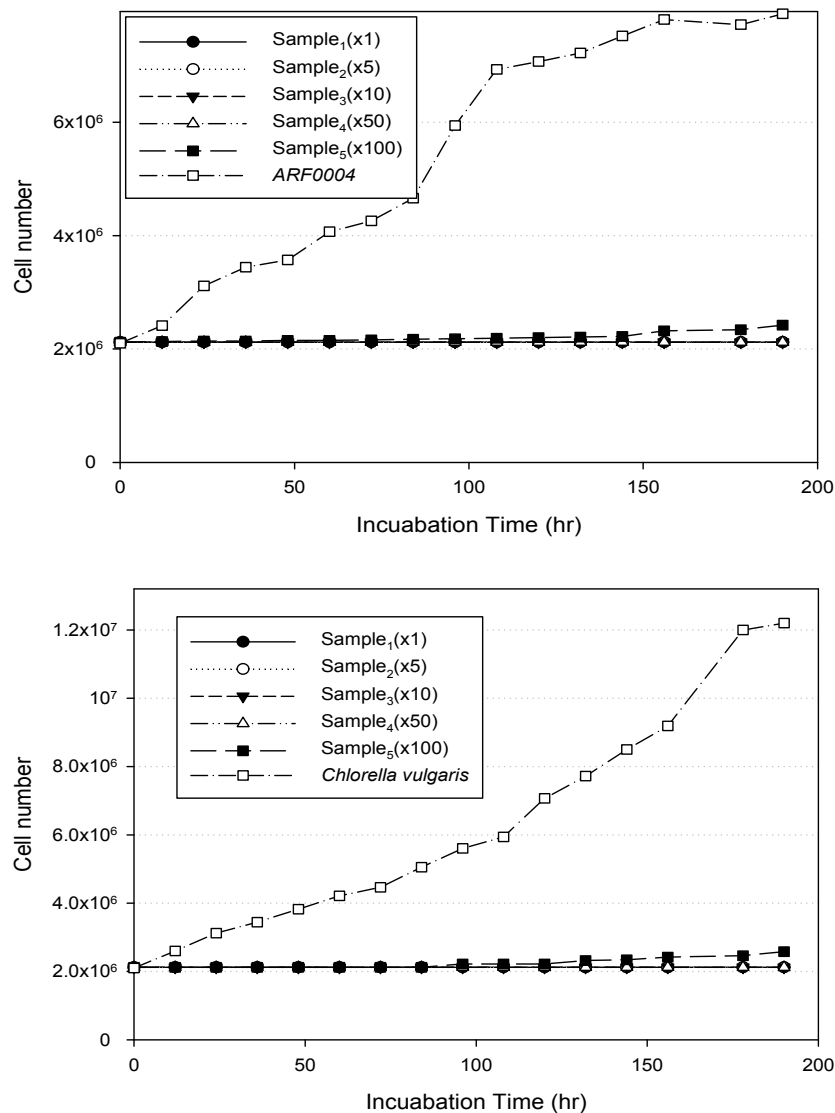


그림 97. 가축분뇨액에 미세조류 배양(위-12 °C, 아래-25 °C).

표 54. 가축분뇨원액과 희석액의 성상.

Parameter (Dilution)	TS (wt.%)	VS (wt.%)	VS/TS ratio	Soluble COD (g/L)	TN (g/L)	TP (g/L)	Ammonia- N (g/L)	Phosphat- P (g/L)	Color (mg/LPt-Co)
S ₁ (×1)	1.60	0.88	0.55	48.6	4.3	2.3	4.2	2.2	2512
S ₂ (×10)	0.17	0.13	0.75	4.92	0.41	0.22	0.40	0.20	253
S ₃ (×20)	0.09	0.05	0.55	2.35	0.211	0.113	0.232	0.13	127
S ₄ (×50)	0.02	0.01	0.5	0.94	0.089	0.049	0.88	0.047	58
S ₅ (×100)	0.01	0.006	0.6	0.45	0.040	0.021	0.041	0.021	28

바. 혐기소화액에 미세조류 배양

- (1) 가축분뇨가 1상 혐기소화를 거쳐 발생한 혐기소화액에 미세조류 배양을 실시하였음. 혐기소화액의 원액과 10배, 20배, 50배, 100배 희석액에 미세조류를 배양하였음.
- (2) 그 결과 원액과 10배 희석액에 배양한 조류는 성장하지 못하였지만 20배와 50배 희석액에 배양한 조류는 성장하였음(그림 98 및 표 55).
- (3) 20배와 50배 희석액에 배양한 조류 *Chlorella* sp. ArF0004는 μ 값 0.0050, 0.0056을, *Chlorella vulgaris*는 μ 값 0.0053, 0.0059를 달성하였음.
- (4) 가축분뇨의 원액과 희석액을 배지로 사용한 미세조류는 성장하지 못했지만 혐기소화의 원액과 희석액을 배지로 사용한 경우는 성장하였음.
- (5) 이는 혐기소화과정에서 유기물뿐만 아니라 미세조류 성장에 저해가 되는 미지의 요인이 제거되었다는 것을 나타냄. 따라서 미세조류 성장에 저해가 되는 높은 농도의 암모니아와 색도를 제거하여 미세조류 배양을 실시하고 최적의 미세조류 성장을 촉구하려함.

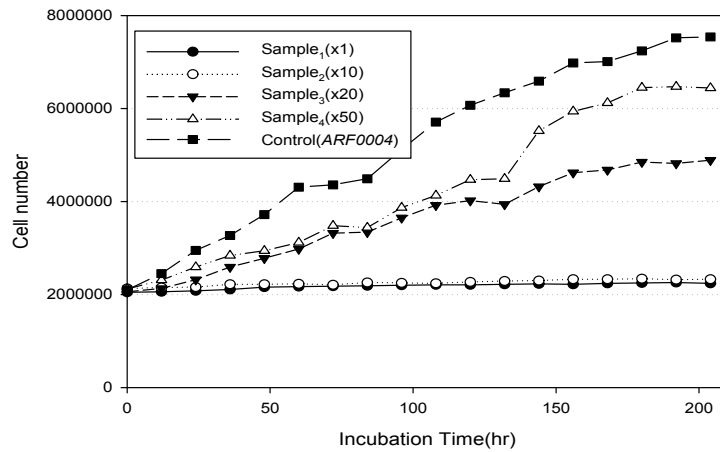
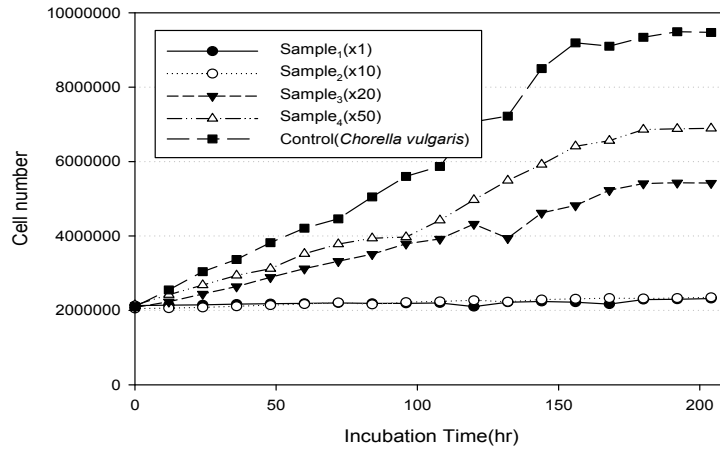


그림 98. 혐기소화액에 미세조류 배양(위-25℃, 아래-12℃).

표 55. 혐기소화 원액과 희석액의 성상.

Parameter (Dilution)	TS (wt.%)	VS (wt.%)	VS/TS ratio	Soluble COD (g/L)	TN (g/L)	TP (g/L)	Ammonia- N (g/L)	Phosphat- P(g/L)	Color (mg/LPt-Co)
S ₁ (×1)	1.01	0.56	0.55	5.26	3.3	0.67	3.1	0.56	1500
S ₂ (×10)	0.10	0.056	0.56	0.519	0.32	0.066	0.30	0.054	148
S ₃ (×20)	0.049	0.027	0.55	0.265	0.165	0.0334	0.153	0.027	76
S ₄ (×50)	0.02	0.011	0.55	0.105	0.066	0.0135	0.062	0.011	33

다. 결합공정의 처리율 평가 암모니아 및 색도가 제거된 가축분뇨와 혐기소화액 희석 배지을 이용한 미세조류 배양)

- (1) Wang 등(2010)에 의하면, 혐기소화액을 배양배지로 이용하여 *Chlorella* 속을 배양할 경우, 미세조류의 초기 접종량이 *Chlorella*의 성장에 영향을 미친다고 보고함.
- (2) 1×10^7 cells/ml 수준으로 *Chlorella* 접종 시 혐기소화액에서 미세조류의 접종에 의한 빛의 간섭 없이 가장 잘 성장한다고 보고하고 있으며, 1×10^5 cells/ml 이하의 접종량일 경우 미세조류가 성장하지 않는다고 보고함.
- (3) 이에 본 연구에서는 BG-11 배지에 중온성 미세조류 *Chlorella vulgaris*를 1×10^7 cells/ml 수준으로 접종하여, 25°C에서 14일 동안 배양하였으며, optical density와 dry weight (DW, g/L), algal cell number (cells/ml)를 측정하여 미세조류의 성장을 관찰하였음(그림 99).
- (4) 또한, biomass productivity (P ; $P = (DW_i - DW_0) / (t_i - t_0)$), specific growth rate (μ , d^{-1} ; $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, $N = DW$, g/L), doubling time ($d = \ln 2 / \mu$), specific growth rate constant (k ; $k = 1 / \text{Log} 2 \times 1 / t_x (\text{Log} N_t - \text{Log} N_0)$, $N = DW$ at time t and t_0), 질소에 대한 yield coefficient (Y ; $Y_{X/S} = dX / dS$, $X = DCW$ and $S = \text{amount of substrate(nitrogen) consumed}$)를 계산하였음.

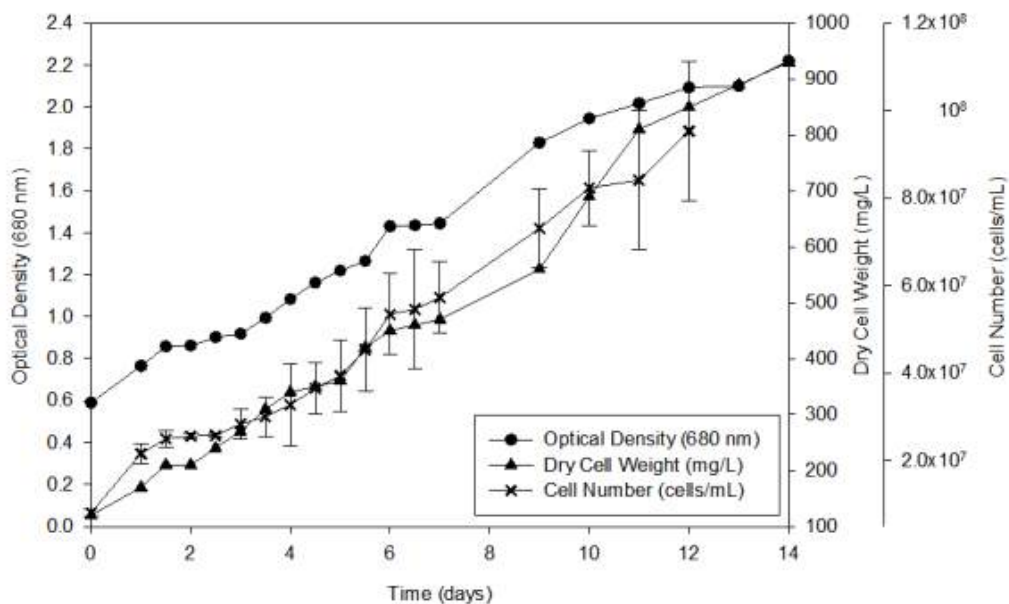


그림 99. BG-11 medium을 이용한 *Chlorella vulgaris*의 배양.

- (5) 중온성 미세조류 *Chlorella vulgaris*는 BG-11에서 12일 동안 세포수가 증가하였음. 배양 12일 이후 미세조류의 바이오매스는 증가하였으나, 세포수는 감소함.
- (6) 세포의 수가 증가가 관찰되는 총 12일 배양기간 동안 biomass productivity (P)는 $0.06 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ 이며, 4.96일의 doubling time과 0.14 d^{-1} 의 specific growth rate (μ), 0.24 의 specific growth rate constant (k)의 생장이 관찰되었음.
- (7) 중온성 미세조류 *Chlorella vulgaris*는 BG-11배지, 25°C 배양에서 dry weight와 optical density사이에 $0.45 \times OD_{680} - 0.17$ ($R^2 = 0.97$)의 선형관계를 보임.

- (8) 가축분뇨 및 혐기소화액을 미세조류의 배양배지로 이용하기 위해서는 15~50배까지 희석이 필요하므로 과량의 물이 필요함. 본 연구에서는 희석비율을 최소화하기 위하여 단순희석법과 암모니아 및 색도를 제거하여 배양배지로 이용하는 방법을 비교함.
- (9) 암모니아 및 색도 제거 방법으로는 암모니아스트리핑 (ammonia-stripping)과 염소처리 (chlorination) 방법을 사용하였음.
- (10) 암모니아스트리핑의 경우, 1L 반응기(ID 90 × H 200 mm)에 pH 10 ~ 10.1로 조정된 가축분뇨 및 혐기소화액 500 ml을 채워 37°C에서 1 L / min의 에어를 12시간 공급함. 염소처리의 경우, 동일 반응기와 pH 7.6의 동량 시료에 12% NaOCl 50 ml과 3시간 반응 후, Na₂SO₃를 이용하여 잔류염소를 완전히 제거함.
- (11) 가축분뇨와 혐기소화액, 암모니아스트리핑과 염소 처리한 각 시료의 영양염류 농도 및 색도를 표 56에 나타내었음.

표 56. 암모니아와 색도가 제거된 가축분뇨와 혐기소화액의 성상.

	Piggery Wastewater (PW)			Anaerobic digestate (AD)			
	PW	Ammonia Stripping	Chlorination	AD	Ammonia Stripping (1)	Chlorination (2)	(1)+(2)
pH	7.63	9.49	7.6	8.49	9.48	7.63	7.63
Total solid (TS, g/L)	59.6±0.51	56.7±0.78	54.4±1.31	53.4±4.72	40.1±2.29	26.0±0.45	19.5±0.1
Volatile solid (VS, g/L)	27.0±0.65	28.2±0.45	25.4±0.76	25.9±6.69	15.8±2.41	6.2±0.38	5.6±0.1
Total chemical oxygen demand (TCOD, g/L)	75.4±0.1	70.1±0.56	54.6±0.31	16.7±0.15	13.8±0.5	8.9±0.32	6.5±0.36
Soluble chemical oxygen demand (SCOD, g/L)	24.4±0.27	19.9±0.36	18.1±0.41	6.1±0.38	5.9±0.27	5.0±0.35	4.3±0.2
Total nitrogen (TN, gN/L)	5.9±0.3	2.2±0.1	4.1±0.21	4.0±0.12	2.0±0.15	3.8±0.06	1.4±0.2
Ammonia-N (gNH ₃ ⁺ -N/L)	3.95±0.03	1.08±0.02	3.6±0.05	3.7±0.06	0.92±0.01	3.0±0.03	0.8±0.02
Total phosphate (TP, gP/L)	0.47±0.01	0.44±0	0.41±0.01	0.3±0.01	0.29±0.01	0.27±0.01	0.29±0.01
Color (120 color Units, Pt-Co)	7,133±153	4,067±231	5,300±100	8,367±208	7,767±306	5,583±95	4,400±458

- (12) 암모니아스트리핑을 이용할 경우 고농도의 암모니아성 질소 및 색도가 각각 70%, 40% 이상 제거됨을 알 수 있음.
- (13) 염소처리의 경우, 유기물 및 색도 제거 효과가 가장 뛰어나나 암모니아성질소의 제거가 어려움.

- (14) Chen 등(2012)은 TN의 농도가 200 ml/L까지 희석된 가축분뇨 혐기소화액에서 미세조류의 배양이 가능하다고 보고하였으며, Zhu 등(2013)은 가축분뇨를 혐소처리하고 희석하여 이용하여 1,900 ml/L의 COD, 148 ml/L의 TN, 156 ml/L의 TP 농도의 배양배지에서 미세조류 *Chlorella* 속의 생장이 적합하다고 보고하였음.
- (15) 위 보고된 농도를 기준으로 단순희석하거나, 암모니아 및 색도를 제거하여 희석한 가축분뇨 및 혐기소화액을 배양배지로 사용함. 중온성 미세조류 *Chlorella vulgaris* (25°C) 및 저온성 미세조류 *Chlorella* sp. ArF0004 (12°C)를 1×10^7 cells/ml 수준으로 접종하고, 7일간 배양하여 각 배양배지에 대한 생장을 관찰하였음(그림 100 및 표 57).



그림 100. 영양염류가 제거된 가축분뇨 및 혐기소화액을 배양배지로 이용한 *Chlorella vulgaris*의 성장 사진. 영양염류 제거를 위하여 단순희석 외에 암모니아스트리핑 및 혐소처리 후 희석하여 미세조류의 배양배지로 사용함.

표 57. 가축분뇨 및 혐기소화액의 단순희석 배양배지와 영양염류제거 배양배지의 미세조류 성장 비교.

	Piggery Wastewater (PW)				Anaerobic digestate (AD)							
	Not treatment		Ammonia Stripping		Not treatment		Ammonia Stripping (1)		Chlorination (2)		(1) + (2)	
Dilution	1 ×	10 ×	1 ×	10 ×	1 ×	10 ×	1 ×	10 ×	1 ×	10 ×	1 ×	10 ×
<i>C. vulgaris</i> (25°C)	-	+	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++
<i>C. sp. ArF0004</i> (12°C)	-	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	+++

- (16) 단순회석법보다는 암모니아스트리핑으로 암모니아성 질소를 제거하고 회석 배양한 가축분뇨 및 혐기소화액에서 중온 및 저온성 미세조류의 생장이 뛰어난 것을 알 수 있음.
- (17) 단순회석 배양배지를 이용하여 *Chlorella vulgaris*를 7일간 배양할 경우, 미세조류의 배양이 매우 느리게 관찰되었으나, 암모니아스트리핑으로 영양염류를 제거하고 회석한 배양배지의 경우 BG-11 배양배지보다 빠른 생장이 확인되었음.
- (18) 각 배양배지에 대한 *Chlorella vulgaris*의 성장과 질소에 대한 성장수율을 표 58에 나타냄.

표 58. 영양염류가 제거된 가축분뇨 및 혐기소화액을 배양배지로 이용한 *Chlorella vulgaris*의 성장 특성.

<i>C. vulgaris</i> (25°C)		Growth_Dry Weight (DW, g/L)				Nitrogen yield coefficient (Y)
		Biomass productivity (P, g·L ⁻¹ d ⁻¹)	Doubling Time (d)	Specific growth rate (μ, d ⁻¹)	Specific growth rate constant (k)	
Blue-Green medium (BG-11)		0.05	3.55	0.195	0.281	0.003
10 × diluted Piggery wastewater	Not Treatment	0.20	12.18	0.057	0.082	0.016
	Ammonia-Stripping	0.57	3.40	0.204	0.294	0.040
10 × diluted Anaerobic digestate	Not Treatment	0.03	Not growth	0.026	0.038	0.002
	Ammonia-Stripping (1)	0.22	3.56	0.195	0.281	0.067
	Chlorination (2)	0.003	Not growth	0.004	0.005	0.0003
(1) + (2)		0.07	6.19	0.112	0.162	0.013

- (19) BG-11 배지에 *Chlorella vulgaris*를 7일간 배양할 경우, biomass productivity (P)는 0.05 gL⁻¹d⁻¹이며, 3.55일의 doubling time과 0.195 d⁻¹의 specific growth rate (μ), 0.281의 specific growth rate constant (k)의 생장이 관찰되었음.
- (20) 암모니아스트리핑으로 영양염류를 제거하고 회석한 배양배지에서의 biomass productivity (P)는 0.22 ~ 0.57 gL⁻¹d⁻¹이며, 3.4 ~ 3.56일의 doubling time과 0.195 ~ 0.204 d⁻¹의 specific growth rate (μ), 0.281 ~ 0.294의 specific growth rate constant (k)의 생장이 관찰되었음.
- (21) 염소처리 (Chlorination)의 경우 미세조류가 성장하지 않음. 색도 및 유기물의 영향보다는 높은 암모니아의 농도 때문이라 사료됨.
- (22) 암모니아스트리핑 배양배지의 경우 BG-11 배지와 유사하거나 조금 높은 성장율을 보임. 높은 성장율은 BG-11보다 암모니아스트리핑 방법을 이용한 가축분뇨 및 혐기소화액 배양배지에 존재하는 높은 농도의 영양염류의 영향으로 생각됨.

- (23) 암모니아스트리핑과 염소처리를 결합한 경우, 암모니아스트리핑만 하고 회석한 배양배지에서 성장한 미세조류와 큰 차이가 없음. 색도 및 유기물 제거를 위한 염소 처리보다는 미세조류 배양 후 잔류영양염류 제거 및 살균처리에 적용함이 효과적일 것으로 생각 됨. 즉, 정화처리에 이용이 적당함.
- (24) 질소에 대한 생장을 또한 BG-11 배지와 유사하거나 높게 관찰됨.
- (25) 각 배양배지에 대한 저온성 미세조류 *Chlorella* sp. ArF0004의 생장과 질소에 대한 성장수율 실험은 현재 진행 중임.

라. 가축분뇨 혐기소화액을 이용한 미세조류 배양 조건 확립 및 영양염류 제거특성 파악

- (1) 미세조류의 배양에 의한 가축분뇨 및 혐기소화액의 영양염류 이용 농도 및 미세조류 배양 후 영양염류의 제거특성과 처리농도를 알아보고자 함.
- (2) 미세조류의 배양에 사용한 가축분뇨 및 혐기소화액의 영양염류 성분과 배양 후의 잔류량 및 제거율을 표 59에 나타냄.
- (3) 중온성 미세조류 *Chlorella vulgaris*의 경우 650 ~ 7000 mg/L의 TCOD, 430 ~ 2000 mg/L의 SCOD, 140 ~ 220 mg/L의 TN (용존 총질소, TDN: 100 ~ 140 mg/L), 80 ~ 100 mg NH₃⁺-N/L의 암모니아성질소, 4 ~ 49 mg NO₃-N/L의 질산염, 16 ~ 44 mg/L의 TP (용존 총인, TDP: 1 ~ 14 mg/L) 농도에서 생장이 가능함을 알 수 있음.

표 59. 가축분뇨 및 혐기소화액을 배양배지로 이용한 *Chlorella vulgaris*의 영양염류 제거 특성.

		SCOD			TDN			TDP		
		Initial Cont. (mg/L)	Final Cont. (mg/L)	Removal W%	Initial Cont. (mg/L)	Final Cont. (mg/L)	Removal W%	Initial Cont. (mg/L)	Final Cont. (mg/L)	Removal W%
0.1× Piggery wastewater	Not Treatment	2140 ± 26	383 ± 5	82.1	380 ± 17	227 ± 83	23.0	15 ± 0.1	5.8 ± 0.06	62.4
	Ammonia Stripping	1990 ± 36	360 ± 21	81.9	137 ± 2	366 ± 06	73.3	144 ± 0.2	2.7 ± 0.1	81.3
0.1× Anaerobic digestate	Not Treatment	613 ± 38	257 ± 6.7	58.3	343 ± 15	253 ± 31	25.6	12.7 ± 0.6	9.9 ± 0.1	21.8
	Ammonia Stripping (1)	590 ± 26	241 ± 1.5	59.2	103 ± 15	801 ± 21	21.9	7.7 ± 0.6	6.3 ± 0.1	17.8
	Chlorination (2)	500 ± 35	265 ± 44	47	320 ± 10	227 ± 8.3	17.9	8.7 ± 1.5	10.8 ± 0.2	-
	(1) + (2)	430 ± 20	200 ± 12	53.6	103 ± 2.1	65 ± 1.2	36.4	7 ± 1	11.9 ± 0.2	-

- (4) 색도의 경우 120 color units로 측정된 결과, 800 Pt-Co 이하 농도의 배양배지에서 생장이 가능하고 400 Pt-Co 이하의 농도에서 총질소의 제거능력이 탁월함을 알 수 있음.
- (5) 암모니아스트리핑 후 회석 사용한 배양배지에서 생장한 미세조류는 37 ~ 80 mg/L 수준까지 질소제거가 가능함. BG-11 배지 결과를 토대로 12일 이상 배양할 경우 4 급 수질기준 (20 mg/L TN)까지 질소제거가 가능할 것으로 사료됨.
- (6) 단순회석 배양배지 및 염소처리 후 회석 배양배지를 이용하여 *Chlorella vulgaris*를 7일간 배양할 경우, 미세조류가 제대로 성장하지 못할 뿐 아니라 총질소가 거의 제거되지 않음. 염소처리는 미세조류 배양 후 수질기준에 부합하기 위한 정화처리에 적합할 것으로 사료됨.
- (7) 염소처리 후 배양을 통하여 색도보다는 암모니아성질소의 농도가 미세조류의 생장에 매우 중요함을 알 수 있음.
- (8) 이를 통해, 고농도의 암모니아성질소를 제거하기 위한 전처리가 필요함을 알 수 있음. 또한, 미세조류 배양을 이용한 질소의 이용 및 제거는 암모니아성질소의 농도 뿐 아니라 색도에도 영향을 받음.
- (9) 암모니아스트리핑 운전조건을 변화하고, 미세조류 배양에서 제거되지 못하는 총인의 제거 공정 및 색도와 탁도 제거공정이 필요함.

14. 혐기소화 전공정 pilot plant 가동, trouble shooting, 성능평가 자료 확보

가. 전처리, 혐기소화, 후처리 공정의 통합을 통한 전공정 확립

- (1) 본 연구의 연구결과를 토대로 가축분뇨 혐기소화액의 영양염류를 제거하기 위해서는 미세조류의 배양, 총질소 (TN)와 총인 (TP)의 농도를 방류수수질기준까지 제거하기 위한 처리방법이 필요함.
- (2) 선행연구에서 진행한 가축분뇨 혐기소화액을 단순 회석하여 사용할 경우, 상당한 양의 물이 필요하여 미세조류 배양이 어려울 뿐 아니라 방류수 수질기준을 만족할 수 없음.
- (3) 따라서, 본 연구는 고농도 가축분뇨 폐수를 혐기소화하고 유기물 제거 및 바이오가스를 회수하는 단계를 일차적으로 진행하였으며, 여러 가지 물리화학적 처리를 통하여 회석을 하지 않고 혐기소화액에 많은 양으로 존재하고 있는 유기물 및 영양염류를 제거하고자 함.
- (4) 물리화학적처리는 원심분리 (centrifugation), 응집 (coagulation), 탈기 (air stripping), 염소처리 (breakpoint chlorination) 등 4단계를 순차적으로 진행하였음(그림 101).



그림 101. 4단계 물리화학적처리 공정도.

- (5) 원심분리의 경우, 혐기소화액에 여전히 존재하고 있는 다량의 부유물질과 유기물 등을 제거하고자 원심분리기 (Hanil-SUPRA 30K)를 이용하여 진행하였음.
- (6) 원심분리의 제거효율은 처리강도, 처리시간에 따라 영향을 받기 때문에 본 연구의 최적 조건을 결정하기 위하여 실험을 진행하였으며, 처리강도는 2000 ~ 12000 g 까지 6개의 강도로 구분하였고, 처리시간은 5, 15, 30, 60 min으로 구분하였음(그림 102, 103).
- (7) 실험결과 6000 g로 5 min을 진행한 경우 TCOD, TSS, TP가 각각 70%, 71%, 81% 제거되었고, 이 이상의 강도에서 진행한 결과와 큰 차이를 보이지 않았음. 30 min를 진행한 경우 TCOD, TSS, TP가 각각 74%, 91.8%, 81% 제거되었고 60 min 진행한 결과와 크게 다르지 않았음. 따라서 6000 rpm, 30 min 원심분리를 진행하는 것이 최적이라고 판단하였고, 그 때의 제거효율은 표 60에 제시함.

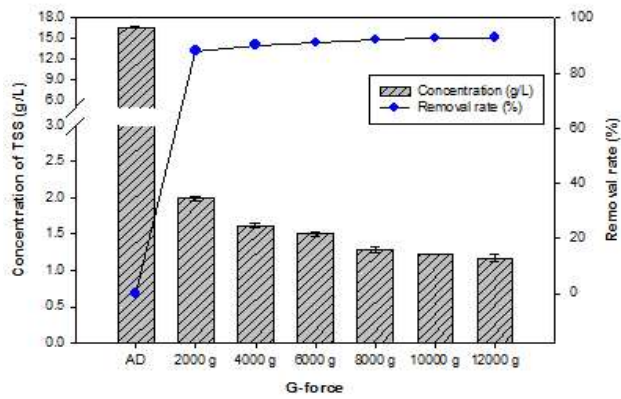
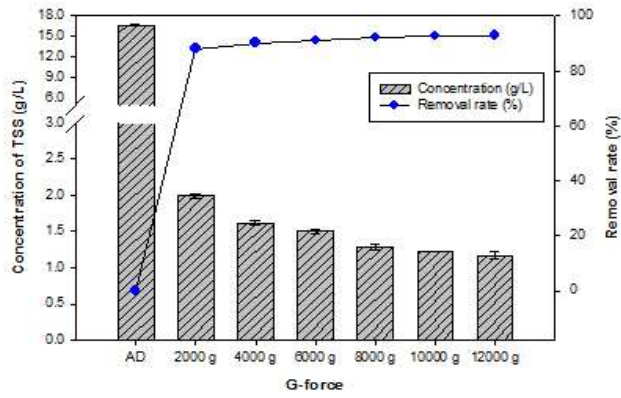
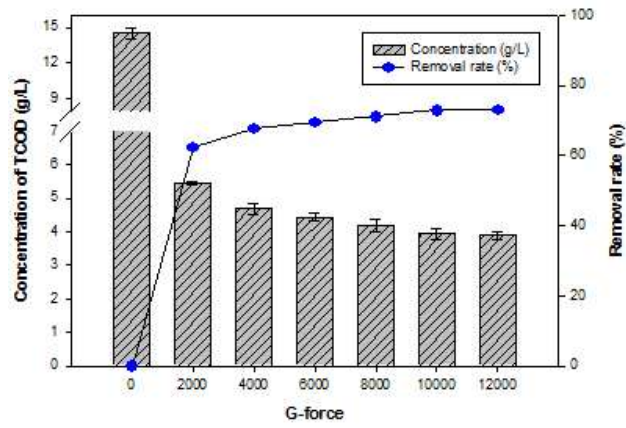


그림 102. 처리강도에 따른 원심분리 실험결과.

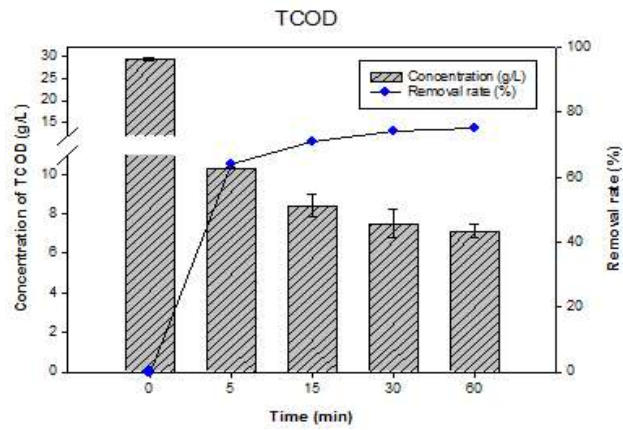
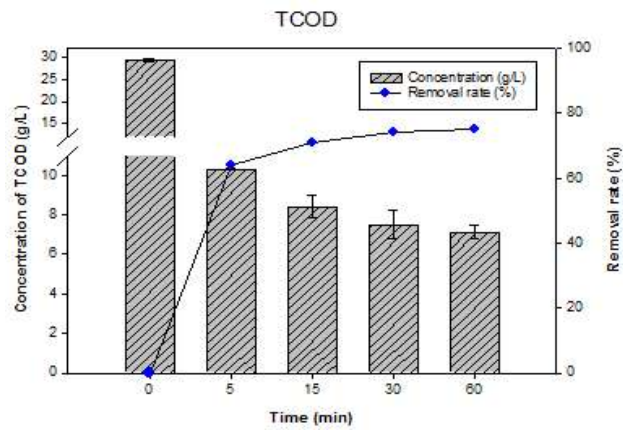
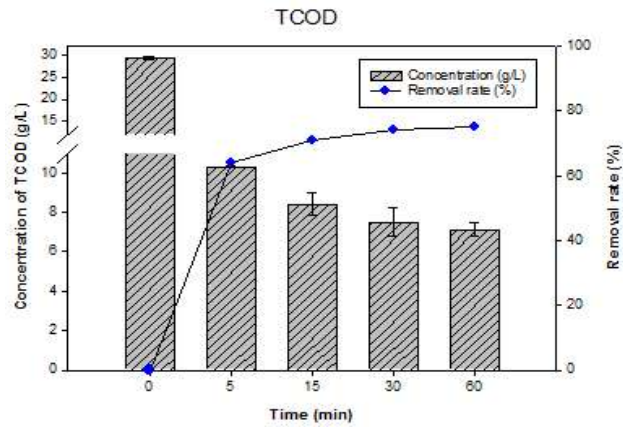


그림 103. 처리시간에 따른 원심분리 실험결과.

표 60. 혐기소화액 원심분리 성분분석 결과.

Parameters	Anaerobic digestate (g/L)	Centrifugation (6000 rpm, 30 min, g/L)	Removal rate (%)
Total chemical oxygen demand (g COD/L)	29.3	7.5	73
Total Suspendedsolid (g/L)	16.7	1.5	91
Total nitrogen (g N/L)	4.0	3	24
Total phosphate (g P/L)	0.57	0.08	85
Ammonia-N (g NH ₃ -N/L)	4.1	3.7	10

- (8) 응집의 경우, 원심분리를 진행한 이후에도 용액 내 존재하고 있는 콜로이드성 물질, 유기물, 인 등을 제거하고자 진행하였음.
- (9) 본 연구의 경우 대표적으로 사용되어지는 응집제인 Alum, PAC, FeCl₃의 응집효율을 비교하여 최적 응집제를 우선적으로 선정하였고, 응집제 적정 pH는 세 가지 응집제 모두 pH 5로 선정해주었으며, 응집제 주입량은 Alum은 2.5 g/L, PAC는 0.3 g/L FeCl₃의 경우 2.0 g/L를 선정하여 진행하였음. 응집제 주입량 및 적정 pH는 Lee 등 (2004)을 인용하여 선정하였음(표 61).

표 61. 응집제 최적 주입량 및 적정 pH.

Acid coagulants		
Name	Dosages (g/L)	Optimal pH
Aluminiumsulfate (Al ₂ (SO ₄) ₃)	2.5	4 ~ 5
Ferric chloride (FeCl ₃)	2.0	4 ~ 5
Ferric sulfate (Fe ₂ (SO ₄) ₃)	2.0	4 ~ 6
Poly aluminiumchloride (PAC)	0.3	4.5 ~ 9.5
Ferrous sulfate (FeSO ₄)	2.0	5 ~ 6
Ferrous chloride (FeCl ₂)	2.0	5 ~ 6

(10) 가장 처리효율이 높은 응집제는 FeCl_3 이었으며, pH 5로 반응을 진행한 경우 제거효율이 가장 높았음(그림 104, 105).

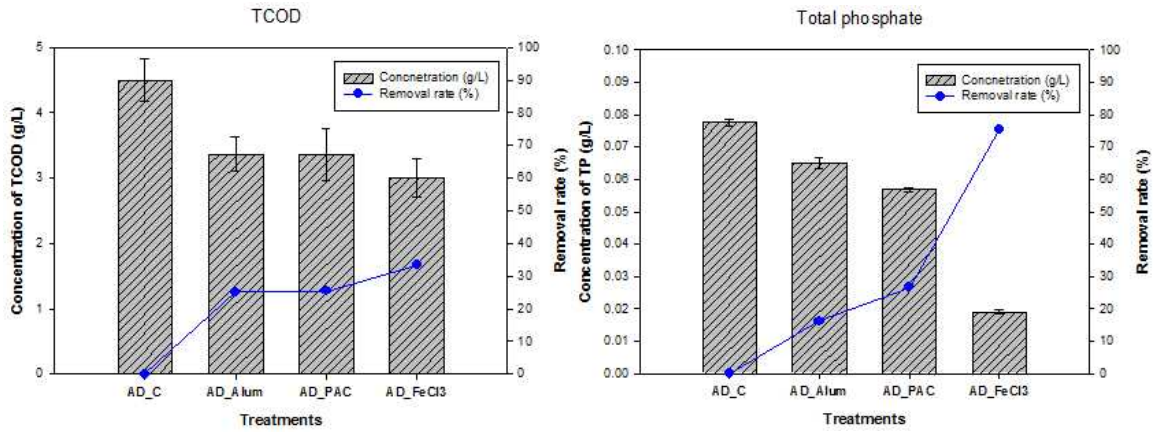


그림 104. 응집제 별 응집 후 제거효율.

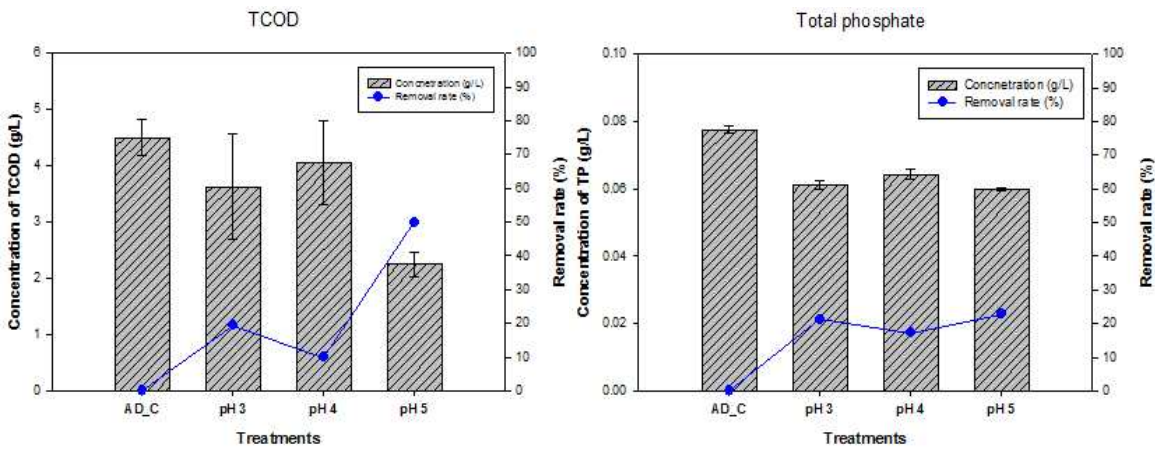


그림 105. pH 별 응집 후 제거효율.

(11) 원심분리와 응집은 용액 내에 존재하고 있는 물질의 양에 따라 제거효율에 영향을 주는 것으로 판단됨. 따라서 두 가지 처리방법의 순서에 따른 제거효율을 알아보기 위하여 실험을 진행하였음.

(12) 이 때, 응집의 경우 실험조건은 앞선 실험결과에서 최적 pH로 선정된 pH 5로 조정하였고, 1M FeCl_3 의 응집제를 투입하여 220 rpm, 30 sec의 급속교반, 75 rpm, 15 min의 완속교반, 1 hr 자연침강을 진행하였음. 교반조건은 M. Hjorth et al., (2008), J. Dosta et al., (2008)를 인용하였으며, 원심분리의 경우 6000 rpm, 30 min으로 진행하였음(그림 106 및 표 62).

1. AD (Anaerobic digestion)
2. AD_C/F (Anaerobic digestion+Coagulation)
3. AD_C (Anaerobic digestion+Centrifugation)
4. AD_C/F_C (Anaerobic digestion+Coagulation+Centrifugation)
5. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)

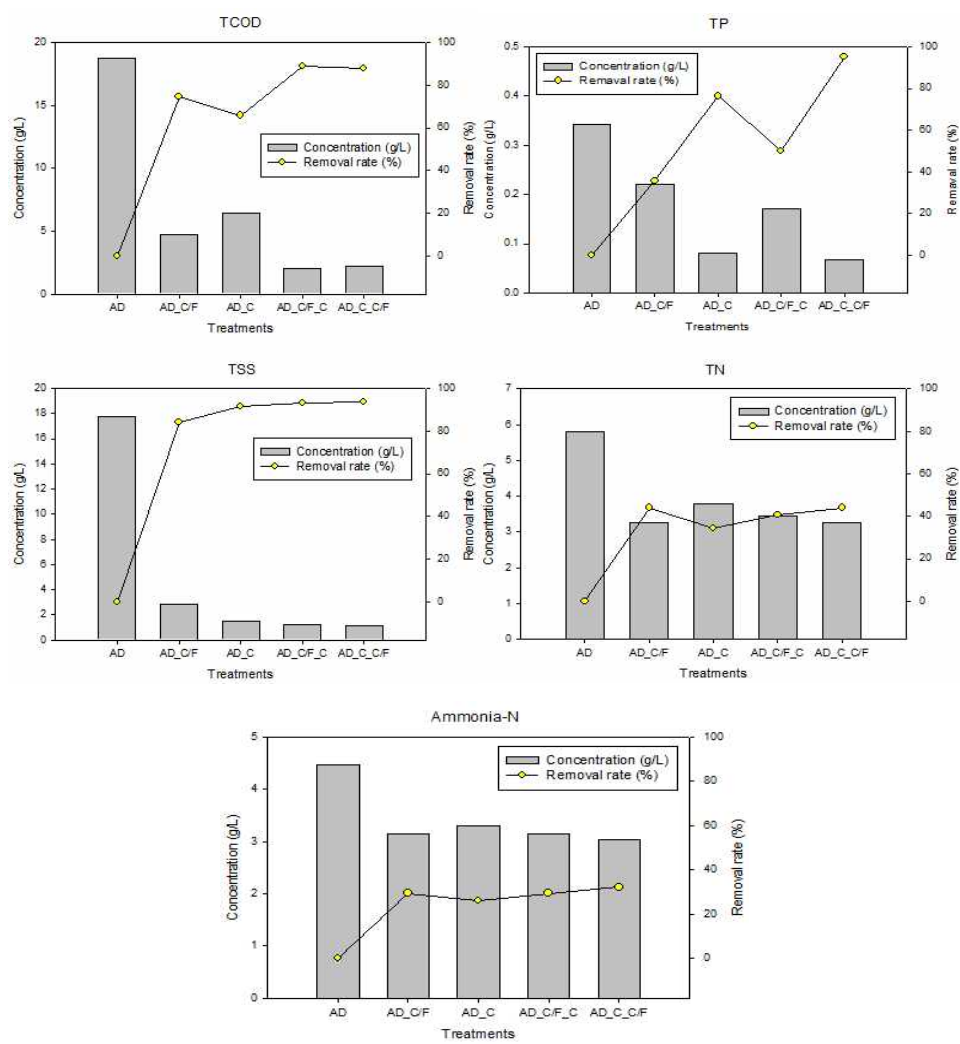


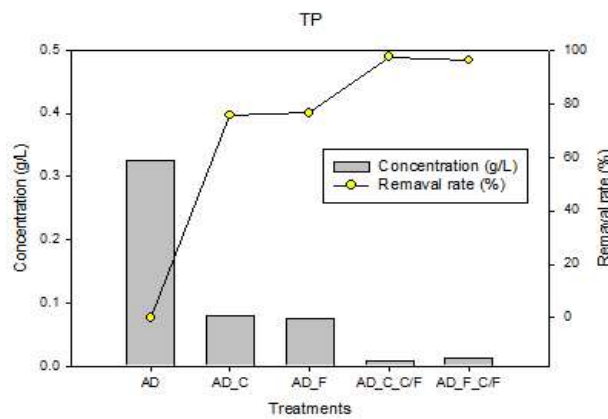
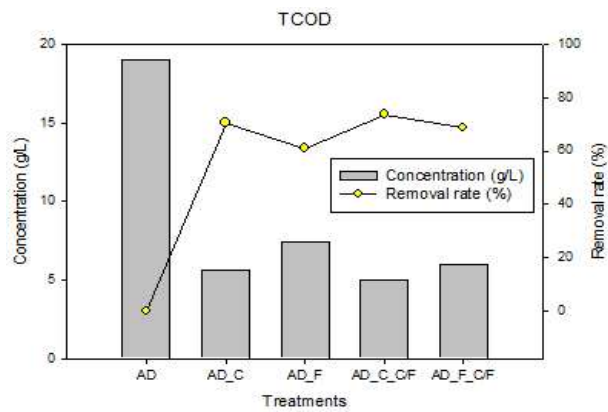
그림 106. 원심분리-응집 결합공정의 처리순서별 제거효율 비교.

표 62. 원심분리-응집 결합공정의 처리순서별 제거효율 비교.

Treatments	TCOD (g/L)	TSS (g/L)	TP (g/L)	TN (g/L)	NH ₃ -N (g/L)
AD	18.70	17.72	0.34	5.80	4.46
AD_C/F	4.75	2.84	0.22	3.25	3.15
AD_C	6.40	1.49	0.08	3.80	3.30
AD_C/F_C	2.05	1.20	0.17	3.45	3.15
AD_C_C/F	2.25	1.15	0.07	3.25	3.03

- (13) 결과적으로 혐기소화액을 원심분리로 처리하고 응집을 하는 공정이 가장 효율이 좋은 것으로 나타남.
- (14) 혐기소화액에 존재하고 있는 다량의 부유물질과 유기물 등을 제거하기 위한 다른 방법으로 정밀여과 (Microfiltration)을 진행하였으며, WHATMAN사의 cellulose ester 0.45 μm filter를 이용하여 여과를 진행하였음(그림 107, 표 63).

1. AD (Anaerobic digestion)
2. AD_C (Anaerobic digestion+Centrifugation)
3. AD_F (Anaerobic digestion+Microfiltration)
4. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)
5. AD_F_C/F (Anaerobic digestion+Microfiltration+Coagulation)



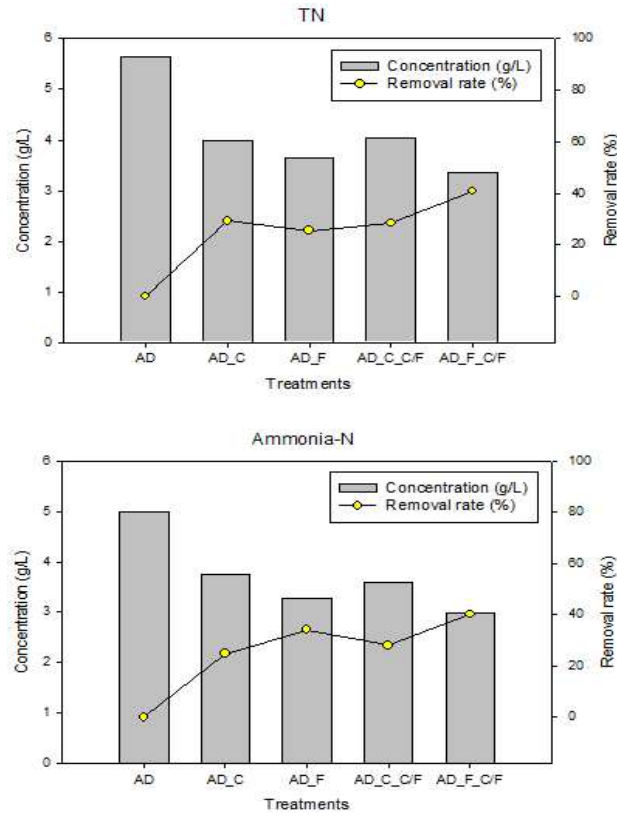


그림 107. 정밀여과-응집 결합공정의 처리순서별 제거효율 비교.

표 63. 정밀여과-응집 결합공정의 처리순서별 제거효율 비교.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (g/L)	TN (g/L)	NH ₃ -N (g/L)
AD	19.0	0.325	5.65	4.98
AD_C	5.6	0.079	4.00	3.74
AD_F	7.4	0.076	3.65	3.28
AD_C_C/F	5.0	0.008	4.05	3.58
AD_F_C/F	5.95	0.013	3.35	2.98

- (15) 원심분리와 정밀여과 두 가지의 처리공정의 제거효율 비교 결과 원심분리를 하는 경우가 제거효율이 더 좋았으며, 같은 양의 시료를 처리함에 있어서 정밀여과보다 그 처리시간도 짧음.
- (16) 다음은 원심분리와 응집을 통하여 많은 양의 부유물질, 유기물, 인이 제거되었지만 여전히 고농도로 존재하는 질소를 제거하기 위한 암모니아스트리핑을 진행하였음.

(17) 암모니아스트리핑의 경우 1 L 반응기(ID 90 × H 200 mm)에 pH 11로 조정 한 원심분리-응집공정으로 처리된 혐기소화액 500 mg을 채워 38℃에서 1 L/min의 공기를 18시간 공급함(그림 108 및 표 64).

1. AD (Anaerobic digestion)
2. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)
3. AD_C_C/F_S (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Air stripping)

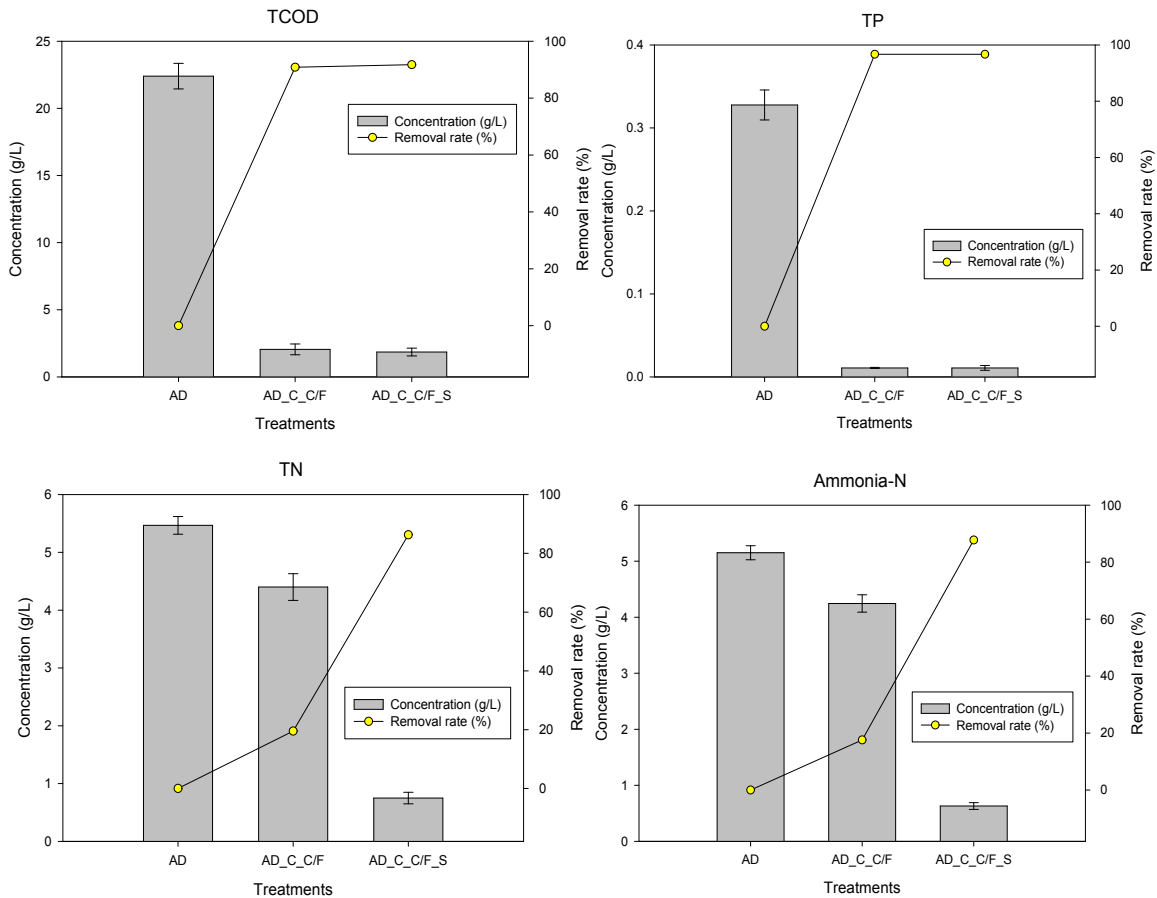


그림 108. 원심분리-응집-암모니아스트리핑 처리결과.

(AD: Anaerobic digestate, C: Centrifugation, C/F: Coagulation, S: Stripping)

표 64. 원심분리-응집-암모니아스트리핑 결합공정 진행결과 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (g/L)	TN (g/L)	NH ₃ -N (g/L)
AD	22.40	0.98	5.47	5.15
AD_C_C/F	2.05	0.032	4.40	4.25
AD_C_C/F_S	1.85	0.032	0.75	0.63

- (18) 암모니아스트리핑을 1 L/min의 공기주입량으로 연구를 진행한 결과 18 hr의 반응시간에도 불구하고 암모니아의 제거효율이 90%에 도달하지 못함. 따라서 공기주입량을 높여서 암모니아스트리핑을 진행할 필요가 있다고 판단하였으며, 공기주입량을 1, 2, 4, 8 L/min으로 구분하여 최적 조건을 선정하기 위한 실험을 진행함(그림 109 및 표 65).

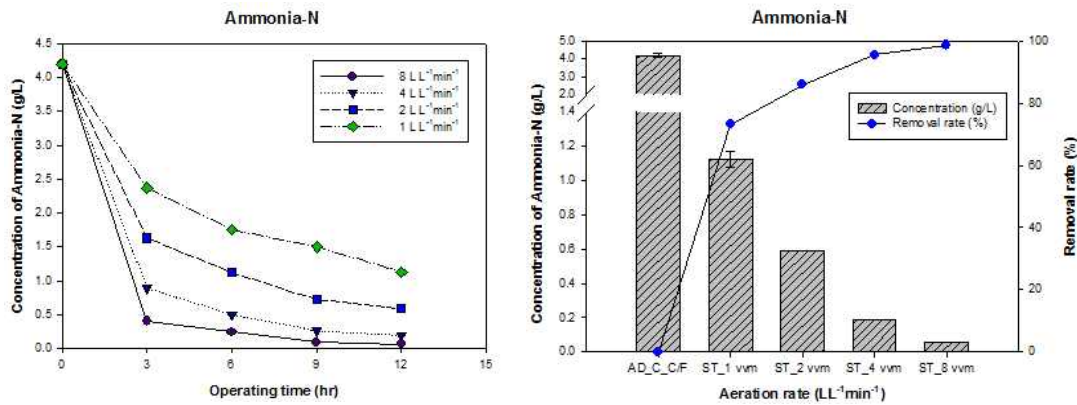


그림 109. 공기주입량 및 처리시간에 따른 탈기 효율.

표 65. 탈기처리 시 공기주입량 및 처리시간에 따른 암모니아 제거 분석결과.

	1 L/min	2 L/min	4 L/min	8 L/min
0 hr			4.20	
3 hr	2.37	1.63	0.89	0.40
6 hr	1.75	1.12	0.50	0.24
9 hr	1.50	0.72	0.26	0.09
12 hr	1.13	0.59	0.19	0.06

- (19) 실험결과 공기주입량이 8 L/min인 경우 암모니아의 제거효율이 99%로써 가장 높았으며, 8 L/min의 공기주입량으로 6시간 반응한 이후에는 그 처리효율의 차이가 거의 없다고 판단됨. 따라서 암모니아스트리핑의 최적 조건은 8 L/min, 6 hr으로 선정함.
- (20) 원심분리, 응집과 암모니아스트리핑 이 세 가지 공정으로 COD, TP, TN이 상당부분 제거되었지만 아직 많이 존재하는 TCOD와 잔존하고 있는 TN을 제거하기 위해 후처리공정으로 염소주입법 (breakpoint chlorination), 오존처리법 (ozonation), 펜톤산화법 (fenton oxidation)을 진행하였음.
- (21) 염소주입법의 경우 용액 내의 존재하는 암모니아와 주입된 염소량이 반응에 미치는 영향이 크기 때문에 우선적으로 NH₃-N과 Cl의 최적 질량비를 찾는 실험을 진행하였으며(그림 110) NH₃-N과 Cl의 질량비는 7.6 : 1 (이론 값), 10 : 1, 15 : 1로 구분하여 진행함.

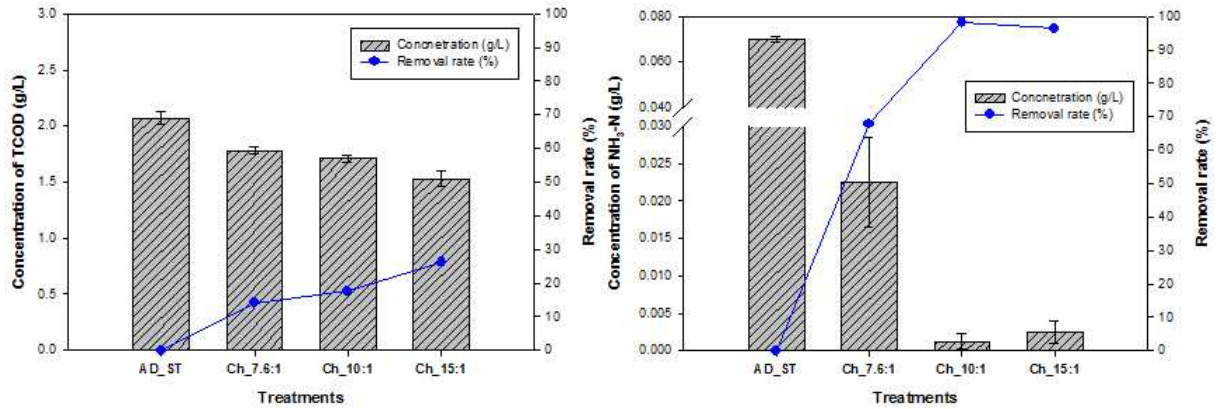


그림 110. NaOCl 주입량별 염소처리 결과.

- (22) 처리결과 TCOD의 경우 제거효율이 크게 차이가 없음을 보였고 NH₃-N의 경우 7.6 : 1보다 10 : 1, 15 : 1에서의 제거효율이 높았고 이 두 가지 질량비에서의 효율의 차이가 적었음. 따라서 NaOCl이 적게 소모되는 질량비가 10 : 1일 때를 최적으로 선정함.
- (23) 선행연구를 통하여 염소주입의 경우 역시 암모니아를 어느 수준 제거할 수 있다는 것을 파악하였고, 통합공정에서의 제거 수준을 암모니아스트리핑과 비교하기 위하여 연구를 진행하였음.
- (24) 최적화를 통해 암모니아와 염소의 질량비를 10 : 1로 선정하였기 때문에 원심분리-응집 처리된 100 ml의 혐기소화액에는 33 ml의 NaOCl을 주입하였고, 원심분리-응집-탈기 처리된 100 ml 혐기소화액에는 5 ml의 NaOCl을 주입하였으며, 10 M NaOH, 12N H₂SO₄ 를 이용하여 pH 7로 조정하고 30 rpm으로 2 hr 반응을 진행하였음.(그림 111, 112 및 표 66).

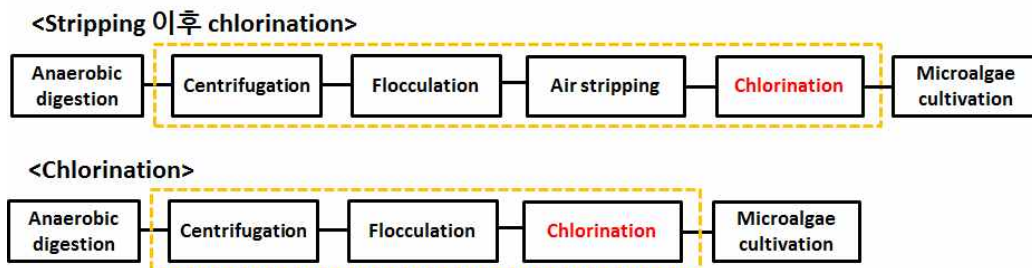
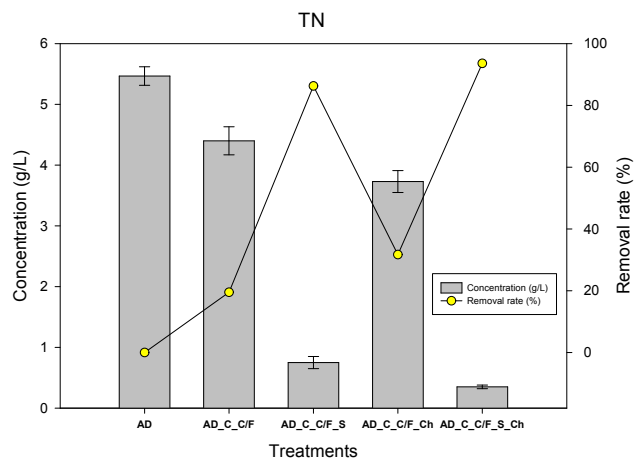
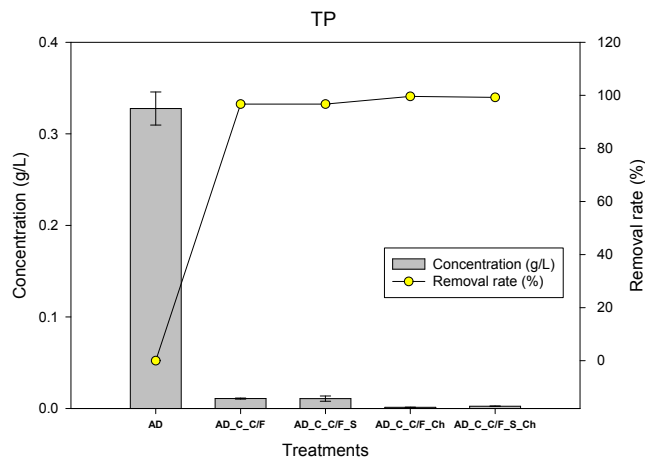
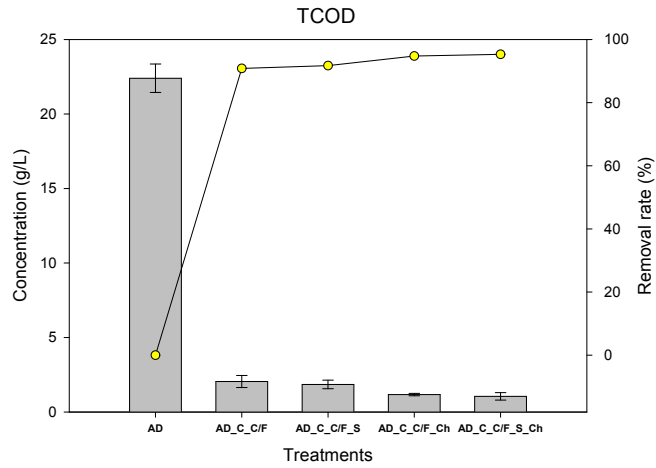


그림 111. 탈기-염소주입, 염소주입 처리공정도.

1. AD (Anaerobic digestion)
2. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)
3. AD_C_C/F_S (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Air stripping)
4. AD_C_C/F_CI (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Chlorination)
3. AD_C_C/F_S_CI (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Air stripping+Chlorination)



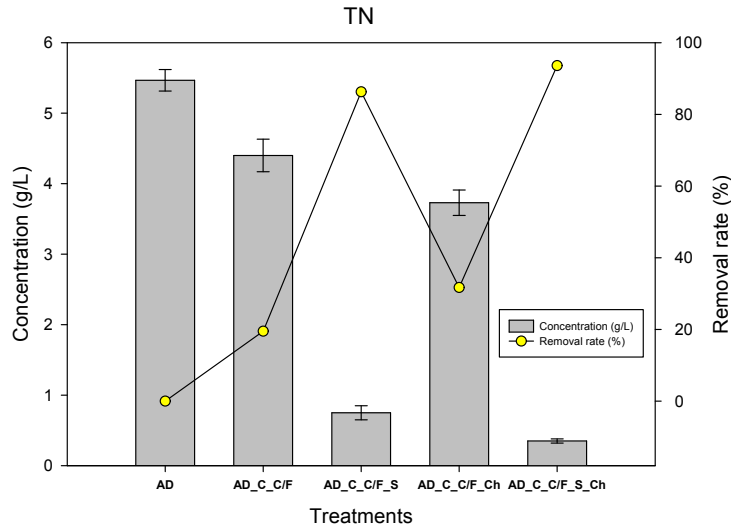


그림 112. 암모니아스트리핑-염소주입, 염소주입 처리공정별 제거효율 비교.

표 66. 암모니아스트리핑-염소주입, 염소주입 처리공정의 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (g/L)	TN (g/L)	NH ₃ -N (g/L)
AD	22.40	0.98	5.47	5.15
AD_C_C/F	2.05	0.032	4.40	4.25
AD_C_C/F_S	1.85	0.032	0.75	0.63
AD_C_C/F_Cl	1.17	0.0013	3.73	3.65
AD_C_C/F_S_Cl	1.05	0.0025	0.35	0.63

- (25) 처리결과 탈기 후 염소주입을 하는 공정에서 TCOD, TN, NH₃-N의 제거 효율이 각각 95%, 93%, 88%로 가장 높았으며, TP의 경우 제거효율이 모두 97%이상으로 높은 수준이었으며 크게 차이가 나지 않았음.
- (26) 오존처리법의 경우 ozonation는 강력한 산화제인 오존을 이용하여 유기화합물과, 무기화합물은 산화시켜 제거하는 방법이며, 오존은 수산화기에 의해 분해가 시작되며 높은 전위차를 갖는 OH 라디칼을 만들어 거의 모든 유기물과 매우 빠른 속도로 반응하여 제거함.
- (27) 오존처리법은 pH, 공기주입량과 시간 등에 따라 제거효율에 영향을 받음. 본 연구에서는 12N H₂SO₄ 를 이용하여 pH 8로 조정하였으며, 오존 주입량은 1.2 g/h, 주입시간은 30 min로 진행하였음(그림 113 및 표 67).

(28) 오존처리법 역시 최적화를 위해 시간에 따른 TCOD와 NH₃-N의 제거효율 비교하였으나 그 차이가 거의 없음을 보임.

1. AD (Anaerobic digestion)
2. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)
3. AD_S (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Air stripping)
4. AD_S_O (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+Air stripping+Ozonation)

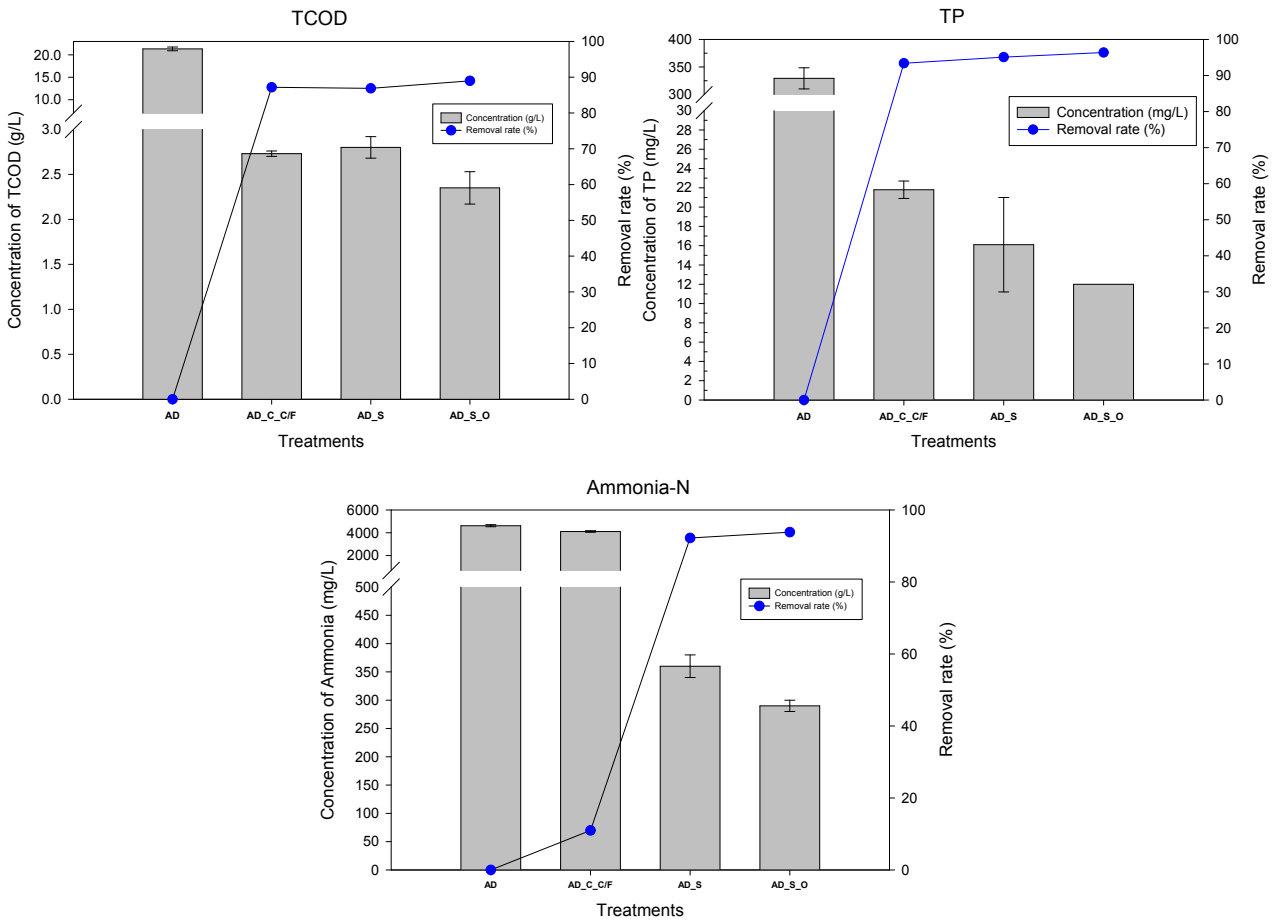
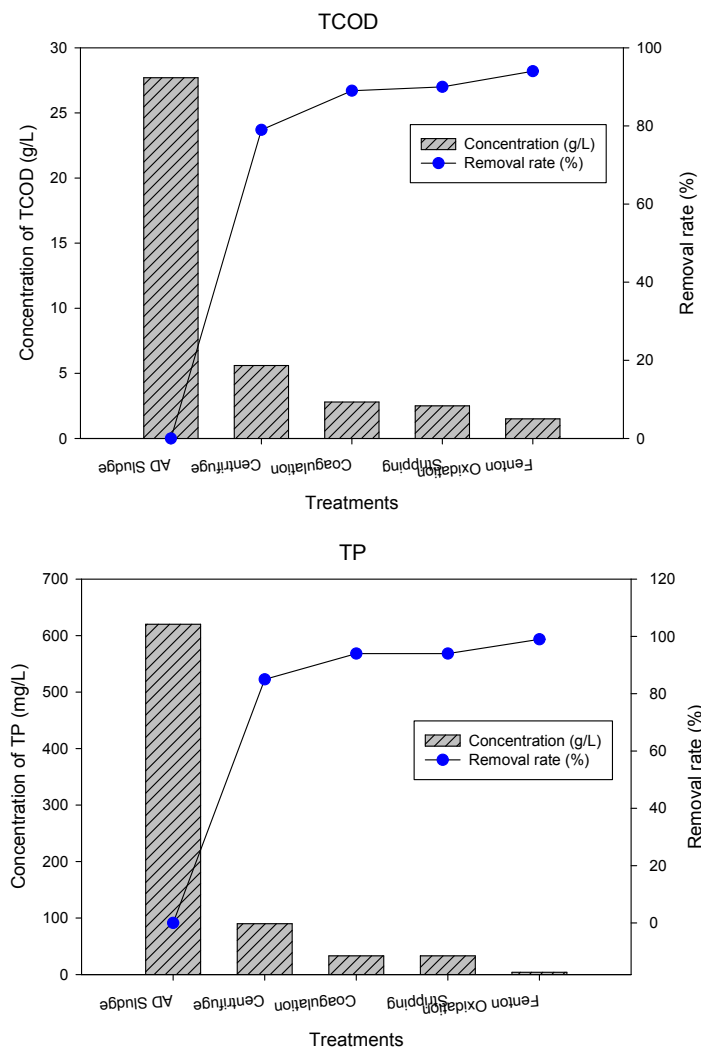


그림 113. 원심분리-응집-암모니아스트리핑-오존처리 처리공정 단계별 제거효율.

표 67. 원심분리-응집-암모니아스트리핑-오존처리 처리공정의 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (g/L)	NH ₃ -N (g/L)
AD	21.33	0.3294	4.62
AD_C_C/F	2.73	0.0218	4.11
AD_C_S	2.8	0.0161	0.36
AD_S_O	2.35	0.0120	0.29

- (29) 오존주입법의 경우 선행연구결과와 같이 수중에 Br^- 존재하는 경우 암모니아 제거 효율이 높아지지만, 본 연구에서는 Br^- 존재하지 않는 조건으로 실험을 진행하였음.
- (30) 따라서, 전반적으로 제거효율이 낮았으며 TCOD, $\text{NH}_3\text{-N}$, TP의 경우 최종 제거효율이 각각 89%, 96%, 93%이었으며, 이는 암모니아스트리핑까지 했을 때의 제거효율과 크게 차이가 없었음.
- (31) 펜톤산화법의 경우 과산화수소 (H_2O_2)와 2가 철염 (Fe^{2+})의 펜톤시약 (Fenton's reagent)을 사용하여 반응 중 생성되는 OH radical ($\text{OH}\cdot$)의 산화력으로 산업폐수나 오염토양 중의 오염물질을 처리하는 기술임.
- (32) Deng 등 (2006)에 의하면, 펜톤산화의 경우 과산화수소와 철염의 주입량, 주입비율, pH, 온도 등에 따라 제거효율에 영향을 줄 수 있다고 보고함. 특히, 과산화수소 농도가 높아질수록 유기물 제거효율이 높아진다고 보고함.
- (33) 따라서, 본 연구에서는 단계별 공정으로 처리 한 후에도 존재하고 있는 유기물과 무기물을 제거하기 위하여 과산화수소와 철염의 주입비율 2 ($\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+} = 2$)로 하였으며, 12N H_2SO_4 를 이용하여 pH 5로 조정, 100 ml의 전처리 된 혐기소화액에 1.8 ml 과산화수소와 10.7 ml의 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 주입하여 300 rpm으로 30 min 교반을 진행하였음(그림 114 및 표 68).



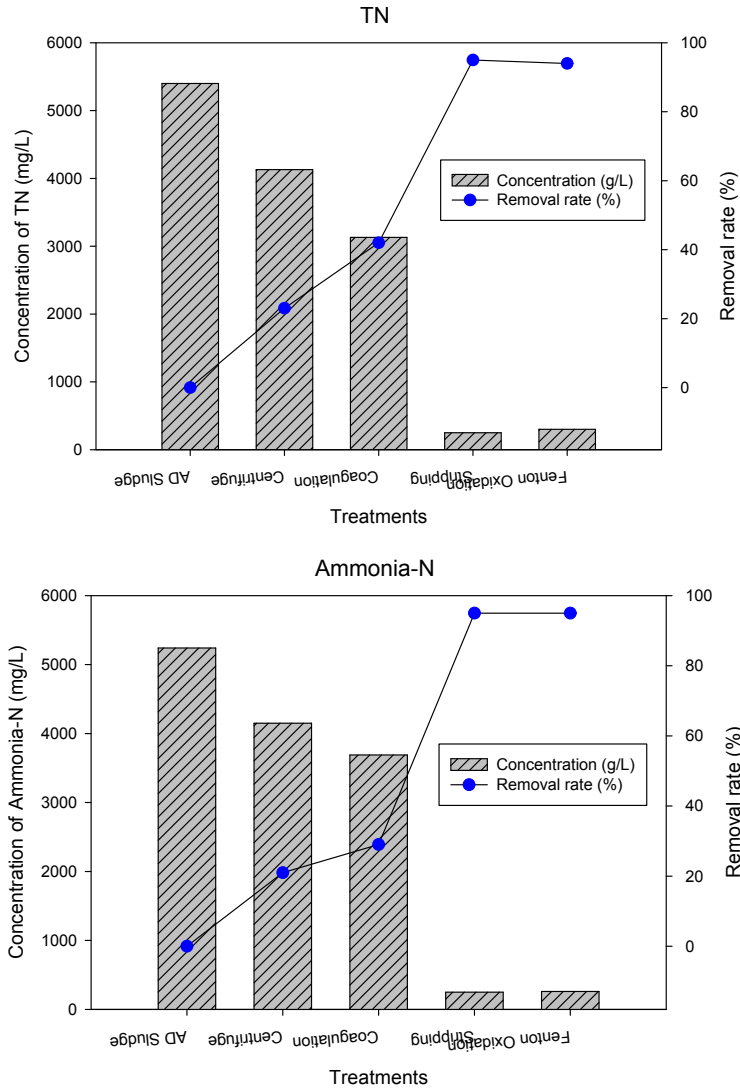


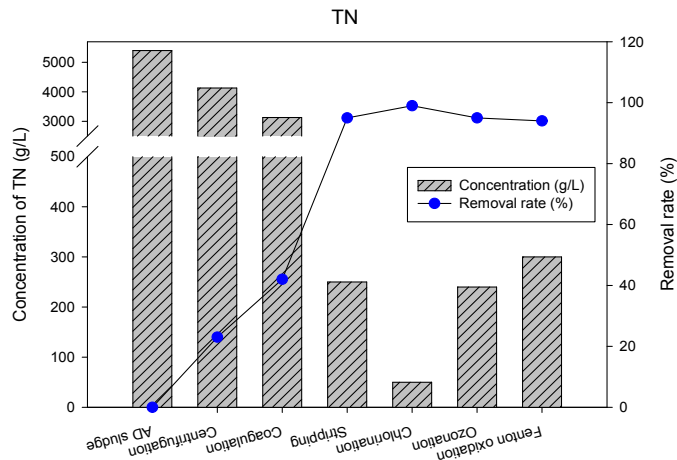
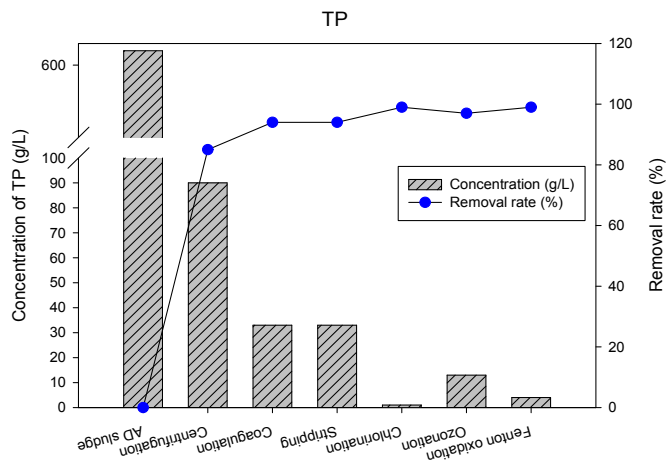
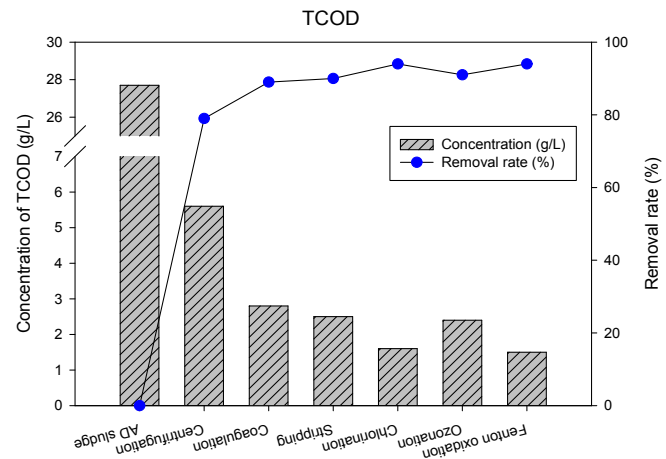
그림 114. 원심분리-응집-탈기-펜톤산화법 처리공정 단계별 제거효율.

표 68. 원심분리-응집-탈기-펜톤산화법 처리공정의 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (mg/L)	TN (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)
AD sludge	27.7	620	5,400	5,240
Centrifugation	5.6	90	4,130	4,150
Coagulation	2.8	33	3,130	3,690
Stripping	2.5	33	250	250
Fenton Oxidation	1.5	4	300	260

(34) 분석결과 유기물의 경우 최종제거효율이 94%로 높은 제거 효율을 보였지만 TN, NH₃-N의 경우 근소하지만 농도가 증가하였음. 이는 HACH사의 kit를 이용하여 분석을 함에 있어서 처리 후 용액내의 잔존하는 철염이 방해물질로 작용한 것으로 판단됨. 따라서 분석 시 철염의 제거가 필요함.

(35) 다음은 4단계에서 진행한 염소주입법, 오존산화법, 펜톤산화법의 유기물 및 영양염류의 제거효율을 비교하여 전공정 확립을 위한 처리방법을 비교함(그림 115 및 표 69).



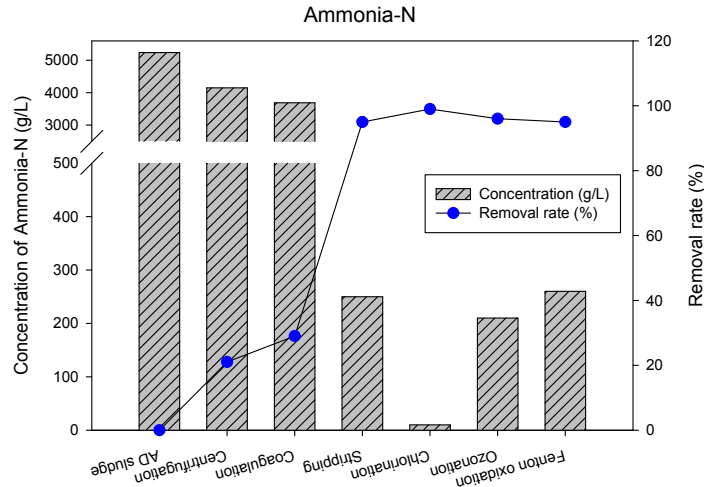


그림 115. 원심분리-응집-암모니아스트리핑-염소주입법 또는 오존산화법 또는 펜톤산화법 처리공정 단계별 제거효율

표 69. 원심분리-응집-암모니아스트리핑-염소주입법 또는 오존산화법 또는 펜톤산화법 처리공정의 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (mg/L)	TN (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)
AD sludge	27.7	620	5,400	5,240
Centrifugation	5.6	90	4,130	4,150
Coagulation	2.8	33	3,130	3,690
Stripping	2.5	33	250	250
Chlorination	1.6	1	50	10
Ozonation	2.4	13	240	210
Fenton Oxidation	1.5	4	300	260

- (36) 염소주입법, 오존산화법과 펜톤산화법을 비교해 본 결과 오존산화법보다는 염소주입법과 펜톤산화법으로 처리한 혐기소화액이 유기물, 총인, 총질소의 제거효율이 높았으며, 특히 염소주입법의 경우 총질소와 암모니아의 제거효율이 각각 99%로써 가장 높았음.
- (37) 하지만 본 연구의 최종 처리방법으로 미세조류의 배양이 있으므로 잔류염소가 존재하게 되고 미세조류의 영양분이 되는 질소가 적은 양으로 존재하는 염소주입법 보다는 펜톤산화법이 적절하다고 판단됨.

나. 통합공정 설치, 운전, 및 trouble shooting을 통한 최적화

- (1) 본 연구의 연구결과를 토대로 원심분리-응집-탈기-펜톤산화 총 4단계 공정으로 설치, 운전을 진행하였음.
- (2) 원심분리의 경우 험기소화액을 Hanil-SUPRA 30K를 이용하여 6000 rpm으로 30 min으로 진행하였으며, 응집의 경우 회수된 험기소화액을 jar test (JISICO, J-6S)를 이용하여 진행하였으며, pH 5로 조정 후, 1M FeCl₃의 응집제를 6 ml 투입하여 220 rpm, 30 sec의 급속교반, 75 rpm, 15 min의 완속교반, 1 hr 자연침강을 진행하였음. 이후 상등액을 회수하여 암모니아스트리핑을 packed tower aerator (Diameter 10.8 cm, Height 108 cm)를 이용하여 8 vvm의 공기주입량, 38℃, 6 hr의 반응시간으로 진행하였으며, 진행하였음. 펜톤산화의 경우 Heating mentle (SciLab, WCL-3)을 이용하여 온도는 50℃, 교반속도는 300 rpm으로 고정하여 1 hr 반응하여 회수하였음(그림 116).





그림 116. 원심분리-응집-암모니아스트리핑-펜톤산화법 통합공정의 사용기기.

- (3) 본 연구의 4단계의 물리화학적처리는 각각의 공정을 진행함에 있어서 원심분리를 제외한 모든 공정을 최적 pH로 조정 후에 반응을 하였음. 이 과정에 있어서 약품 소모량이 증가함. 또한, pH 5의 산성조건에서 진행한 응집 후에 자연침강으로 고액분리를 진행하여 상등액을 분리하지만, pH 11로 반응하는 탈기를 진행하기 때문에 pH가 증가함에 따라 철염의 침전물이 추가 발생하여 고액분리가 이중으로 진행되는 단점이 존재함.
- (4) 따라서, 이 과정에서의 trouble shooting이 필요하다고 판단하였으며 이를 해결하고자 펜톤산화를 진행 한 뒤, 시료를 pH 11로 증가시켜 잔존하고 있는 철염과 응집된 물질을 동시에 제거하고 탈기를 진행하는 3단계 물리화학적 처리공정으로 수정하였음(그림 117, 118 및 표 70).

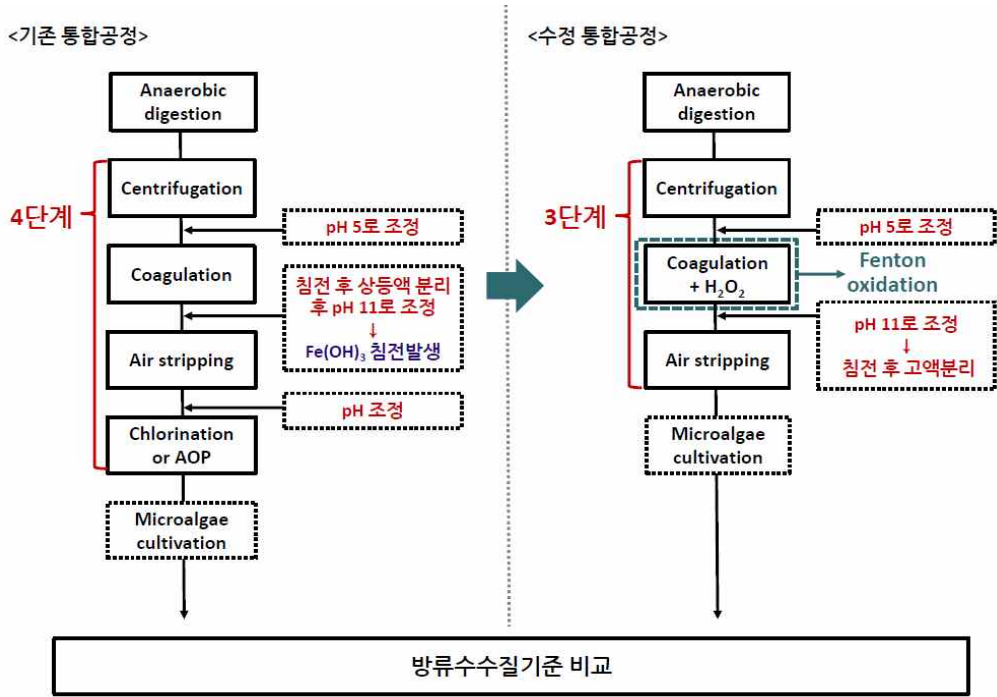


그림 117. 수정된 물리화학적처리 통합공정도.

1. AD_C (Anaerobic digestion+Centrifugation)
2. AD_C_C/F (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation)
3. AD_C_FT (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+H₂O₂) (Cf. FT: Fenton oxidation)
4. AD_C_FT_S (Anaerobic digestion+Centrifugation+Coagulation+H₂O₂+Air stripping)

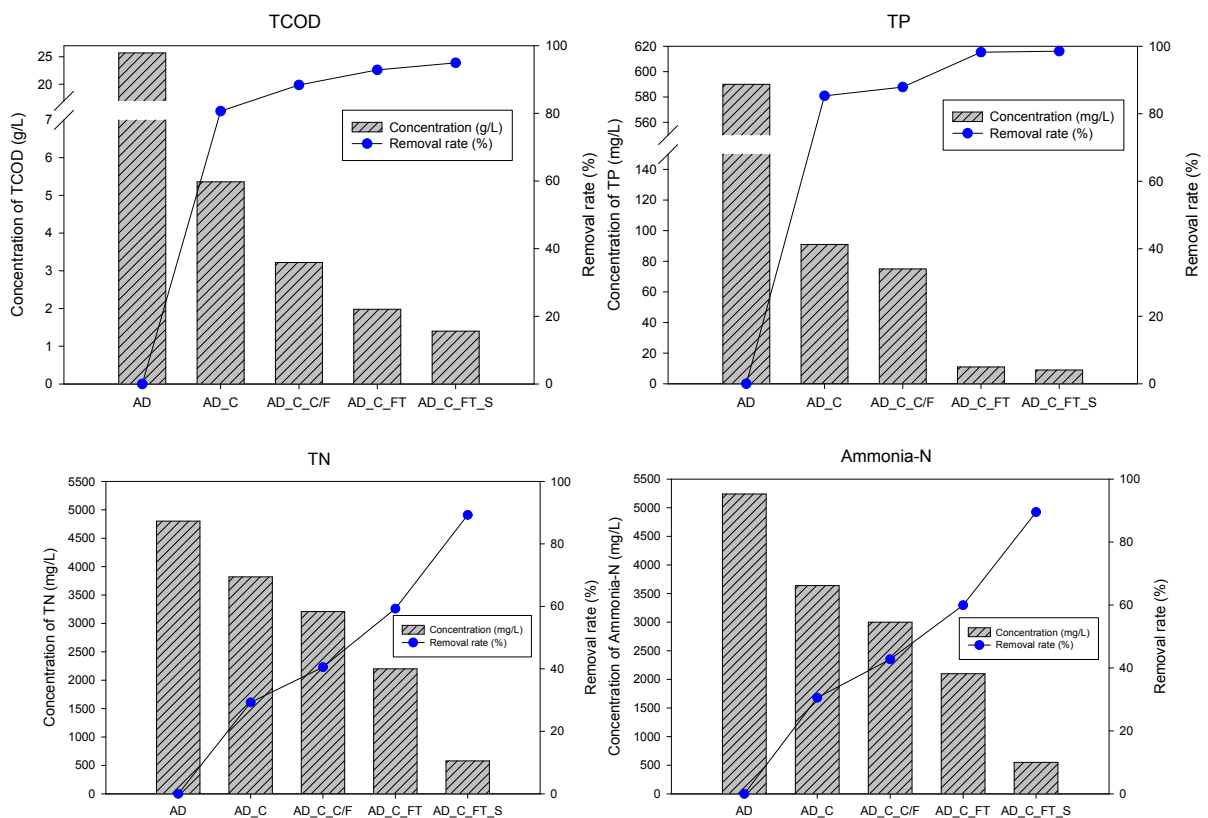


그림 118. 원심분리-펜톤산화법-탈기 처리공정 단계별 제거효율.

표 70. 원심분리-페톤산화법-암모니아스트리핑 처리공정의 각 항목별 결과.

Treatments	TCOD (g/L)	TP (mg/L)	TN (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)
AD_sludge	25.7	590	4,800	4,740
Centrifugation	5.36	91	3,820	3,640
Coagulation	3.22	75	3,210	3,000
Fenton Oxidation	1.98	11	2,200	2,100
Stripping	1.40	9	580	550

(6) 3단계 물리화학적 처리공정으로 실험을 진행한 결과 응집공정을 제거하였고 고액분리 단계가 한번으로 줄어들었기 때문에 총 반응시간이 1시간 이상 줄어들었으며, 제거효율의 경우 TCOD, TP, TN, NH₃ -N이 각각 95%, 99%, 89%, 89%이었음.

다. 통합공정의 성능평가(오염물질 제거능, 미세조류 배양 등)

- (1) 선행연구를 통해 각각의 물리화학적 처리방법으로 처리된 혐기소화액에 최종적으로 미세조류를 배양하여 통합공정의 성능평가를 진행함.
- (2) 본 연구에서는 BG-11 배지, BG-11 + glucose 배지 (이 두 가지 배지를 control이라 표시), 물리화학적 처리된 혐기소화액에 중온성 미세조류 *Desmodesmus communes* 를 접종하여, 27°C에서 11일 동안 배양하였으며, optical density (OD)와 specific growth rate (μ , d⁻¹; $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$)를 측정하여 미세조류의 생장을 관찰하였음(그림 119 및 표 71, 72). BG-11 배지, BG-11 + glucose (10 g/L) 배지의 경우 빛의 유무에 따른 미세조류의 생장을 알아보기 위하여 light, dark, light : dark (12 hr : 12 hr)의 조건으로 배양을 진행하였으며, 물리화학적 처리된 혐기소화액은 light : dark (12 hr : 12 hr)의 조건으로 배양을 진행하였음.

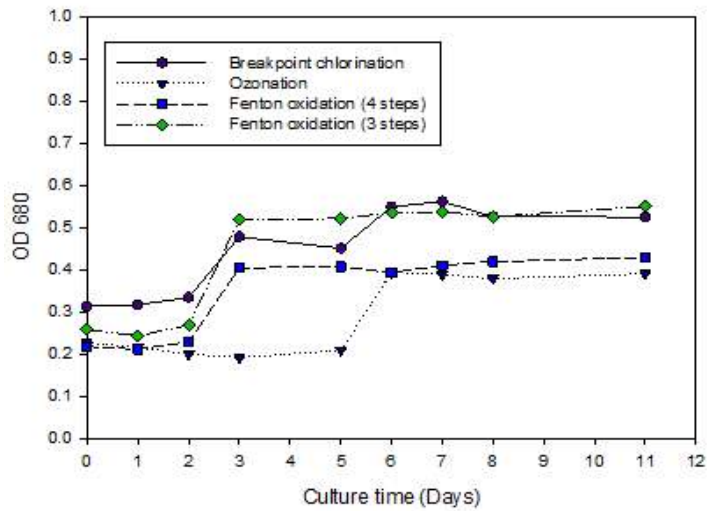
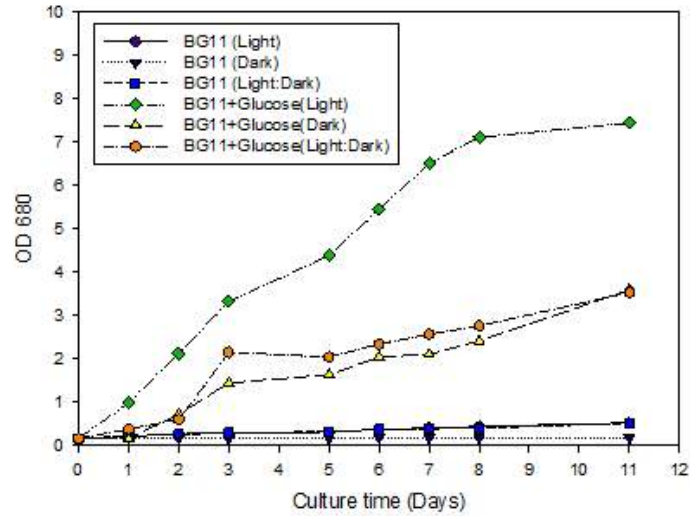


그림 119. 배지, 배양조건에 따른 미세조류 성장(위: control / 아래: 처리된 혐기소화액).

표 71. 배지, 배양조건에 따른 미세조류 성장분석결과(BG-11, BG-11 + glucose (10 g/L)).

Medium	Initial OD	Final OD	Specific growth rate μ (d^{-1})
BG11 (Light)	0.16	0.53	0.110
BG11 (Dark)	0.17	0.19	0.010
BG11 (Light : Dark)	0.17	0.52	0.101
BG11 + Glucose (Light)	0.17	7.45	0.344
BG11 + Glucose (Dark)	0.16	3.60	0.283
BG11 + Glucose (Light : Dark)	0.17	3.54	0.276

표 72. 배지, 배양조건에 따른 미세조류 성장분석결과(물리화학적 처리된 혐기소화액).

Medium	Initial OD	Final OD	Specific growth rate μ (d^{-1})
Breakpoint chlorination	0.31	0.53	0.049
Ozonation	0.23	0.39	0.048
Fenton oxidation (4 steps)	0.22	0.43	0.061
Fenton oxidation (3 steps)	0.26	0.55	0.068

- (3) 배양 후 optical density와 specific growth rate의 분석결과 control 배지에서는 BG-11 + glucose 배지 중에서 빛이 존재하는 배지에서의 final OD가 가장 높았으며 이때의 μ 값은 0.344이었음. 물리화학적 처리된 혐기소화액 배지에서는 3단계 물리화학적 처리를 한 경우 Final OD가 0.55이었으며, μ 값은 0.068로써 다른 3가지 처리된 혐기소화액보다 높았음.
- (4) 또한, TCOD, TN의 제거효율을 분석하여 각각의 배지와 조건에 따른 기대효과를 분석함(그림 120, 121 및 표 73 ~ 76).
- (5) L.F.A. de Mattos (2016)등은 사탕수수 찌꺼기가 존재하는 용액에 *Desmodesmus* sp.를 접종하여 30시간 배양한 경우 TCOD는 27 g/L에서 17.5 g/L으로 약 40%, TN의 경우 1.4 g/L에서 750 g/L으로 약 50%가 제거된다고 보고함.

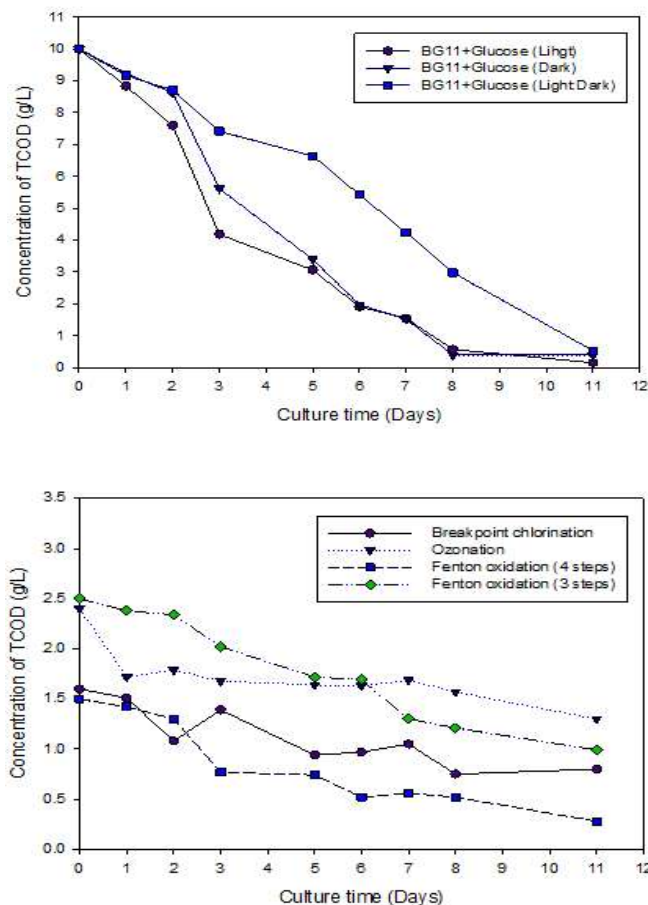


그림 120. 배지, 배양조건에 따른 TCOD제거 비교(위: control / 아래: 처리된 혐기소화액).

표 73. 배지, 배양조건에 따른 TCOD제거 분석결과(BG-11, BG-11 + glucose (10 g/L)).

Medium	Initial TCOD (g/L)	Final TCOD (g/L)	Removal rate (%)
BG11 + Glucose (Light)	10	0.15	98.5
BG11 + Glucose (Dark)	10	0.39	96.1
BG11 + Glucose (Light : Dark)	10	0.53	94.7

표 74. 배지, 배양조건에 따른 TCOD제거 분석결과(물리화학적 처리된 혐기소화액).

Medium	Initial TCOD (g/L)	Final TCOD (g/L)	Removal rate (%)
Breakpoint chlorination	1.6	0.8	50.0
Ozonation	2.4	1.3	45.8
Fenton oxidation (4 steps)	1.5	0.28	81.3
Fenton oxidation (3 steps)	2.5	0.99	60.4

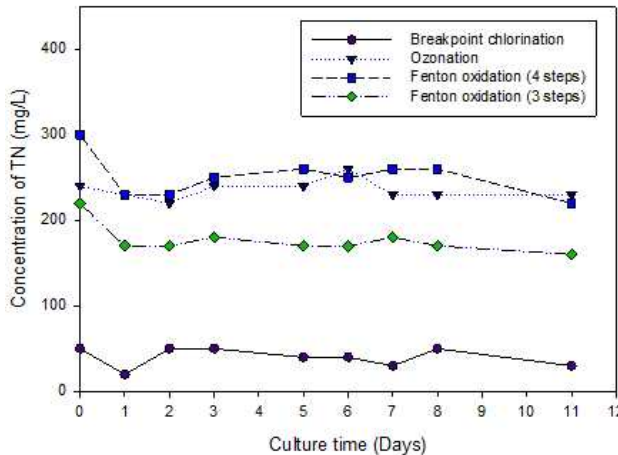
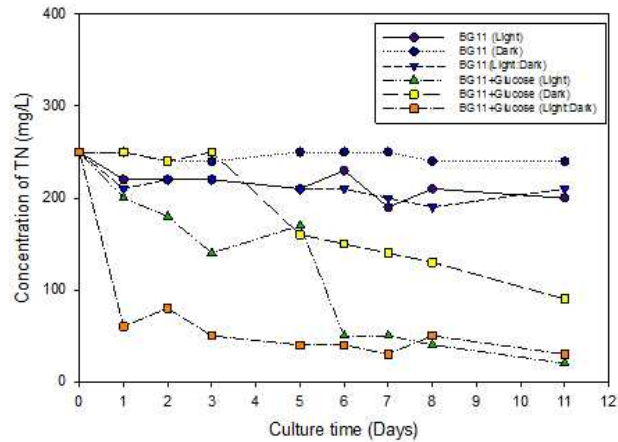


그림 121. 배지, 배양조건에 따른 TN 제거 비교(위: control / 아래: 처리된 혐기소화액).

표 75. 배지, 배양조건에 따른 TN제거 분석결과(BG-11, BG-11 + glucose (10 g/L)).

Medium	Initial TN (mg/L)	Final TN (mg/L)	Removal rate (%)
BG11 (Light)	250	200	20.0
BG11 (Dark)	250	240	4.0
BG11 (Light : Dark)	250	210	16.0
BG11 + Glucose (Light)	250	20	92.0
BG11 + Glucose (Dark)	250	90	64.0
BG11 + Glucose (Light : Dark)	250	30	88.0

표 76. 배지, 배양조건에 따른 TN제거 분석결과(물리화학적 처리된 혐기소화액).

Medium	Initial TN (mg/L)	Final TN (mg/L)	Removal rate (%)
Breakpoint chlorination	50	30	40.0
Ozonation	240	230	4.2
Fenton oxidation (4 steps)	300	220	26.7
Fenton oxidation (3 steps)	220	160	27.3

- (6) 배양 후 TCOD의 분석결과 control배지 중에서 BG-11 + glucose (light)배지의 제거 효율이 가장 높았지만 dark, light : dark 조건의 배지에서의 제거효율이 모두 94% 이상으로 높게 나타남. 물리화학적 처리된 혐기소화액 배지에서는 최종처리로 펜톤 산화를 진행한 혐기소화액에서의 TCOD 제거효율이 가장 높았으며, 4단계 물리화학적 처리 중 최종 처리로 펜톤산화를 진행한 경우 81%, 3단계 펜톤산화를 진행한 경우 60%이었음.
- (7) TN의 분석결과 control배지 중에서 BG-11 + glucose (light 조건에서 배양)배지의 제거효율이 가장 높았으며, light : dark 조건의 배지에서의 제거효율이 모두 88% 이상으로 높게 나타남. 물리화학적 처리된 혐기소화액 배지에서는 최종처리로 염소주입법을 진행한 혐기소화액에서의 TN 제거효율이 가장 높지만 제거된 TN의 양이 20 mg/L로 낮았으며, 펜톤산화를 진행한 경우의 제거된 TN의 양이 상대적으로 많았음.

15. 가축분뇨 혐기소화 전 공정운전 기준 작성

가. 통합공정의 설계 인자 및 운전 기준 작성

- (1) 본 연구의 연구내용 중 pilot plant 설치에 따른 설계 인자 및 운전 기준 작성사항이 존재하지만 pilot plant가 운영되지 못함에 따라 연구실 내에서 scale up을 통한 통합공정을 설계 및 운영함.
- (2) 가축분뇨의 혐기소화의 경우 기존 연구실에서 운영 중인 1상 단일 혐기소화조를 이용하였음. 저장조의 크기는 ID 29 cm, H 39 cm이며 72 rpm으로 교반하였음. 혐기소화조의 크기는 ID 38 cm, H 46 cm이며 37°C에서 50 rpm으로 교반하였음. 침전조의 경우 ID 29 cm, H 39 cm이며 침전조에 저장된 혐기소화액은 회수하여 20 L 말통에 보관하였음.
- (3) 물리화학적처리 통합공정의 첫 번째 단계인 원심분리의 경우 기존 연구에서 사용한 Hanil-SUPRA 30K를 이용하여 6000 rpm으로 30 min 진행하였으며, 두 번째 단계인 펜톤산화의 경우 항온계와 pH meter가 부착되어있는 ID 20 cm, H 30 cm의 반응기에 원심분리로 고액분리가 된 혐기소화액을 50°C, pH 5, 300 rpm의 조건으로 1 hr 반응하였음.
- (4) 펜톤산화가 완료된 혐기소화액은 암모니아스트리핑을 진행하기 위해 NaOH를 주입하여 pH11로 조정하고 자연침강을 진행하여 응집물질 및 반응 후 남아있는 철염을 제거하였음. 이후, 펌프 (Green Tech, GP-100)를 사용하여 침전된 슬러지는 제거하였으며, 혐기소화액의 상등액을 탈기탑으로 이동함.
- (5) 탈기탑을 이용한 암모니아스트리핑의 경우 ID 10.8 cm, H 108 cm의 반응기에 에어펌프 (고성밸브, LP-40A)를 이용하여 8 L/min으로 공기를 주입하였고, 6 hr 반응을 진행하였음.
- (6) 처리가 완료된 혐기소화액은 펌프를 사용하여 ID 20 cm, H 30 cm의 저장조에 이동하여 저장하였으며, 설계된 통합공정과 모식도는 아래의 그림 122, 123에 제시함.



그림 122. 가속분뇨 혐기소화액 처리를 위한 통합공정.

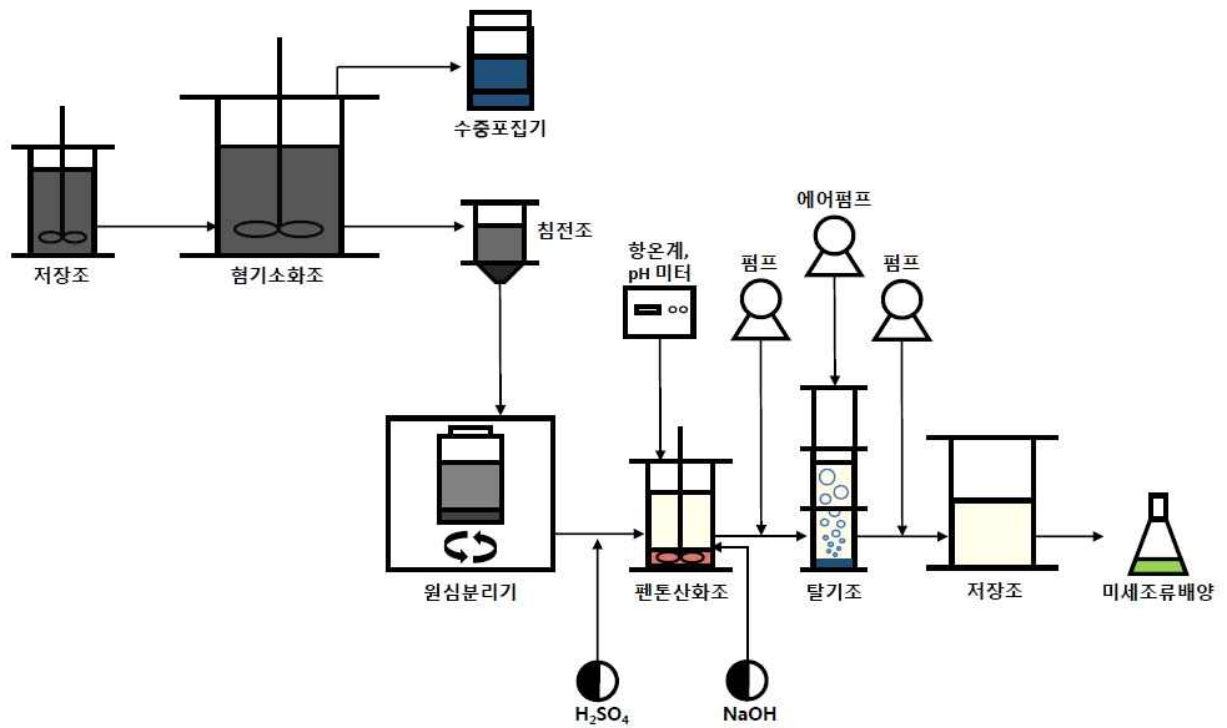


그림 123. 가속분뇨 혐기소화액 처리를 위한 통합공정 모식도.

16. 부하변동에 따른 혐기소화 조건의 최적화 및 소화 성능 평가
- 가. 가축분뇨의 1상 혐기소화 기본조건: 37°C, HRT (20일)
 - 나. 혐기소화조의 TS, VS, TN, TP, TCOD, SCOD, NH_4^+-N , $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$, VFA의 제거율: TS = 47.02%, VS = 53.02%, TCOD = 70.04%, SCOD = 86.01%, TN = 8.44%, TP = 18.05%, NH_4^+-N = 16.74%, $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ =26.95%, VFA = 74.4%
 - 다. 혐기소화조 CH_4 가스 산출 : CH_4 production rate 988 ml/L·day, CH_4 yield 210 ml $\text{CH}_4/\text{g COD}_{\text{add}}$, CH_4 yield 400 ml $\text{CH}_4/\text{g VS}_{\text{add}}$
17. 여러 가지 암모니아 제거 기술 개발 및 최적 기술 적용을 통한 가축분뇨의 암모니아 농도 조절
- 가. 암모니아 스트리핑: 암모니아제거율 76% (조건 pH 10.0), 암모니아제거율78% (4 LL - min^{-1})
 - 나. 염소파괴점 주입: 암모니아제거율 45% (조건 염소와 암모니아 비 20배)
 - 다. Struvite 형성: 암모니아 제거율은 3.5% (조건 Mg^{2+} 이 PO_4^{3-} 의 1.2배양 주입)
 - 라. 암모니아 제거방법에서는 암모니아스트리핑의 제거율이 염소파괴점 주입보다 2배 이상 높으며 염소파괴점 주입 시 염소가 암모니아만을 제거하는데 사용되는 것이 아니라 대부분 유기물을 제거하는데 사용됨으로 암모니아스트리핑이 더 적절하였음.
 - 마. 또한 struvite 침전을 통한 암모니아 제거율은 3.5%밖에 나오지 않았으며 초기 암모니아 농도가 높고 struvite가 형성되는 암모니아 분자의 분자량이 낮고 인의 양도 부족하며 추가적으로 Mg^{2+} 의 양을 넣어 줄 경우 경제적으로 고려해야 되기 때문에 암모니아 스트리핑이 더 적절하였음.
18. 색도물질을 염소, 오존, UV 등을 이용하여 색도제거 기술 개발
- 가. 혐기소화액의 색도 제거의 경우 오존의 경우 74.4%, 염소처리의 경우 65%, 펜톤산화의 경우 63.6%로 효율은 오존처리의 경우가 양호하였음.
 - 나. 그러나 단순 색도효율만을 고려할 것이 아니라 색도 처리시 발생하는 잔류산화제 및 기타 성분들에 의해 미세조류 성장에 저해가 되는 요소들을 고려해야 한다고 판단하였음.
 - 다. 색도가 제거되지 않은 혐기소화액에서는 성장하지 못하였고 색도의 농도가 높은 혐기소화액에서 역시 미세조류는 성장하지 못하였음. 결과적으로 희석의 경우는 색도가 76 mg/LPt-Co 이상, 처리 수의 경우는 64 mg/LPt-Co 이상의 색도가 되어야함.
 - 라. 염소처리과정에서 발생한 잔류염소를 제거한 결과 활성탄의 경우 36.8%, 환원제의 경우 94%로 잔류염소제거기술은 환원제의 경우가 효율이 높았음.
 - 마. 잔류염소가 제거되지 않은 혐기소화액에서는 성장하지 못하였고 잔류염소의 농도가 높은 혐기소화액에서 역시 미세조류는 성장하지 못하였음. 결과적으로 67 mg/LPt-Co 이상의 색도가 되어야함.
 - 바. 혐기소화 후 암모니아 제거와 색도 제거를 진행한 경우의 SCOD, TN, Ammonia-N, Color 제거율은 염소처리 과정에서 60.57%, 22.58%, 32.26%, 55.86%를, 암모니아 스트리핑 과정에서 24.59%, 64.52%, 78.39%, 24.83%를 달성하였음. 염소처리 과정에서는 유기물과 색도의 제거 효과가, 암모니아 스트리핑 과정에서는 암모니아 제거 효과가 뛰어났음.

19. 암모니아 제거 전처리, 혐기소화, 색도제거 후처리를 결합한 전공정의 가동 및 운전 최적화
가. 암모니아 스트리핑과 염소처리 공정이 결합된 ABC process (후처리 공정)의 경우 63%의 SCOD, 67%의 TN, 79.7%의 NH₃-N, 57.9%의 color 제거 효과를 얻을 수 있었음.

20. 혐기소화 전공정 pilot plant가동, trouble shooting, 성능평가 자료 확보

가. Pilot plant 미설치로 인하여 연구실 수준으로 실험을 진행하였음.

나. 여러 가지 물리화학적 처리를 4단계로 순차적으로 진행하여 유기물 및 영양물질을 제거하였음.

다. 4단계 물리화학적 처리공정의 경우 단 단계별 pH 조절이 잦아 약품소모량이 증가한다는 단점이 있어, 이를 보완하고자 3단계 물리화학적 처리공정도 실시하였음.

(1). 4단계 물리화학적 처리공정

(가) 원심분리-응집-암모니아스트리핑-염소주입: TCOD, TP, TN, NH₃-N 제거효율이 각각 94%, 99%, 99%, 99%이었음.

(나) 원심분리-응집-암모니아스트리핑-오존처리: TCOD, TP, TN, NH₃-N 제거효율이 각각 91%, 97%, 95%, 96%이었음.

(다) 원심분리-응집-암모니아스트리핑-펜톤산화: TCOD, TP, TN, NH₃-N 제거효율이 각각 94%, 97%, 94%, 95%이었음.

(2). 3단계 물리화학적 처리공정

(가) 원심분리-펜톤산화-암모니아스트리핑: TCOD, TP, TN, NH₃-N 제거효율이 각각 91%, 96%, 96%, 97%이었음.

마. 물리화학적 처리공정 다음 단계로 미세조류 배양단계가 있으므로 적정량의 유기물 및 무기물이 필요할 것으로 판단함. 또한 처리 소요시간이 가장 짧으며, 산, 염기의 약품소모량이 가장 적은 3단계 물리화학적 처리공정을 최적 통합공정으로 선정하였음.

바. 물리화학적 처리된 혐기소화액에 미세조류 배양 시, 3단계 물리화학적 처리를 한 경우 Final OD가 0.55이었으며, μ 값은 0.068로써 다른 3가지 처리된 혐기소화액보다 높았음. 이때의 TCOD, TN 제거율은 각각 60%, 30%이었음.

사. 결과적으로 TP, TN, TSS의 경우 방류수 수질기준을 달성할 것으로 판단되나, TCOD의 경우 아직 그 수준에 도달하지 못하였음.

21. 가축분뇨 혐기소화 전공정 운전 기준 작성

가. 통합공정의 경우 Pilot plant 미설치로 인하여 연구실내에서 scale up을 통하여 설계 인자 및 운전 기준을 작성함.

22. ArM0029 균주의 분자생물학적 동정

가. Ribosomal DNA인 SSU 염기서열 분석 결과, *Chlorella* 속에 속하는 미세조류로 분석됨

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. NDem.9/21.T-13d.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3160	3160	97%	0.0	99%	AY197628.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. MDL4-1.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3160	3160	97%	0.0	99%	AY197624.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. NMX17N.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3155	3155	97%	0.0	99%	JF767012.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. V111.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3155	3155	97%	0.0	99%	FJ946884.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. NJ-18.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3155	3155	97%	0.0	99%	DQ377324.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium inermum</i> genes for SSU rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, LSU rRNA, culture collection: NIES 2171	3149	3149	97%	0.0	99%	AB731604.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. V14.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3149	3149	97%	0.0	99%	FJ946885.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. EO5-4C.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3145	3145	97%	0.0	99%	FJ946889.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. WO10-1.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3145	3145	97%	0.0	99%	FJ946896.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. NIES-2171.18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	3140	3140	97%	0.0	99%	JX889641.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella vulgaris</i> genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, culture collection CCZ	3140	3140	97%	0.0	99%	FR865683.1
<input type="checkbox"/> <i>Micractinium</i> sp. CCAP 211/11F.18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, and 28S rRNA gene (partial), strain CCAF	3133	3133	97%	0.0	99%	FM260877.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella vulgaris</i> strain CCAP 211/11F.18S ribosomal RNA gene, complete sequence	3125	3125	97%	0.0	99%	AY591515.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella sorokiniana</i> strain AnSeonq4.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3121	3121	97%	0.0	99%	KF864472.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. ZJU0204.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3121	3121	97%	0.0	99%	JX097056.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. IFRPD.1018 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	3121	3121	97%	0.0	99%	AB260898.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. IFRPD.1014 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	3121	3121	97%	0.0	99%	AB260897.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella sorokiniana</i> 18S rRNA gene, strain UTEX 2805	3121	3121	97%	0.0	99%	AM423162.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella sorokiniana</i> 18S rRNA gene, strain SAG 211-8k	3118	3118	97%	0.0	99%	XG2441.2
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella sorokiniana</i> genes for SSU rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, LSU rRNA, culture collection: NIES 2173	3116	3116	97%	0.0	99%	AB731602.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella sorokiniana</i> genes for SSU rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, LSU rRNA, culture collection: NIES 2173	3116	3116	97%	0.0	99%	AB731601.1
<input type="checkbox"/> <i>Chlorella</i> sp. V12.18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3116	3116	97%	0.0	99%	FJ946883.1
<input type="checkbox"/> <i>Actinostromum hantzschii</i> 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain CCAP 2003	3116	3116	97%	0.0	99%	FM205884.1

그림 124. ArM0029 SSU 염기서열의 Blastn 검색 결과.

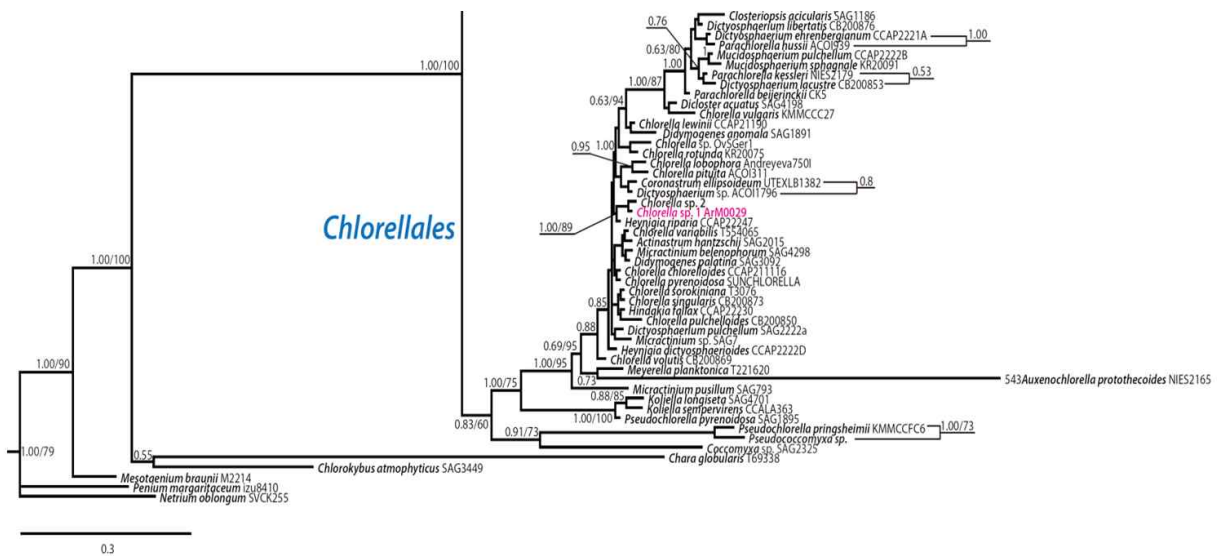


그림 125. ArM0029 SSU 서열을 기반으로 한 계통분류연구 결과.

나. ArM0029 균주의 온도별 성장률 분석

(1) 4, 8, 12, 20°C 총 4개의 온도 조건에서 20°C를 제외한 모든 온도에서 지속적인 성장을 보임.

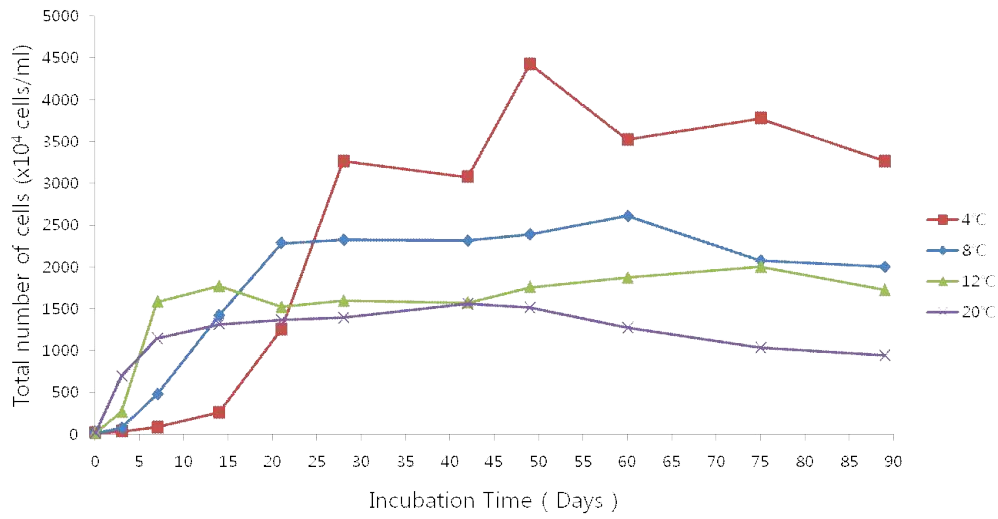


그림 126. ArM0029의 온도별 성장률 측정.

(2) 담수배지 (BBM, TAP)와 해수배지 (F/2)를 대상으로 한 최적배지 탐색 결과, 두 종의 담수배지에서 높은 성장률을 보이는 것으로 측정됨.

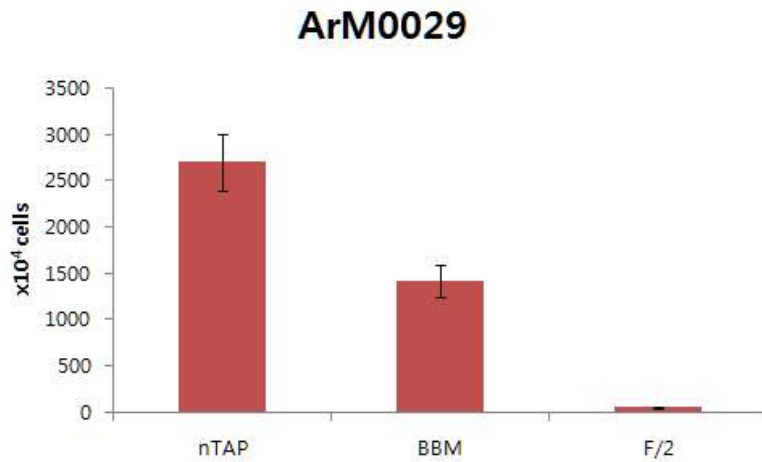


그림 127. ArM0029의 배지별 성장률 측정.

23. ArM0029 균주의 지질성분 분석

가. 미세조류의 지질함유 여부를 정성적으로 분석하기 위하여, ArM0029를 Nile Red를 사용하여 염색한 결과, 지질을 함유하는 것으로 판단되는 노란색 및 갈색 부분이 세포 전반에서 관찰되어 지질함유 미세조류로서 판단함.

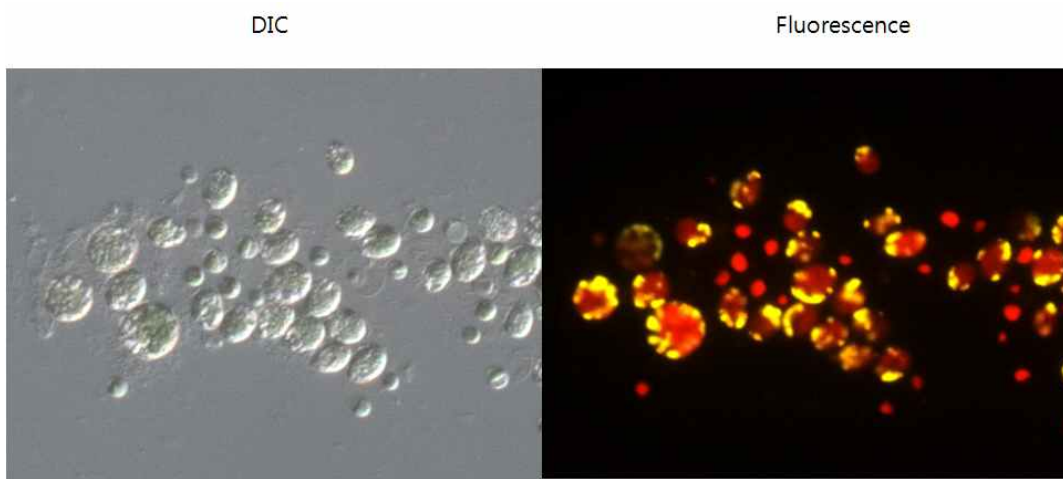


그림 128. ArM0029 미세조류의 정성적 지질함량 분석.

나. FAME C8-C24 mix standard를 기준으로 한 ArM0029의 지질분석을 gas chromatography 방법으로 분석한 결과, 바이오디젤의 공급원이 될 수 있는 가능성이 높은 C16 : 0 (palmitic acid), C18 : 0 (oleic acid) 지방산이 비교적 높은 수치로 검출되었음. 또한 인간 면역시스템을 조절하는 호르몬의 전구체, 가축분뇨 혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도 배양기술 개발로서 사용 가능한 C18 : 3 (linolenic acid) 지방산 역시 높은 수치로 검출되어 바이오디젤 이외의 고부가 가치의 물질을 생산하는데 유용한 미세조류라고 판단됨.

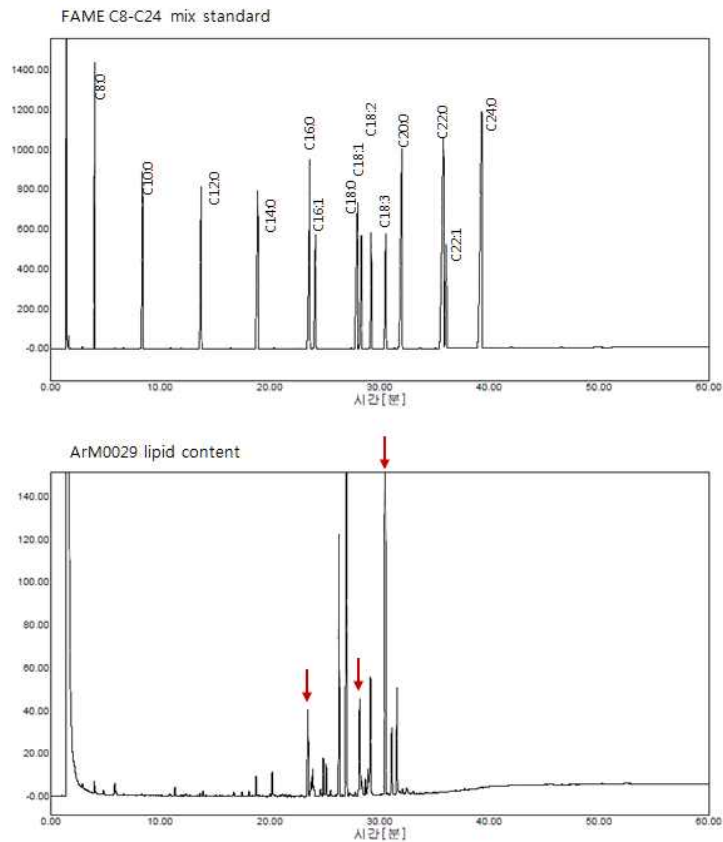


그림 129. Gas-chromatography를 이용한 ArM0029의 지질성분 프로파일 분석.

다. LC-MS 분석을 통한 세밀한 ArM0029 균주의 지질성분 분석시, phospholipid, triglyceride (TG), diglyceride (DG) 성분이 wild-type *Chlamydomonas* sp.인 CC-125 균주보다 약 5배 이상 함유된 것으로 분석됨.

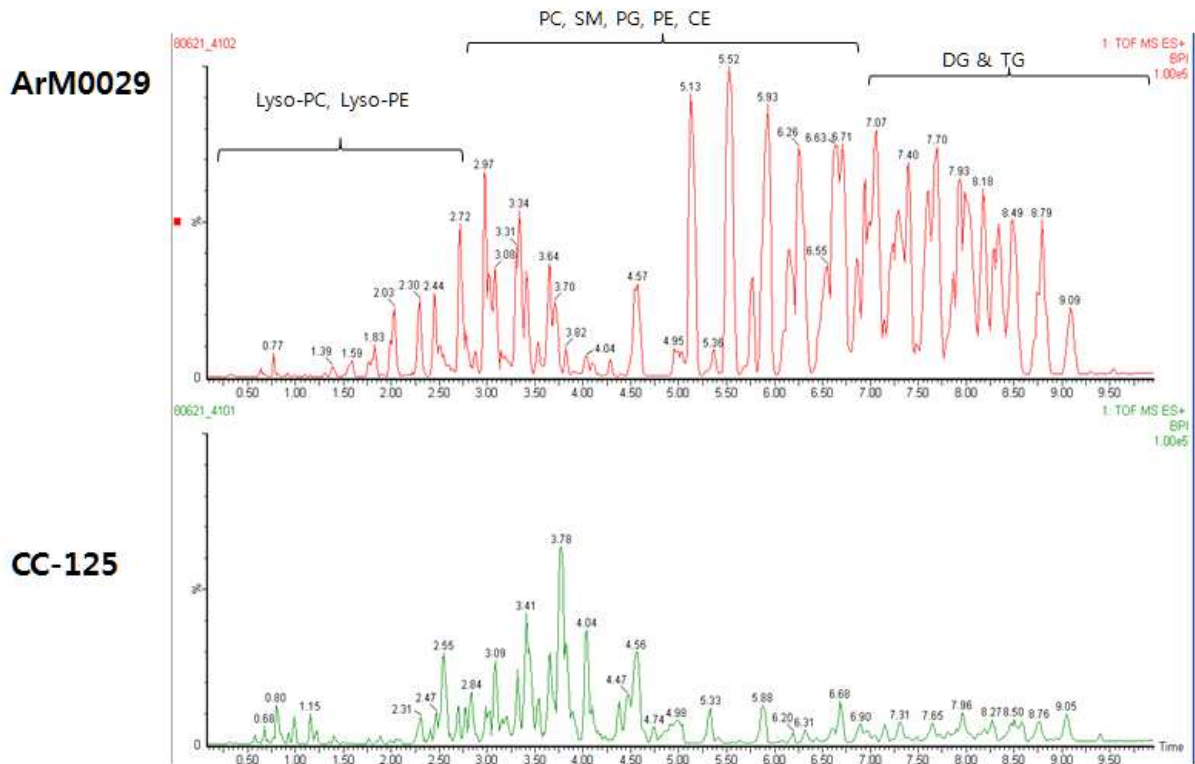
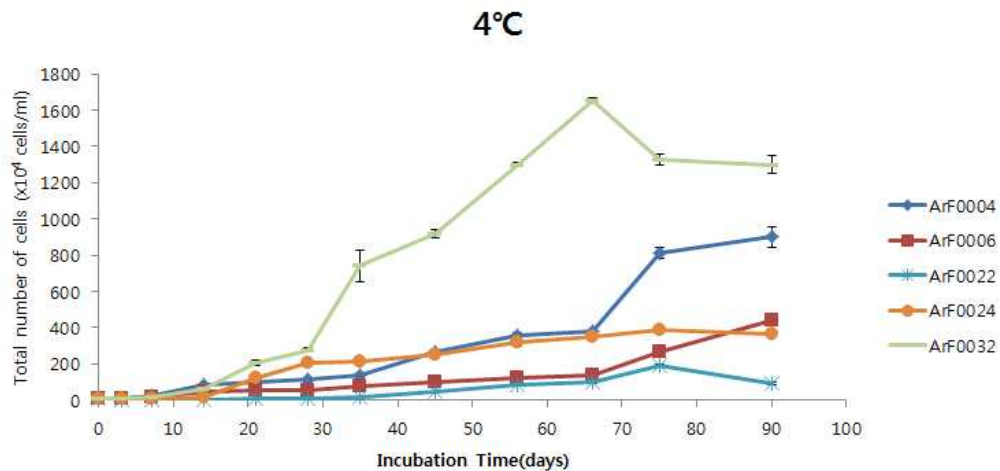


그림 130. LC-MS 분석을 통한 ArM0029의 지질성분 분석.

24. 고밀도 배양을 위한 우량균주 추가선별

가. 총 240종의 극지 미세조류를 대상으로 온도별, 배지별 성장패턴 분석한 결과, ArF0004, ArF0006, ArF0022, ArF0024, ArF0032 총 5종의 성장 우량균주 선별하였음.



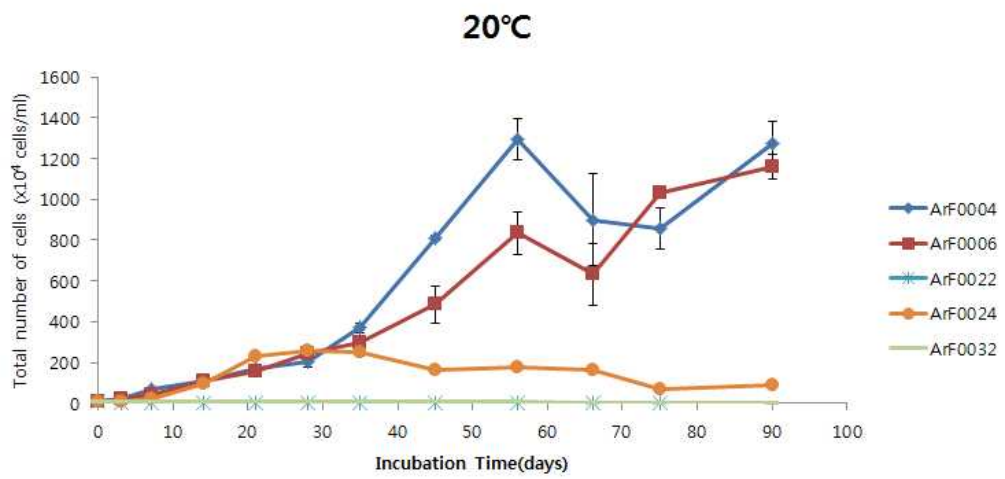
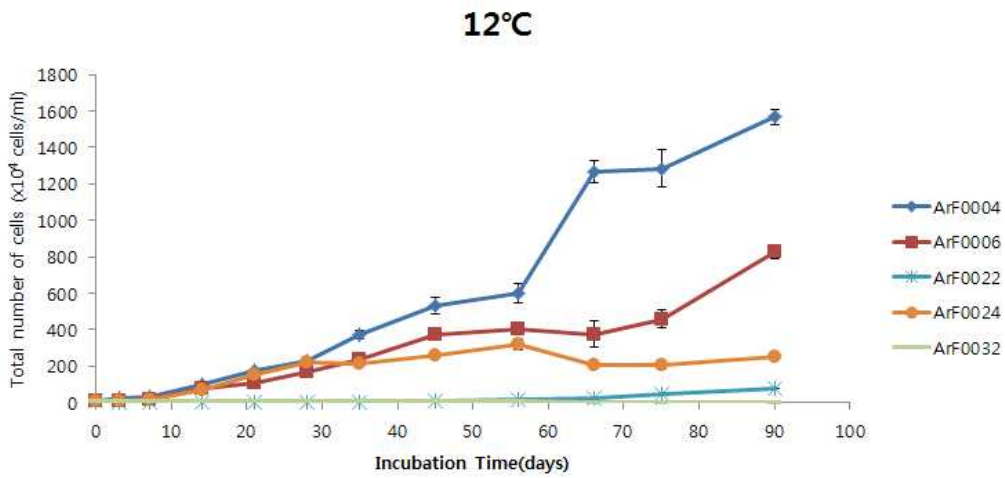
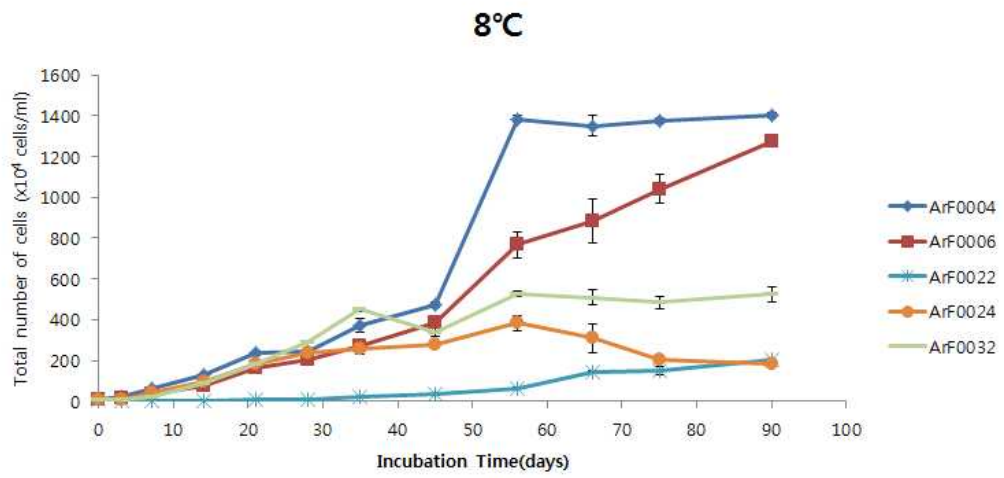


그림 131. 우량균주 5종의 온도별 성장패턴 분석.

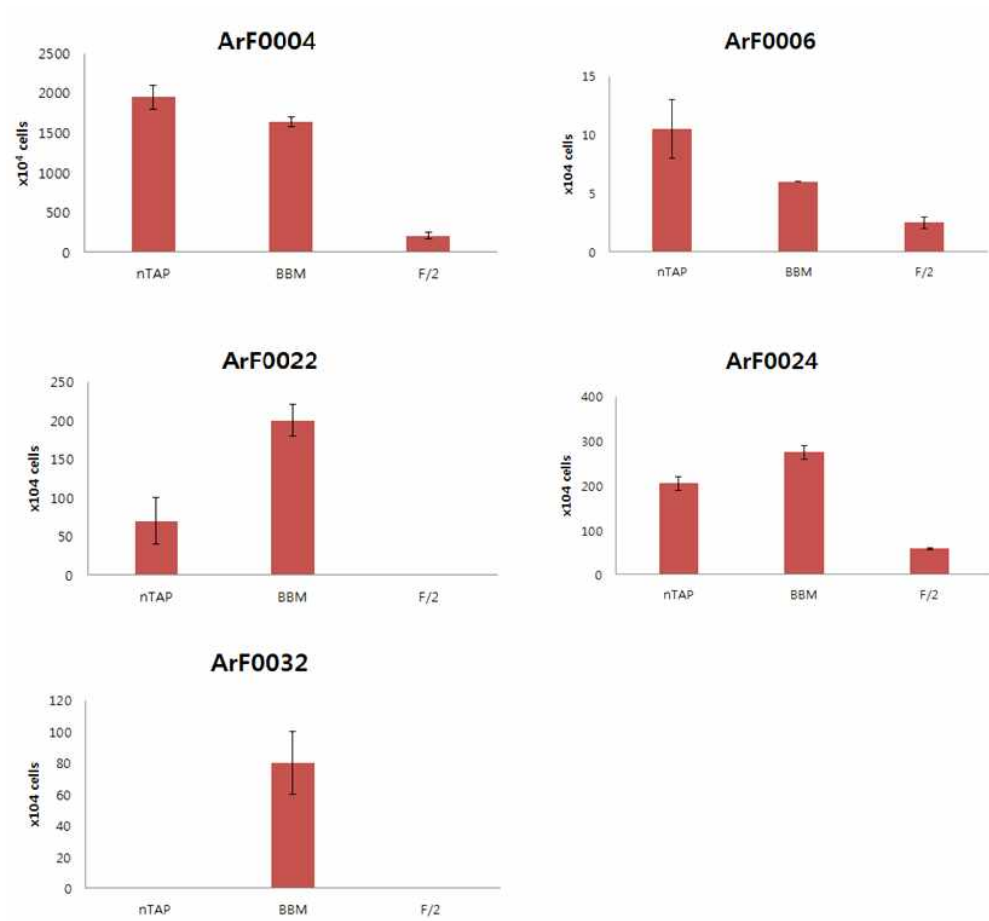


그림 132. 우량균주 5종의 배지별 성장패턴 분석.

나. Nile Red 염색을 총 5종의 선발 우량균주를 대상으로 수행한 결과, 노란색 및 갈색 세포가 발견되어 추후 고농도 지질을 유도하기 위한 배지에서 배양 시 고농도 지질을 생산할 수 있는 가능성이 높은 균주로 판단되었음.

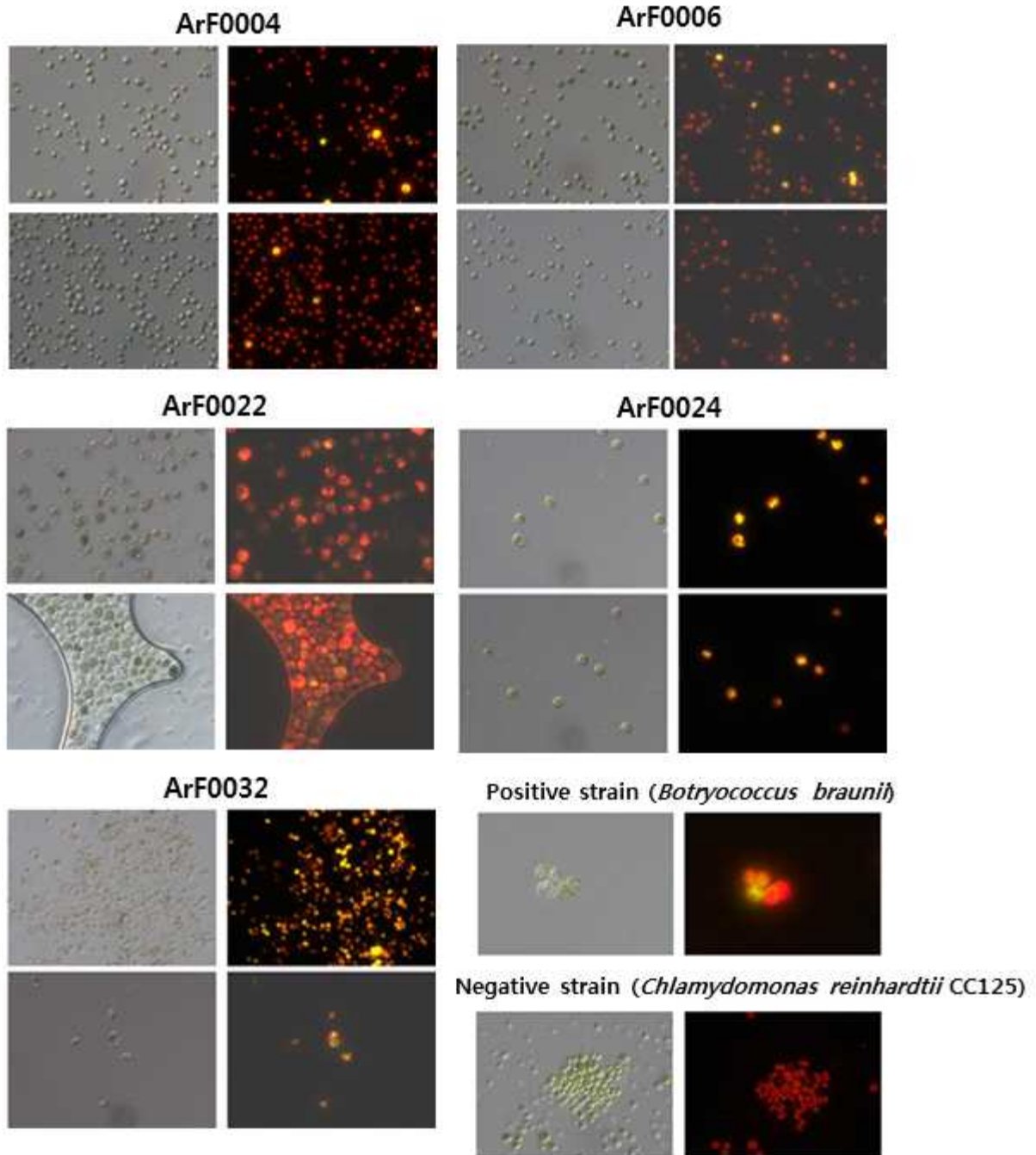


그림 133. Nile Red 염색을 통한 우량균주 5종의 정성적 지질성분 분석.

25. 농축산 폐수에서 선별 미세조류의 배양 최적화 모사

- 가. 실험실 수준에서의 극지 미세조류 ArF0024 균주의 생산 최적화를 위한 최적배지 연구를 통계적 방법을 사용하여 수행함.
- 나. 기본 배지인 TAP 배지를 사용하여 배지의 각 성분들 중에서 하나씩 제거한 배지를 사용하여 유효성분을 선정하는 Elimination method 분석 결과, 유의확률 0.05 미만에서 모든 성분이 positive effect를 주는 것으로 파악됨.

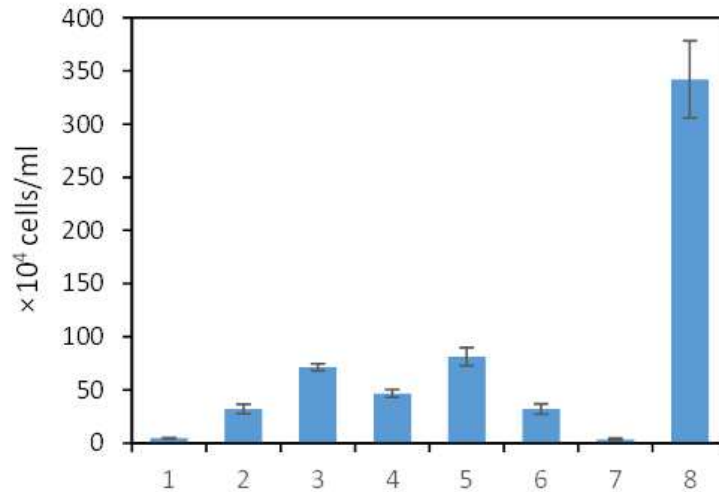


그림 134. TAP 배지의 각 성분을 제외한 ArF0024 미세조류 균주의 배양결과.

TAP 배지에서 Tris base (1), Ammonium chloride (2), Magnesium sulfate (3), Calcium chloride (4), Potassium phosphate (5), Trace elements (6), Acetic acid (7)를 제외하여 배양한 후 세포수를 측정 비교함.

표 77. ArF0024 미세조류 균주에 대한 Elimination 결과.

Variable	Component	-value (g/L)	+value (g/L)	Effect	T statistics	P value
X ₁	Tris base	0	2.42	337.3	17.77	0.000
X ₂	NH ₄ Cl	0	0.375	310.0	16.33	0.000
X ₃	MgSO ₄	0	0.1	270.7	14.26	0.000
X ₄	CaCl ₂	0	0.05	295.3	15.56	0.000
X ₅	Potassium phosphate	0	0.432	260.7	13.73	0.000
X ₆	Trace elements	0	0.0977	310.0	16.33	0.000
X ₇	AcOH	0	1	338.3	17.82	0.000

- 다. Plackett-Burman method를 적용하여 positive effect를 부여하는 component를 선정하는 실험을 수행함. 이를 위하여 유효성분 7종의 농도를 각각 기존농도의 2배로 높여서 정밀하게 유효성분을 탐색함.
- 라. 유의확률 0.05 미만에서 Trace element는 non-significant component로 나타났으며, Tris base, Ammonium chloride, Magnesium sulfate, Acetic acid의 4개 성분은 negative effect를 보였고, Calcium chloride, Potassium phosphate의 2개 성분은 positive effect를 보이는 것으로 조사되었음.

표 78. ArF0024 미세조류 균주에 대한 Plackett-Burman method 결과.

Variable	Component	-value (g/L)	+value (g/L)	Effect	T statistics	P value
X ₁	Tris base	0.484	4.84	-30.58	-5.54	0.000
X ₂	NH ₄ Cl	0.075	0.75	-12.48	-2.26	0.036
X ₃	MgSO ₄	0.02	0.2	-65.72	-11.91	0.000
X ₄	CaCl ₂	0.01	0.1	30.93	5.60	0.000
X ₅	Potassium phosphate	0.0864	0.864	25.37	4.60	0.000
X ₆	Trace elements	0.1954	0.1954	-7.83	-1.42	0.173
X ₇	AcOH	0.2	2	-67.82	-12.29	0.000

- 마. Box-Behnken design을 이용한 상호작용을 고려한 최적조건을 탐색하기 위하여, Plackett-Burman method에서 찾은 6개의 유효성분들의 상호작용을 함께 분석하기 위하여 positive effect를 보인 2개의 성분 (Calcium chloride, Potassium phosphate)은 기존 투입량 의 2배로, negative effect를 보인 4개의 성분 (Tris base, Ammonium chloride, Magnesium sulfate, Acetic acid)은 기존 투입량으로 하여 Box-Behnken design 방법을 수행함. 예상 세포농도는 $[23 - 42X_1 + 461X_2 + 404X_3 + 7404X_4 + 85X_5 - 80X_6 - 32X_1^2 - 1838X_2^2 - 5655X_3^2 - 62157X_4^2 - 97X_5^2 - 468X_6^2 + 382X_1X_2 - 19X_1X_3 + 64X_1X_4 + 3X_1X_5 + 251X_1X_6 + 3742X_2X_3 + 256X_2X_4 - 7X_2X_5 + 28X_2X_6 - 2167X_3X_4 - 38X_3X_5 - 42X_3X_6 - 1320X_4X_5 - 51X_4X_6 + 265X_5X_6] \times 10^4$ cells/ml 로 분석되었음.

(X₁ = Tris base, X₂ = Ammonium chloride, X₃ = Magnesium sulfate, X₄ = Calcium chloride, X₅ = Potassium phosphate, X₆ = Acetic acid).

- 사. 상기 분석방법에 의해 도출된 ArF0024 미세조류 균주의 최적배지 조성 및 농도는 표 79와 같으며, 이때 미세조류 세포의 농도는 5.8×10^6 cells/ml로 계산되었음.

표 79. ArF0024 미세조류 균주의 최적배지 조성 및 농도.

Variable	Component	Concentration (g/L)
X ₁	Tris base	2.42
X ₂	NH ₄ Cl	0.375
X ₃	MgSO ₄	0.1
X ₄	CaCl ₂	0.05
X ₅	Potassium phosphate	0.86
X ₆	Trace elements	0.0977
X ₇	AcOH	0.81

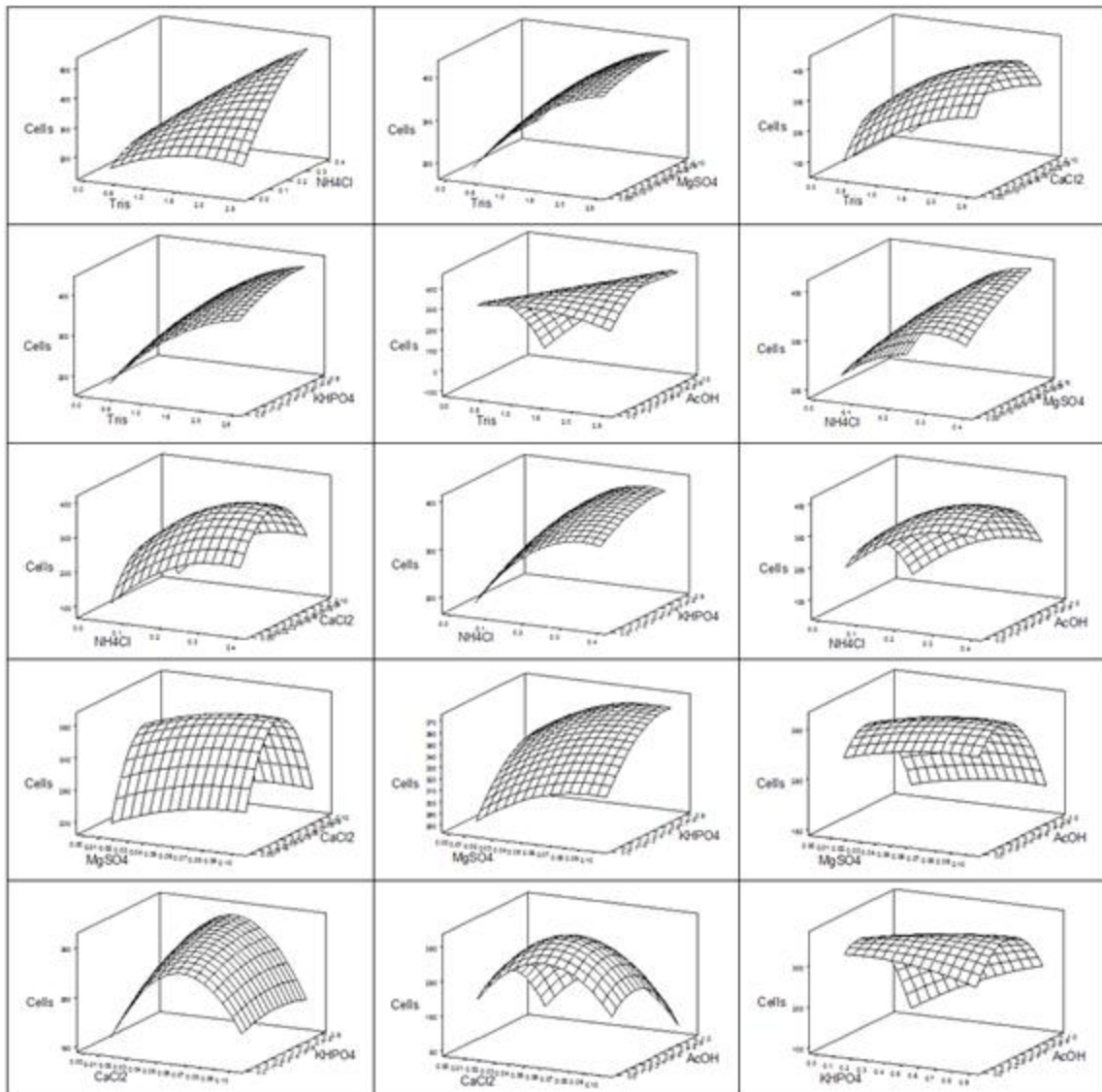


그림 135. ArF0024 미세조류 균주에 대한 유효성분의 효과를 도시하는 surface plot 결과.

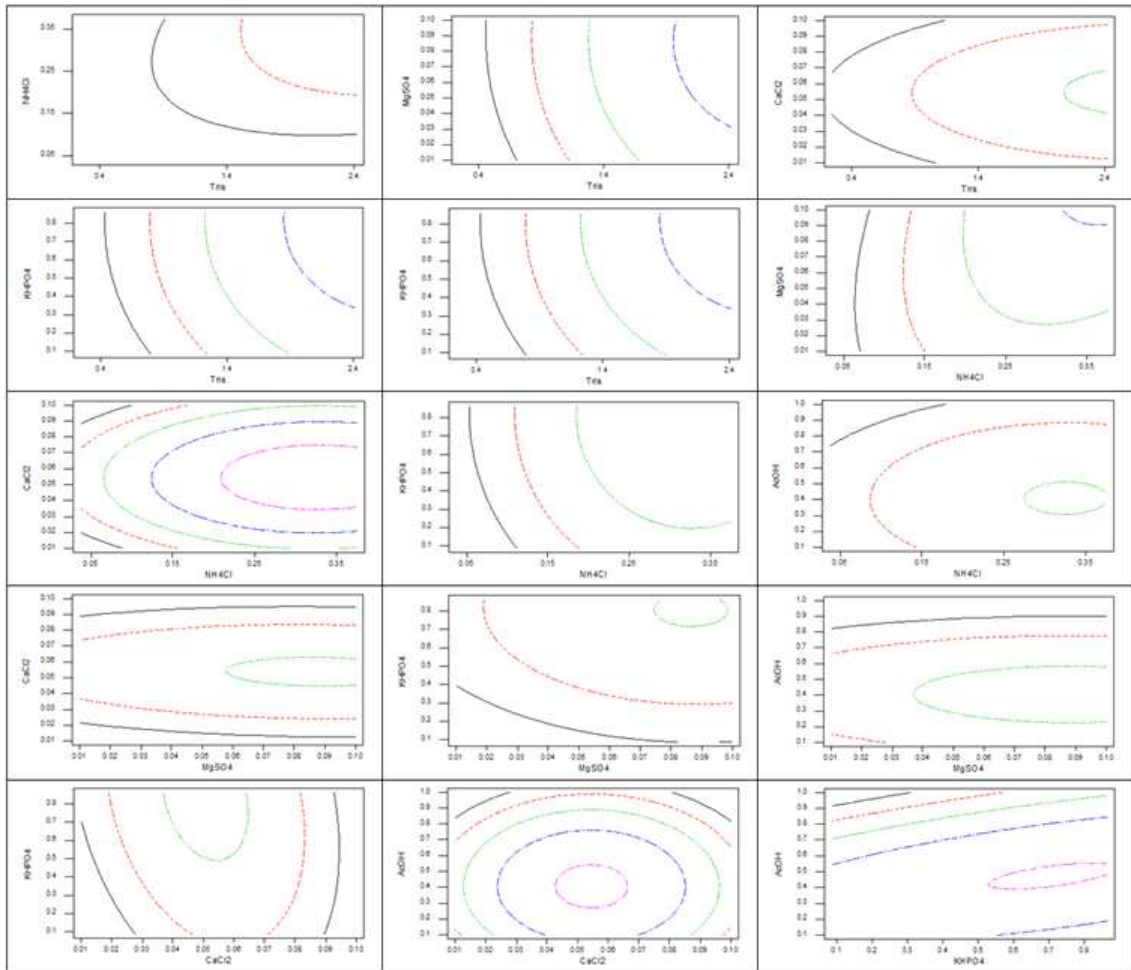


그림 136. ArF0024 미세조류 균주에 대한 유효성분의 효과를 도시하는 contour plot 결과.

아. 실험실 수준에서의 극지 미세조류 ArM0029C 균주의 생산 최적화를 위한 최적배지 연구를 통계적 방법을 사용하여 수행함. 기본 배지인 TAP 배지를 사용하여 배지의 각 성분들 중에서 하나씩 제거한 배지를 사용하여 유효성분을 선정하는 Elimination method 분석 결과, 유의확률 0.05 미만에서 Tris base, Ammonium chloride, Magnesium sulfate, Potassium phosphate, Trace elements, Acetic acid가 positive effect를 주는 것으로 파악되었고, CaCl₂는 비유효성분 (non-significant component)로 밝혀짐.

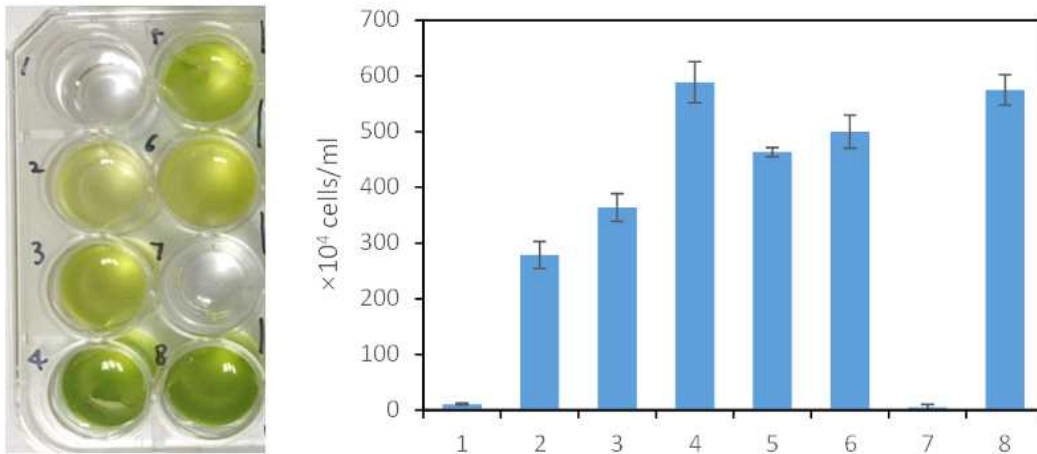


그림 137. ArM0029C 미세조류 균주 배양배지인 TAP 배지의 각 성분을 제외하여 배양한 결과. TAP 배지에서 Tris base (1), Ammonium chloride (2), Magnesium sulfate (3), Calcium chloride (4), Potassium phosphate (5), Trace elements (6), Acetic acid (7)를 제외하여 배양한 후 세포수를 측정 비교함.

표 80. ArM0029C 미세조류 균주에 대한 Elimination 기법에 의한 결과.

Variable	Component	-value (g/L)	+value (g/L)	Effect	T statistics	P value
X ₁	Tris base	0	2.42	64.6	17.19	0.000
X ₂	NH ₄ Cl	0	0.375	296.7	9.03	0.000
X ₃	MgSO ₄	0	0.1	211.3	6.43	0.000
X ₄	CaCl ₂	0	0.05	-13.7	-0.42	0.683
X ₅	Potassium phosphate	0	0.432	111.7	3.40	0.004
X ₆	Trace elements	0	0.0977	75.0	2.28	0.036
X ₇	AcOH	0	1	570.3	17.36	0.000

자. Plackett-Burman method를 적용하여 positive effect를 부여하는 component를 선정하는 실험을 수행함. Elimination 실험을 통해 선정된 6개의 유효성분의 농도를 기존 농도의 2배로 높여서 정밀하게 유효성분을 탐색함. 유의확률 0.05 미만에서 Potassium phosphate, Trace element의 2개 성분은 negative effect를 보였고, Ammonium chloride, Magnesium sulfate는 positive effect를 보이는 것으로 조사되었음.

표 81. ArM0029C 미세조류 균주에 대한 Plackett-Burman method에 의한 결과.

Variable	Component	-value (g/L)	+value (g/L)	Effect	T statistics	P value
X ₁	Tris base	0.484	4.84	-22.0	-1.11	0.279
X ₂	NH ₄ Cl	0.075	0.75	57.4	2.90	0.009
X ₃	MgSO ₄	0.02	0.2	57.4	2.90	0.009
X ₄	Potassium phosphate	0.0864	0.864	-47.0	-2.37	0.028
X ₅	Trace elements	0.1954	0.1954	-320.3	-16.18	0.000
X ₆	AcOH	0.2	2	-23.1	-1.17	0.257

차. Box-Behnken design을 이용한 상호작용을 고려한 최적조건을 탐색하기 위하여, Plackett-Burman 방법에서 찾은 4개의 유효성분들의 상호작용을 함께 알아보기 위하여 positive effect를 보인 두 성분 (Ammonium chloride, Magnesium sulfate)은 기존 투입량의 2배로, negative effect를 보인 두 성분 (Potassium phosphate, Trace elements)은 기존 투입량으로 조절하여 Box-Behnken design 수행함. 예상 세포농도는 $[76.9894 + 1008.27X_1 + 1196.68X_2 + 433.663X_3 + 3601.52X_4 - 1128.97X_1^2 - 4137.4X_2^2 - 142.603X_3^2 - 29733.7X_4^2 + 364.856X_1X_2 - 547.439X_1X_3 + 2448.75X_1X_4 - 295.353X_2X_3 - 1369.14X_2X_4 - 3451.59X_3X_4] \times 10^4$ cells/ml 였음 (여기서, X₁ = ammonium chloride, X₂ = magnesium sulfate, X₃ = potassium phosphate, X₄ = Trace elements).

카. 상기 분석방법에 의해 도출된 ArM0029C 미세조류 균주의 최적배지 조성 및 농도는 표 82과 같으며, 이때 미세조류 세포의 농도는 5.87×10^6 cells/ml로 계산되었음.

표 82. ArM0029C 미세조류 균주의 최적배지 조성 및 농도.

Variable	Component	Concentration (g/L)
X ₁	Tris base	2.42
X ₂	NH ₄ Cl	0.54
X ₃	MgSO ₄	0.16
X ₄	CaCl ₂	0.05
X ₅	Potassium phosphate	0.04
X ₆	Trace elements	0.08
X ₇	AcOH	1.0

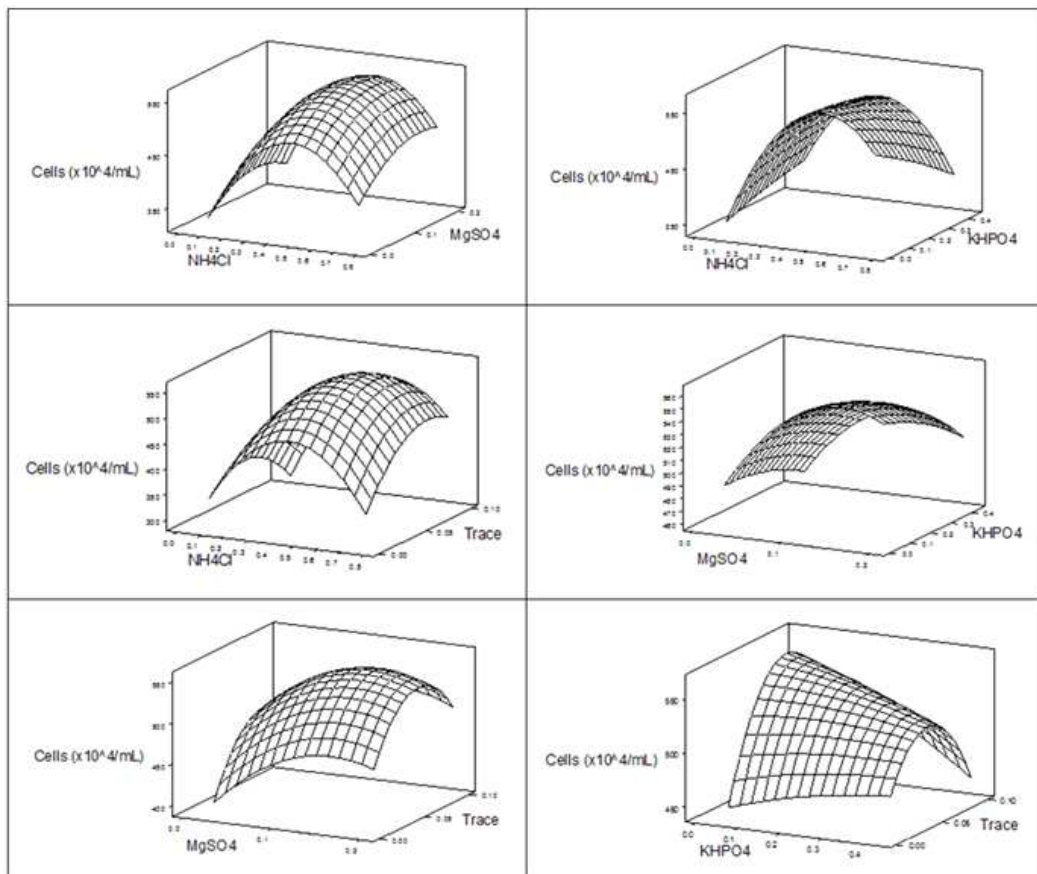


그림 138. ArM0029C 미세조류 균주에 대한 유효성분의 효과를 도시하는 surface plot 결과.

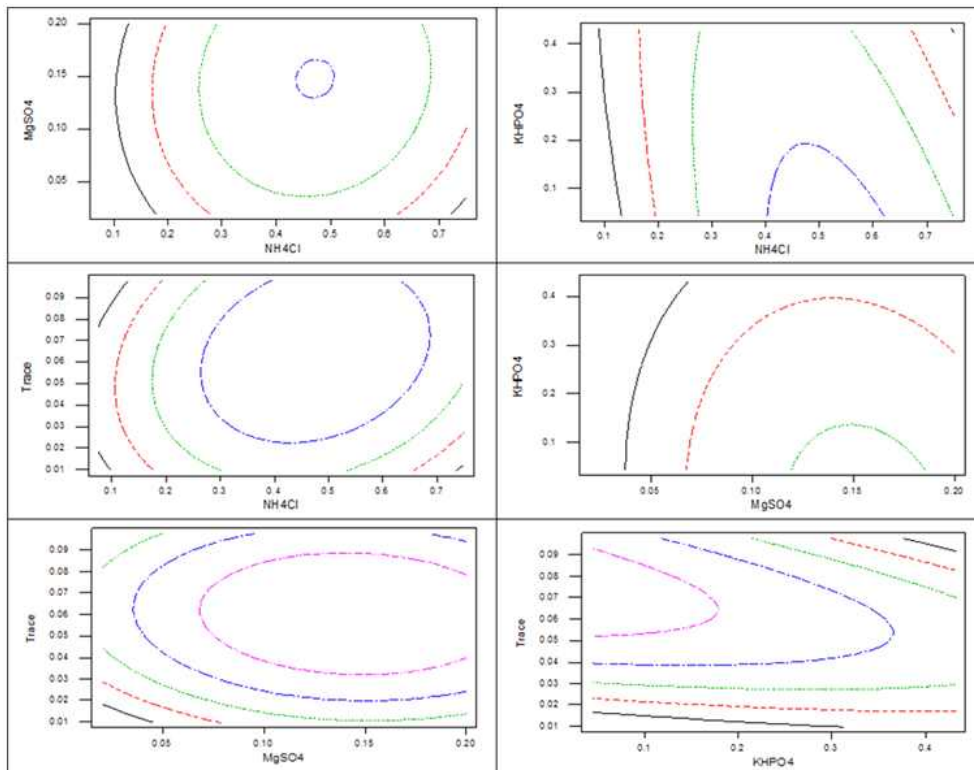


그림 139. ArM0029C 미세조류 관주에 대한 유효성분의 효과를 도시하는 contour plot 결과.

26. 선별 미세조류 균주의 대사체 분석

- 가. Next-Generation Sequencing (NGS) 방법에 의해 도출된 극지 미세조류 균주 ArF0024의 유전체 자료 중 지방산 합성에 관련된 물질을 합성하는 유전자에 대한 전반적인 대사 경로를 분석함.
- 나. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway program을 통하여 지방산 합성에 관련된 유전자가 관여하는 단계를 조사함.

표 83. KEGG mapping에 의한 ArF0024 미세조류 균주의 지방산 합성 불포화 지방산 합성 관련 유전자 정보.

Fatty acid biosynthesis			
Reductase (NADH)	ec:1.3.1.9	11	arf24_contig_12275, arf24_contig_18435, arf24_contig_20101, arf24_contig_26639, arf24_contig_30477, arf24_contig_31086, arf24_contig_33507, arf24_contig_39740, arf24_contig_39788, arf24_contig_40002, arf24_contig_46593
Carboxylase	ec:6.4.1.2	19	arf24_contig_356, arf24_contig_763, arf24_contig_4148, arf24_contig_9253, arf24_contig_9632, arf24_contig_11464, arf24_contig_14237, arf24_contig_20101, arf24_contig_21308, arf24_contig_22287, arf24_contig_22320, arf24_contig_22321, arf24_contig_24447, arf24_contig_30477, arf24_contig_40928, arf24_contig_41932, arf24_contig_43367, arf24_contig_53520, arf24_contig_54867
Reductase	ec:1.1.1.100	3	arf24_contig_5653, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Synthase	ec:2.3.1.86	2	arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Synthase	ec:2.3.1.85	1	arf24_contig_54937
Ligase	ec:6.2.1.3	1	arf24_contig_22722
Synthase I	ec:2.3.1.41	4	arf24_contig_3706, arf24_contig_14839, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
S-malonyltransferase	ec:2.3.1.39	3	arf24_contig_11993, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Desaturase	ec:1.14.19.2	2	arf24_contig_4639, arf24_contig_19001
Hydrolase	ec:3.1.2.14	2	arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Reductase (NADPH, si-specific)	ec:1.3.1.10	1	arf24_contig_20101
Fatty acid elongation			
C-acyltransferase	ec:2.3.1.16	1	arf24_contig_3161
Dehydrogenase	ec:1.1.1.35	4	arf24_contig_2154, arf24_contig_3012, arf24_contig_45486, arf24_contig_54371
Hydrolase	ec:3.1.2.22	1	arf24_contig_15526
Reductase (NADPH)	ec:1.3.1.38	1	arf24_contig_23950

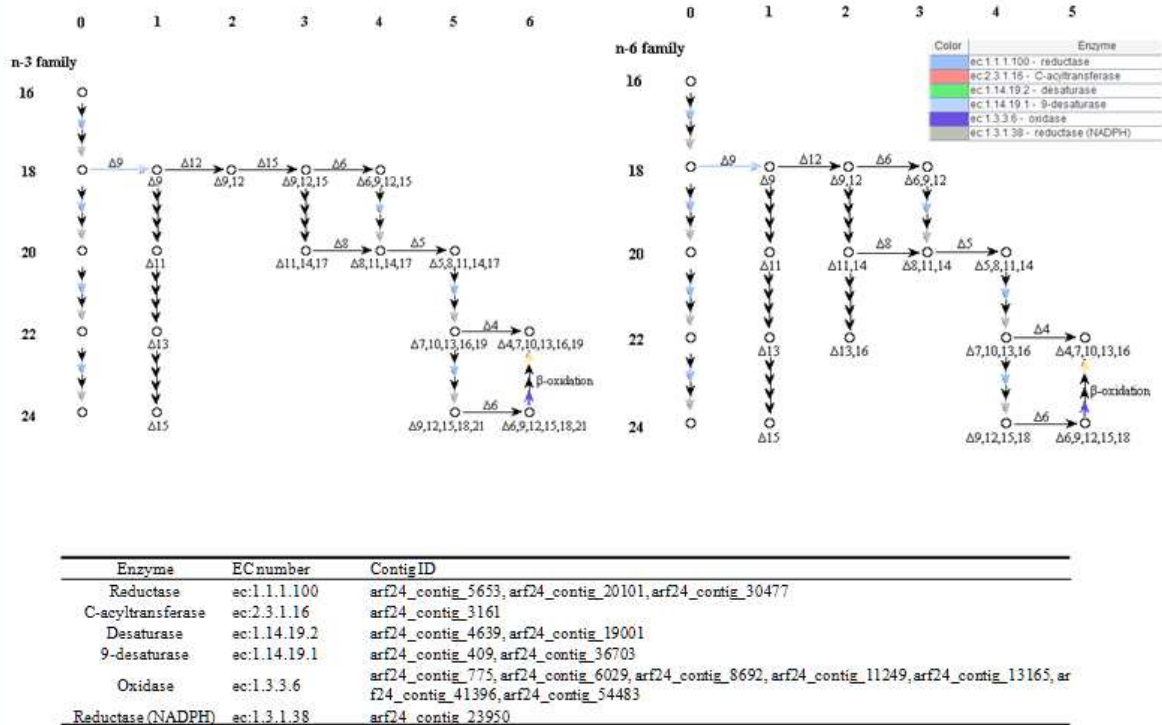


그림 140. ArF0024 미세조류 균주의 불포화 지방산 합성 관련 유전자를 대상으로 한 Blast2GO에 의한 KEGG mapping.

27. 선별 미세조류 균주의 유전체 분석

- 가. Next-Generation Sequencing (NGS) 방법에 의해 극지 미세조류 ArF0024 및 ArM0029C를 대상으로 전체 유전체 분석을 수행함.
- 나. ArF0024 미세조류 균주에 대한 온도별 전체 유전체 분석 결과, 데이터의 전처리 후 도출된 read는 약 12,885,000 여개로 분석되었고, read에 대한 assembly analysis 후 55,894개의 contiguous sequence (contig)를 확보하였음.

표 84. ArF0024의 온도별 culture에 대한 Next-generation sequencing (NGS) 결과.

Name	Number of reads	Avg. length	Number of reads after trim	Percentage trimmed (%)	Avg. length after trim
arf24-12_S7_L001_R1_001 (paired)	5,747,330	236.6	3,238,751	56.35	157.9
arf24-20_S8_L001_R1_001 (paired)	5,149,068	215.9	2,992,875	58.12	151.2
arf24-4_S5_L001_R1_001 (paired)	5,813,622	230.2	3,364,061	57.87	156.6
arf24-8_S6_L001_R1_001 (paired)	5,722,264	230.4	3,289,740	57.49	156.5
Total	22,432,284	228	12,885,427	-	156

표 85. ArF0024의 온도별 culture에 대한 NGS 분석 후 Assembly 결과.

Nucleotide	Count	Frequency
Adenine (A)	5,979,000	18.00%
Cytosine (C)	10,543,825	31.80%
Guanine (G)	10,796,757	32.60%
Thymine (T)	5,838,164	17.60%
Any nucleotide (N)	580	0.00%

	Length	
N75	392	
N50	751	
N25	1,663	
Minimum	95	
Maximum	13,916	
Average	593	
Count	55,894	
Total	33,158,326	

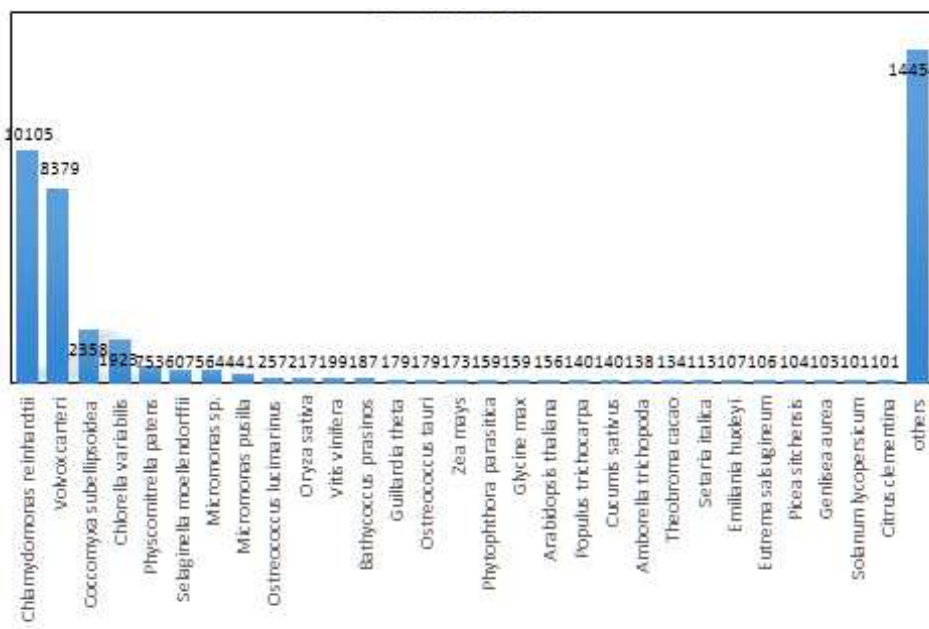


그림 141. ArF0024 미세조류 균주의 NGS 분석 후 BLAST search 결과.

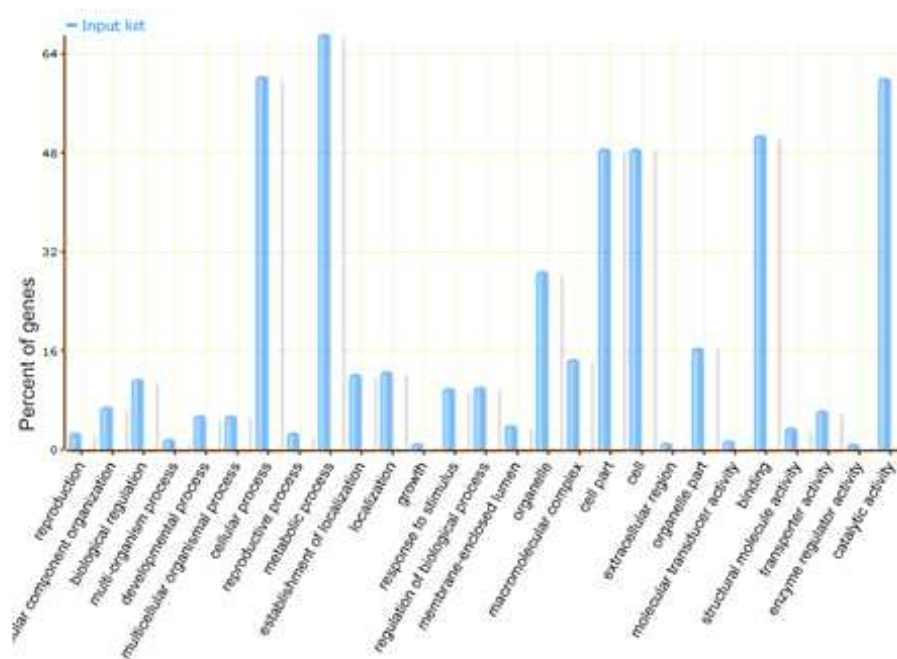


그림 142. ArF0024 미세조류 균주의 NGS 분석 후 gene ontology 분석 결과.

28. 선별 미세조류 균주의 리피도믹스 분석

가. 선별 미세조류 균주인 ArF0024 및 ArM0029C를 온도별로 배양한 후, 각 온도에 대한 지질성분을 파악하기 위하여 LC-MS 분석을 수행함.

나. LC-MS 분석 결과, 지방산으로 합성될 수 있는 DG (diacylglycerol), TG (triacylglycerol) 등의 물질이 성장 가능한 저온에서 높은 농도로 존재함을 확인함.

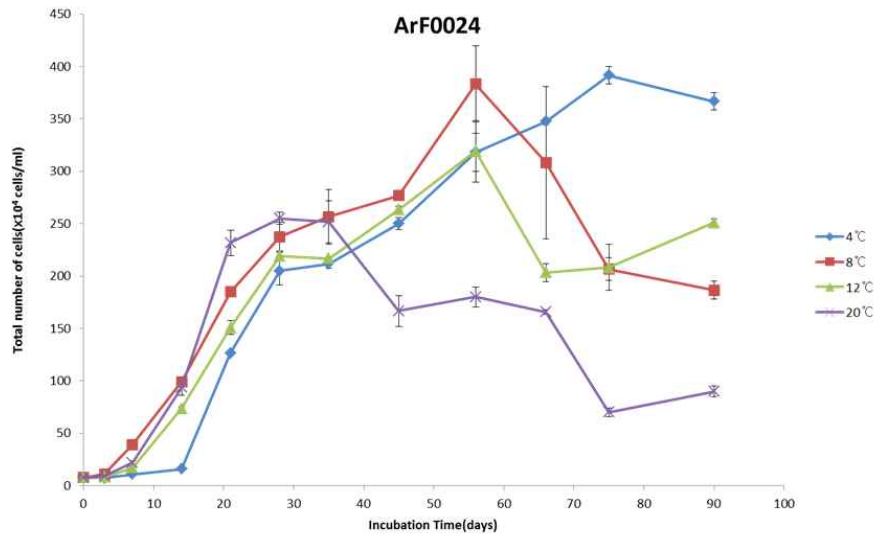


그림 143. ArF0024의 4, 8, 12, 20도 온도별 성장곡선.

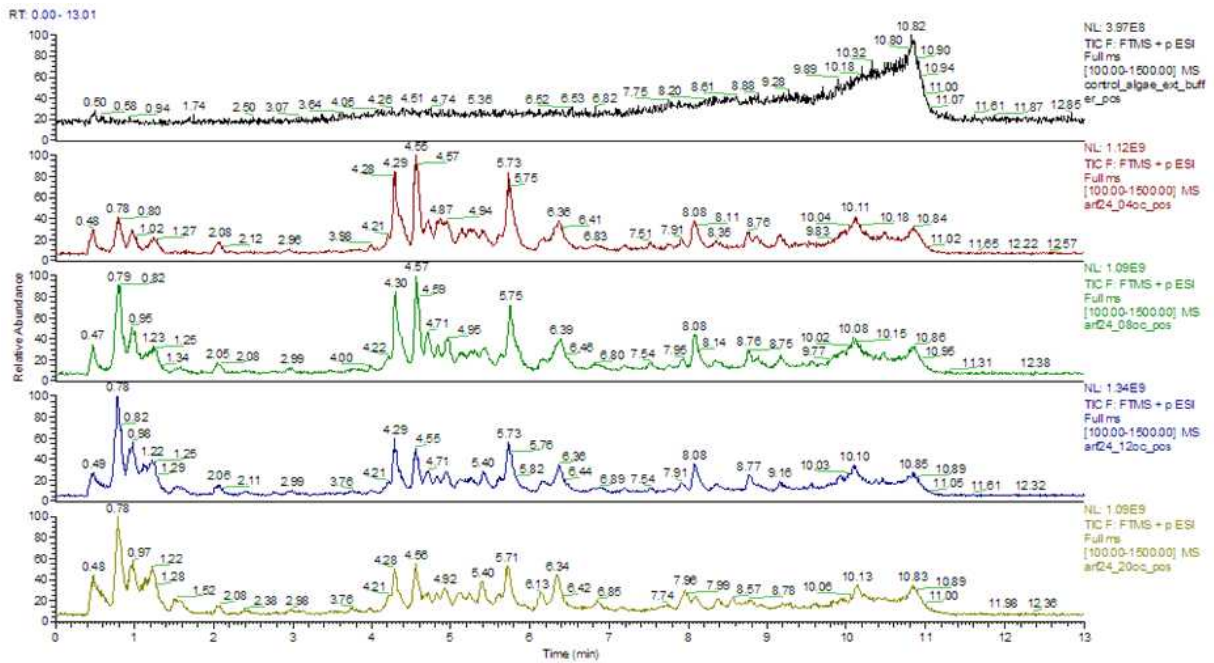


그림 144. ArF0024 미세조류 균주의 온도별 지질성분 분석 결과.

29. 선별 미세조류 균주의 유전자 분석결과를 통한 유용 유전자원 발굴

- 가. ArF0024 미세조류에서 확보한 55,894개의 contiguous sequence (contig) 중 각 온도별 유전자 발현량에 차이가 나는 유전자들을 선별하였으며 이 중 저온에서 발현량이 높은 유전자들과 온도가 증가할수록 발현이 감소되는 유전자들을 비교 분석.
- 나. 저온에서 발현이 높은 유전자들 중 지방산 관련 유전자들을 선별하여 온도별 지방산 합성량과 저온활성도를 조사.

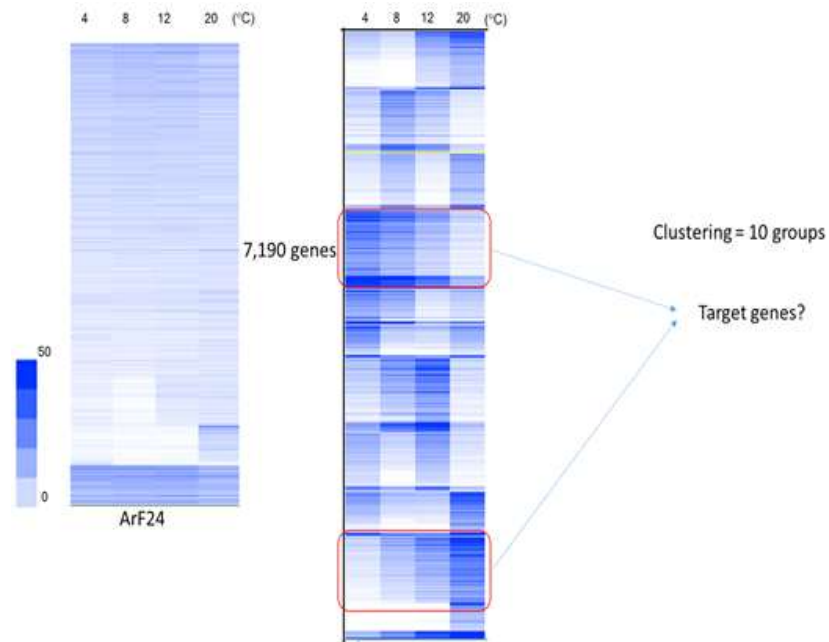


그림 145. ArF0024의 Temperature dependent-transcriptome change.

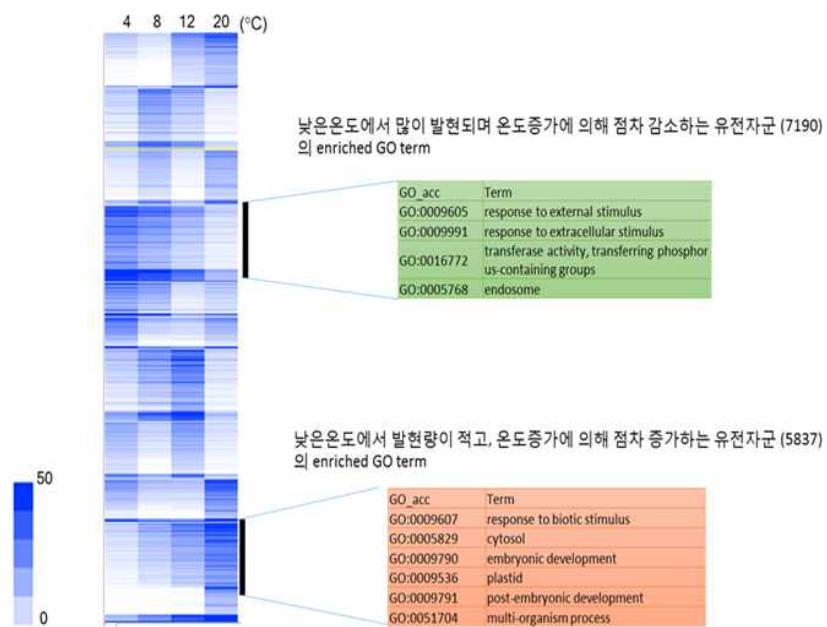


그림 146. ArF0024의 유전자들 중 온도에 의해 발현 차이가 있는 그룹들에 대한 Clustering 분석.

표 86. ArF0024의 대표적 저온반응 유전자들.

Feature_ID	NAME	4℃	8℃	12℃	20℃
arf24_contig_51831	cobalamin-independent methionine synthase	560.1	66.9	23.8	6.3
arf24_contig_13180	chitin binding domain-containing protein	535.3	327.9	85.2	8
arf24_contig_35669	cell wall protein pherophorin-c18	502.2	140.7	21.1	0
arf24_contig_24047	zinc finger protein 484	338.9	29.2	1.1	0
arf24_contig_54757	periplasmic protein	319.9	24.8	3.1	0
arf24_contig_35780	aldehyde dehydrogenase	285	108.3	17.2	0
arf24_contig_18646	membrane-anchored protein	277.3	93.4	105.7	16.8
arf24_contig_36669	alcohol oxidase	186.5	103.4	30.8	7.1
arf24_contig_1033	hypothetical protein BEWA_030380	185.2	22.8	2.7	0.8
arf24_contig_51096	light harvesting protein	183.2	54.7	39.8	4.7
arf24_contig_51539	cell wall protein pherophorin-c18	178.6	58.6	12.4	0.3
arf24_contig_3203	c6 finger domain	178.1	24.2	3.3	0
arf24_contig_25825	glycine cleavage p protein	176.8	112.1	46.9	7.8
arf24_contig_39369	chaperonin 60c	169.5	75	33.2	19.6
arf24_contig_13002	ubiquitin-activating enzyme e1	165.7	109.5	85.8	9.5
arf24_contig_28903	hypothetical protein CHLREDRAFT_193060	155.5	1.2	2.5	1.1
arf24_contig_52084	glutamine synthetase	154.2	19.1	73.9	2.7
arf24_contig_27691	cobalamin-dependent methionine synthase	149.6	170.6	64.2	5.1
arf24_contig_24058	c-c motif chemokine 19	149.4	15	0	0

표 87. ArF0024의 대표적 지방산 대사 관련 유전자들 (RPKM sum > 26).

Seq. Name	Seq. Description	Length	4℃	8℃	12℃	20℃	Sum	eValue	Similarity
arf24_contig_54263	long-chain fatty acid	331	86.9	173.7	208.5	78.3	547.4	3.71E-35	71.60%
arf24_contig_12069	fatty acid synthase subunit alpha	691	59.1	50.7	49.5	51.2	210.5	1.58E-15 0	98.00%
arf24_contig_8191	cyclopropane fatty acid synthase	277	31.1	55.3	51.4	45.8	183.6	1.14E-45	77.00%
arf24_contig_2154	glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein	2381	49.6	24.8	30	38.4	142.8	0	78.40%
arf24_contig_10593	fatty acid desaturase	1459	26.5	19.9	26.5	51.4	124.3	0	75.80%
arf24_contig_52822	delta-6 fatty acid desaturase	373	26.7	39.2	24.1	22.2	112.2	7.08E-26	63.80%
arf24_contig_49213	delta fatty acid desaturase	407	41.8	29	18.1	22.6	111.5	1.43E-27	84.40%
arf24_contig_12275	fatty acid synthase subunit beta	338	28.8	26.2	24.1	29.5	108.6	1.41E-59	91.80%
arf24_contig_3852	omega13 fatty acid desaturase	2600	37.9	19.3	28.6	21.8	107.6	0	70.20%
arf24_contig_48657	long-chain fatty acid--ligase	403	27.4	25.6	31.5	22.7	107.2	3.61163	48.50%
arf24_contig_18435	fatty acid synthase subunit beta	400	33.3	17	15.3	24.4	90	1.43E-76	94.20%
arf24_contig_40002	fatty acid synthase subunit beta	542	20.7	30.9	29	8.6	89.2	2.98E-59	94.20%
arf24_contig_2776	fatty acid delta-12	1522	10.1	13.8	13.2	45	82.1	0	78.80%
arf24_contig_9693	fatty acid hydroxylase domain-containing protein 2-like	252	15.2	13.8	23.2	22.2	74.4	1.79E-08	56.20%
arf24_contig_54403	short-chain fatty acid transporter	246	13.5	11.2	18.8	7.6	51.1	0.735026	54.00%
arf24_contig_17383	delta fatty acid desaturase	677	5.4	2.3	28.5	13.8	50	1.07155	72.00%
arf24_contig_25620	fatty acid 2-hydroxylase-like	317	16.5	10.1	22.2	0	48.8	6.07E-23	71.20%
arf24_contig_40047	fatty acid synthase subunit alpha	466	10.3	21	10.6	2.6	44.5	3.25E-77	92.00%
arf24_contig_52793	fatty acid synthase	261	27.2	10.2	5.5	1.2	44.1	4.99E-11	60.50%
arf24_contig_52494	delta-6 fatty acid desaturase	728	7.8	17.6	16.7	0	42.1	6.18E-82	68.80%
arf24_contig_13053	elongation of very long chain fatty acids	338	12.2	8.3	12.6	5.4	38.5	4.00E-26	65.80%
arf24_contig_17130	fatty acid desaturase	717	10.3	14	12.4	0	36.7	2.53893	49.50%
arf24_contig_201	fatty acid desaturase	2637	1.5	0	3.2	28.3	33	0	81.60%
arf24_contig_2227	cyclopropane fatty acid synthase	2103	9.3	10.8	8.3	2.6	31	0	70.40%
arf24_contig_2227	cyclopropane fatty acid synthase	2103	9.3	10.8	8.3	2.6	31	0	70.40%
arf24_contig_31043	omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase	224	12	8.2	10.3	0	30.5	1.00146	48.75%
arf24_contig_20728	long-chain fatty acid--ligase	598	5	7.4	9.3	7.1	28.8	2.50E-07	66.00%
arf24_contig_53171	delta fatty acid desaturase-like	246	2	4.7	7.4	14.6	28.7	1.66E-24	75.80%
arf24_contig_631	omega-3 fatty acid desaturase	2224	4.6	8.3	11.5	4	28.4	0	85.00%
arf24_contig_51109	fatty acid elongase	471	7.9	8	4.6	7.9	28.4	1.28E-54	69.20%
arf24_contig_7011	short-chain fatty acid transporter	437	3.5	13	10.8	1	28.3	2.48746	47.00%
arf24_contig_32047	fatty acid desaturase	307	2.3	7	19	0	28.3	6.87896	58.00%
arf24_contig_19568	elongation of very long chain fatty acids protein 4	246	20.6	3.5	3.5	0	27.6	0.334576	51.60%
arf24_contig_26484	omega-6 fatty acid desaturase (delta-12 desaturase)	221	13.1	4.1	0	8.9	26.1	1.19E-39	91.20%

표 88. ArF0024의 KEGG mapping에 의한 지방산 합성 및 불포화 지방산 합성 관련 유전자들.

Fatty acid biosynthesis			
Reductase (NADH)	ec:1.3.1.9	11	arf24_contig_12275, arf24_contig_18435, arf24_contig_20101, arf24_contig_26639, arf24_contig_30477, arf24_contig_31086, arf24_contig_33507, arf24_contig_39740, arf24_contig_39788, arf24_contig_40002, arf24_contig_46593
Carboxylase	ec:6.4.1.2	19	arf24_contig_356, arf24_contig_763, arf24_contig_4148, arf24_contig_9253, arf24_contig_9632, arf24_contig_11464, arf24_contig_14237, arf24_contig_20101, arf24_contig_21308, arf24_contig_22287, arf24_contig_22320, arf24_contig_22321, arf24_contig_24447, arf24_contig_30477, arf24_contig_40928, arf24_contig_41932, arf24_contig_43367, arf24_contig_53520, arf24_contig_54867
Reductase	ec:1.1.1.100	3	arf24_contig_5653, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Synthase	ec:2.3.1.86	2	arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Synthase	ec:2.3.1.85	1	arf24_contig_54937
Ligase	ec:6.2.1.3	1	arf24_contig_22722
Synthase I	ec:2.3.1.41	4	arf24_contig_3706, arf24_contig_14839, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
S-malonyltransferase	ec:2.3.1.39	3	arf24_contig_11993, arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Desaturase	ec:1.14.19.2	2	arf24_contig_4639, arf24_contig_19001
Hydrolase	ec:3.1.2.14	2	arf24_contig_20101, arf24_contig_30477
Reductase (NADPH, si-specific)	ec:1.3.1.10	1	arf24_contig_20101
Fatty acid elongation			
C-acyltransferase	ec:2.3.1.16	1	arf24_contig_3161
Dehydrogenase	ec:1.1.1.35	4	arf24_contig_2154, arf24_contig_3012, arf24_contig_45486, arf24_contig_54371
Hydrolase	ec:3.1.2.22	1	arf24_contig_15526
Reductase (NADPH)	ec:1.3.1.38	1	arf24_contig_23950

다. ArM0029C 미세조류 균주에 대한 온도별 전체 유전체 분석으로 GC 함량 61.41%, 95,453,218 raw read, 총 18,062,167 bp를 확보하였으며 이들을 assembly analysis 한 결과 34,822 unigene과 29,622 singleton을 확보하였음.

표 89. ArM0029C의 온도별, 배지별 전사체 분석 결과.

FASTQ (Quality scale : +33)

Sample	Yield	Read	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
29A-12	5,807,756,389	42,773,518	0.009	48.30	82.57
29A-4	3,725,738,790	27,150,686	0.008	48.08	83.14
29A-8	4,502,442,302	32,901,450	0.007	48.19	82.21
ArM29-4	4,205,413,237	31,384,042	0.008	48.17	83.50
ArM29A-12	4,155,487,928	31,242,336	0.007	48.29	83.13
ArM29A-16	3,973,102,328	29,515,322	0.006	48.29	82.91
ArM29A-8	4,291,215,909	32,212,762	0.007	48.00	83.84
ArM29A-F2	3,945,114,812	29,173,608	0.008	48.32	82.46
ArM29A-TAP	4,518,339,620	34,066,848	0.008	49.01	82.07
F2291A-2	4,537,675,667	33,856,014	0.007	47.65	83.36
TAP29A-8	4,726,607,596	35,391,224	0.007	48.37	83.87

3.2 Assembly Results

* Unigene statistics (11EA pooled data)

Unigene	Singleton	Cluster	Total Base	GC(%)	Max Size	Min Size
34,822	29,622	5,200	18,064,167	61.41	200	13,937

Median	Mean	N10	N20	N30	N40	N50
364	518.76	1,829	1,310	1,005	791	630

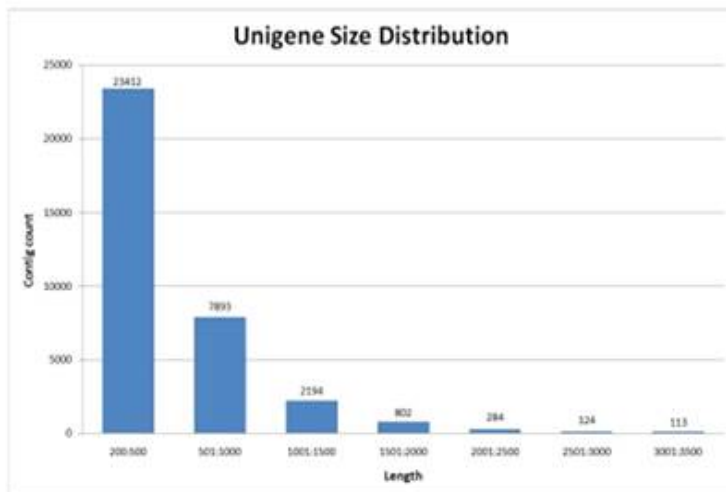


그림 147. ArM0029C의 unigene 크기별 분포 비교.

* Differentially expressed transcripts(unigenes)
- MA plots

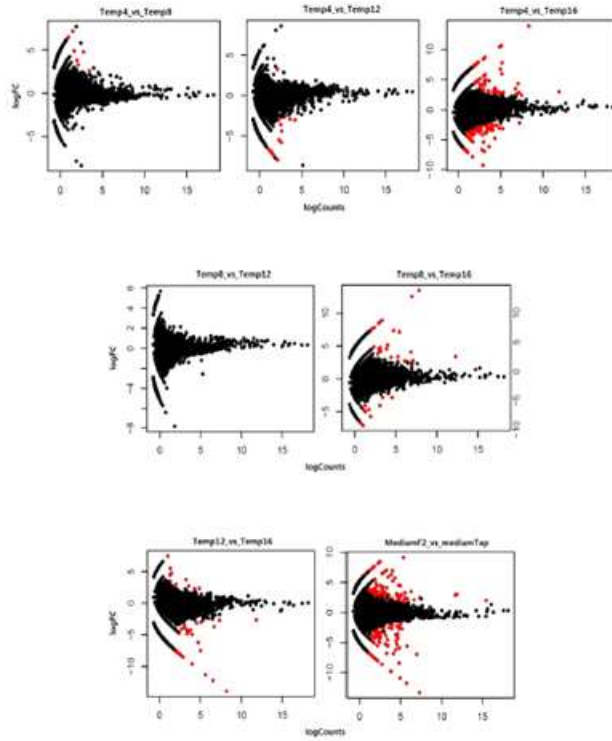


그림 148. ArM0029C의 온도별 전사체 RNA-Seq의 intensity-dependent ratio를 비교한 MA plots.

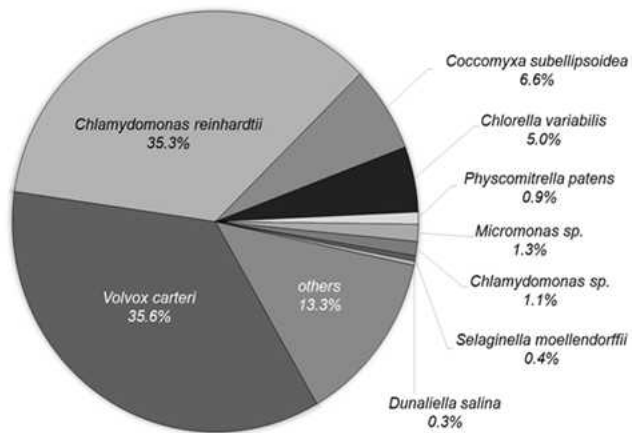


그림 149. ArM0029C의 contig 8,947개에 대한 top-hit 생물종 분석.

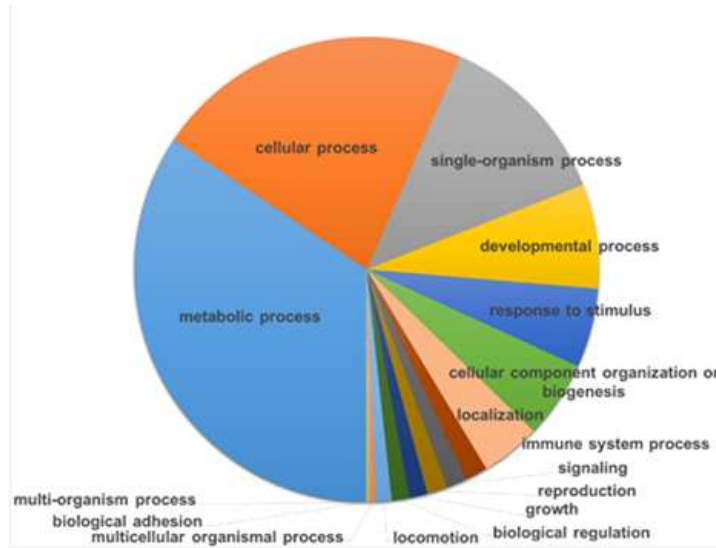


그림 150. ArM0029C의 Gene-Ontology Classification.

표 90. ArM0029C의 담수 배지에서 발현이 증가한 유전자들.

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	-F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A			
			-TAP -	-F2 -	-BBM -			
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig5603	2594	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	1145	15	1748	0.4	28.2	39.8
contig5863	483	atp synthase subunit beta	3344	1402	18940	209	442.4	2314.1
contig5764	1481	binding protein 1	177	140	1381	6.8	7.6	55
contig875	2746	cell wall-associated hydrolase	8441700	7402391	8512552	194086.2	196439.4	182940.6
contig5266	586	chlorophyll a b binding protein	2918	411	2025	50.5	318.2	203.9
contig3584	348	chlorophyll a-b binding expressed	652	245	601	50.7	119.7	101.9
contig78	300	chlorophyll a-b binding protein of lhci	843	57	376	13.7	179.6	74
contig6041	714	chloroplast precursor	533	81	473	8.2	47.7	39.1
contig3974	3283	cytochrome oxidase subunit 1	12148	12425	22794	272.5	236.4	409.7
contig1602	295	cytochrome p450 liketbp	24342	1977	13874	482.5	5272.7	2775.4
contig604	5797	cytochrome p450 liketbp	1498013	703823	1705802	8741.4	16512.4	17365.1
contig3985	2489	elongation factor tu	13154	9785	20377	283	337.7	483.1
contig4133	1578	fe-assimilating protein 1	641	381	1707	17.4	26	63.8

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	-BBM -
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig4748	837	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (nadp+)	463	90	590	7.7	35.3	41.6
contig10492	216	heat shock	11	12	185	4	3.3	50.5
contig1113	1027	histone h2b	512	232	1056	16.3	31.9	60.7
contig1266	313	light-harvesting chlorophyll-a b binding protein 1	1343	98	771	22.5	274.2	145.4
contig5220	384	light-harvesting chlorophyll-a b binding protein 5	1745	208	1120	39	290.4	172.1
contig13480	333	light-harvesting chlorophyll-a b binding protein lhcb4	352	111	311	24	67.5	55.1
contig11630	418	light-harvesting chlorophyll-a b protein of photosystem i	249	32	182	5.5	38.1	25.7
contig4115	1034	light-harvesting complex ii chlorophyll a-b binding protein m3	2529	246	1410	17.1	156.3	80.5
contig3393	527	light-harvesting protein of photosystem i	509	61	441	8.3	61.7	49.4
contig3394	297	light-harvesting protein of photosystem i	234	17	152	4.1	50.3	30.2
contig2854	238	luminal binding protein	77	46	265	13.9	20.7	65.7
contig2855	614	luminal binding protein	82	35	631	4.1	8.5	60.6
contig2423	1406	orf16-lacZ fusion protein	562526	461429	600061	23628.9	25565.6	25186.1
contig8913	738	oxygen-evolving enhancer protein	622	156	650	15.2	53.9	52
contig2819	1622	chloroplast precursor pgl homology to homo sapiens	1072539	616124	1174620	27348.9	42253.4	42736.3
contig13875	1903	protein	2961	6170	10884	233.4	99.4	337.5
contig12542	1434	s-adenosyl homocysteine hydrolase	896	100	1556	5	39.9	64

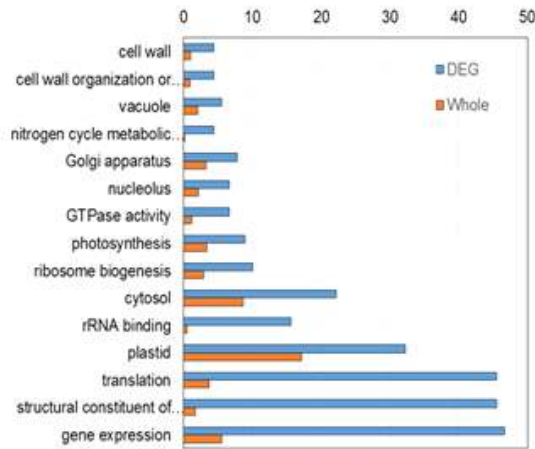


그림 151. ArM0029C의 해수 배지에서 발현이 증가한 유전자들의 KEGG category 분석.

표 91. ArM0029C의 해수 배지에서 발현이 증가한 유전자들.

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A		ArM29A	ArM29A
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	ArM29A-B
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig2593	3971	p700 apoprotein a1 of photosystem i	435572	815513	675145	14786.1	7009.1	10033.4
contig6567	2197	cell wall-associated partial	1845302	1895692	2015267	62124.2	53670.6	54131.9
contig10414	424	cell wall-associated hydrolase	52911	66819	56301	11346.4	7974.1	7836.1
contig10789	2717	p700 apoprotein a2 of photosystem i	71500	103633	73672	2746.2	1681.6	1600.2
contig7909	1461	ammonia channel protein	1	3381	0	166.6	0	0
contig8321	1927	ribulose- bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	72178	98698	90710	3687.7	2393.4	2777.9
contig10732	2593	cytochrome b6 f complex subunit iv	9981	22885	13382	635.4	246	304.6
contig3875	2460	high affinity nitrate transporter	136	3415	40	99.9	3.5	1
contig14722	3255	photosystem ii 47 kda protein	1713	9358	3215	207	33.6	58.3
contig11478	654	ribosomal protein l14	3771	6788	4887	747.3	368.4	441
contig2765	2343	cf1 alpha subunit of atp synthase	22192	45034	38205	1383.9	605.2	962.3
contig3737	1383	hypothetical protein VOLCADRAFT_106678	13	1603	7	83.5	0.6	0.3
contig2538	1117	ammonium transporter	0	1135	1	73.2	0	0.1
contig4892	1504	ribosomal protein s11	6224	14417	10771	690.2	264.4	422.6

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A-B
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	BM -
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig7365	340	atp synthase cf0 c chain	9211	12528	12748	2652.9	1731.1	2212.7
contig12871	389	neurochondrin family protein isoform 2	8240	13489	13637	2496.6	1353.6	2068.8
contig5394	1781	low-co2 inducible protein	3580	7978	7308	322.5	128.4	242.2
contig875	2746	cell wall-associated hydrolase	8441700	7402391	8512552	194086.2	196439.4	182940.6
contig7091	961	ribosomal protein l16	4994	8203	8195	614.6	332.1	503.2
contig10130	1426	ammonium transporter	1	1244	0	62.8	0	0
contig4690	398	ammonium transporter	0	329	0	59.5	0	0
contig8547	673	nadh-cytochrome b5 reductase 1-like	26	603	20	64.5	2.5	1.8
contig10147	787	ef hand domain-containing protein	5	548	0	50.1	0.4	0
contig13875	1903	protein	2961	6170	10884	233.4	99.4	337.5
contig12473	247	ammonium transporter	0	125	0	36.4	0	0
contig598	2101	photosystem ii protein d2	47117	54693	47867	1874.3	1433	1344.5
contig13005	715	40s ribosomal protein s20	515	1213	483	122.1	46	39.9
contig574	1969	nitrate transporter	2	732	4	26.8	0.1	0.1
contig2456	1015	ammonium transporter	0	357	0	25.3	0	0
contig84	1689	tubby-like protein	53	705	45	30.1	2	1.6
contig362	1165	ribosomal protein l5	482	1273	238	78.7	26.4	12.1
contig3466	278	protein	1	83	4	21.5	0.2	0.8
contig5875	1648	alpha tubulin	690	1716	357	75	26.8	12.8
contig4741	380	nitrate reductase	2	109	0	20.7	0.3	0
contig3465	275	echinoderm microtubule-associated 6	0	68	0	17.8	0	0
contig7535	2045	ferredoxin--nitrite reductase	33	555	30	19.5	1	0.9
contig4621	553	fucoxanthin chlorophyll a c li818 clade	6	142	0	18.5	0.7	0
contig8872	477	60s ribosomal protein l23	2082	2688	2364	405.7	278.9	292.5
contig1976	2242	nitrate reductase	36	541	21	17.4	1	0.6
contig2285	660	zinc c2h2 type family protein	0	130	2	14.2	0	0.2

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A-B
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	BM -
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig2453	3789	rh protein	55	880	25	16.7	0.9	0.4
contig3464	436	protein	3	90	0	14.9	0.4	0
contig13613	562	ribosomal protein l23a	1431	1923	1530	246.4	162.7	160.7
contig578	830	kinesin light	9	162	2	14.1	0.7	0.1
contig6050	1558	argininosuccinate synthase	142	530	124	24.5	5.8	4.7
contig417	1908	mgdg specific palmitate delta-7 desaturase	247	750	218	28.3	8.3	6.7
contig895	289	60s ribosomal protein l31	373	543	374	135.3	82.5	76.4
contig3487	1340	#NAME?	78	337	48	18.1	3.7	2.1
contig3263	3291	ammonium transporter	207	841	20	18.4	4	0.4
contig13153	557	protein	1456	1829	1235	236.4	167	130.8
contig1534	681	cell wall-associated partial	1272	1662	1036	175.7	119.4	89.8
contig6590	228	protein	1569	1770	1099	558.9	439.7	284.5
contig2067	356	60s ribosomal protein l37	1054	1293	856	261.5	189.2	141.9
contig10810	1552	plastid acyl-acyl desaturase	181	498	120	23.1	7.5	4.6
contig7345	849	protein	2563	3122	2079	264.8	192.9	144.5
contig11352	417	60s ribosomal protein l37a	515	707	416	122.1	78.9	58.9
contig1085	2785	xanthine uracil vitamin c permease-like protein	298	801	47	20.7	6.8	1
contig6065	2002	pyruvate kinase	224	590	138	21.2	7.1	4.1
contig7818	1505	carbamoyl-phosphate synthase s chain	322	664	219	31.8	13.7	8.6
contig5562	788	hypothetical protein VOLCADRAFT_87928	175	350	128	32	14.2	9.6
contig3208	1435	beta tubulin	496	870	373	43.7	22.1	15.3
contig10113	368	ribosomal protein component of cytosolic 80s ribosome and 40s small subunit	680	852	550	166.7	118.1	88.2
contig13071	992	60s ribosomal protein l39	633	944	555	68.5	40.8	33
contig13840	305	60s ribosomal protein l9-1-like	283	392	273	92.5	59.3	52.8
contig12777	229	60s ribosomal protein l10a	846	935	331	294	236.1	85.3

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A-B
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	BM -
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig5068	310	protein	850	873	406	202.8	175.2	77.3
contig938	745	elongation factor 1-	2891	3159	1923	305.3	248	152.3
contig4295	246	nhp2-like protein 1-like	657	632	341	185	170.7	81.8
contig936	225	translation elongation factor-like protein	830	736	482	235.5	235.7	126.4
contig1042	1138	60s ribosomal protein l10a-1	1764	1953	1020	123.6	99.1	52.9
contig935	361	elongation factor-1 alpha-like protein	1217	1060	722	211.4	215.4	118
contig3933	785	40s ribosomal protein s4	1460	1392	792	127.7	118.8	59.5
contig5873	571	60s ribosomal protein l26-1	1755	1682	1184	212.1	196.4	122.4
contig10573	581	protein	527	552	211	68.4	58	21.4
contig5801	672	protein	1126	1324	804	141.9	107.1	70.6
contig11364	1565	low-co2-inducible protein	684	1014	259	46.6	27.9	9.8
contig12899	462	protein	924	804	471	125.3	127.8	60.2
contig7987	662	family transcriptional regulator	1431	1462	971	159	138.1	86.6
contig6239	551	ribosomal protein s18	862	937	563	122.4	100	60.3
contig7871	593	40s ribosomal protein s13	614	761	397	92.4	66.2	39.5
contig8059	344	60s ribosomal protein l19-2-like	268	332	144	69.5	49.8	24.7
contig13268	502	60s ribosomal protein l36	1222	1382	1009	198.2	155.5	118.6
contig9335	1818	nuclear localization sequence-binding protein	802	1033	278	40.9	28.2	9
contig10639	300	beta- partial	103	171	47	41	21.9	9.2
contig3280	593	carbamoyl phosphate large subunit	141	236	34	28.7	15.2	3.4
contig12648	388	acidic ribosomal protein p0	529	523	310	97	87.1	47.1
contig13839	249	60s ribosomal protein l9	333	356	222	102.9	85.5	52.6
contig6243	611	60s ribosomal protein l21	808	693	400	81.7	84.5	38.6
contig606	784	hypothetical protein VOLCADRAFT_106850	270	373	111	34.3	22	8.4
contig3359	526	60s ribosomal protein l35	1016	1032	751	141.3	123.4	84.3
contig11577	485	ribosomal protein s25	1206	1257	994	186.6	158.9	120.9

Feature ID	Length	Annotation	TAP -	F2 -	BBM -	F2 -	TAP -	BBM -
			ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A	ArM29A-B
			-TAP -	-F2 -	-BBM -	-F2 -	-TAP -	BM -
			Total	Total	Total	RPKM	RPKM	RPKM
			gene	gene	gene			
			reads	reads	reads			
contig4701	578	40s ribosomal protein s23	945	1061	761	132.2	104.5	77.7
contig3326	942	ubiquitin extension protein	1396	1339	884	102.3	94.7	55.4
contig4698	854	60s ribosomal protein l18a	1086	1066	669	89.9	81.3	46.2
contig5987	399	40s ribosomal protein s11	487	512	328	92.4	78	48.5
contig11381	255	60s ribosomal protein l14	325	406	282	114.6	81.4	65.3
contig14200	374	40s ribosomal protein s24	664	751	564	144.6	113.4	89
contig2514	1997	zinc finger protein 862-like	429	700	163	25.2	13.7	4.8
contig6771	498	mitochondrial substrate carrier protein	164	194	54	28	21	6.4
contig11794	1084	ribosomal protein l28e	752	1037	606	68.9	44.3	33
contig13638	1254	sulfate adenylyltransferase	789	638	249	36.6	40.2	11.7
contig1718	566	protein	1236	1307	1049	166.3	139.5	109.4
contig636	539	protein	859	824	588	110.1	101.8	64.4
contig534	546	40s ribosomal protein s16	665	741	515	97.7	77.8	55.7
contig8060	512	60s ribosomal protein	651	584	385	82.1	81.2	44.4
contig4399	1520	60s ribosomal protein l6	1386	1077	571	51	58.3	22.2
contig7333	432	protein	428	508	344	84.7	63.3	47

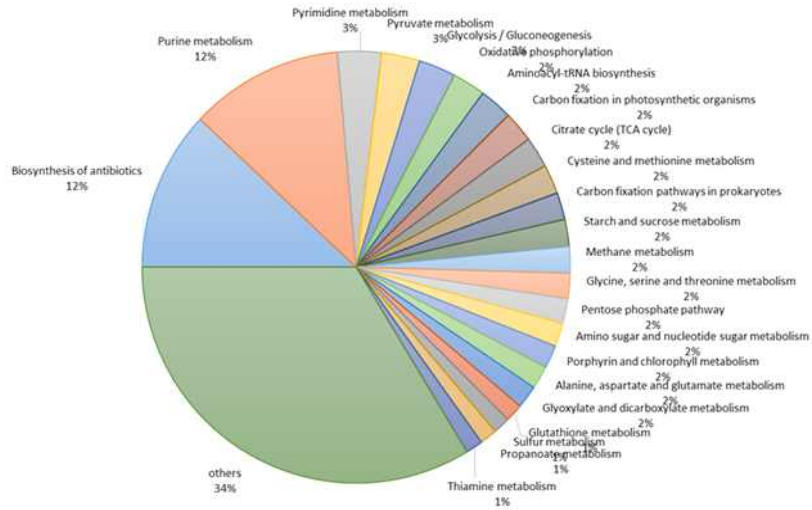


그림 152. ArM0029C에서 불포화 지방산의 합성에 관련된 유전자에 대한 KEGG mapping.

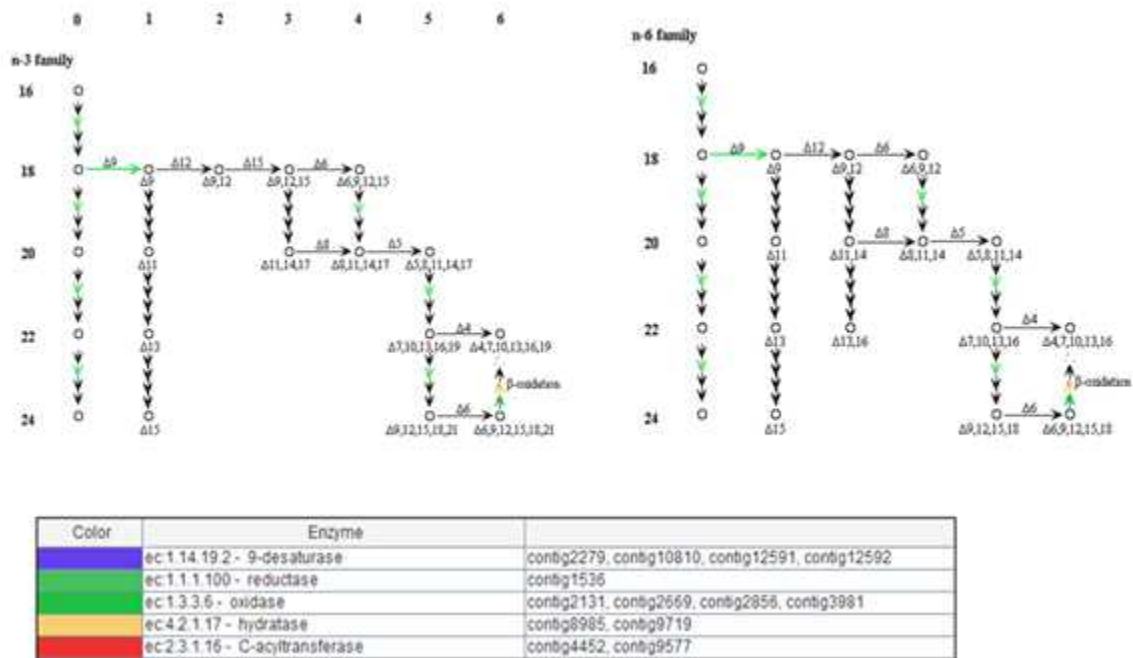


그림 153 ArM0029C에서 불포화 지방산의 합성에 관련된 유전자에 대한 KEGG pathway.

30. 선별 미세조류 균주의 유전자 자원을 기반으로 한 유용물질의 발굴 및 합성
- 가. ArF0006의 NGS 방법에 의하여 획득된 불포화 지방산 합성 효소 유전자 중 omega-6 불포화 지방산 합성에 관련된 유전자를 선별하여 이를 대장균에 도입 후 효소 활성 여부 연구.
 - 나. 북극 담수 미세조류에서 발견되는 불포화 지방산 합성 효소 (AChFAD6)는 총 1,274 개의 염기로 구성되어 있으며 본 유전자의 발현시 424개의 아미노산 및 48.2 kDa의 단백질 크기를 나타내는 것으로 분석됨.
 - 다. 계통분류 연구를 통하여 AChFAD6는 *Chlorella vulgaris* 및 *Chlorella variabilis*의 불포화 지방산 효소의 아미노산과 높은 근연관계가 높은 것으로 분석되었고, 기타 녹조 미세조류들의 불포화 지방산 그룹에 속하는 것으로 조사됨.
 - 라. AChFAD6는 막 단백질로서 불포화 지방산 효소가 가지는 His-rich domain이 존재하는 것으로 분석되었음.
 - 마. pET32 발현 벡터와 AChFAD6 유전자를 연결시킨 발현 플라스미드를 대장균에 형질전환 후 AChFAD6 단백질 발현시 Western blot analysis에 의하여 그 발현 여부가 탐색되었음.
 - 바. AChFAD6에 의하여 증가된 불포화 지방산 여부를 분석하기 위하여 gas-chromatography를 사용함. 분석 결과 C18 : 2 fatty acid (Linoleic acid)가 대조군에 비하여 증가하였음.
 - 사. 생체막에 함유된 AChFAD6의 아미노산을 다른 아미노산으로 대체 시, AChFAD6 본연의 효소 활성이 변환되어 C18 : 1 fatty acid (Oleic acid)를 증가시키는 불포화 지방산 합성 효소인 stearoyl-CoA desaturase로 전환되는 것으로 분석되었음.

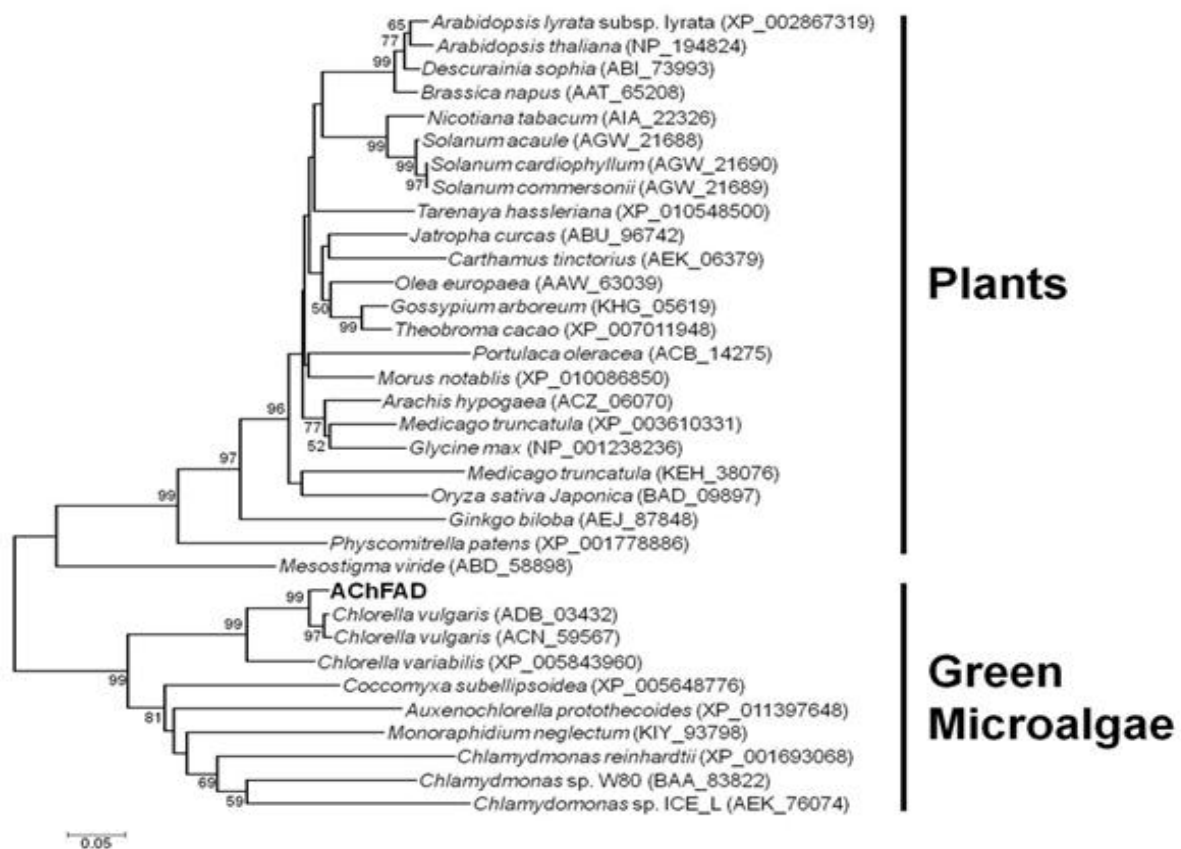


그림 154. ArF0006에서 발견된 불포화 지방산 합성 효소인 AChFAD6에 대한 계통분류 결과.

AChFAD6	1	MQATVACARAPMGLSAQCSLRRPAAAGAGAAAPRRSVLARTAMPVGLPACPPQVGYLGD	88
Chlo_vul_01	1	MQATVACARAPMGLSAQCSLRRPAAAGAGAAAPRRSVLARTAMPVGLPACPPQVGYLGD	87
Chlo_vul_02	1	MQATVACARAPMGLSAQCSLRRPAAAGAGAAAPRRSVLARTAMPVGLPACPPQVGYLGD	87
Chlo_var	1	M-LGAVRAPSVMETGSRCCRRPAAAGAAAPRRSVLARTAMPVGLPACPPQVGYLGD	89
Chla_rei	1	M-R-FNLRSPGAVRAPPACRASGVRAAPGFLRRAAVARPPQVQTNAAALSDV--VNCLEDEERAFLARELQVRSIGKELPDSVTLQDII	86
Chla_sp	1	M-R-LSNQRMGGSELVQQRKAVSDFAGPRLSLNGKSSMRTTKA--NAFTIPLASNNLSDPFAKGLAKDLVTRIGKELPDSVTLNEVV	86

AChFAD6	89	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	178
Chlo_vul_01	88	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	177
Chlo_vul_02	88	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	177
Chlo_var	90	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	179
Chla_rei	87	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	176
Chla_sp	87	KSMPPSVFELNAPKAWSAVAIAIASFGASLISICPAPLLPLAWALSGTAMTGWVFGHDCGHRFSKKNLVEDIVGTLMFEMPLIYPFD	176

AChFAD6	179	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	268
Chlo_vul_01	178	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	267
Chlo_vul_02	178	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	267
Chlo_var	180	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	269
Chla_rei	177	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	266
Chla_sp	177	PWRIRKHNQHHHTNKLVEDTAWHPVQKETMDAWGPVEKTLTKYKFFLGSPLKLFASVGHWWIWHFDLSKYTEQQKPRVLVSLAAVGLFMAVG	266

AChFAD6	269	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	358
Chlo_vul_01	268	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	357
Chlo_vul_02	268	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	357
Chlo_var	270	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	359
Chla_rei	267	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	356
Chla_sp	267	WPLIVYYTGWGWLKFWLMPWLGYPHFMSTFTVIHHTAPHIPFKPAGEWNAAKAQLSGTVHCDYPRWVEFLCFDINVHVPHHVMSKIPWY	356

AChFAD6	359	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	424
Chlo_vul_01	358	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	423
Chlo_vul_02	358	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	423
Chlo_var	360	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	425
Chla_rei	357	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	424
Chla_sp	357	NLRAATDSLRCNWGEYMTEAFNWRMLKYIFTHCHVYDEDRNYVPDFFAKEEAFFAAQRKVLNNM--	422

그림 155. AChFAD6와 근연관계에 있는 녹조 미세조류의 불포화 지방산의 아미노산 서열 비교.

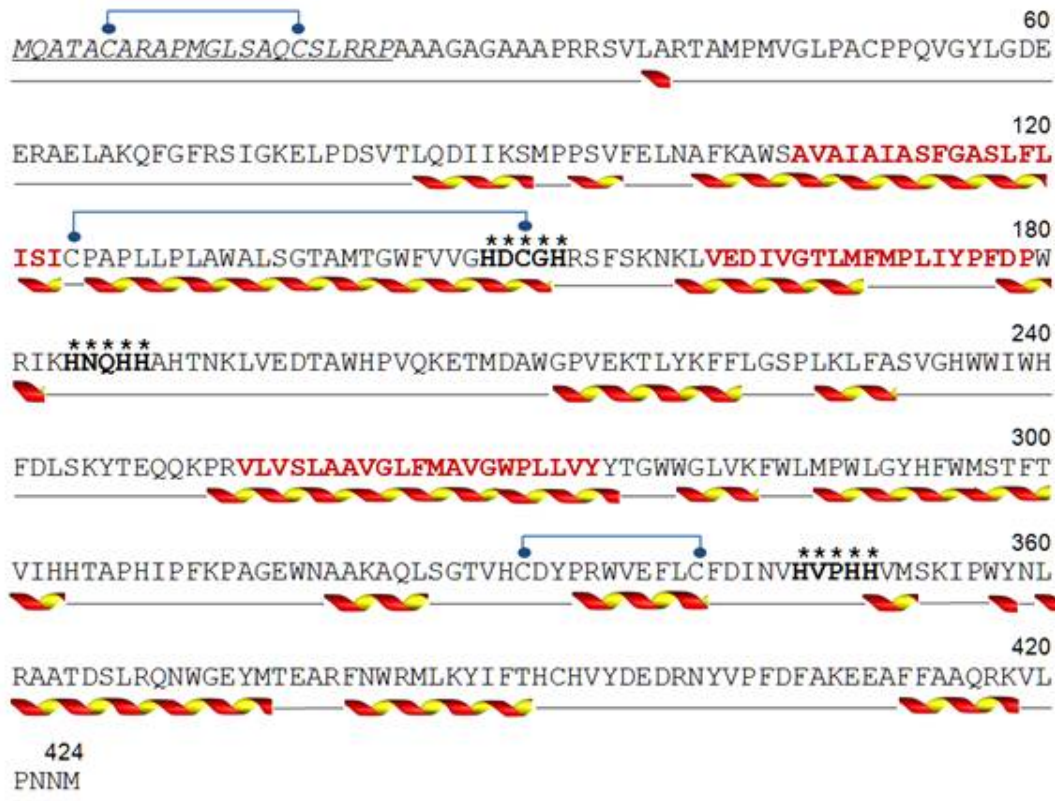


그림 156. AChFAD6의 단백질 2차구조 분석. 직선, beta-helix; 나선, alpha-helix; 파란 구획, 생체막 내 위치한 아미노산 서열 부분; *, His-rich domain.

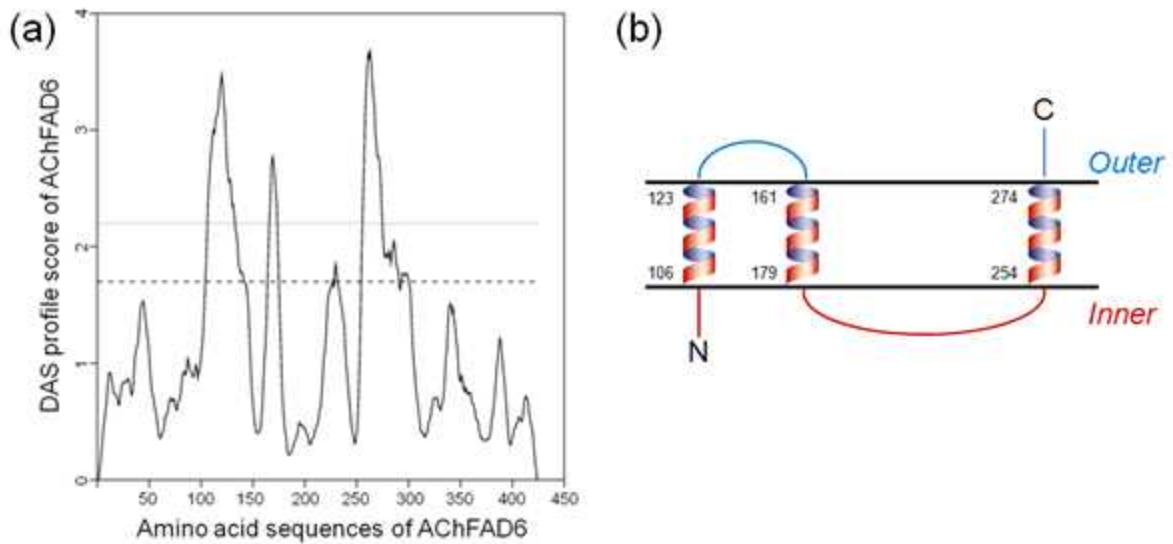


그림 157. AChFAD6의 생체막 내 위치하는 아미노산 구획 분석. (a) DAS program에 의한 transmembraneous region 결과, (b) DAS program 결과를 기반으로 도시한 AChFAD6의 amino acid structure topology.

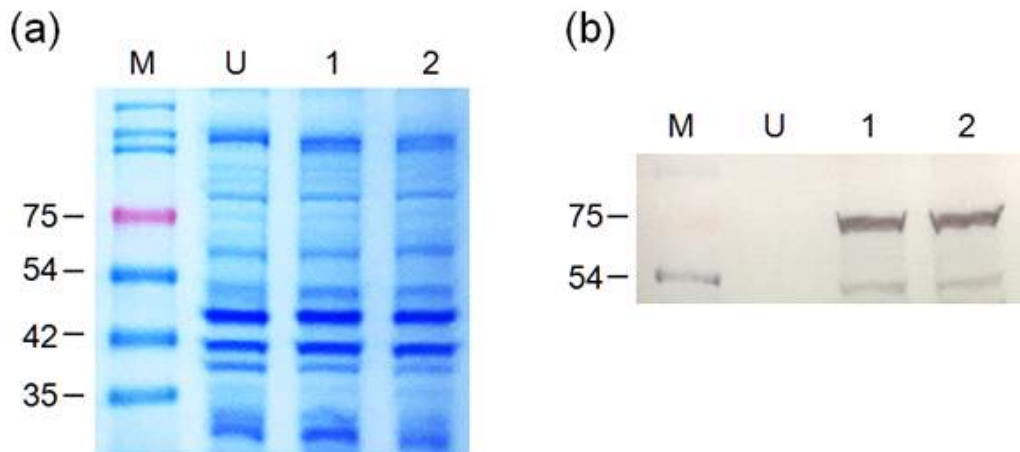


그림 158. 대장균에서 발현시킨 AChFAD6의 발현 결과. (a) Coomassie blue 염색에 의한 단백질 발현 탐색, (b) Western blot analysis에 의한 단백질 발현 탐색.

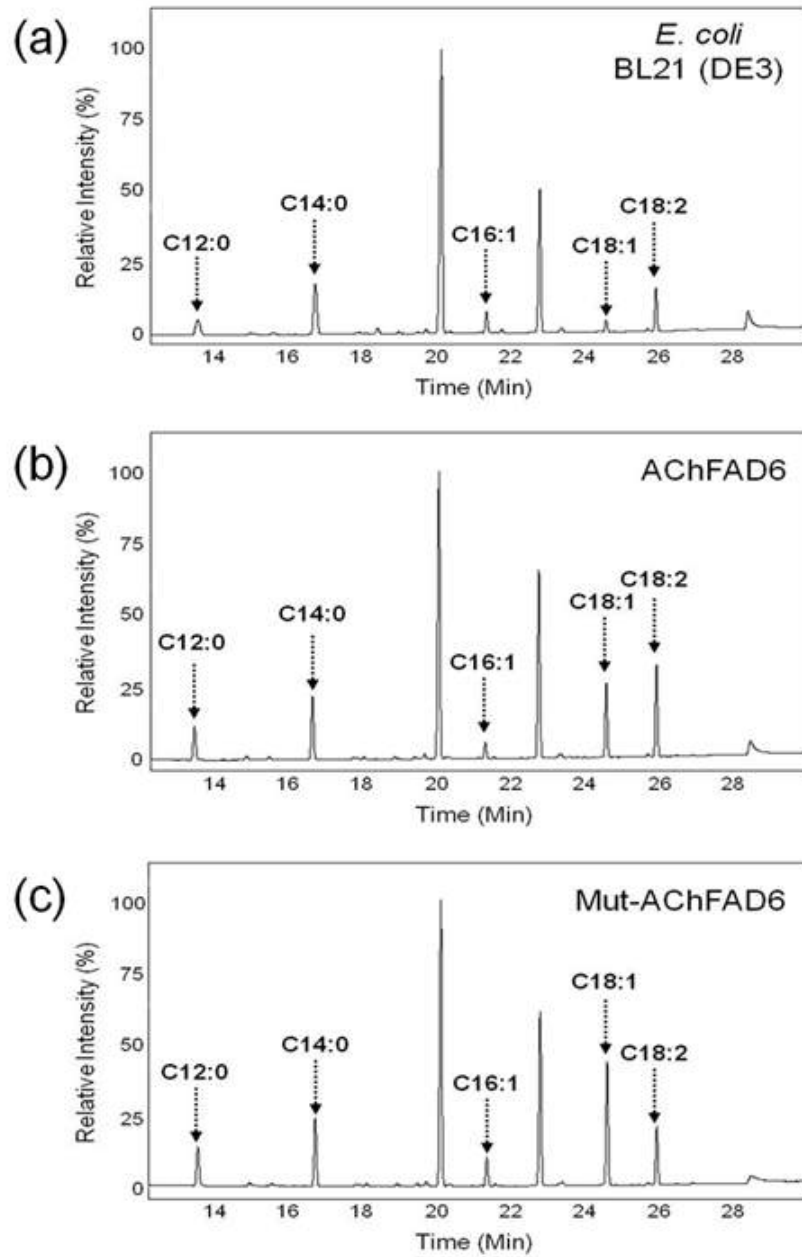


그림 159. AChFAD6이 발현된 대장균에 대한 지방산 조성 및 함량의 gas-chromatography를 사용한 정량분석 결과. (a) 대조군 (pET32-vector only), (b) AChFAD6 발현 대장균, (c) 아미노산을 변환시킨 돌연변이 AChFAD6 발현 대장균.

표 92. AChFAD6이 발현된 대장균에 대한 지방산 조성 및 함량의 gas-chromatography를 사용 한 정량 분석 결과.

	Microorganisms analyzed			
	<i>Escherichia coli</i>			<i>C. reinhardtii</i> CC-125
	pET32a (+) (Negative control)	Induced cells by <i>AChFAD6</i>	Induced cells by <i>Mut-AChFAD6</i>	
C12:0 mg/g (%)	1.54 ± 0.05 (4.06 ± 0.24%)	2.99 ± 0.17 (5.32 ± 0.97%)	3.48 ± 0.17 (5.39% ± 0.35%)	N/D
C14:0 mg/g (%)	3.85 ± 0.15 (10.13 ± 0.65%)	5.02 ± 0.25 (8.93 ± 1.58%)	5.38 ± 0.21 (8.32 ± 0.45%)	N/D
C16:1 mg/g (%)	1.11 ± 0.06 (2.92 ± 0.23%)	1.26 ± 0.05 (2.24 ± 0.38%)	2.23 ± 0.07 (3.45 ± 0.16%)	1.00 ± 0.02 (0.77 ± 0.03%)
C18:1 mg/g (%)	0.56 ± 0.05 (1.48 ± 0.17%)	5.45 ± 0.16 (9.67 ± 1.52%)	9.23 ± 0.18 (14.27 ± 0.49%)	1.40 ± 0.04 (1.08 ± 0.05%)
C18:2 mg/g (%)	2.06 ± 0.12 (5.43 ± 0.45%)	6.73 ± 0.13 (11.92 ± 1.76%)	4.24 ± 0.13 (6.56 ± 0.30%)	N/D
Total fatty acids (mg/g)	38.07 ± 0.97	63.66 ± 1.27	64.71 ± 0.97	130.00 ± 1.56

* N/D : not detected

31. 형질전환기법을 이용한 분자생물학적 균주개발 기반 확립

- 가. 대장균에서 불포화 지방산 합성 활성을 가지는 것으로 분석된 ArF0006의 불포화 지방산 합성 효소인 AChFAD6를 대상으로 중온성 미세조인 *Chlamydomonas reinhardtii*에 형질전환 시도.
- 나. *C. reinhardtii*에 형질전환 하여 AChFAD6를 발현시키기 위한 발현 벡터를 도입하여 AChFAD6 유전자와 결합하여 단백질 발현 플라스미드 구축.
- 다. Electroporation 방법을 사용하여 *C. reinhardtii*에 형질전환 후 다수의 녹조 콜로니 확보.

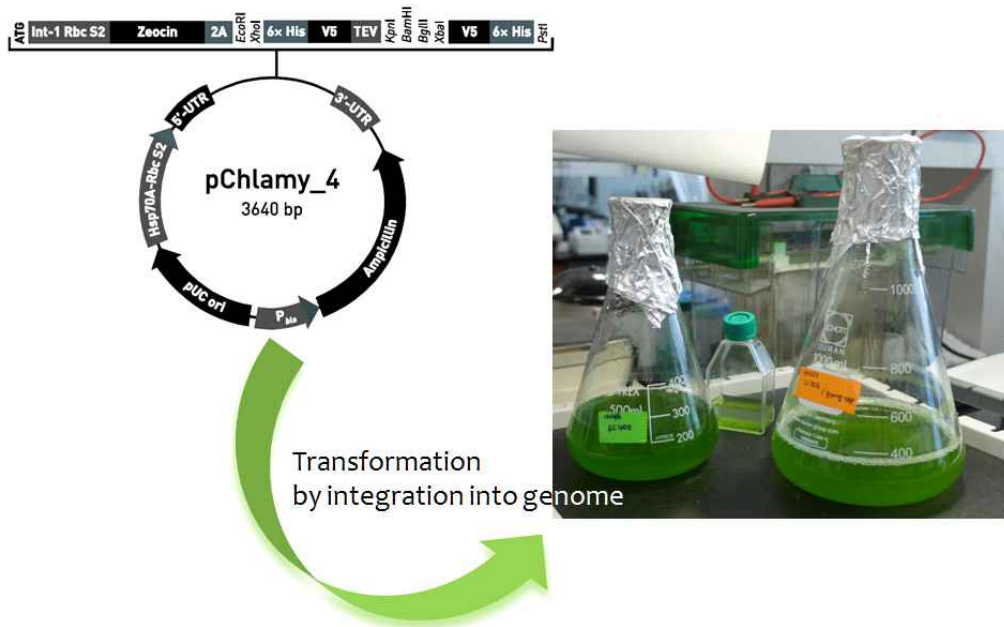


그림 160. 중온성 녹조 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii*에 AChFAD6를 도입시켜 불포화 지방산 합성 효소를 발현시키기 위한 실험과정.

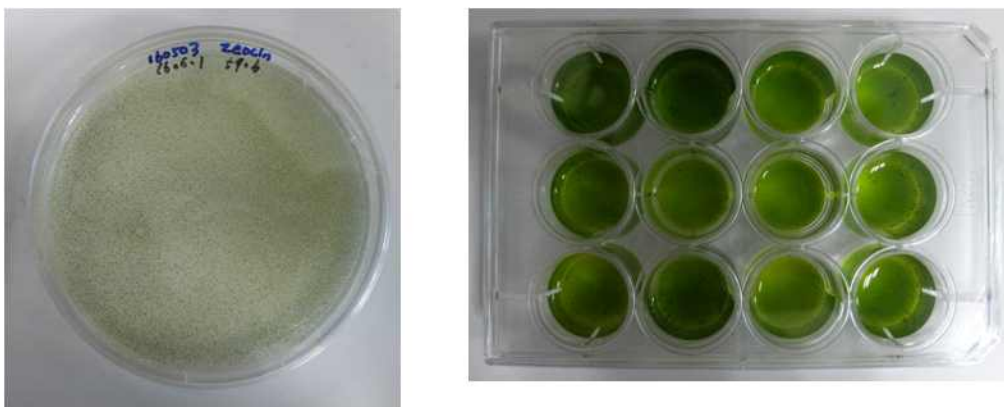


그림 161. Electroporation 방법을 사용한 중온성 녹조 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii* 내의 AChFAD6 형질전환 후 생성된 녹조 콜로니 및 콜로니의 액체배양 후 성장 사진.

제 4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

1절. 1차년도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
1차년도 (2013)	미세조류 고밀도 배양을 위하여 혐기성소화액 조건 및 소화액 전처리 최적화	100	소화액의 성분 분석한 자료를 바탕으로 소화액에 따른 미세조류의 생체량 및 지질 함량 분석 통한 혐기성소화액 조건은 미세조류 활용 연구에 기여 소화액에 따른 미세조류의 생화학 및 분자생물학적 분석을 통해 성장저해물질 제거 효율 극대화할 수 있을 것으로 기대함.
	미세조류의 순환배양 공정 시스템 구축	100	미세조류의 순환배양 공정 시스템 구축 유기용매에 따른 생존율, 생체량, 지질 함량을 분석하여 순환 배양 순환배양 공정에 기초 자료로 활용될 것임. 지질함량을 높이기 위한 숙성조건은 미세조류를 활용한 유사연구 수행이 가능함.
	부하변동에 따른 혐기소화 조건의 최적화 및 소화 성능 평가	100	1상 혐기소화조를 운전하여 기본 조건 확립하과 이 과정에서의 성분분석을 통하여 제거율을 평가하고 소화 운전 중 발생하는 메탄생산속도, 함량, 소화슬러지 정량 평가하여 혐기소화활용 연구에 기여함.
	여러 가지 암모니아 제거 기술 개발 및 최적 기술 적용을 통한 가축분뇨의 암모니아 농도 조절	100	탈기, 염소과피점주입, Struvite 형성을 통한 암모니아 제거 기술을 통해 제거율 및 혐기소화에 미치는 영향을 파악하여 최적의 방법 선정하여 관련 연구에 기여함.
	ArM0029 균주 분자생물학적 동정	100	극지 미세조류 ArM0029 분자생물학적 동정을 완료하여 본 미세조류 활용 연구에 기여.
	ArM0029 균주 온도별 성장률 분석	100	4, 8, 12, 20℃ 총 4개의 온도조건에서의 성장률 및 총 3종의 배양배지에서의 성장률을 분석함으로써 본 미세조류를 활용한 연구에 기초자료로서 활용될 것임.
	ArM0029 균주 지질성분 분석	100	본 미세조류에 대한 정성적, 정량적 지질분석이 세밀하게 수행됨으로서 본 미세생물을 사용하여 수행될 추후 지방산 생산 연구에 기초자료로 활용될 것임
	고밀도 배양을 위한 우량균주 추가선별	100	ArM0029 이외에 총 5종의 고농도 지방산을 함유하는 것으로 분석된 복극 담수 미세조류 후보를 발굴함으로써 지속적으로 극지 미세조류를 활용한 유사연구 수행이 가능함

2절. 2차년도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전에의 기여도
2차년도 (2014)	미세조류의 생물학적 연구 및 미세조류 친환경 세포비 파괴추출 기술 개발	100	<p>협기소화액 활용 미세조류 연속순환 고밀도 배양 scale up을 위하여 전처리 시스템화/다양한 형태의 바이오연료(가스, 오일 등) 생산 기술 개발.</p> <p>순환배양 전·후 배양액의 수질분석 자료는 미세조류를 활용한 유사연구에 기초 자료로 활용될 것을 기대함.</p>
	색도물질은 염소, 오존, UV 등을 이용하여 색도 제거 기술 개발	100	염소, 오존, UV 처리를 통한 색도제거 기술 연구를 통하여 미세조류가 성장에 미치는 영향을 파악하고 염소처리 과정에서 발생한 잔류염소를 제거하는 기술을 확립하고 그 영향을 파악하여 관련 연구에 기여함
	암모니아 제거 전처리, 혐기소화, 색도제거 후처리를 결합한 전공정의 가동 및 운전 최적화	100	전 처리로 암모니아제거, 혐기소화, 후처리 색도제거 공정을 거쳐 성분분석을 통하여 제거율을 평가하였고, 혐기소화 후 후처리로 암모니아와 색도제거를 실시한 후 성분분석을 통하여 제거율을 평가하여 가축분뇨 유기물, 무기물질 제거를 하는 연구에 활용될 수 있을 것이라고 기대함.
	농축산 폐수에서 선별 미세조류의 배양 최적화 모사	100	농축산 폐수 등 다양한 배지 내 성분에 대한 다양한 배지 최적화 연구가 수행됨으로서 향후 선발되어 사용될 극지 미세조류의 성장 최적화를 위한 배지 성분의 설계에 대한 실질적 자료로서 활용될 것으로 기대함
	선별 미세균주의 대사체 분석	100	극지 녹조 미세조류에 대한 유전체 자료를 기반으로 한 대사체 분석 결과를 토대로 유전자 클러스터를 활용한 대상 지방산을 고농도로 합성할 수 있는 종주 개량 데이터로 활용될 것으로 기대함.
	선별 미세균주의 유전체 분석	100	Next-generation sequencing 방법을 통한 대량의 유전체 정보가 확보됨으로서 KEGG pathway 등을 활용한 대사체 연구에 기초자료로서 활용될 것으로 기대함
	선별 미세균주의 리피도믹스 분석	100	극지 녹조 미세조류에 대한 LC-MS를 사용한 리피도믹스 분석이 수행됨으로서 목적 지방산으로 전환될 수 있는 지질의 조성 및 함량 데이터를 확보함.

3절. 3차년도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차년도 (2015)	혐기소화액 활용 미세조류 연속순환 고밀도 배양	100	<p>혐기소화액 활용 미세조류 연속순환 고밀도 배양 scale up을 위하여 전처리 시스템화/다양한 형태의 바이오연료(가스, 오일 등) 생산 기술 개발.</p> <p>순환배양 전·후 배양액의 수질분석 자료는 미세조류를 활용한 유사연구에 기초 자료로 활용될 것을 기대함.</p>
	혐기소화 전공정 pilot plant 가동, trouble shooting, 성능평가 자료 확보	100	전처리, 후처리를 통합한 최적의 공정을 확립하고 공정 진행 시 제거율을 평가하였고 통합공정의 문제점을 발견하고 trouble shooting을 통한 공정의 최적화를 진행하여 기존 가축분뇨 처리에 소요되는 시간을 최소화할 수 있을 것이라고 기대함
	가축분뇨 혐기소화 전동정 운전 기준 작성	100	Pilot plant 운영 간 성분분석을 통한 자료 확보를 실시하고, 통합공정의 안정을 위한 설계인자 및 운전기준을 작성하여 운영함으로써 관련 연구에 기여함
	선별 미세조류 균주의 유전자 분석결과를 통한 유용 유전자원 발굴	100	총 2종의 극지 미세조류에 대한 대량의 유전자원을 확보함으로써 지속적인 지방산 합성효소 관련 유전자를 발굴하여 최대 불포화 지방산 합성 활성을 나타내는 효소를 발굴하는 연구에 기초자료로 활용될 것으로 기대함.
	선별 미세조류 균주의 유전자 자원을 기반으로 한 유용 물질의 발굴 및 합성	100	미세조류 균주 유래 불포화 지방산 합성효소의 유전자를 대장균, 효모 또는 중온성 미세조류에 형질전환함으로써 단시간에 대량의 목적 불포화 지방산을 합성할 것으로 기대함. 또한 위치 특이적 돌연변이 기법을 활용하여 효소의 활성을 변환시킴으로써 목적하는 불포화 지방산을 대량으로 합성할 수 있을 것으로 기대함.
	형질전환기법을 이용한 분자생물학적 균주개량 기반 확립	100	극지 녹조 미세조류와 근연관계가 높은 중온성 녹조 미세조류에 불포화 지방산 합성효소 유전자를 형질전환하여 다수의 녹조 콜로니를 획득하는데 성공하였음. 이를 더욱 발전시켜 최종적으로 중온성 녹조 미세조류에서 목적 불포화지방산을 합성시키는 연구의 중간단계의 결과를 획득하였음. 본 결과를 지속적으로 발전시켜 중온성 녹조 미세조류의 형질전환기법을 확립하는데 본 연구가 기여할 것으로 기대함.

제 5장. 연구 결과의 활용 계획

1절. 연구개발 결과의 활용 방안

1. 본 연구는 산·학·연 지역 업체 및 농어촌 현지 주민들의 협력형 연구로써 하수처리 및 축산분뇨 처리시설의 물 재이용 / 유기성 폐기물 처리 관련 신기술 확립, 농가 수익 증대와 고용 증대의 부가적인 효과를 기대할 수 있음.
2. 본 연구는 고부가가치 사업을 제시하고 있으며 친환경 신재생에너지의 생산을 기반으로 기획 되고 수질정화 및 유기성 폐기물 처리에 대한 신기술로써 농어촌의 신성장 동력 사업으로 추진 가능하며 관련 특허를 다수 확보 및 선행연구 진행 중임.
3. 개량된 최적화 미세조류 및 고효율 균주를 자체 확보 하는 것은 상업적 가치의 생물종에 대한 수입대체 효과뿐 아니라 향후 본격적인 바이오연료 및 화학제품 생산에 대비 했을 때 기존 화석원료 기반 제품 대비 가격 경쟁력 확보에 기여.
4. 폐바이오매스를 이용하므로 자원의 공급이 무한정하며 재생 가능한 산업시스템을 형성 및 농업 경영인에게 새로운 비즈니스와 고용 기회 창출.
5. 재생가능자원 (biomass) 사용 공정 개발을 통한 원유 수입 및 온실가스 배출 절감 지방산 에스테르 1톤 사용 시 2.2톤의 이산화탄소 발생 저감 효과가 있으며 이는 이산화탄소 배출권 가격으로 약 2만원에 해당.
6. 본 연구는 가축분뇨내의 고농도로 존재하는 유기물과 영양염류를 혐기소화, 비교적 간단한 몇 가지의 물리화학적 처리와 미세조류를 배양을 통하여 95% 이상 다량 제거하고 동시에 바이오매스의 회수를 통한 바이오 디젤생산 등을 할 수 있어 가축분뇨의 처리에 있어서 소요되는 시간을 절감하고 부가적인 이익 창출을 기대할 수 있음.
7. 북극에서 유래한 미세조류 ArM0029는 저온에서도 높은 성장률을 보이며, 비교적 고농도의 지질을 함유하는 것으로 분석되어, 특히 겨울철 수온이 낮을 때에 혐기소화액을 정화 하면서 지질을 생산할 수 있는 균주로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료됨.
8. 극지연구소가 보유하고 있는 극지 미세조류에 대한 배지별 성장률 분석 결과, 균주별로 선호하는 배지가 다양하게 도출되었음. 또한, 다양한 염 농도 조건에서 성장 가능한 미세조류가 선발되었으므로 혐기소화액에서 배양할 수 있는 미세조류로 사용될 수 있을 것으로 기대됨.

9. 선별된 북극 미세조류 균주의 높은 불포화지방산 비율과 함량은 바이오연료의 주요성분으로 사용될 수 있을 것으로 기대함.
10. 선별 미세조류 균주로부터 대량으로 획득된 유전정보 중 지방산 합성효소 관련 유전자를 지속적으로 획득하고, 이 유전자들을 지방산 합성 KEGG pathway에 기반하여 연구 시, 재조합 단백질에 의한 대장균, 효모 및 중온성 미세조류 등에서 대량으로 고품량 지방산 합성이 가능할 것으로 기대함.
11. 유전자의 의도적 돌연변이에 의해 단백질의 활성이 변화되고, 그에 따라 합성되는 주요 지방산 성분 및 농도가 변환되는 결과를 바탕으로, 단백질의 2차 구조에 기반한 연구를 추진함으로써 목적하는 지방산의 고농도 합성을 가능하게 할 수 있을 것으로 기대됨.
12. 북극 미세조류 뿐만 아니라 남극미세조류를 이용한 바이오에너지 생산도 추진하여 활용성을 높일 필요가 있으며, 비록 세계 경제 침체와 국제 유가의 하락으로 바이오에너지 개발의 동력이 크게 저하되었지만 꾸준한 연구개발로 미래를 대비할 필요가 있음.

2절. 기대성과

1. 기술적 측면

- 가. 가축분뇨의 혐기소화 후 슬러지류까지 전량 소모하는 시스템의 표준화.
- 나. 질소와 인 제거능을 향상시킨 생물학적 처리시스템 및 활용 가능한 바이오매스로 변환.
- 다. 기존의 바이오가스 생산 시스템을 변형하여 적용하므로 신축 시설 건립이 아닌 시스템 추가 공정으로 시설비 절감.
- 라. 본 연구로 인한 신재생 에너지생산기술 보급 용이.
- 마. 바이오가스, 바이오 디젤 및 바이오 에탄올 등의 수송용 연료 생산이 가능하여 다양화된 바이오 연료 생산 가능.
- 바. 저급 농축산폐수, 음폐수 뿐만 아니라 하수의 혐기소화폐액 처리에 활용 가능.

2. 환경적 측면

- 가. 혐기소화액의 해양투기 방지 후, 매립과 소각 위주의 육상처리방안에서 다양한 신재생 에너지 생산을 통한 친환경 시스템 구축.
- 나. 유기성 폐기물의 친환경 처리 기술을 확보하여 녹조와 부영양화 발생을 억제.
- 다. 친환경적인 에너지 생산 및 이산화탄소 저감을 통한 배출권 획득.
- 라. 폐기물의 재자원화, 에너지화로 고질적인 환경 문제 발생을 억제.



그림 162. 본 연구기술 개발의 기대효과 및 연계 가능 사업 분야.

3. 경제적·산업적 측면.

- 가. 지방자치단체와 연계한 지역기반의 사업화 성공을 위한 실증적 연구 개발로써 농촌의 첨단 바이오기술과 친환경적인 사업을 통하여 지역사회 발전과 지역 중소기업의 동반 성장이 가능.
- 나. 농촌 지역 일자리 증대 및 지역 연계 중소기업의 수익 증대를 통한 농촌의 재정 수익 극대화 및 친환경 과학 단지 구축 가능, 테마형 현장 교육장 등의 부가 관광 사업으로 확대 가능.
- 다. 혐기소화폐액처리가 가능함에 의한 액비로의 사용이 용이하지 않은 경우의 문제 해결.
- 라. 기존의 혐기소화기술 적용이 가능함에 의해 농축산폐수 처리 비용 저감.
- 마. 이산화탄소배출권, 사료비료 생산, 바이오연료 생산을 통한 다각적인 수익 사업 추진을 통해 안정적인 사업모델 확립.
- 바. 세포비과과 오일 추출기술은 미세조류 바이오매스를 활용하는 사업에 획기적인 비용 절감형 공정 제시.
- 사. 유기성 폐기물 처리를 위한 지역사회의 신성장동력 사업으로 추진.
- 아. 부산물을 제품화하여 저탄소 생산제품이라는 이미지 구축이 가능하여 해외수출 장벽을 낮출 수 있음.

4. 자동 재순환 배양 시스템을 활용한 미세조류 바이오매스 사업화

- 가. Milking기술로 지방산을 추출하는 특허를 개발한 Dr. Sayre는 Phycal사를 설립하여 미국 연방정부의 DOE로부터 60M\$를 지원받아 하와이에서 미세조류로부터 지방산을 추출하여 2010년부터 바이오디젤을 생산하여 하와이발전에 공급하고 있음. 당사의 기술은 자동화 및 운영효율성이 Dr. Sayre 기술보다 우수하여 효율적으로 바이오매스를 생산할 수 있을 것으로 판단되어 바이오매스의 원천기술로 사업화를 진행할 수 있음.

- 나. 미세조류 자동 재순환 배양 시스템을 통한 바이오매스 대량 생산
- 미세조류 crude 형태의 원재료 공급(powder, flake, film, a wet mass 형태로 판매)
 - 지용성물질이 제거된 미세조류로 단백질 및 탄수화물을 활용한 제품 개발
- 다. 가축분뇨·농축부산물 등 유기성 폐자원을 이용, 바이오 에너지를 생산하고 남은 혐기소화액은 액비화하여 자원순환 촉진
- 환경오염 방지, 화석 에너지 대체, 온실가스 감축, 화학비료 대체, 농촌생활 환경개선 등 1석 5조 효과
 - 유기성 탄소원, 질소 및 인 처리 과정에서 발생하는 생물자원(biomass)의 회수와 활용방안의 정립은 바이오에너지 개발, 바이오소재 개발과 농촌 축산 사료 등 재자원화는 청정개발체제(CDM)사업으로 가치를 가짐.
- 라. 저온성 미세조류를 이용하여 겨울철 수온이 낮을 때에도 혐기소화액을 정화하면서 지질을 생산할 수 있는 균주로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료됨.
- 마. 지방지단체와 국내 테크노파크, 대학 산하 제조시설을 갖춘 센터와 연구협력 및 기술개발 예정
- 농업회사법인자연재배주식회사와 기술[노하우]이전 계약을 체결함
 - 고급연구 인력 양성 및 설비 시설의 효율적 활용
 - 고밀도 배양 관련 기술, Milking 관련 기술 외에도 관련 후처리 공정 기술 개발 유도, 지질/단백질/탄수화물 활용 등으로 추가적인 부가사업 추진 가능
- 바. 과제 종료 후, 본 기술을 활용하여 다양한 미세조류의 고밀도 배양과 milking 추출을 이용한 신규 물질 탐색 연구 개발 및 사업다각화 계획을 추진 예정

제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. FAO (UN 식량농업기구, 2007)는 향후 2030년까지 액체 바이오연료가 전 세계 도로교통 연료수요의 4 ~ 7% 정도를 담당할 것으로 전망하고 있으며, 미국, EU, 일본, 브라질 등 많은 나라들이 바이오연료 생산에 박차를 가하고 있다고 보고함.
2. Wijffels & Barbosa (2010)는 지구온난화와 에너지 위기가 계속되는 등급변하는 시대를 에너지기후시대로 칭하는 상황에서 조류 생물연료 생산은 현재는 연구개발 단계이지만 기술적 진보에 의해 향후 5 ~ 15년이면 산업적 생산이 가능하다고 보고함.
3. Chisti, Y. (2007)는 미세조류가 생산하는 지질 (Lipid)을 추출하여 바이오디젤로 전환하면 수송용 바이오연료로 사용할 수 있기 때문에 최근 미세조류가 바이오매스 자원으로 각광 받고 있음. 특히, 표 91을 보면 미세조류가 다른 식물체에 비해서 단위면적당 생산성이 월등히 높은 것으로 조사되었음.

표 93. 바이오디젤에 대한 다양한 원료의 비교.

Crop	Oil yield (L/ha)	Land area needed (Mha) ^a	Percent of existing US cropping area ^a
Corn	172	1,540	846
Soybean	446	594	326
Canola	1,190	223	122
Jatropha	1,892	140	77
Coconut	2,689	99	54
Oil palm	5,950	45	24
Microalgaeb	136,900	2	1.1
Microalgaec	58,700	4.5	2.5

^a For meeting 50 % of all transport fuel needs of the United States.

^b 70 % oil (by wt) in biomass.

^c 30 % oil (by wt) in biomass

4. 유기물 및 영양물질 제거효율 증대를 위한 기술

- 가. Deng 등(2009)은 펜톤산화를 하는 경우 주입된 과산화수소가 높아질수록 총 COD 제거율은 선형적으로 좋아진다고 보고함. 하지만, 포화되는 지점이 존재하여 효율을 감소시킬 수 있기 때문에 적절한 주입량을 찾는 것이 중요함. 펜톤산화의 경우 응집과 산화가 동시에 이루어지기 때문에 주입하는 과산화수소와 철염의 비율, 반응 온도, pH 등도 중요하다고 보고함.
- 나. Guo 등(2010)은 펜톤산화의 경우 일반적으로 적정 pH는 약 2.5에서 3정도이며 pH 5 이상일 경우 산화가 감소하여 COD 제거효율이 낮아진다고 보고함. 또한, pH 3에서 FeSO₄를 10 g/L 주입한 경우 H₂O₂를 24 ml 주입하는 것이 적절하며 OH라디칼이 너무 많아지면 서로 반응하여 O₂ + H₂O 형태로 반응하여 제거효율이 낮아진다고 보고함.

5. 미세조류 배양

- 가. Wang 등(2010)에 의하면, 혐기소화액을 배양배지로 이용하여 *Chlorella* 속을 배양할 경우, 미세조류의 초기 접종량이 *Chlorella*의 성장에 영향을 미친다고 보고함.
- 나. 1 × 10⁷ cells/ml 수준으로 *Chlorella* 접종 시 혐기소화액에서 미세조류의 접종에 의한 빛의 간섭 없이 가장 잘 성장한다고 보고하고 있으며, 1 × 10⁵ cells/ml 이하의 접종량일 경우 미세조류가 성장하지 않는다고 보고함.
- 다. Mattos 등(2016)은 *Desmodesmus* sp. 의 경우 pH 7, 25°C, 3 g의 교반속도에서 30시간 배양하였을 경우 TCOD, TN 각각 36.2%, 52.1% 제거되었다고 보고함.

6. Christenson, L. and R. Sims.(2011)는 부착성 미세조류 배양은 미세조류 바이오매스의 회수뿐만 아니라 활용 측면에서도 유용하다. 폐수처리와 연계하여 부착성 미세조류를 배양한 연구는 여러 건이 있었으며, 표 94와 같이 기존의 부유성 미세조류에 비해 생산성이 높게 나타났음.

표 94. 미세조류 배양방법에 따른 특성의 비교.

D9sign	Culture density (g/L)	Gas exchange	Scalability	Culture control
Raceway pond	0.25 ~ 1.00	Low	High	Low
Tubular reactor	1.5 ~ 1.7	Very low	Medium	High
Biofilm system	70	High	High	Low

7. 조류/세균 혼합배양 (algal - bacterial process)을 통한 환경정화효율 향상 기술.

- 가. 폐수처리 과정에서의 조류/세균 혼합배양 장점은 조류가 광합성을 통해 생산하는 O₂를 타가영양 미생물이 이용, 미생물이 생산하는 CO₂를 조류가 소비토록 함.
- 나. 상호 공생능력을 향상시켜 환경정화 효과를 상승시키고 아울러 조류에 의한 CO₂ 흡수, 중금속 제거, 영양염 제거 효과를 누리면서 생산된 algal biomass를 바이오 연료나 비료 등으로 활용할 수 있음.
- 다. 따라서 폐수처리에서 조류/세균 혼합배양에 의한 biomass 생산은 미세조류의 높은 중금속 흡착능과 낮은 생산단가가 결합하여 폐수처리에 아주 유용하게 활용될 수 있음.

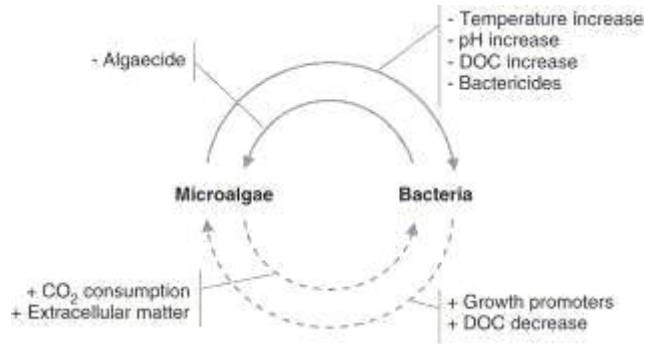


그림 163. 미세조류와 박테리아 사이의 상호작용(환경부, 2014).

표 95. 하수처리장에 미세조류(microalgae) 적용 사례.

적용 사례	내용	참고 문헌
BOD 처리	- Pilot 및 Lab 규모의 광생물반응기를 이용한 하수 및 폐수 처리에서 미세조류의 산소 전환율은 0.48 ~ 1.85 kg/d에 달하고, 광합성 정에서 미세조류 1 kg은 약 1.5 ~ 1.92kg의 산소를 발생시킨다고 알려져 있음.	Grobbelaar et al., 1988. Martinez et al., 2000. McGriff and McKinney, 1972. Munoz et al., 2004. Oswald, 1988.
영양염류 처리	- 미세조류는 단백질 (미세조류 건조 중량의 45 ~ 60%), 핵산, 및 인지질 합성을 위해 질소와 인을 필요로 하여 상당량의 영양염류를 체내에 흡수함. - 영양염류의 제거로 광합성 과정에서 pH의 증가가 유발되기 때문에 암모니아의 탈기 또는 인의 침전을 유도함.	Lalibert et al., 1994. Oswald, 2003. McGriff and McKinney, 1972. Nurdogan and Oswald, 1995. Vollenweider, 1985.
중금속 처리	- 광합성 미생물은 세포 표면에 물리 흡착, 이온 교환 및 화학 흡착, 공유 결합, 표면 침전, 산화 환원 반응 또는 결정화에 의해 중금속을 축적 할 수 있음. - 축적된 중금속은 필수 미량 원소로 사용하거나 독성을 방지하는 역할을 하며, 미세조류는 금속이온을 활용하여 세포 외 대사산물 발생 시킬 수 있음. - 미세조류 성장에 의한 pH 증가는 중금속의 침전을 향상 시킴.	Chojnacka et al., 2005. Kaplan et al., 1995. Kaplan et al., 1987. Rose et al., 1998. Travieso et al., 1996.; V an Hille et al., 1999 Wilde & Benemann, 1993. Yu and wang, 2004.
병원균 처리	- 미세조류는 처리수의 pH, 온도 및 용존산소를 증가시켜 병원균의 활성도를 저감.	Aiba, 1982. Mallick, 2002. Mezrioui et al., 1994. Robinson, 1998. Schumacher et al., 2003.
유해물 처리	- 특정 녹조류 및 남조류는 독성을 가진 화합물을 탄소, 질소, 황 또는 인으로서 사용할 수 있음.	Semple et al., 1999. Subaramaniana and Uma, 1997.
바이오가스 생산	- 조류/박테리아 바이오매스를 이용하여 혐기성 소화 후 메탄을 생산할 시, 상당한 경제적 비용을 절감할 수 있음.	Eisenberg et al., 1981. Oswald, 1976.

표 96. 조류 박테리아 또는 미세조류에 의한 유기 오염물질 제거.

화합물	실험 조건	균 주	제거율 (mg/L · d)	참고 문헌
아세트니트릴	600ml 교반 반응조	<i>C. sorokiniana</i> 와 박테리아	2,300	Munoz et al., 2005.
	50 L 광생물반응기	<i>Chorella/Scenedesmus</i> 와 alcanotrophic 박테리아	432	Munoz et al., 2005.
석유	5ml 튜브	<i>Chorella/Scenedesmus</i> 와 alcanotrophic 박테리아	-	Safonova et al., 1999.
	100 L 반응조	<i>Chorella/Scenedesmus/ Rhodococcu/Phormidium</i>	5.5	Safonova et al., 2004.
페난트렌	2 L 스탠다드와 10%실리콘유 10%	<i>C.sorokiniana</i> 와 <i>Pseudomonas migula</i>	192	Muoz et al., 2005.
	50ml 튜브와 20% 실리콘유	<i>C.sorokiniana</i> 와 <i>Pseudomonas migula</i>	576	Muoz et al., 2003.
페놀	600ml 스탠다드와 8 g/L NaHCO ₃	<i>C.vulgaris/ Alcaligenes sp.</i>	90	Essam et al., 2006.
	100ml E-플라스크	<i>Anabaena variabilis</i>	4.4	Hirooka et al., 2003.
살리실산	600ml 스탠다드	<i>C. sorokiniana/ Ralstonia basileensis</i>	2,088	Munoz et al., 2004.
p-니트로페놀	-	<i>C. vulgaris/ C. pyrenoidosa</i>	50	Lima et al., 2003.

8. 2014년 7차 Asian Pacific Phycological Forum (중국)

가. 2014. Dang Diem Hong. et al. Explore the potential of producing biodiesel and valuable co-products of squalene and polyunsaturated fatty acids from heterotrophic marine microalga of *Schizochytrium mangrovei* PQ6

- 스쿠알렌은 높은 탄소수를 가진 불포화지방산임. 콜레스테롤 과 담즙산, 스테로이드의 생합성 전구체임. 스쿠알렌은 항산화제, 항암제, 항방사선 효능, 피부보습 효과를 지님. 그리고 고지혈증을 감소시킴. 고부가가치 물질로 각광받고 있음. *Schizochytrium* 속을 이용하여 불포화지방산을 생산할 수 있음. 이는 바이오연료, 필수지방산, 향장품으로 사용 가능함.



그림 164. Hong et al. 발표자료.

- 나. Tomonori Kotajima. et al. A novel $\Delta 15$ fatty acid desaturase involved in synthesis of octadecapentaenoic acid, 18 : 5, in the Haptophyta *Emiliana huxleyi*.
- *E. huxleyi* 의 C18 지방산 조성은 C18 : 0, C18 : 1 $\Delta 9$, C18 : 2 $\Delta 9, 12$, C18 : 3 $\Delta 9, 12, 15$, C18 : 4 $\Delta 6, 9, 12, 15$, C18 : 5 $\Delta 3, 6, 9, 12, 15$ 임. 각각의 desaturase가 존재하지만, $\Delta 3$ desaturase는 알려지지 않음. 각각의 desaturase 유전체를 이중발현하여 이중결합을 만들어 불포화 지방산을 만드는 효과를 확인함. 특히 $\Delta 15$ desaturase는 유전적으로 미세 조류 특이성을 밝혀냄.

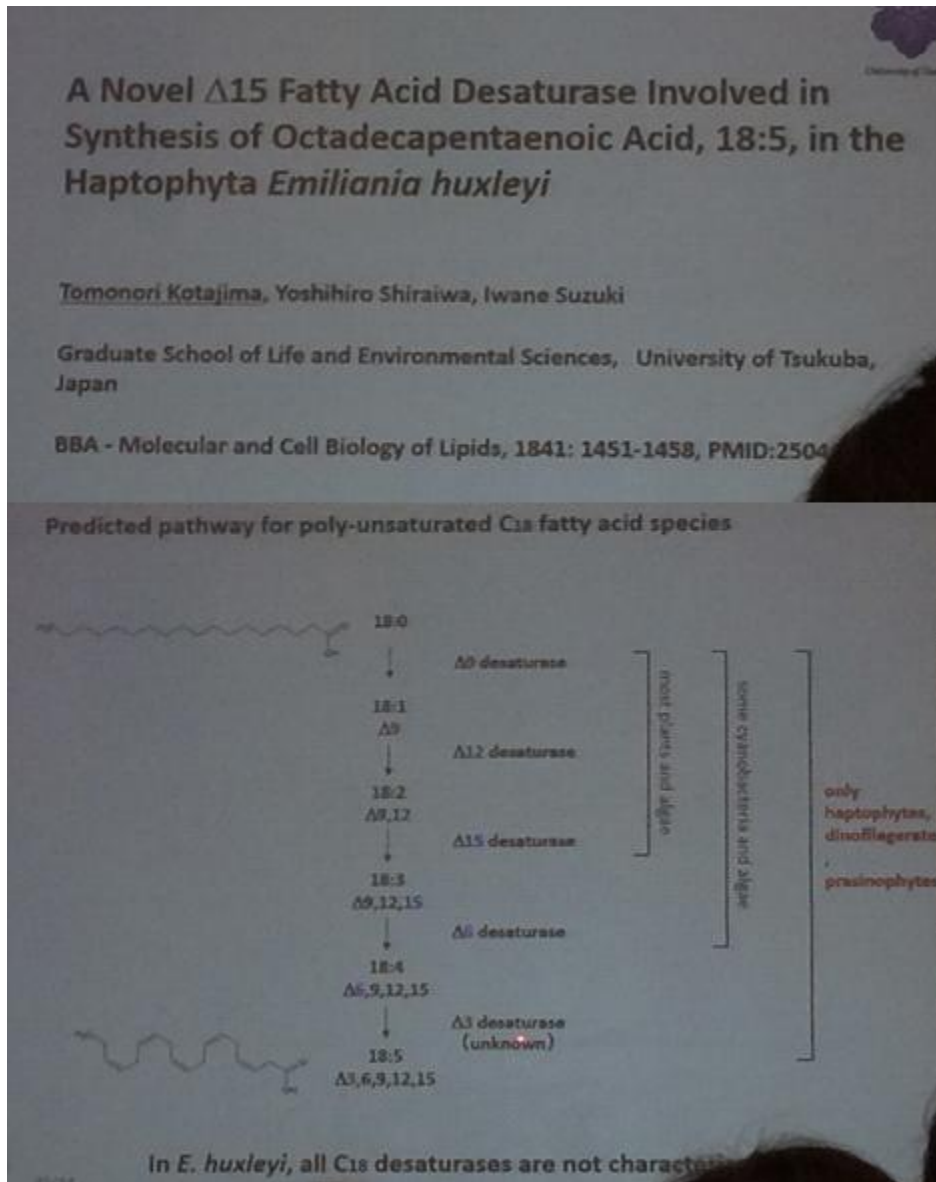


그림 165. Tomonori Kotajima. et al. 발표 자료.

9. 2015년 9차 International Algae Congress (포르투갈)

가. Duarte Rego. et al. Pulsed electric fields; a tool for upstream and downstream processing of microalgae cultures.

- 전자기장 PEF (Pulsed Electric Fields) 을 이용한 미세조류의 업스트림, 다운스트림 기술 개발 : 전 자기장을 활용하는 것은 미세조류의 막 투과성을 높여주는 잠재적 기술임. 업스트림 측면; 배양시 발생하는 미생물의 오염 (미세조류포식자 요각류, 원생동물)을 제거할 수 있음. 다운스트림 측면; 세포내부에 존재하는 지질 (바이오연료소재, 식품, 의약품 소재)을 세포 소멸없이 추출할수 있음. PEF의 전기적 세기는 900 V/ccm, 65 μ s pulses of 50 Hz로 설정함. 이세기에서 업스트림 측면에서 미세조류 포식자를 100% 제거할 수 있음. 10 kV/cm, 5 μ s pulses of 200 Hz에서는 기능성 물질 추출이 가능함.



그림 166. Duarte Rego. et al. 발표 자료.

나. W. Frey. et al. Pulsed Electric Field (PEF) treatment of microalgae: Benefit of cascade processing.

- 전자기장은 세포의 플라즈마 막을 구조적으로 부수거나 회복될 수 있는 수준의 구멍을 만들어냄. 이러한 점은 세포내 구성물을 밖으로 빼낼 수 있음. 세포를 살리면서 세포내 구성물을 효과적으로 빼내는 기술이 중요함. 이러한 전자기장 기술은 과일을 즙을 빼내거나 식품 멸균, 의료적 치료법을 사용됨. PEF 장치를 미세조류 배양기에 설치하고 펄스를 1 μ s, 34 kV/cm으로 처리함. 표준 처리 에너지량은 150 kJ/kg_{SUS} 임. PEF를 처리하여 수용성 물질 추출 가능. 단백질과 탄수화물, TOC, 상등액상 물질이 추출이 비교군에 비해 많은 양 검출됨. 염기성 용매와 유기용매를 통해 기타단백질과 지질을 추출할 수 있었음.

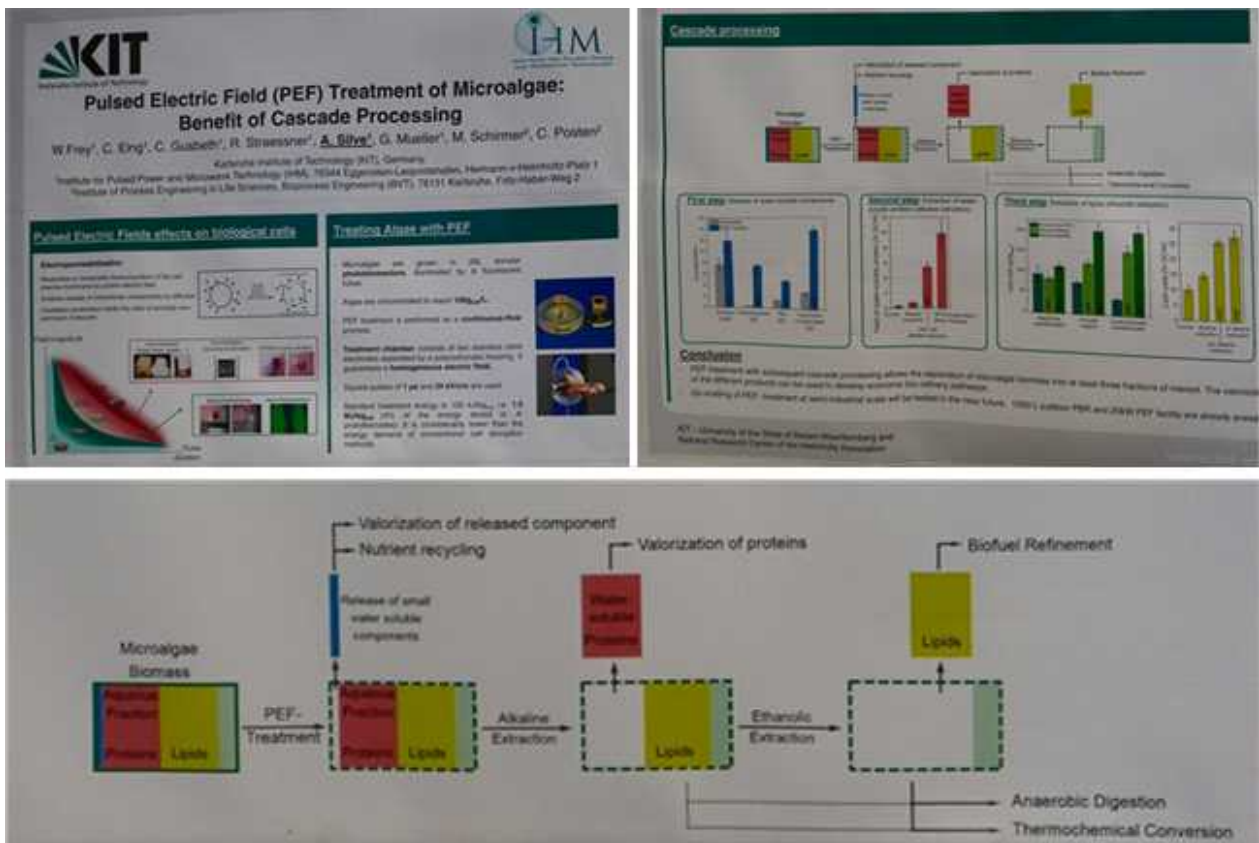


그림 167. Frey et al., 발표 자료와 Cascade processing.

다. 2015. Ju Xiaohui. et al. Selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*.

- 금과 팔라듐은 의료, 전자, 촉매산업에서 수요가 증가되고 있는 희귀한 고가의 금속자원임. 이러한 중요성으로 재활용 방법이 개발되고 있지만, 10 ppm 이하의 농도 조건에서 회수가 힘들. sulfo-thermophilic red alga 인 *Galdieria sulphuraria* 는 희귀 금속인 Au^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{4+} 를 높은 수준으로 회수함. 이 균주는 다른 금속이온도 회수를 가능케 하지만 특이적으로 금과 팔라듐을 높은 수준에서 회수하였음. 이 균주를 폐수처리 시설에서 활용하면 금과 팔라듐을 효과적으로 회수할 것으로 기대함.

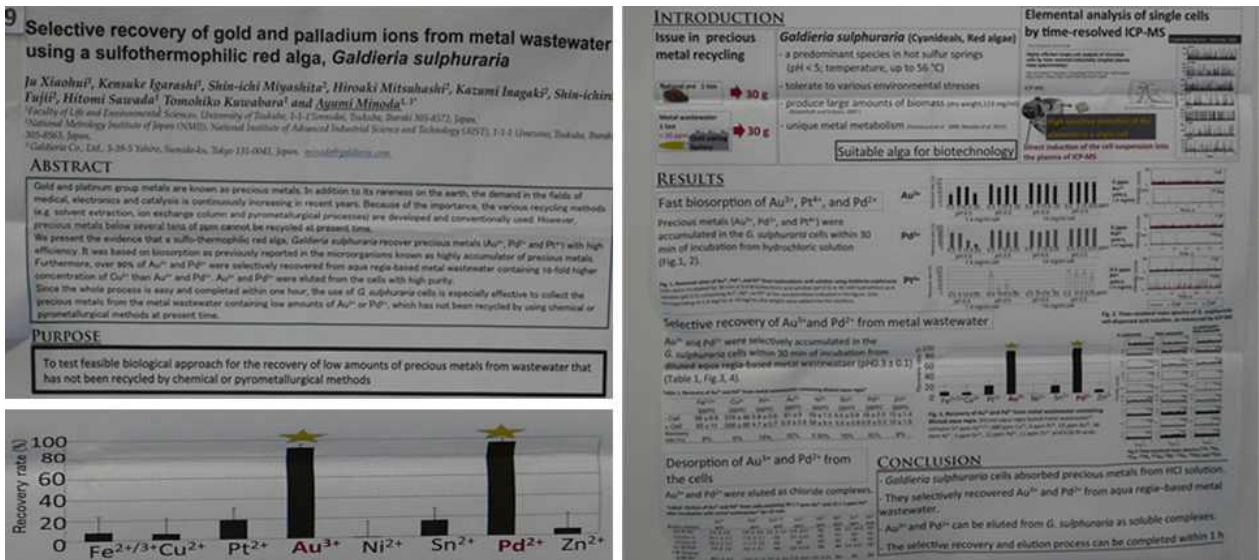


그림 168. Ju Xiaohui. et al. 발표 자료 및 폐수에서 회수된 금과 팔라듐 이온.

제 7장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

1. 연구실적표

구분	논문		특허		학술발표	언론홍보	유전자원 등록	인력양성
	SCI	비SCI	출원	등록				
최종목표	4	-	2	1		1	1	-
1차년도	목표							
	실적	1			1	3	1	5
2차년도	목표	2		1				
	실적		1	3	1	4	1	2
3차년도	목표	2		1	1		1	
	실적	3		2	2	6	3	5
달성도 (%)	100	-	250	400	-	200	400	-

2. 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	인큐베이터에서 광원에 따른 미세조류 성장 특성	(주)바이 오이즈	제1저자, 교신저 자	한국생태공 학회지	-	2014.12.01	-	-
2	논문	A comparative study on the alternating mesophilic and thermophilic two-stage anaerobic digestion of food waste	명지대	제1 저자	Journal of Environ mental Sciences /중국	3.26	2014.06.01	-	SCIE / 10회 인용
3	논문	Growth and lipid content at low temperature of Arctic algae <i>Chlamydomonas</i> sp. KNM0029C	한국해양 과학기술 원 부설 극지연구 소	제1저자, 교신저 자	Bioprocess and Biosystems Engineering	1.901	2015.10.26	단독사사	SCI

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
4	논문	Cellular growth and fatty acid content of Arctic chlamydomonadalean	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	제1저자, 교신저자	Algae	1.778	2016.02.08	중복사사	SCIE
5	논문	Enzymatic modification by point mutation and functional analysis of an omega-6 fatty acid desaturase from arctic Chlamydomonas sp.	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	제1저자, 교신저자	Preparative Biochemistry and Biotechnology	1.7	2016.05.18	중복사사	SCI
6	특허 등록	돼지분뇨 혐기소화액을 이용한 미세조류 배양 배지 제조방법, 미세조류 배양 방법 및 이를 포함하는 돼지분뇨 처리 방법	명지대학교 산학협력단	대표발명자	대한민국	-	2015.08.27	-	-
7	특허 등록	지질 생산능을 가지는 클라미도모나스 속 ArM0029C 미세조류 및 그 용도	한국해양과학기술원	대표발명자	대한민국	-	2016.03.02	-	-
8	특허 등록	지질 생산능을 가지는 클라미도모나스 속 ArF0008 미세조류 및 그 용도	한국해양과학기술원	대표발명자	대한민국	-	2016.03.02	-	-

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
9	특허 등록	북극 해양에서 분리한 지질 고생산 미세조류 클라미도모나스 세포주 및 이의 용도	한국해양 과학기술 원	대표발 명자	대한민국	-	2014.01.14	-	-
10	특허 출원	클라미도모나스 유래의 오메가-6 지방산 불포화효소 및 이의 용도	한국해양 과학기술 원	대표발 명자	대한민국	-	2016.04.25. (출원일)	-	-
11	특허 출원	남극 요각류 티그리오푸스 킹세중엔시스 유래의 스테아로일-CoA 불포화효소 및 이의 용도	한국해양 과학기술 원	대표발 명자	대한민국	-	2016.06.17. (출원일)	-	-

3. 학술대회 발표

번호	발표일시	소속 기관명	장소/국명	학술회의명	발표제목
1	2013.09.26	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	한국과학기술원 (KAIST) KI빌딩	한국조류학회	남극 세종과학기지 주변의 연중 Chlorophyll 변화 양상
2	2014.04.09	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	경주 현대호텔	한국생물공학회	Cultivation and Lipid Formation of a Green Microalgae, <i>Chlamydomonas</i> sp. Arm0029A, Isolated from Arctic Sea Ice
3	2014.04.16	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	완도문화예술의전당	한국조류학회	Diversity of unicellular green algae from Ny-Alesund
4	2014.09.20	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	Wuhan, china	APPE	The arctic <i>Chlamydomonas</i> sp. as microalgal candidates for biofuel production: The analyses for growth and lipid contents
5	2014.09.20	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	Wuhan, china	APPE	The new arctic <i>Chlorella</i> species: growth and lipid contents
6	2014.09.26	명지대학교	경주 더케이호텔	한국청정기술학회	Cultures of microalgae for the production of bio-fuel using piggery wastewater anaerobic digestate
7	2014.11.28	명지대학교	유기성자원학회	한국환경정책평가연구원 대강당	Cultures of microalgae for the production of bio-fuel using piggery wastewater anaerobic digestate
8	2015.12.02	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	EABA	lisbon, portugal	Growth and Lipid Content of Psychrophilic <i>Chlamydomonas</i> sp. KNM0029C
9	2015.12.02	한국해양과학기술원 부설 극지연구소	EABA	lisbon, portugal	The Arctic <i>Chlamydomonas</i> sp. as microalgal candidates for biofuel production
10	2016.03.23	명지대학교	한국물환경학회	부산 BEXCO	미세조류 배양을 위한 가축분뇨 혐기소화액의 전처리
11	2016.03.23	명지대학교	한국물환경학회	부산 BEXCO	가축분뇨 혐기소화액을 이용한 미세조류의 배양 및 영양염류 제거
12	2016.05.19	(주)바이오이즈	한국해양학회	부산 BEXCO	미세조류 순환배양 공정 시스템 구축을 위한 <i>Chlorella protothecoides</i> 의 고밀도 순환 배양의 최적화
13	2016.05.19	(주)바이오이즈	한국해양학회	부산 BEXCO	가축분뇨 혐기소화액을 이용한 미세조류 <i>Chlorella vulgaris</i> 의 바이오디젤 성분 분석 연구

4. 홍보실적

번호	홍보일	홍보유형	국내/외	매체명	제목
1	2013.10.10	지방TV방송	국내	마로니에방송	녹조 관리방안 마련을 위한 전문가 간담회
2	2014.09.01	기타	국내	일간지	극지연소식 제14호

5. 유전자원 등록

기탁일	생물자원명	등록, 기탁번호	비고
2014.12.08	<i>Chlamydomonas</i> sp. ArM0029C	KCTC12730BP	특허 균주 기탁
2016.04.12	<i>Escherichia coli</i> BL21 (D53) - AChFAD6	KCTC18460P	특허 균주 기탁
2016.04.12	<i>Escherichia coli</i> BL21 (D53) - Mut-AChFAD6	KCTC18461P	특허 균주 기탁
2016.04.27	<i>Escherichia coli</i> BL21 (D53) - TkSCD-1	KCTC18465P	특허 균주 기탁

6. 연구인력 양성

번호	인력양성년도	인력양성명	인력양성내용	학위수	인력양성대상수
1	2014	가축분뇨혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도배양 기술 개발	연구인력 활용	석사: 3 박사: 1 기타: 1	5
2	2015	가축분뇨혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도배양 기술 개발	연구인력 활용	학사: 1 석사: 1	2
3	2016	가축분뇨혐기소화액을 이용한 바이오연료용 미세조류 고밀도배양 기술 개발	연구인력 활용	박사: 2 석사: 2 기타: 1	5

제 8장. 참고문헌

1. 강도형 (2012) 한국해양과학기술원, 미세조류 바이오연료 상용화를 위한 주요인자 연구.
2. 산업통상자원부 (2014) 2014 신·재생 에너지 백서. 신·재생에너지센터.
3. 유기돈 (2008) 각국의 바이오연료 정책과 시사점, LGERI리포트.
4. 이봉수, 최강국, 정병률 (2013) 한국과학기술원, 바이오 연료 생산을 위한 미세조류의 분자 유전학적 개량.
5. 이상필, 김희식, 2013. 한국과학기술정보연구원, 미세조류를 이용한 바이오디젤.
6. 이진석 (2013) 한국에너지기술연구원, 목질계 바이오에탄올 R&D 현황과 전망.
7. 이진석 (2015) 미국 바이오연료 산업의 전략 분석, 한국에너지기술평가원.
8. 전은진, 한수현, (2014) 바이오에너지이슈분석 및 정책제언. 녹색기술센터.
9. 정원중, (2012) 바이오에너지생산성 향상을 위한 미세조류 생명공학 연구동향. Bioin 스페셜 웹진.
10. 지식경제부 (2012) 미세조류 기반 오일 양산을 위한 PBR-open pond 하이브리드형 바이오메스 사계절 대량생산 및 디젤 연료화 시스템 실증. 에너지기술개발사업 기획보고서.
11. 한국환경산업기술원 (2014). 미세조류(microalgae)를 이용한 하수 고도처리(N,P 제거) 및 Bio-ethanol 생성 기술 개발.
12. 한국환경자원공사 (2008). Waste-to-Energy Report(vol.1). 환경부, 2008. 폐기물 에너지화 종합대책.
13. 환경부 (2007). 바이오연료(바이오디젤, 바이오에탄올)의 환경, 경제성 분석 및 보급 확대 방안 연구.
14. Aiba, S., 1982. Growth kinetics of photosynthetic organisms. *Advances in Biochemical Engineering*, 23, 85 ~ 156.
15. Chisti, Y., 2007. "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, 25, 294 ~ 306.
16. Christenson, L. and R. Sims., 2011. "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts", *Biotechnology Advances*, 29, 686 ~ 702.
17. Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25, 294 ~ 306.
18. Choi, Y.J., Lee, S.Y., 2013. Microbial production of short-chain alkanes. *Nature*. 502, 571 ~ 574.
19. Chojnacka, K., Chojnacki, A., Gorecka, H., 2005. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* 59, 75 ~ 84.
20. Craggs, R.J., McAuley, P.J. and Smith, V.J., 1997. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Res.* 31, 1701 ~ 1707.
21. EBI, 2009. Inc, San Diego, Calif, Global Market data.
22. Eisenberg, D.M., Oswald, W.J., Benemann, J.R., Benemann, R.P., Tiburzi, T.T., 1981. Methane fermentation of microalgae. *Anaerobic Dig. Proc. Int. Symp.* 1st, 99 ~ 111.
23. Essam, T., Magdy, A.A., El Tayeb, O. Mattiasson, B., Guieysse, B., 2006. Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water Sci. Technol.* 53(11), 117 ~ 125.
24. FAO. 2007. Assessment of the World Food Security Situation.

25. Grobbelaar, J. U., Soeder, C.J., Groeneweg, E.S. Hartig, P., 1988. "Rates of biogenic oxygen production in mass-cultures of microalgae, absorption of atmospheric oxygen and oxygen availability for waste-water treatment. *Water Res.* 22, 1459 ~ 1464.
26. Hirooka, T., Akiyama, T., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K., Miyamoto, K., 2003. Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *J. Biosci, Bioeng.* 95, 200 ~ 203.
27. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621 ~ 639.
28. Kang, D.H., Heo, S.J., Oh, C.H., Ju, S.J., Affan, M.D.A., Lee, D.W., Jung, M.J., 2010. Method of extracting triglycerides or fatty acid methyl esters from lipids of microalgae belonging to Heterokontophyta or Haptophyta and method of producing biodiesel using the extracts. KR Patent 10-0983023 (2010-09-13) (to Korea Institute of Ocean Science and Technology).
29. Kaplan, D., Abeliovich, A. & Ben-Yaakov, S., 1987. The fate of heavy metals in wastewater stabilization ponds. *Water Res.* 21, 1189 ~ 1194.
30. Kaplan, D., Teltsch, B., and Soeder C. J., 1995. Unbalanced nitrogen fluxes during the nitrification process in wastewater reservoirs. 1st Annual Report submitted to BMFT and MOSA.
31. Kates M., 1986. Amsterdam: Elsevier Science Publisher.
32. Laliberte, G., Proulx, G., Pauw, N., De la Noue, J., 1994. "Algal technology in wastewater treatment. *Ergenisse Limnol.* 42, 283 ~ 302.
33. Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ. Pollut.*, 89, 59 ~ 66.
34. Lepage, G. and Roy, C. C., 1984. "Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification Without Prior Extraction or Purification," *J. Lipid Res.*, 25, 1391 ~ 1396.
35. Lima, S.A.C., Castro, P.M.L, Morais, R., 2003. Biodegradation of p-nitrophenol by microalgae. *J. Appl. Phycol.* 15, 137 ~ 142.
36. Mallick, N., 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals.* 15, 377 ~ 390.
37. Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., Yousfi, F., Munoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.* 73, 263 ~ 272.
38. McGriff, Jr., E.C., McKinney, R.E., 1972. The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Res.* 6, 1155 ~ 1164.
39. *Methods of soil and plant analysis.*, 2000.
40. Mezrioui, N., Baleux, B. and Troussellier, M., 1994. A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in Brackish water. *Water Research* 29, 459 ~ 465.
41. Mihalyfalvy, E., Johnston, H.T., Garrett, M.R., Fallowfield, H.J. et Cromar, N.J., 1998. Improved mixing of high rate algal ponds. *Water. Res.*, 32, 1334 ~ 1337.

42. Munoz, R., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2003. Phenanthrene biodegradation by an algal-bacterial consortium in two-phase partitioning bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 261 ~ 267.
43. Munoz, R., Kollner, C., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2004. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 87(6), 797 ~ 803.
44. Munoz, R., Rolving, C., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2005. Aerobic phenanthrene biodegradation in a two-phase partitioning bioreactor. *Water Sci. Technol.* 52(8), 265 ~ 271
45. Munoz, R., Rolving, C., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2005. Photosynthetically oxygenated acetonitrile biodegradation by and algal-bacterial microcosm: a pilot scale study. *Water Sci. Technol.* 52(12), 261 ~ 265.
46. Munoz, R., Jacinto, M.S.A., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2005. Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(5), 699 ~ 707.
47. Nurdogan, Y., Oswald, W.J., 1995. Enhanced nutrient removal in high rate ponds. *Water. Sci. Technol.* 31, 33 ~ 43.
48. Oswald, W.J., 1976. Gas production from micro algae. *Clean Fuels biomass, Sewage, Urban Refuse, Agricultural Wastes, Symposium Paper*, 311 ~ 324.
49. Oswald, W.J., 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 305 ~ 328.
50. Oswald, W.J., 2003. My sixty years in applied algology, *J. Appl. phycol.* 15, 99 ~ 106.
51. Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Ko, S.R., Oh, H.M., Kim, H.S., 2013. Lipid droplet synthesis is limited by acetate availability in starchless mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS letters* 587, 370 ~ 377.
52. Rectenwald, L.L., Drenner, R.W., 2000. Nutrient removal from wastewater effluent using an ecological water treatment system. *Environ Sci Technol* 34, 522 ~ 526.
53. Robinson, P.K., 1998. Immobilized algal technology for wastewater treatment purposes. In: *Wastewater Treatment with Algae* (Wong, Y.-S. and Tam, N. F. Y., eds.) Springer-verlag & Landes Bioscience, New York, 1 ~ 16.
54. Rose, P.D., Boshoff, G.A., van Hille, R.P., Wallace, L.C.M., Dunn, K.M., Duncan, J.R., 1998. An integrated algal sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters. *Biodegradation* 9, 247 ~ 257.
55. Safonova, E., Dmitrieva, I.A., Kvitko, K.V., 1999. The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resourc. Conserv. Recycl.* 27, 193 ~ 201.
56. Safonova, E., Kvitko, K.V., Iankevitch, M.I., Surgko, L.F., Afri, I.A., Reisser, W., 2004. Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia. *Eng. Life Sci.* 8, 347 ~ 353.
57. Schuchardt, U., Sercheli, R., Vargas, R.M., 1998. Transesterification of vegetable oils: A review. *J Braz Chem Soc* 9, 199 ~ 210.

58. Schumacher, G., Blume, T. and Sekoulov, I., 2003. Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm, *Water Science & Technology*, Vol 47 No 11. 195 ~ 202.
59. Semple, K.T., Cain, R.B., Schmidt, S., 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 291 ~ 300.
60. Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 2000. Effect of immobilized bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ Pollut.* 107, 145 ~ 151.
61. Travieso, L., Benitez, F., Weiland, P., Sanchez, E., Dupeyron, R., Dominguez, A.R., 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresour. Technol.* 55, 181 ~ 186.
62. Van Hille R.P., Zhao M., Duncan J.R., 1999. Removal and recovery of zinc from solution and electroplating effluents using *Azolla filiculoides*. *Water Research* 33, 1516 ~ 1522.
63. Vollenweider, R.A., 1985. Elemental and biochemical-composition of plankton biomass-some comments and explorations. *Arch. Hydrobiol.* 105, 11 ~ 29.
64. Wijffels and Barbosa., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*. 379, 796 ~ 799.
65. Wilde E.W., Benemann J.R., 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Acta* 11, 781 ~ 812.
66. Yu, R.Q., Wang, W.X., 2004. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 129, 443 ~ 456.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.