

Chlorella saccharophila 배양 최적화 및 유용물질의 생산

김아람 · 박미라 · 김효선 · 김성구 · 정귀택[†]

부경대학교 생물공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
(2016년 8월 12일 접수, 2016년 10월 17일 수정본 접수, 2016년 10월 25일 채택)

Optimization of *Chlorella saccharophila* Cultivation and Useful Materials Production

A-Ram Kim, Mi-Ra Park, Hyo Seon Kim, Sung-Koo Kim and Gwi-Taek Jeong[†]

Department of Biotechnology, Pukyong National University, 45, Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea
(Received 12 August 2016; Received in revised form 17 October 2016; accepted 25 October 2016)

요 약

본 연구에서는 *Chlorella saccharophila*의 배양을 통하여 바이오에너지 자원을 대량으로 확보하고자 배지 최적화 실험을 진행하였다. 최적화 인자로는 배양 형태, 초기 접종량, 탄소원 종류 및 농도, 질소원 종류 및 농도, 배양시간이다. 실험 결과, 배양 형태는 광원과 외부탄소원을 모두 공급하는 mixotrophic 배양이 적절하였다. 초기 접종량은 3% (v/v), 탄소원은 glucose 30 g/L, 질소원은 NaNO₃ 0.95 g/L를 첨가하는 것이 우수하였다. 최적 배지 조건으로 배양한 결과, oil의 함량은 12일에서 가장 높았으나, 회수되는 *C. saccharophila*의 biomass양과 chlorophyll의 양은 10일에서 가장 높았다. 위의 결과는 미세조류의 배지 최적화를 통하여 대량배양을 위한 기초자료로 사용될 수 있으리라 판단된다.

Abstract – In this study, the optimization of several factors for *Chlorella saccharophila* cultivation was investigated. The studied factors were medium type, culture type, inoculum size, sugar/nitrogen source type and concentrations. As a result, the optimized conditions for *C. saccharophila* cultivation were found to be the best at 3% (v/v) inoculum, 30 g/L glucose and 0.95 g/L NaNO₃ under mixotrophic culture. Under the optimized condition, the content of oil was high at 12 day, whereas, the amount of biomass and chlorophyll were high at 10 day.

Key words: Microalgae, *Chlorella saccharophila*, Optimization, Oil, Chlorophyll

1. 서 론

현대 사회에서 재생에너지의 개발과 이용에 대한 관심이 증가하면서 재생 가능한 자원으로부터 바이오연료와 화학제품 등을 생산하고자 기존의 육지자원에서 벗어나 해양자원을 선별, 그리고 증식 연구와 더불어 이를 이용한 열화학적 또는 생물학적 공정 연구가 이슈가 되고 있다[1-4].

해조류는 광합성을 하는 엽록소를 가지는 독립영양생물로 성장이 빠르고, 토지를 필요로 하는 육지 식물과는 다르게 물에서 자라므로 3차원적인 경작이 가능하다[5,6]. 이로 인해 생산성이 우수하며 더 나아가 해조류를 식량으로 이용하는 국가는 동아시아 일부에 국한되어 있으므로, 식량경쟁에서도 비교적 자유롭다. 해조류는 미

세조류와 해조류로 나뉘며, 이들은 탄수화물 및 지질 함량과 구성 및 특성이 매우 다양하여 바이오매스로서 이용 가능성이 뛰어나고 알려져 있다[5-8]. 미세조류는 염양염류의 제거[9,10], 이산화탄소 고정화[11], 중금속 흡착[12] 등의 특성을 이용하는 연구와 미세조류로부터 바이오디젤을 추출하고 이를 위한 배양 최적화 연구 역시 더불어 진행되고 있다[13-16].

*Chlorella*는 오랜 기간 연구되어 건강식품 등에 사용되고 있는 미세조류이다. 최근에는 클로렐라 유래의 지질을 통하여 바이오에너지를 생산하고자 하는 연구가 이루어지고 있다[15-17]. 경제성을 확보하기 위하여 저렴한 탄소원을 이용하거나 배양방법, 배양조건 등을 다양하게 조절함으로써 생산성을 증가시키고자 하는 연구가 진행되고 있다[10,13,15,18].

본 연구에서 사용한 *Chlorella saccharophila*는 해양에서 분리되었으며, glycerol을 섭취하는 능력이 있다고 알려져 있고, lipid를 축적하여 바이오 디젤 생산에 새로운 가능성을 제시하고 있다[17]. 일부 문헌에 의하면 *C. saccharophila*는 배양 방법에 따라 10~47%의 lipid 함량을 가지며, 저농도의 glucose와 non-aerated 일 때 lipid 함

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

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

량이 증가한다고 알려져 있다[18]. 본 연구에서는 유용물질을 생산하기 위해 녹조류 단세포의 일종인 *Chlorella saccharophila*를 대량으로 배양하고자 클로렐라 배양 배지 조건의 최적화와 유용물질의 생산 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 미세조류

본 연구에 사용한 클로렐라는 *Chlorella saccharophila* (Kruger) Migula KMMCC-195이며, 한국해양미세조류은행에서 분양받아 사용하였다.

2-2. 배양 조건

본 실험은 동일한 shaking incubator (Vision Scientific Co. Ltd, Korea)에서 진행하였으며, 배양 온도 25 °C, 교반속도 120 rpm으로 고정하였다. 모든 배양은 조건마다 2회 반복 배양하였고, 일정 시간마다 샘플을 취하여 분석하였다.

2-3. 배지 및 배양 조건의 최적화

2-3-1. 배지 종류의 영향

배양 배지 종류의 영향을 알아보기 위해 PG 배지(mg/L; KNO₃ (1900), CaCl₂·2H₂O (440), MgSO₄·7H₂O (370), KH₂PO₄ (170), MnSO₄·H₂O (16.9), ZnSO₄·7H₂O (8.6), H₃BO₃ (6.2), KI (0.83), Na₂MoO₄·2H₂O (0.25), CuSO₄·5H₂O (0.25), CoCl₂·6H₂O (0.25), FeSO₄·7H₂O (37.3), EDTA-Na₂ (27.8), Myo-inositol (10), Glycine (0.2), Nicotinic acid (0.05), Pyridoxine HCl (0.05), Thiamine HCl (0.1)), JM(Jaworski's Medium with fresh water [19]), JMS(Jaworski's Medium with Sea water [19]), BG-11(Sigma-Aldrich, Co. Ltd.), f/2(Guillard's f/2 medium [20])에 대하여 탄소원으로 glucose를 10 g/L 첨가하여 10일간 배양하였다.

2-3-2. 배양 방법의 영향

클로렐라의 배양 형태를 결정하기 위해 위 실험에서 선택된 PG 배지에 광원과 탄소원을 선택적으로 제공하였다. 먼저 광합성에 따른 성장을 보기 위해 탄소원을 제공하지 않고 광원만 제공한 autotroph, 빛이 없는 환경에서 탄소원을 소비하는 호흡에 대한 성장을 알아보기 위한 heterotroph, 그리고 광원과 탄소원 모두 제공한 mixotroph의 3가지 배양방법으로 배양하였다. Autotroph과 mixotroph 배양 조건은 형광등 광원을 이용하여 약 100 μmol/m²/s의 광량과 주간 16시간, 야간 8시간의 간격으로 빛을 조사하면서 배양하였다. 모든 미세조류의 배양은 shaking incubator를 이용하였으며, 배양 온도는 25 °C, 교반속도 120 rpm으로 고정하여 배양하였다.

2-3-3. 접종량의 영향

초기 접종량에 따른 영향을 알아보기 위해 초기 접종량을 배지의 1~6% (v/v) (OD₆₆₀ 0.166~0.676)로 설정하여 mixotrophic으로 배양하였다.

2-3-4. 탄소원 종류 및 농도의 영향

탄소원의 종류에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 PG 배지에 8가지의 탄소원을 10 g/L 첨가하여 배양하였다. 사용된 탄소원은 fructose, mannose, lactose, sucrose, xylose, galactose, glycerol

그리고 glucose이다. 그리고 초기 접종량은 3%로 하여 12일간 배양하였다. 그리고 glucose의 농도에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 glucose를 10~40 g/L 포함하는 PG 배지에 초기 접종량을 3%로 하여 8일간 배양하였다.

2-3-5. 질소원 종류 및 농도의 영향

질소원의 종류에 따른 영향을 알아보기 위해 질소원을 1.90 g/L 포함하는 PG 배지를 제작하였으며, 탄소원으로 30 g/L의 glucose를 첨가하였다. 사용한 질소원으로는 NH₄NO₃, urea (NH₄)₂SO₄, casein, yeast extract, peptone, corn steep solid, KNO₃ 그리고 NaNO₃이다. 초기 접종량은 3%로 하여 접종 후 8일간 배양하였다. 그리고 질소원의 농도에 따른 영향을 알아보기 위해 질소원 종류 실험 결과를 토대로 선택된 NaNO₃을 0.475 g/L, 0.950 g/L, 1.425 g/L로 설정하였으며, glucose 30 g/L를 첨가하였다. 초기 접종량은 3%로 하여 접종 후 10일간 배양하였다.

2-4. 분석 방법

2-4-1. 클로렐라 수확

배양한 클로렐라를 수확하기 위해 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 배지와 클로렐라를 분리한 다음 증류수를 사용하여 수확한 클로렐라에 남아있는 배지를 제거하는 세척과정을 2회 반복하였다. 세척을 마친 클로렐라는 동결 건조한 후 분쇄하여 암소에서 냉장보관하면서 분석에 사용하였다[21].

2-4-2. Cell density 측정

클로렐라의 성장을 측정하기 위해 일정 간격으로 채취한 시료를 분광광도계(SPEKOL 1300, Analytik Jena)를 사용해 흡광도를 660 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 건조 세포 농도로 환산하여 나타내었다. $y = 0.5351x - 0.016$ ($R^2 = 0.995$). 이때, x는 측정된 흡광도 값(OD₆₆₀)이며, y는 cell density (g/L)이다[21].

2-4-3. 오일 추출 및 함량 측정

오일 추출 방법은 Bligh and Dyer method [22]를 변형하여 사용하였다. 동결 건조된 클로렐라 10 mg에 5 mL의 증류수를 첨가하여 초음파 파쇄기를 사용하여 cell을 파쇄하였다. 파쇄된 cell에 chloroform과 methanol을 1:2 비율로 첨가한 다음 5분간 vortexing 하고 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 cell debris를 제거하였다. 이후 chloroform과 증류수를 1:1 비율로 첨가하여 5분간 vortexing 후 다시 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 층 분리를 하였다. 추출된 oil은 아래의 chloroform 층을 회수하여 열을 가하여 chloroform을 제거한 후 시료를 건조하여 oil의 무게를 측정하였다. 측정된 chloroform 층의 무게(oil 량)는 추출에 사용한 바이오매스의 초기 무게와 비교하여 % of dcw (오일무게/건조중량*100)을 계산하였다[21].

2-4-4. 클로로필 추출 및 함량 측정

색소 함량을 분석하기 위해 10 mL의 methanol에 동결 건조한 클로렐라를 10 mg을 첨가한 다음 균일하게 혼합하였다. 60 °C에서 30분간 용출시킨 후 666 nm와 653 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식을 사용하여 색소의 양을 계산하였다[23]. Chlorophyll (mg/L) = $25.5 \cdot A_{653} + 4 \cdot A_{666}$. 이때, A는 absorbance로 흡광도이고, 653과 666은 spectrophotometer에서 사용한 각각의 파장이다. Chlorophyll의

함량(%)은 측정된 chlorophyll의 농도(mg/L)를 분석에 사용한 바이오매스의 초기 농도와 비교하여 % of dcw (chlorophyll 농도/초기 바이오매스 농도*100)을 계산하였다[21].

3. 결과 및 고찰

3-1. 배지 종류의 영향

배지 종류에 따른 클로렐라의 성장을 알아보기 위해 5가지 배지를 사용해 배양하였으며, Fig. 1에 그 결과를 나타내었다. 배양 결과 PG 배지에서 가장 높은 cell density (1.99 ± 0.13 g/L)를 보였다. 이는 기존의 *C. saccharophila* 배지인 f2배지(1.68 ± 0.10 g/L)보다 높은 cell density를 보이는 것이다. 그러나 cell growth rate를 고려하였을 때, PG 배지에서 1.35 ± 0.09 day⁻¹이고, f2에서 1.16 ± 0.07 day⁻¹인데 반해, cell density가 낮은 JM 배지에서 1.35 ± 0.06 day⁻¹의 높은 cell growth rate를 보였다. 그렇지만 대량 배양 및 product의 생산을 고려할 때 이 실험에서 cell growth rate가 큰 영향을 주지 않을 것이라고 판단하였다. 따라서 본 실험 이후에서는 *C. saccharophila*의 배양 실험에 PG 배지를 선택하였다.

3-2. 배양 방법의 영향

배양 방법에 따른 *C. saccharophila*의 성장 정도를 알아보기 위해 3가지의 배양방법(autotroph, heterotroph 그리고 mixotroph)으

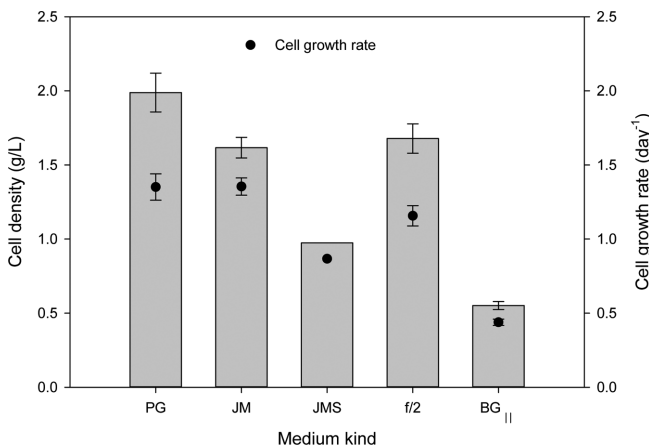


Fig. 1. Effect of medium kind of the growth of *C. saccharophila*.

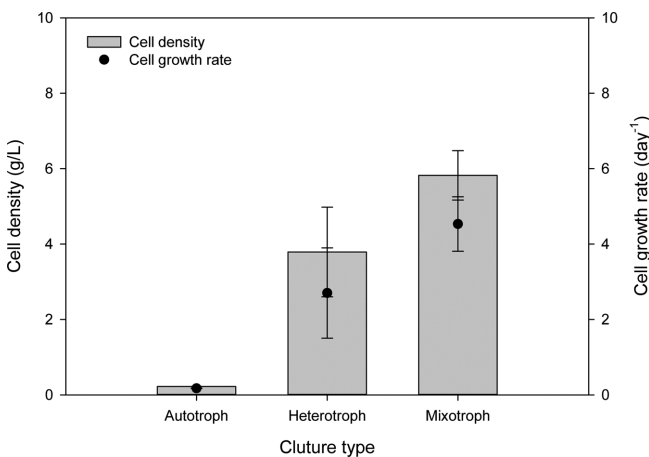


Fig. 2. Effect of culture type on the growth of *C. saccharophila*.

로 배양 하였다(Fig. 2). 광원을 사용한 autotroph에서 다른 두 배양 형태보다 현저히 낮았고(0.22 ± 0.00 g/L), 초기 접종량과 비교했을 때 미량 증가한 cell density를 확인할 수 있었다. 이는 *C. saccharophila*가 자가 영양생물이며, 탄소원이 없는 환경에서 광합성만으로 성장은 가능함을 보여주는 것이다. 그러나 autotroph에서 원하는 농도까지 배양하는 시간과 광원에 대한 효율을 고려했을 때, 대량 생산을 하기 위한 배지 조성 연구에 적합한 방법이 아니라고 판단되었다. 광원을 제공하지 않고 탄소원만을 제공한 heterotroph에서는 어느 정도 높은 cell density (3.79 ± 1.19 g/L)를 확인할 수 있었다. 이는 앞의 autotroph과 비교했을 때 빛보다는 탄소원의 제공이 클로렐라 배양에 조금 더 중요한 것이라고 판단되는 부분이다. 그리고 빛과 외부 탄소원을 모두 제공한 mixotroph에서(5.83 ± 0.66 g/L)의 높은 cell density를 확인할 수 있었다. 3가지 배양 결과를 비교했을 때, *C. saccharophila* 배양에는 광원이나 탄소원을 단편적으로 제공하는 것 보다 모두 제공할 때 cell 성장의 효율이 가장 높은 것으로 판단 되었다. Cell growth rate 또한(4.53 ± 0.72 day⁻¹) 향상되는 것을 확인하였다. Liang 등[24]에 의하면 *C. vulgaris*의 배양에 있어서 autotroph 조건에서는 heterotroph에 비하여 세포 성장과 lipid 생산 성이 낮았고, glucose를 탄소원으로 사용한 경우에서 14배 증가한 lipid 생산성을 보고하였다. 또한 빛과 탄소원이 공존하는 mixotroph 조건에서 빛에 의해 영향을 받는다고 보고하였다.

3-3. 접종량의 영향

초기 접종량에 따른 *C. saccharophila*의 성장을 알아보기 위해 PG 배지에서 접종량을 배지의 1~6% (v/v)를 접종하여 mixotroph 으로 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 각각의 초기 접종량은 분광광도계를 사용하여 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하였을 때 1%에서 0.166, 2%에서 0.270, 3%에서 0.390, 4%에서 0.467, 그리고 6%에서 0.676 이었다. 배양 결과 초기 접종량이 증가함에 따라 성장 역시 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 1% (3.80 ± 0.62 g/L)를 접종한 경우와 2% (5.82 ± 0.66 g/L)를 접종한 경우를 비교했을 때 약 50%의 성장 차이를 보였으나, 3% (6.46 ± 0.31 g/L)를 접종한 경우와 6% (7.35 ± 0.01 g/L)를 접종한 경우를 비교할 때 약 14%의 성장을 차이를 보여 6%를 접종한 경우의 성장률은 접종량에 비해 효율이 현저히 낮음을 보였다. 이는 *C. saccharophila* 배양에 초기 접

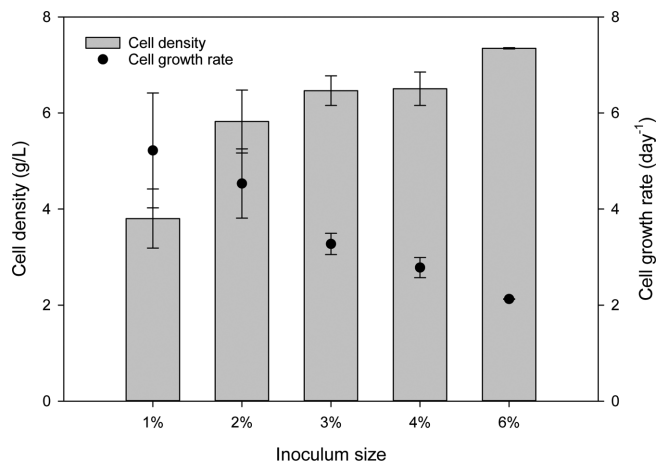


Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of *C. saccharophila* in mixotrophic culture.

종량이 성장에 영향을 미치며 일정 농도 이상의 초기 접종량은 cell growth 수율이 떨어지는 것으로 판단된다. 특히 3% (6.46 ± 0.31 g/L)를 접종한 배지와 4% (6.50 ± 0.35 g/L)를 접종한 배지에서는 성장의 차이가 거의 나타나지 않는 것으로 나타났다. 마찬가지로 cell growth rate가 접종량이 증가함에 따라 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 접종량을 2~4% (v/v)로 하여 heterotroph 조건에서 10일간 배양한 결과, heterotroph에서는 mixotroph과는 반대로 접종량이 증가할수록 성장이 감소하는 것으로 나타났다 (data not shown). Productivity 또한 감소하는 것으로 나타났다. 이는 heterotroph에서 한정된 탄소원만 제공될 때 필요 이상의 초기 접종량은 오히려 비효율적이었다. 따라서 본 실험에서 mixotroph이 이상적인 배양 형태임이 확인되었으며, 이러한 점들을 기초로 하여 이후 실험의 초기 접종량의 기준을 배지의 3% (v/v)로 결정하였다. Heidari 등 [25]은 *C. vulgaris*의 hybrid cultivation system에서 접종 대상 미세 조류의 나이 및 농도를 연구한 결과, 영양분 고갈 4일째 되는 미세 조류를 66 mg/L의 농도로 접종하였을 때 최대의 lipid 생산성을 얻었다고 보고하였다. 이는 접종하고자 하는 미세조류의 나이와 성장 상태, 그리고 접종 농도가 차후의 미세조류 성장과 lipid 생산성에 영향을 미친다는 보고이다.

3-4. 탄소원 종류 및 농도

탄소원의 종류에 따른 *C. saccharophila*의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 PG 배지에 8가지의 탄소원을 10 g/L가 되도록 첨가하여, 초기 접종량을 3%로 12일간 배양하여 얻은 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험에 사용한 탄소원은 fructose, mannose, lactose, sucrose, xylose, galactose, glycerol 그리고 glucose이다. 배양 결과 fructose (6.35 ± 0.11 g/L)에서 가장 높은 cell density를 보였으며, 그 다음으로 glucose (5.48 g/L)가 높은 cell density를 보였다. 이는 *C. saccharophila*가 glucose보다 fructose를 선호하는 것으로 판단된다. 또한 대부분의 탄소원에서 12일 정도에 성장이 감소하였다. 그러나 본 실험에서는 경제적인 면과 *C. saccharophila*의 성장 등을 고려하여 fructose가 아닌 glucose를 탄소원으로 선택하였다. 이와 유사한 결과로는 Liang 등 [24]은 *C. vulgaris* 배양의 mixotroph 조건에서는 acetate, glucose, or glycerol을 대상으로 배양한 결과, glucose를

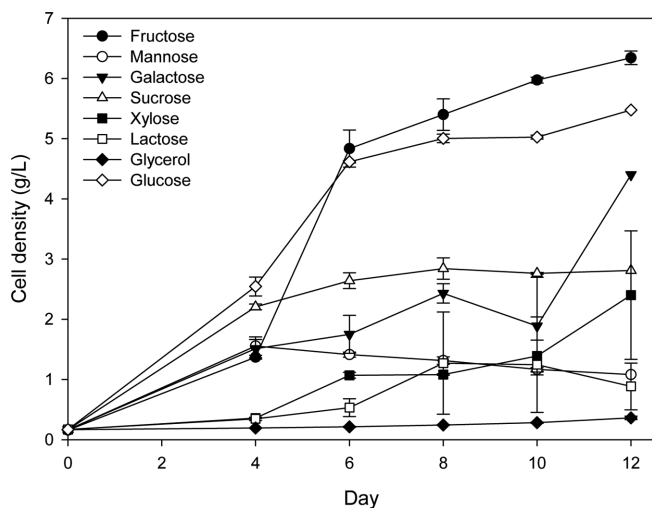


Fig. 4. Effect of sugar kind on the growth of *C. saccharophila*.

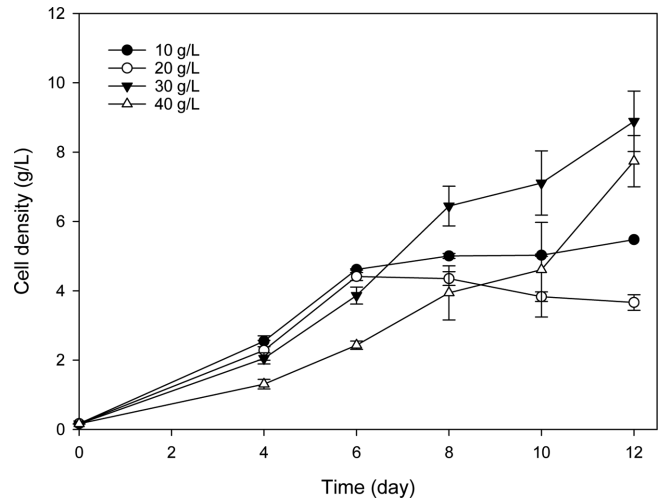


Fig. 5. Effect of glucose concentration on the growth of *C. saccharophila*.

사용한 경우에 가장 높은 세포 성장과 lipid 생산성을 얻었다.

탄소원의 농도에 따른 *C. saccharophila*의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 탄소원으로 glucose를 10~40 g/L가 되도록 첨가하여, 초기 접종량을 3%로 접종하여 12일간 배양한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 대체적으로 glucose의 농도가 증가할수록 성장을 역시 증가하였다. 그러나 가장 높은 농도인 40 g/L (7.74 ± 0.74 g/L)에서는 오히려 30 g/L (8.89 ± 0.87 g/L)보다 cell density가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 cell growth rate에서도 20 g/L의 경우에는 1.83 day^{-1} , 30 g/L의 경우에는 4.63 day^{-1} , 40 g/L의 경우에는 3.89 day^{-1} 로 나타났다. 이는 *C. saccharophila* 배양시 높은 농도의 glucose가 기질저해를 일으키는 것으로 판단된다. Liang 등 [24] *C. vulgaris* 배양의 mixotroph 조건에서는 낮은 농도의 glucose (1~2%)에서 고농도의 glucose (5~10%)에 비하여 높은 세포 성장을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 가장 높은 성장을 보여준 30 g/L의 glucose 농도에서 다음 실험을 수행하였다.

3-5. 질소원 종류 및 농도

질소원의 종류와 농도에 따른 *C. saccharophila*의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 9가지의 질소원 (NH_4NO_3 , urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casein, yeast extract, peptone, corn steep solid, KNO_3 그리고 NaNO_3)과 glucose (30 g/L)를 포함하는 배지를 조제하여 초기 접종량 3%로 접종하여 8일간 배양하였다 (Fig. 6). 배양 결과 NaNO_3 를 0.95 g/L 첨가한 배지(8.45 g/L)에서 *C. saccharophila*의 cell density가 가장 높았다. Cell growth rate 역시 7.30 day^{-1} 으로 가장 높았다. KNO_3 와 NaNO_3 에서 높은 농도인 1.90 g/L (1.91 ± 0.24 g/L와 2.19 ± 0.01 g/L)에서 오히려 성장이 감소하는 것으로 보아 탄소원과 유사하게 기질저해 작용을 하는 것으로 보인다. 또한 1.90 g/L를 첨가한 다른 질소원 실험보다 NaNO_3 에서 수율이 좋으므로 질소원의 종류를 NaNO_3 로 결정하였다.

0.475~1.475 g/L 농도의 NaNO_3 배지를 이용하여 10일간 배양하여 얻은 결과, 0.475, 0.950, 1.425 g/L의 NaNO_3 에서 각각 5.34 ± 0.13 , 7.34 ± 0.06 , 5.29 ± 0.22 g/L의 cell density를 나타내어 0.950 g/L NaNO_3 에서 cell density가 가장 높음을 알 수 있으며, cell growth rate 면에서도 우수한 것을 확인하였다. 본 실험의 결과를 바탕으로 클로

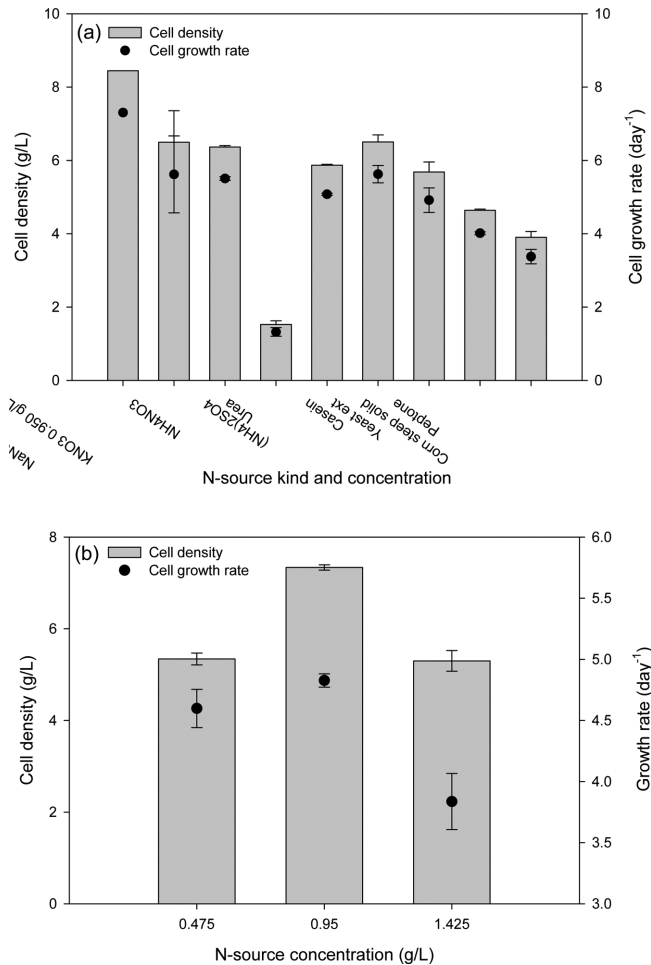


Fig. 6. Effect of nitrogen source kind and concentration on the growth of *C. saccharophila*. (a) Nitrogen source, (b) NaNO₃ concentration.

렐라 배양시 질소원은 0.950 g/L의 NaNO₃가 적절하다고 판단하였다. 반면에 Nigam 등[26]은 *C. pyrenoidosa*의 autotroph 배양에서 0~4 g/L KNO₃의 질소원에서 미세조류의 성장과 lipid 함량을 연구한 결과, nitrate의 농도가 감소함에 따라 미세조류 세포량도 감소하였으나, lipid 함량은 증가하였다고 보고 하였다. 또한 0.05 g/L의 KNO₃ 농도에서 높은 lipid 축적을 보고하였다.

3-6. 최적 조건에서 *C. saccharophila* 배양

위의 실험 결과를 종합하여 최적 조건의 배지를 조성하였으며, 이로부터 *C. saccharophila*를 mixotrophic 배양 조건에서 12일간 배양하여 그 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 실험 결과 시간이 경과함에 따라 *C. saccharophila*의 cell density와 productivity는 증가하는 추세였으나, 10일 이후 감소하였다. 그러나 oil 함량의 경우에는 12일까지 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 사실은 10일 이후 배지의 영양성분이 대부분 고갈되면서 발생하는 환경적 스트레스(질소원 고갈, 빛 파장 변화)에 기인해 oil의 함량이 오히려 증가한 것으로 보인다[14,25,27]. 일반적으로 미세조류의 배양에 있어서 배양 후기에 질소원의 고갈되고 이로 인하여 미세조류의 지질 합성과 축적이 증가한다는 연구결과들이 알려져 있다 [14,26,27].

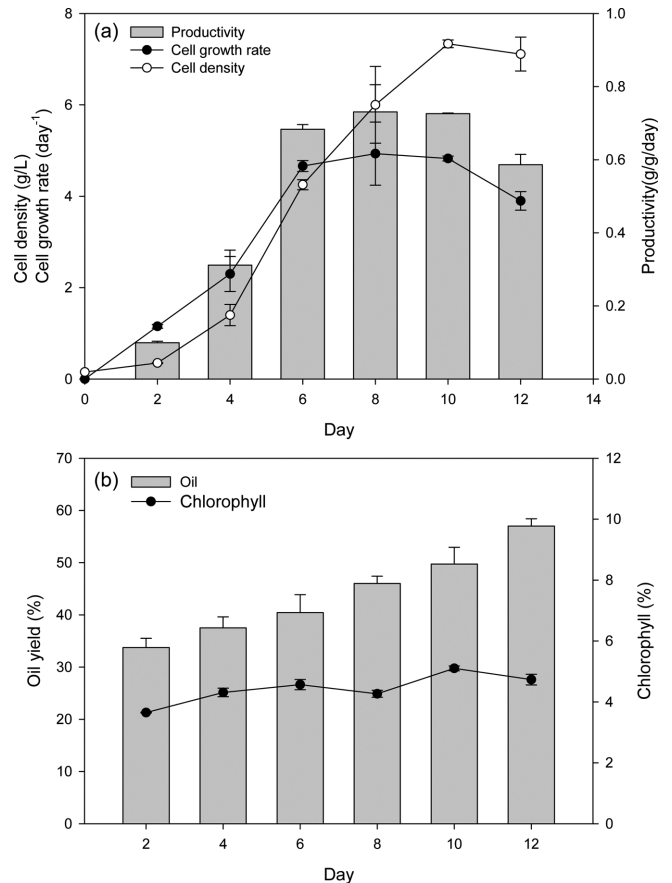


Fig. 7. Effect of optimized medium on the growth of *C. saccharophila*. (a) Cell density, (b) Products.

4. 결 론

*C. saccharophila*의 대량 배양을 위한 배지 최적화 실험을 진행하였다. 실험 결과 기본 배지는 PG 배지가 적합하였으며, 배양 형태는 광원과 외부탄소원을 모두 공급하는 mixotrophic 배양이 적절하였다. 초기 접종량 역시 회수되는 클로렐라 양을 고려할 때 배지의 3% 내외로 접종하는 것이 효율적이다. 배지에 첨가되는 질소원과 탄소원의 경우 탄소원은 glucose를 30 g/L를 첨가하고 질소원은 NaNO₃으로 0.95 g/L를 첨가하는 것이 우수하였으며, 이를 초과할 경우 영양원에 의한 기질저해가 발생하는 것으로 판단되었다. 최적 배지 조건으로 배양한 결과 oil의 함량은 12일에서 가장 높았으나, 회수되는 *C. saccharophila*의 biomass양과 chlorophyll의 양은 10일에서 가장 높았다. 따라서 보다 많은 lipid를 회수하기 위해서 *C. saccharophila*의 배양 일을 12일로 하되, chlorophyll의 회수를 위한다면 배양 일을 10일로 하는 것이 적절하다고 판단된다.

감 사

이 연구는 2015년 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원을 받아 연구되었습니다. 또한, WISET 프로그램에 참여한 김주예, 민혜원, 최소영, 선지원, 윤지현님께 감사합니다.

References

- Demibras, A., "Progress and Recent Trends in Biofuels," *Prog. Energy Combust. Sci.*, **33**, 1-18(2007).
- Kamm, B., Gruber, P. R. and Kamm, M., "Biorefineries : Industrial Processes and Products," WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim(2008).
- Werpy, T. and Petersen, G., "Top Value Added Chemicals from Biomass, volume I : Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas," The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL)(2004).
- Jeong, G. T., "Production of Total Reducing Sugar and Levulinic acid from Brown Macro-algae *Sargassum fulvellum*," *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **42**, 177-183(2014).
- Hamasaki, A., Shioji, N., Ikuta, Y., Hukuda, Y., Makita, T., Hirayama, K., Matuzaki, H., Tukamoto, T. and sasaki, S., "Carbon Dioxide Fixation by Microalgae Photosynthesis using Actual Flue Gas from a Power Plant," *Biochem Biotechnol.*, **45**, 799-809(1994).
- Park, J. I., Woo, H. C. and Lee, J. H. "Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives," *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**(5), 833-844(2008).
- Kang, S., Kim, S., Lee, J., "Optimization of Cross Flow Filtration System for *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis* sp. Microalgae Harvest," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(7), 1377-1380(2015).
- Choi, K., Lee, J., Jo, J., Shin, S., Kim, J. W., "Optimization of Hot-water Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Lipid Extracted Microalgae," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(3), 310-314(2016).
- Hashimoto, S. and Furukawa, K., "Nurtient Removal from Secondary Effluent by Filamentous Algae," *J. Fermt. Bioeng.*, **67**, 62-69(1989).
- Banat, J., Puskas, K., Esen, I. and Al-Dahar, R., "Wastewater Treatment and Algal Productivity in an Intergrated Ponding System," *Biol. Wastes.*, **32**, 265-275(1990).
- Wilde, E. W. and Benemann, J. R., "Bioremoval of Heavy Metals by the Use of Microalgae," *Biotechnol. adv.*, **11**, 781-812(1993).
- Kandah, M., Abu Al-Rub F.A. and Al-Dabaydeh, N., "The Aqueous Adsorption of Copper and Cadmium Ions on Sheep Manure," *Adsorption Science Technol.*, **21**, 501-509(2003).
- Lee, J. Y., "Fatty Acids Production from *Chlorella* sp. KR-1 using Bubble-column Photobioreactors," *KSBB J.*, **4**, 183-183(2010).
- Ra, C. H., Kang, C. H., Jung, J. H., Jeong, G. T. and Kim, S. K., "Effects of Light-Emitting Diodes (LEDs) on the Accumulation of Lipid Content using a Two-phase Culture Process with Three Microalgae," *Bioresour. Technol.*, **212**, 254-261(2016).
- Cho, S. J., Lee, D. H., Luong, T. T., Park, S. R., Oh, Y. K. and Lee, T. H., "Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Fatty Acid Contents and Composition in the Green Microalga, *Chlorella* sp. 227," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1073-1080(2011).
- Lee, H. S., Jeon, S. G., Oh, Y. K., Kim, K. H., Chung, S. H., Na, J. G. and Yeo, S. D., "Recovery of Lipid from *Chlorella* sp. KR-1 via Pyrolysis and Characteristics Pyrolysis Oil," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(4), 672-677(2012).
- Singh, D., Puri, M., Wilkens, S., Mathur, S. A., Tuli, K. D. and Barrow, J. C., "Characterization of a New Zeaxanthin Producing Strain of *Chlorella saccharophila* Isolated from New Zealand Marine Waters," *Bioresour. Technol.*, **143**, 308-314(2013).
- Tan, K. C. and Johns, R. M., "Fatty Acid Production by Heterotrophic *Chlorella saccharophila*," *Hydrobiologia.*, **215**, 13-19(1991).
- Tompkins, J., Deville, M. M., Day, J. G., Turner, M. F., The Culture Collection of Algae and Protozoa. Ambleside, Institute of Freshwater Ecology, 204(1995).
- Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, J. P., Watanabe, M.M., in R. A. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques*, Burlington Elsevier San Diego and London, Academic Press, 429-532(2005).
- Kim, A. R., Kim, H. S., Park, M. R., Kim, S. K. and Jeong, G. T., "Application of Lignocellulosic and Macro-algae Hydrolysates for Culture of *Chlorella Saccharophila*," *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, **44**, 522-528(2016).
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H., "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipid from Animal Tissues," *J Biochem.*, **226**, 497-502(1957).
- Kim, J. K., Park, H. J., Kim, Y. H., Joo, H., Lee, S. H. and Lee, J. H., "UV-induced Mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the Increase of Lipid Accumulation and Its Characterization," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **24**, 155-160(2013).
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., "Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions," *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1043-1049(2009).
- Heidari, M., Kariminia, H., Shayegan, J., "Effect of Culture Age and Initial Inoculum Size on Lipid Accumulation and Productivity in a Hybrid Cultivation System of *Chlorella Vulgaris*," *Process Saf. Environ. Prot.*, **104**, 111-122(2016).
- Nigam, S., Rai, M. P., Sharma, R., "Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella Pyrenoidosa*," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, **7**(3), 124-129(2011).
- Ra, C. H., Kang, C. H., Jung, J. H., Jeong, G. T., Kim, S. K., "Enhanced Biomass Production and Lipid Accumulation of *Picochlorum atomus* using Light-Emitting Diodes (LEDs)," *Bioresour. Technol.*, **218**, 1279-1283(2016).