

염분농도에 따른 해양미세조류(*Nannochloropsis oculata*)의 지질 및 지방산의 변화

정우철 · 한종철¹ · 최병대² · 강석중*

경상대학교 해양생명과학과/해양산업연구소, ¹국립수산과학원 남동해수산연구소, ²경상대학교 해양식품공학과

Lipid and Fatty Acid Composition in *Nannochloropsis oculata* Cultured in Varying Salinities

U-Cheol Jeong, Jong-Cheol Han¹, Byeong-Dae Choi² and Seok-Joong Kang*

Department of Marine Biology and Aquaculture/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

¹Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Tongyeong 650-943, Korea

²Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

The quality and quantity of food organisms in fish seed production are important. The marine microalgae *Nannochloropsis oculata* are used as initial food organisms in the field. We investigated the effects of salinity (0, 10, 20, 30, 40 and 50 psu) on the lipid and fatty acid composition of *N. oculata*. Cultivation of *N. oculata* at varying salinities showed the highest growth rate at 20 psu. Total lipid content ranged from 17.26 to 18.63% at salinities from 0 to 50 psu). The nonpolar lipid content increased markedly at 30 psu and was highest at 15.55%. The polar lipid content was lowest at 30 psu, by 84.45%. It was also found that the omega-3 and EPA contents were inversely proportional to salt concentration. For the polar and nonpolar lipid compositions, there was no significant effect of salinity. Omega-3 polyunsaturated fatty acid content especially the content of EPA in the seawater larvae is the essential fatty acid in this food organism. It is thus advantageous to culture *N. oculata* at 20 psu.

Key words: *Nannochloropsis oculata*, Marine microalgae, Salinity, EPA (Eicosapentaenoic acid)

서론

해양미세조류는 어패류 양식을 위한 Rotifer와 같은 동물성 플랑크톤의 먹이생물로 이용되고(Hur and Kim, 1988), 연료, 비타민, β -carotene, Eicosapentaenoic acid (EPA)와 같은 고도 불포화 지방산, 단백질 및 천연색소 등의 고부가치 소재의 공급원으로도 이용될 수 있어서, 효율적 이용을 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(Beck, 1981; Hartig et al., 1988). 먹이생물로서 많이 이용되고 있는 해양미세조류는 주로 광합성을 통해 성장, 증식하는 식물로서 chlorophyll-a와 간단한 증식구조를 가지며, 일반 미생물과 마찬가지로 환경 적응성이 뛰어나 대부분의 자연 환경에 존재하며 크기나 형태에 있어서도 다양성을 가진다. 또한 단백질, 지질, 당질, 색소 그리고 생물고분자 물질과 같은 다양한 유기물질을 체내에 축적하는 것으로 알려져 있고, 대사

속도가 매우 빨라 몇 시간 내에 증식이 이루어지는 것으로 밝혀져 있다(Richmond, 2003). 이러한 미세조류에 대한 연구는 생물분류학적인 측면뿐만 아니라 해양미세조류의 배양과 이용에 대한 연구도 많이 이루어져 있다. 또한 미세조류는 단백질원으로서 뿐만 아니라 지질, 당질, 색소 등의 세포 성분의 측면에서도 유용한 것으로 알려지고 있으며, 최근에는 이들 미세조류의 세포 성분에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

최근 국내 어류 종묘생산에 있어서 기술적인 면에서는 비약적인 발전을 거듭하여 종묘생산 대상 종은 매년 증가하고 있다. 그러나, 아직 고급어류 종묘 생산시 대량폐사를 수반하는 초기 감모와 관련된 먹이생물의 영양가 평가 등에 관해서는 해결해야 할 부분이 많이 남아 있다. 어류 종묘생산에 있어서 먹이생물의 질적 선택과 양적 확보는 종묘생산의 성패를 좌우하기 때문에 먹이생물에 관한 연구는 대단히 중요하다. 해산어류의 성장

Article history;

Received 18 January 2013; Revised 13 May 2013; Accepted 23 May 2013

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 9154 Fax: +82. 55. 644. 4202

E-mail address: sjkang@gnu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 46(3) 252-258, June 2013

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0252>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

에는 먹이생물의 지방성분이 중요한 역할을 하는데 이 먹이생물의 지방성분에 영향을 미치는 것은 지질의 종류(Lipid class)와 지방산조성이다. 즉, 먹이생물의 지방조성은 종묘의 지방조성과 성장에 크게 영향을 주며, 특히 오메가-3고도불포화지방산이 어류의 필수지방산인 것이 증명된 이래 많은 연구자들이 먹이생물에 함유된 오메가-3지방산의 함량을 어류 자치어의 영양가를 결정짓는 척도로 삼고 있다(Watanabe, 1982). 최근에는 먹이생물중의 지방산 종류뿐만 아니라 지질class중에서 sterol 함량도 중요시되고 있다(Teshima and Patterson, 1981). 국내에서도 최근 연안의 자원조성을 위한 방류용 종묘생산이 활발히 진행되고 있으며, 바리와 어류와 참치 같은 고급어종의 종묘생산이 시도되고 있다. 이에 따라 먹이생물의 질적인 평가는 중요성이 더해가고 있다.

따라서 본 연구는 먹이생물 배양현장에서 초기 먹이생물로서 중요하게 이용되고 있고 아직도 해수산 chlorella로 불려지고 있는 해양미세조류인 *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, 진안점조강, 眞眼點藻綱)를 이용하여 염분농도에 따른 지방산의 변화를 관찰하고, 고도불포화지방산의 변화를 바탕으로 먹이생물로서의 지질영양학적 측면에서 평가하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 배양 조건

본 실험에 사용된 해양미세조류 *Nannochloropsis oculata*는 경상대학교 해양과학대학 해양생물사료 공학연구실에 보관 중인 원종을 사용하였다.

실험배양 조건으로서 온도는 20±1℃, 광주기는 18L: 6D, 주간의 조도는 6,000-8,000 Lux로 유지하였고, Air는 0.20 μm sterilized air filter (Advantec mfs, Inc. Japan)를 통해 공급하였다. 염분농도는 여과해수와 증류수를 이용하여 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 실시하였다. 실험에 사용한 배지는 Table 1에 나타낸 바와 같이 F/2배지 (Guillard and Ryther, 1962)를 사용하였으며, 121℃에서 20분간 고압멸균하였다. 초기 접종밀도는 100×10⁴ cells/mL로 10일간 3반복으로 배양하였고, 매일 동일한 시간에 Haemocytometer로 3회 반복 계수하여 평균 세포수를 측정하였으며, 배양이 완료된 배양액은 4℃의 고속

Table 1. Chemical compositions of F/2 medium

Reagent	Concentration	Reagent	Concentration
NaNO ₃	8.83×10 ⁻⁴ M	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3.63×10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	1.07×10 ⁻⁴ M	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1×10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1×10 ⁻⁵ M	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4×10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3×10 ⁻⁸ M	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8×10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5×10 ⁻⁸ M	MnCl ₂ ·4H ₂ O	9×10 ⁻⁷ M
Vitamin B ₁₂	1×10 ⁻¹⁰ M	Biotin	2×10 ⁻⁹ M
Thiamine HCl	3×10 ⁻⁷ M		

원심분리기(UNION 32R, Hanil Science Industrial Co., Ltd. Korea)에서 3,000 rpm으로 25분간 원심분리한 후, 배양액은 버리고 세포만 회수하여 동결 건조하였다.

Total Lipid 추출

총 지질 추출은 Bligh and Dyer (1959) 방법에 준하였다. 균체 중에 지질 추출 시료를 비커에 5 g 취하여 세포분쇄기(Homogenizer AM-12, Nihonseiki Kaisha Ltd. Tokyo, Japan)에서 15,000 rpm으로 5분간 분쇄한 후, Chloroform : Methanol (2 : 1, v/v) 혼합한 추출 용매를 시료의 2 배량 넣어 하루 동안 방치하였다. 다음날 chloroform 층만을 분리하기 위하여 둥근 플라스크 위에 깔때기를 놓고, 여과지를 깔아 그 위에 Na₂SO₄를 넣어 서서히 chloroform층만 흘러내리게 하였다. 분리된 chloroform층은 진공회전농축기(Rotavapor R-114, BUCHI)를 사용하여 40℃이하에서 용매를 완전히 증발시킨 후, 추출된 총 지질의 무게를 측정하였다. 모든 작업은 질소 기류 하에서 행하였다.

극성 및 비극성 지질의 분획

총 지질의 극성 지질과 비극성 지질의 분획은 Juaneda and Rocquelin (1985)방법에 준하여, SEP-PAK silica cartridge (Waters Association, Milford, MA)를 사용하였다. 추출된 지질 100 mg을 넣은 후, 1차적으로 극성용매인 chloroform 10 mL를 천천히 주사기로 주입한 후, 2차적으로 chloroform : methanol (49:1, v/v)로 혼합한 용매 10 mL 주입하여 극성 지질을 분리하였다. SEP-PAK silica cartridge에 남아있는 비극성 지질을 얻기 위해 다른 둥근 플라스크를 놓고 비극성 용매인 methanol을 20 mL를 천천히 주입하여 비극성지질을 분리하였다.

지방산 분석

시료 일정량과 내부표준물질(C_{23:0} methyl ester) 1 mL (1 mg C_{23:0})를 cap tube에 취하고, 0.5 N NaOH-methanol 용액 1.5 mL 넣고, 100℃에서 8분간 가열하여 검화하였다. 방냉 후 12% BF₃-methanol 2 mL 넣고, 다시 100℃에서 11분간 가열하여 methylester화 하였다. 약 30-40℃로 냉각한 후, Iso-octane 1 mL를 첨가하고 30초간 Vortex mixer로 혼합하였다. 즉시 5 mL의 포화식염수를 가한 다음 흔들어 방치하여 iso-octane층이 분리되도록 하였다. iso-octane층을 시료 병(4 mL)에 옮긴 후, 이를 지방산 methylester 시료로 하였다. 지방산 분석에 사용하는 GLC는 OmegawaxTM-320 (bonded polyglycol phase) capillary column (30 m×0.32 mm×0.25 μm, I.D., SUPELCO, Supelco Park, PA, USA)를 장착한 Autosystem XL (Perkin Elmer, USA)를 이용하였다. Column 온도 185-230℃, Injector 온도 250℃, Detector 온도 270℃ 그리고 Carrier gas는 He

Table 2. Percent compositions of the nonpolar lipids and polar lipids in different salinity of *Nannochloropsis oculata*

Salinity	Total lipids (%)	Lipid classes	
		Nonpolar lipids(%)	Polar lipids(%)
0	17.26±0.55 ^b	8.35±0.21 ^e	91.65±0.76 ^a
10	18.63±0.43 ^a	12.32±0.28 ^c	87.68±0.43 ^c
20	18.17±0.62 ^{ab}	14.99±0.12 ^b	85.01±0.54 ^d
30	17.79±1.03 ^{ab}	15.55±0.26 ^a	84.45±0.30 ^d
40	18.15±0.33 ^{ab}	13.08±0.54 ^c	86.92±0.32 ^c
50	17.53±0.51 ^b	10.87±0.60 ^d	89.13±0.84 ^b

Different superscript letters within columns represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

(1.0 kg/cm²)을 사용하였고, 이때 Split ratio는 1:50였다. 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 표준품의 ECL과 비교하여 동정하였고, 지방산 표준품은 14:0, 16:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 22:1, 24:0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)과 GC-MS로 동정된 menhaden oil을 사용하였다.

통계처리

모든 자료는 SPSS (12.0) 프로그램을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성($P<0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

염분농도에 따른 성장

염분농도 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 *N. oculata*를 10 일간 배양한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 염분농도에 따른 균체의 성장 실험은 실험구마다 동일하게 100×10^4 cells/mL로 접종하였다. 0 psu구에서는 배양 9일째 580×10^4 cells/mL, 10 psu구에서는 10일째 $2,280 \times 10^4$ cells/mL, 20 psu구에서는 8일째 $3,505 \times 10^4$ cells/mL, 30 psu구에서는 9일째 $3,050 \times 10^4$ cells/mL, 40 psu구에서는 9일째 $2,805 \times 10^4$ cells/mL로 최대 성장을 나타내었으며 50 psu구에서는 성장이 현저히 떨어져 9일째 523×10^4 cells/mL로 나타났다. 염분농도에 따른 *N. oculata*의 배양 결과는 20 psu구에서 가장 높은 성장률을 보였으며 30, 40, 10, 0, 50 psu 순으로 나타났다($P<0.05$).

총 지질 함량 및 Lipid classes

염분농도에 따른 총 지질 함량은 Table 2에 나타난 바와 같이 0, 10, 20, 30, 40, 그리고 50 psu구에서 각각 17.26, 18.63, 18.17, 17.79, 18.15 그리고 17.53%로 나타났으며 0 psu와 50 psu를 제외한 10, 20, 30, 40 psu에서는 유의차가 없는 것으로 나타났다. 중성지질의 경우 30 psu구에서는 총지질의 15.55%로 가장 높게 나타났으나 염분농도가 40과 50 psu로 높아질수록 각각 13.08%와 10.87%로 낮아지는 경향을 보였다($P<0.05$). 또

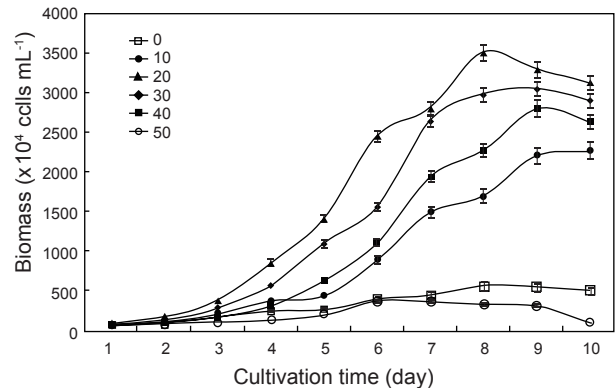


Fig. 1. The effect of cultivation salinity on the cells growth of *Nannochloropsis oculata*. Data were means±S.D. of triplicate.

한 염분농도가 20, 10 그리고 0 psu로 낮아질수록 각각 14.99%, 12.32% 그리고 8.35%로 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$).

극성지질의 함량은 자연해수의 염분농도와 가장 비슷한 30 psu구에서 총 지질의 84.45%로 가장 낮게 나타났으며 20 psu구에서 85.01%로 유의적인 차이는 보이지 않았다($P<0.05$). 그러나 염분농도가 40 그리고 50 psu로 높아질수록 극성지질의 함량은 각각 86.92%와 89.13%로 증가되는 경향을 보였으며 ($P<0.05$), 또한 염분농도가 0 그리고 0 psu로 낮아질수록 각각 87.68% 그리고 91.65%로 증가되는 것으로 나타났다($P<0.05$).

지질의 종류(lipid class)는 최적 성장 염분도인 20 psu에서 중성지질이 14.99%인데 비해서 극성지질이 85.01%로 *N. oculata*의 지질 성분은 극성지질이 대부분인 것으로 나타났다.

총 지방산의 조성 변화

염분농도에 따른 *N. oculata*의 지방산 조성은 Table 3에 나타내었다. 염분농도는 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 배양한 결과는 포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 33.91%로 가장 낮게 나타났으며, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 34.81, 34.20, 36.36, 37.71 그리고 38.18%로 높아지는 것으로 나타났다($P<0.05$). 불포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 66.10%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 65.20, 65.80, 63.65, 62.29 그리고 61.82%로 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$).

오메가-3 계열의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 34.35%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 29.91, 29.68, 25.61, 23.13 그리고 19.18%로 감소하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 오메가-6 계열의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 8.66%로 나타났고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 9.62, 9.45, 8.50, 4.93 그리고 3.73%로 감소하는 것으로 나타났

Table 3. Total fatty acid compositions of *Nannochloropsis oculata* cultured for 7 days

Fatty acid	Salinity concentration (psu)					
	0	10	20	30	40	50
14:0	2.85±0.03	3.47±0.02	3.76±0.08	4.00±0.06	5.38±0.21	5.89±0.21
16:0	29.93±0.52	29.74±0.70	29.46±0.88	31.52±0.69	31.61±0.83	31.61±0.78
16:1n-9	1.01±0.01	1.10±0.03	0.71±0.02	0.70±0.03	0.31±0.01	0.11±0.01
16:1n-7	15.15±0.23	17.85±0.38	19.03±0.46	21.29±0.22	25.32±0.48	27.78±0.42
18:0	1.13±0.03	1.60±0.02	0.98±0.09	0.84±0.12	0.72±0.06	0.68±0.06
18:1n-9	6.90±0.23	6.34±0.31	6.79±0.11	7.43±0.35	8.41±0.21	10.79±0.31
18:1n-7	0.03±0.01	0.38±0.03	0.15±0.03	0.11±0.01	0.19±0.01	0.24±0.02
18:2n-6	4.08±0.19	3.54±0.12	3.07±0.08	2.68±0.05	1.33±0.06	1.08±0.06
18:3n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:4n-6	4.58±0.16	6.08±0.11	6.37±0.21	5.83±0.13	3.60±0.16	2.64±0.11
20:5n-3	34.35±0.52	29.91±0.33	29.68±0.69	25.61±0.76	23.13±0.52	19.18±0.68
22:6n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ΣSaturates	33.91 ^c	34.81 ^c	34.20 ^c	36.36 ^b	37.71 ^{ab}	38.18 ^a
ΣMonoenes	23.09 ^f	25.67 ^e	26.68 ^d	29.53 ^c	34.23 ^b	38.92 ^a
ΣPolyenes	43.01 ^a	39.53 ^b	39.12 ^b	34.12 ^c	28.06 ^d	22.90 ^e
Σn-3 PUFA ¹	34.35	29.91	29.68	25.61	23.13	19.18
Σn-6 PUFA	8.66	9.62	9.45	8.5	4.93	3.73
Σn-3/Σn-6	3.97	3.11	3.14	3.01	4.69	5.15

¹PUFA: Polyunsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3).

^{a-f}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 4. Nonpolar lipid compositions of *Nannochloropsis oculata* cultured for 7 days

Fatty acid	Salinity concentration (psu)					
	0	10	20	30	40	50
14:0	3.00±0.11	3.71±0.12	3.65±0.26	2.86±0.18	3.74±0.21	4.53±0.23
16:0	23.92±0.80	25.23±1.03	26.22±1.30	30.58±1.06	29.12±0.88	30.70±1.42
16:1n-9	1.25±0.10	1.45±0.08	1.24±0.30	1.29±0.20	0.85±0.18	0.39±0.03
16:1n-7	26.54±0.55	23.52±0.80	23.04±0.79	21.87±0.63	22.56±1.20	26.61±0.89
18:0	1.03±0.08	1.06±0.22	0.95±0.12	1.12±0.06	1.42±0.06	1.06±0.06
18:1n-9	4.57±0.21	7.11±0.36	6.65±0.39	7.94±0.51	7.92±0.33	4.33±0.58
18:1n-7	0.12±0.01	0.07±0.03	0.23±0.01	0.08±0.02	0.17±0.01	0.10±0.01
18:2n-6	0.99±0.08	1.65±0.11	1.70±0.21	1.82±0.10	1.99±0.08	0.85±0.21
18:3n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:4n-6	4.84±0.10	4.50±0.24	4.72±0.30	3.84±0.11	3.88±0.19	3.21±0.31
20:5n-3	33.74±0.26	31.71±0.32	31.6±0.64	28.59±0.41	28.34±0.72	28.21±0.88
22:6n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ΣSaturates	27.95 ^d	30.00 ^c	30.82 ^c	34.56 ^b	34.28 ^b	36.29 ^a
ΣMonoenes	32.48 ^a	32.15 ^a	31.16 ^a	31.18 ^a	31.50 ^a	31.43 ^a
ΣPolyenes	39.57 ^a	37.86 ^b	38.02 ^b	34.25 ^c	34.21 ^c	32.27 ^d
Σn-3 PUFA ¹	33.74	31.71	31.6	28.59	28.34	28.21
Σn-6 PUFA	5.83	6.15	6.42	5.66	5.86	4.06
Σn-3/Σn-6	5.79	5.16	4.92	5.05	4.83	6.95

¹PUFA: Polyunsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3).

^{a-f} Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

다($P<0.05$). 특히, 16:1n-7의 경우는 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각 15.15, 17.85, 19.03, 21.29, 25.32 그리고 27.78%로 염분농도가 높아질수록 증가하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 또한 EPA의 경우는 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각

34.35, 29.91, 29.68, 25.61, 23.13 그리고 19.18%로 염분농도가 낮아질수록 EPA함량은 증가하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 염분농도에 따른 *N. oculata*의 포화지방산, 불포화지방산의 변화는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 saturated fatty acid (SFA)

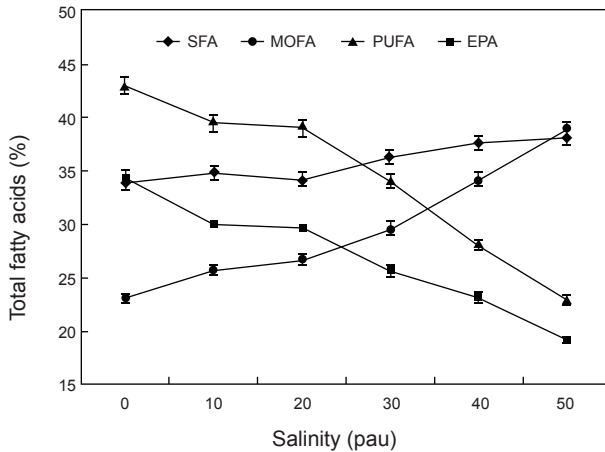


Fig. 2. The effect of salinity concentration on fatty acids in *Nannochloropsis oculata* cells grown Total polyunsaturated fatty acid (PUFA), Total monounsaturated fatty acid (MOFA), Total saturated fatty acid (SFA) and Eicosapentaenoic acid (EPA).

과 monounsaturated fatty acid (MOFA)의 경우 염분농도가 증가함에 따라 지방산 비율이 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 polyunsaturated fatty acid (PUFA)와 eicosapentaenoic acid (EPA)의 경우는 염분농도가 증가함에 따라 지방산 비율이 감소하는 것으로 나타났다. 이로써 먹이생물의 영양학적으로 중요한 EPA 함량은 염분농도가 높아질수록 감소하는 것으로 나타났다. 이로써 영양학적인 측면에서는 염분농도를 낮추어서 배양하는 것이 EPA 함량을 증가시키는 방법으로 나타났다.

비극성지질의 지방산 조성 변화

염분농도에 따른 *N. oculata*의 비극성지질의 지방산 조성은 Table 4에 나타내었다. 염분농도 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 배양한 결과 포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 27.95%로 가장 낮았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 30.00, 30.82, 34.56, 34.28 그리고 36.29%로 증가하는 것으로 나타났으며($P < 0.05$), 불포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 72.05%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 70.01, 69.18, 65.43, 65.71 그리고 63.70%로 감소하는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 오메가-3 계열의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 33.74%로 가장 높게 나타났으며, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 31.71, 31.60, 28.59, 28.34 그리고 28.21%로 감소하는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 그러나 오메가-6 계열의 경우 염분농도 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각 5.83, 6.15, 6.42, 5.66, 5.86 그리고 4.06%로 나타났다(Table 4).

특히, 16:0의 경우는 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각 23.92, 25.23, 26.22, 30.58, 29.12, 그리고 30.70%로 염분농도가 높아질수록 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 또한 EPA

의 경우는 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 33.74%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 31.71, 31.60, 28.59, 28.34 그리고 28.21%로 감소하는 것으로 나타났다($P < 0.05$).

극성지질의 지방산 조성 변화

염분농도에 따른 *N. oculata*의 극성지질의 지방산 조성은 Table 5에 나타내었다. 염분농도 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 배양한 결과 포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 29.80%로 가장 낮았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 30.58, 30.78, 34.40, 36.45 그리고 39.80%로 높아졌으며($P < 0.05$), 불포화지방산의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 70.19%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 69.43, 69.22, 65.60, 63.54 그리고 60.20%로 낮아지는 경향을 보였다($P < 0.05$). 오메가-3 계열의 경우 염분농도가 가장 낮은 0 psu 실험구에서 35.29%로 가장 높았으며, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 30.78, 29.45, 24.43, 21.46 그리고 16.47%로 낮아지는 경향을 보였다($P < 0.05$). 오메가-6 계열의 경우 염분농도가 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 5.91, 5.41, 5.63, 5.69, 5.98 그리고 8.09%로 나타났다($P < 0.05$). 특히, 16:1n-7의 경우는 0, 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각 19.67, 21.73, 21.70, 23.45, 24.49 그리고 26.92%로 염분농도가 증가할수록 증가하는 것으로 나타났으며($P < 0.05$), 또한 EPA의 경우는 염분농도가 가장 낮은 0 psu구에서 35.29%로 가장 높았고, 염분농도가 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 높아질수록 각각 30.78, 29.45, 24.43, 21.46 그리고 16.47%로 낮아지는 경향을 나타내었다($P < 0.05$).

이상의 결과를 종합하면 *N. oculata*의 염분농도에 의한 지방산의 변화는 염분농도가 증가함에 따라 PUFA가 감소하였으며, 이러한 감소는 극성지질 중의 PUFA의 감소에 일어났으며, 극성지질의 지방산의 감소 원인은 EPA 지방산의 감소가 주된 원인으로 나타났다.

총 지질에 미치는 영향

*Nannochloropsis oculata*의 성장을 위한 최적 염분농도는 20 psu였다. 총 지질의 함량도 10-30 psu의 범위를 나타내어 최적 성장도를 나타내는 염분농도에서 생리적으로 최적 상태가 지질 생합성의 최적 상태를 반영한 것으로 생각된다. 총 지질 함량은 Table 2에서 나타낸 바와 같이 염분농도 10 psu에서의 가장 높게 나타났지만 비극성 지질의 증가보다는 극성지질 증가가 큰 것으로 나타났다. 이러한 극성지질의 증가는 염분농도에 따른 극성지질 중에 인지질의 변화에 의한 것인지 아니면 당지질의 변화에 의한 것인지에 대한 연구가 더욱 이루어져야 할 것으로 사료되며 염분농도에 따른 지질의 변화는 극성지질의 변화가 중요하게 작용한다고 생각된다.

Table 5. Polar lipid compositions of *Nannochloropsis oculata* cultured for 7 days

Fatty acid	Salinity concentration (psu)					
	0	10	20	30	40	50
14:0	2.66±0.06	2.69±0.20	2.71±0.18	2.95±0.16	3.56±0.21	5.51±0.11
16:0	25.60±0.80	26.52±0.97	26.64±1.08	29.67±0.66	31.32±0.34	33.35±0.62
16:1n-9	1.75±0.07	1.07±0.03	1.79±0.04	1.15±0.06	1.57±0.02	1.96±0.06
16:1n-7	19.67±0.38	21.73±0.82	21.70±0.70	23.45±0.88	24.49±0.73	26.92±0.56
18:0	1.54±0.03	1.37±0.10	1.43±0.09	1.78±0.12	1.57±0.26	0.94±0.26
18:1n-9	7.41±0.17	10.09±0.31	10.43±0.56	10.71±0.61	9.85±0.34	6.62±0.23
18:1n-7	0.16±0.01	0.35±0.02	0.22±0.02	0.17±0.02	0.19±0.01	0.14±0.03
18:2n-6	2.15±0.03	2.02±0.06	2.08±0.11	1.86±0.20	1.91±0.16	1.92±0.08
18:3n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20:4n-6	3.76±0.23	3.39±0.28	3.55±0.28	3.83±0.20	4.07±0.12	6.17±0.23
20:5n-3	35.29±1.02	30.78±0.86	29.45±0.46	24.43±0.62	21.46±0.78	16.47±0.84
22:6n-3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ΣSaturates	29.80 ^e	30.58 ^d	30.78 ^d	34.40 ^c	36.45 ^b	39.80 ^a
ΣMonoenes	28.99 ^c	33.24 ^b	34.14 ^{ab}	35.48 ^a	36.10 ^a	35.64 ^a
ΣPolyenes	41.20 ^a	36.19 ^b	35.08 ^b	30.12 ^c	27.44 ^d	24.56 ^e
Σn-3 PUFA ¹	35.29	30.78	29.45	24.43	21.46	16.47
Σn-6 PUFA	5.91	5.41	5.63	5.69	5.98	8.09
Σn-3/Σn-6	5.97	5.69	5.23	4.29	3.59	2.03

¹PUFA: Polyunsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3).

^{a-f} Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

지방산 조성에 미치는 영향

염분농도에 따른 총지질의 지방산 조성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 포화지방산은 염분농도의 증감에 상관없이 33.91-38.18% 범위로서 변화가 없었는데 비해서 MOFA (monounsaturated fatty acid)와 PUFA (polyunsaturated fatty acid)는 현저한 변화를 가져왔다. 변화의 상태도 달라서 MOFA는 염분농도가 증가함에 따라 증가하였지만, PUFA는 오히려 감소하는 역상관 관계를 나타냈다. Table 3에 의하면 염분농도 20 psu의 총 지질의 지방산 조성에서 16:0, 16:1n-7와 20:5n-3 (EPA)가 전체지방산의 78% 이상으로 대부분을 차지하고 있다. 이는 Eustigmatophyceae 속하는 *N. oculata*의 전형적인 지방산 조성이다(Zhukova and Aizdaicher, 1995). 여기에서 16:0는 SFA에 속하는 지방산으로 변동이 없었기 때문에 MOFA의 변화는 16:1n-7의 증가를 의미한다. PUFA는 EPA가 대부분을 차지하기 때문에 20:5n-3의 감소를 나타낸다.

염분농도의 증가가 오메가-3 고도불포화지방산의 대표 지방산인 EPA의 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 미세조류의 지방산 조성에 영향을 미치는 환경인자로서 염분외에 온도가 있다. 많은 미세조류는 온도가 내려감에 따라서 포화지방산에 대한 고도불포화지방산의 비율을 증가시켜서 환경변화에 대한 적응을 하는 것(Ackman et al., 1968; Mortersen et al., 1988; James et al., 1989; Thomson et al., 1992; Renaud et al., 1995; Oliveria et al., 1999)과는 다른 현상이 나타났기 때문에 염분이 지방산 합성에 미치는 메카니즘은 수온과는 다를 수 있는 가능

성을 내포하고 있다.

지금까지 미세조류에 있어서 지방산의 역할은 생체막의 기능과 대사기능에 주요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 지방산의 불포화도 증가는 생체막 유동성의 항상성을 유지하여 환경변화에 대응하는 기능을 갖도록 되어 있다. 염분농도의 증가는 미세조류 세포내 삼투압을 증가시키기 때문에 glycerol농도의 증가(세포외 삼투압의 80%수준)를 일으킨다(Ben-Amotz and Avron, 1973). 그러나, 이러한 일반적인 현상과는 달리 고농도의 염분에서 배양한 *Dunaliella* sp. 경우에도 이와 같은 현상이 발견된다. 이 부분에 대하여 좀 더 고찰해 보면 총 지방산의 변화는 비극성지질 지방산과 극성지질의 지방산 조성의 변화에 기인한다. 염분농도에 따른 비극성지질의 변화는 Table 4에 나타난 바와 같이 SFA는 27.95-36.29%, MOFA는 31.18-32.48%, PUFA는 32.27-39.57%로서 큰 변화는 없었다. 이러한 결과는 편모녹조류인 *Cladophora vagabunda*를 다른 염분농도에 노출시켰을 때 비극성지질의 대부분을 차지하는 triacylglycerol의 조성에 변화가 없었다는 점과 일치한다.

극성지질의 경우에는 Table 5에 나타난 바와 같이 SFA는 29.80-39.80%으로 큰 유의차를 나타냈으며, MOFA는 28.99-36.10%으로 변화하였으며, PUFA는 27.44-41.20%으로 현저한 변화를 가져왔다. 이러한 변화는 PUFA의 대표적인 지방산인 EPA가 16.47-35.29%로 크게 감소하는 것을 그대로 반영하였다.

이상의 고찰을 종합하면 염분농도 증가에 따른 총 지질 중의 PUFA의 현저한 감소 현상이 일어났으며, 이러한 감소 원인은 비극성 지질이 아닌 극성지질의 지방산조성에 의해 감소 되는

것으로 나타났다. 이러한 극성지질의 감소 원인 지방산은 오메가-3 고도불포화지방산인 EPA이었다. 이는 어류에 있어서 환경온도가 하강함에 따라 인지질에서 불포화도가 증가하는 것은 생체막 체액의 “항상성 유지”를 위한 수단으로 이해하여 왔으나(Hazel, 1984; Dutta et al., 1985), 본 연구결과에서는 수온이 지방산의 변화에 미치는 영향과는 다르게 나타났다. 이러한 차이점에 대해서는 미세조류의 극성지질은 인지질과 당지질로 구성되어 있고, 당지질의 함량이 더 높기 때문에 이들 지질class 중의 어느 쪽 지질이 더 크게 영향을 받았는지에 대해서는 향후의 연구가 필요하다.

미세조류의 영양학적 가치 증가

해산어류의 중요생산은 해양미세조류, 동물성플랑크톤(Rotifer), 자치어의 먹이시스템으로 이루어진다. 미세조류는 환경영양인자에 대하여 지방산 조성이 많이 달라진다(Brank and Gillard 1981; Thompson et al., 1992; Park et al. 2012). 해양미세조류인 *N. oculata*는 rotifer의 영양강화제로 많이 사용되고 있다. 해수자치어의 필수지방산인 n-3 PUFA의 함량, 특히 EPA의 함량을 높인다는 측면에서는 염분농도를 낮추어서 20 psu에서 배양하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

참고문헌

- Ackman RG, Tocher CS and McLachlan J. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. *J Fish Res Board Can* 25, 1603-1620.
- Beck EW. 1981. Algae mass cultivation production and utilization. *Process Biochemistry* 8, 10-14.
- Ben-Amotz A and Avron M. 1973. NADP Specific dihydroxyacetone reductase from *Dunaliella parva*. *FEBS Letters* 29, 153-155.
- Bligh EG and Dyer WM. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Brank ME and Gillard RRL. 1981. The effect of continuous light and intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *J Exp Mar Biol Ecol* 50, 119-132.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric* 11, 1-42.
- Dutta H, Das A, Das AB and Farkas T. 1985. Role of environmental temperature in seasonal changes of fatty acid composition of hepatic lipids in air-breathing Indian teleost, *Channa punctatus*(BLOCH). *Comp Biochem Physiol* 81B, 341-347.
- Guillard RRL and Ryther JH. 1962. Studies on marine planktonic diatom: I. *Cyclotella nan* (Hustedt) and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Can J Microbiol*, 8, 229-239.
- Hartig P, Grobbelaar JU, Soeder CJ and Groeneweg J. 1988. On the mass culture of microalgae: A real density as an important factor for achieving maximal productivity. *Biomass* 15, 211-221.
- Hazel JR. 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membrane in fish. *Am J Physiol* 246, 460-470.
- Hur SB and Kim HJ. 1988. Chlorella cultivation for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis* I. Selection of suitable *Chlorella* species. *J Aquaculture* 1, 135-143.
- James CM, Al-Hinty S and Salman AE. 1989. Growth and N3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77, 337-351.
- Mortensen SH, Borsheim KY, Rainuzzo JK and Knutsen G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schutt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J Exp Mar Biol Ecol* 122, 173-185.
- Oliveira MAS, Monteiro MP, Robbs PG and Leite SG. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacult Int* 7, 261-275.
- Park SJ, Choi YE, Kim EJ, Park WK and Kim C. 2012. Serial optimization of biomass production using microalga *Nannochloris oculata* and corresponding lipid biosynthesis. *Bioprocess Biosyst Eng* 35, 3-9.
- Renaud SM, Zhou HC, Parry DL, Loung-Van T and Woo KC. 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp., (clone T.ISO). *J Appl Phycol* 7, 595-602.
- Richmond A. 2003. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. *Biomol Eng* 20, 229-236.
- Teshima SG and Patterson W. 1981. Sterol biosynthesis in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* 16, 234-239.
- Thompson PA, Guo M, Harrison PJ and Whyte JNC. 1992. Effects of variation in temperature: II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol* 28, 488-497.
- Watanabe T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Biochemistry and Physiology* 73, 3-15
- Zhukova NV and Aizdaicher NA. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39, 351-356.