

영흥도에서 분리된 *Phaeodactylum tricornutum*의 증식 및 Monounsaturated fatty acid 관련 지방산 조성 분석

Investigation of cultivation and FAME composition isolated *Phaeodactylum tricornutum* from Youngheung island

이상민, 조용희, 신동우, 전효남, 류영진, 임상민, 이철균*

SangMin Lee, Yonghee Cho, Dong-Woo Shin, Hyonam Jeon, YoungJin Ryu, Sang-Min Lim, Choul-Gyun Lee*

인하대학교 생물공학과, 인천광역시, 402-751, 대한민국

Department of Biological Engineering, Inha University Incheon 402-751, Korea

(Received 30 December 2014, Accepted 13 January 2015)

Abstract Oxidation stability and cold fluid property are considered as the most important factors for determining biodiesel quality. Among the fatty acids, monounsaturated fatty acid satisfy both oxidation stability and cold flow property of biodiesel quality standards. Microalgae with high monounsaturated fatty acid contents is have some benefit for producing to produce biodiesels with satisfying quality standards. In this study, monounsaturated fatty acid contents of a isolated microalga from Youngheung island was analyzed. *Phaeodactylum tricornutum* was isolated by streaking, and growth rate and fatty acid composition of the algae were investigated. Total FAME contents were consisted of 26% of saturated fatty acids, 43% of monounsaturated fatty acids, and 18% of polyunsaturated fatty acids. The contents of monounsaturated fatty acid were especially high in the *Phaeodactylum* species. This result implies that the FAMES from *P. tricornutum* may contribute to improve the oxidation stability and cold flow property of biodiesel.

Keywords : *Phaeodactylum tricornutum*, FAME composition, Oxidation stability

서 론

바이오디젤은 바이오매스로부터 transesterification 공정을 통해 생성되는 FAME(Fatty Acid Methyl Ester)을 말한다. 대두유나 팜유와 같은 식물성 기름과 돈지, 우지와 같은 동물성 지방 그리고 조류 등이

바이오디젤 생산의 공급 원료로 사용되고 있다. 특히, 미세조류는 성장성이 빠르고 지질 함량이 많은 장점이 있어 기존의 바이오디젤의 공급 원료였던 콩이나 팜유와 같은 육상식물의 대체 원료로 각광 받고 있다[1]. 육상식물과 미세조류가 생산하는 바이오디젤의 지방산들의 구성은 화석연료의 지방산들

* Corresponding author
Phone: +82-32-872-7518 Fax: +82-32-873-7518
E-mail: leecg@inha.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

과 유사한 경우가 많다. 세탄가, 점도, 밀도와 같은 화석연료의 물성과 유사하여 기존의 내연기관의 인프라의 변경 없이도 적용이 가능한 장점을 지니고 있다[2]. 바이오디젤을 구성하는 주요 지방산은 C16:0 (palmitic acid), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid), C18:2 (linoleic acid), C18:3 (linolenic acid) 등의 다양한 지방산들이 있다[3]. 이 지방산들의 구성은 산화안정성과 저온유동성 등의 바이오디젤 품질을 결정짓는 중요한 요인이 된다[4]. 특히, 이중결합 정도에 따라 바이오디젤의 품질이 결정되는데, polyunsaturated fatty acids (PUFAs)의 함량은 산화 안정성을 저해 시키지만 저온 유동성을 개선시킨다. 반대로 saturated fatty acids (SFAs)의 함량은 산화 안정성을 향상 시키지만 저온 유동성은 떨어지게 된다[5]. 그러나 현재 바이오디젤의 생산 원료인 대두유, 팜유 그리고 미세조류의 지방산 조성은 PUFA와 SFA가 상당량 차지하고 있다[6]. 대두유의 경우는 PUFA 함량이 전체 지방산들 중에 53.2% 차지하고 있어 산화 안정성이 떨어진다. 반면에, 팜유의 경우 SFA의 함량이 전체 42.8%를 차지하고 있어 저온 유동성이 낮아지게 되는데, 저온 유동성을 판단하는 Cold Flow Pulging Point (CFPP, 필터 막힘점)를 보면 -4°C가 된다. 화석연료의 CFPP는 -42°C 인데 반해 낮은 수치이다[7,8]. 현재 산화 안정성과 저온 유동성 문제를 개선하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 산화 안정성이 낮아지게 되면 생산과 저장, 그리고 사용하는 동안에도 산화가 일어나 엔진의 내연기관에 안 좋은 영향을 미칠 수 있다[9]. 이를 보완하기 위해 butylated hydroxyAnisole (BHA), pyrogallol (PrG) tert-butylhydroquinone (TBHQ), butylated hydroxytoluene (BHT) 및 α -tocopherol 같은 물질들이 산화 안정제로 연구 되었다[10]. 이 물질들은 산화 안정성이 향상된 결과들을 보여준다. 하지만 바이오디젤 생산의 큰 도전과제인 경제성에 있어 안 좋은 영향을 미치게 된다. 저온 유동성이 낮은 바이오디젤을 저온에서 사용하였을 경우, 디젤에 결정화가 발생하게 되고 엔진의 필터를 막아 시동이 걸리지 않게 된다[2]. 이를 개선하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법은 등유를 바이오디젤과 일정량 혼합하는 것이다. 이 방법을 사용하게 되면 CFPP가 -20°C 이상으로 낮아지게 되어 저온 유동성을 향상시킬 수 있다. 하지만 이 방법은 경제성에 좋지 않을

뿐만 아니라 등유의 공급이 지속가능 하지 못한 한계가 있다. 미국 에너지부에 따르면 적합한 바이오디젤은 MUFA를 통해서 만들 수 있다고 한다[11]. 즉, 산화안정성과 저온 유동성이 동시에 좋은 바이오디젤을 제조하기 위해서는 MUFA성분이 많은 지질을 생산할 수 있는 원료가 필요하다. 따라서 본 논문에서는 서해안의 영흥도에서 미세조류를 분리하여 생산되는 지질의 조성 중 MUFA 함량을 분석 하였다.

재료 및 방법

미세조류 분리 및 동정

미세조류를 단일 종으로 분리하기 위해, 해수 토착종이 우점하고 있는 배양액 일부를 채취하였다. 미세조류 배양에 일반적으로 사용되는 f/2-Si 고체배지를 사용하였고, 반복 실험을 통해 단일 콜로니를 분리 할 수 있었다. 분리된 미세조류의 형태를 관찰하기 위해 현미경(Nikon, Digital Sight, DS-Fi1, Japan)을 사용 하였다. 분리된 미세조류는 18s rRNA sequence 분석을 통해 동정하였으며, (주)바이오팩트에 의뢰하여 진행하였다. 18s rRNA 유전자 분석은 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하였으며, MEGA-6의 소프트웨어를 사용하여 계통도를 작성하였다.

균체량 분석

세포 수는 Hemacytometer를 이용하여 측정하였고 계산은 다음과 같다.

Cell concentration (cells mL⁻¹)

$$\frac{\text{Number of cells}}{10^{-4} \times \text{Number of squares} \times \text{Dilution}} = \frac{\text{Number of cells} \times 10^4}{\text{Number of squares} \times \text{Dilution}}$$

바이오매스 농도분석을 위해 건조 중량 (dry cell weight)을 측정하였다. Whatman GF/C (0.45 μ m pore size; 직경 47 mm) 필터를 이용하여 균체를 여과 수집 하였다. 필터의 무게를 측정한 다음, 감압 조건에서 균체를 여과 수집하고, 염분 제거를 위해 증류수로 세척한다. 균체가 여과 수집된 필터는 80°C 오븐에 24시간 건조시킨다. 실온의 데시케이터에서 무게가 일정하게 유지 될 때까지

보관하여 최종적으로 세포의 무게를 측정한다.

균주 배양

미세조류의 배양 균주는 250 mL 플라스크에서 pH 7.3의 f/2-Si 배지와 인공해수를 이용하였다. 인공해수 조성은 NaCl 30 g/L, 0.66 g/L KCl, 8.48 g/L MgCl₂·6H₂O, 1.9 g/L CaCl₂·2H₂O, 6.318 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.18 g/L NaHCO₃ 를 증류수에 첨가하여 제조하였다. 배양조건은 진탕배양기 (VS-8480, Vision Science, Korea)를 사용하여 온도 20°C, 교반 속도 130 rpm에서 수행하였다. 광원은 55 W 형광등(OSRAM korea, FPL36EX-W, Korea)을 사용 하였고 광도는 100 μ E/m²/sec 이었다.

지질 추출 및 분석

동결 건조 처리된 바이오매스를 0.9 mL의 5% (w/v) 아세틸클로라이드/메탄올과 표준용액(nonadecanoic acid, C19:0)을 이용하여 정량에 사용하였다. 오븐에 넣어 80°C에서 1 시간 반응을 시킨다. 반응이 끝난 후 액-액 추출법으로 1 mL의 N-Hexane 넣어 상층액에서 FAME를 분리한다. Gas chromatography (Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용하여 FAME 함량과 지방산 조성을 분석하였다. 사용된 컬럼은 capillary column (HP-INNOWax, Agilent, California, USA, 길이: 30 m, 직경 0.25 mm, 두께 0.2 μm)을 이용하였고, 유량 3 ml/min 헬륨가스를 이동상으로 이용하였다. 오븐의 분석조건은, 초기 오븐 온도 140°C에서 1분간 정치하여 240°C까지 5°C/min로 승온하여 최종온도에서 10분간 정치하였다. FAME standards mixture (F.A.M.E. MixC4-C24, SUPELCO, Bellefonte, USA)와 미세조류 유래 FAME의 체류 시간을 비교하여 FAME를 분석을 하였다.

결과 및 고찰

미세조류 동정 및 계통도 분석

바이오티셀 공급 원료로 사용되기 위해 미세조류를 분리하는 것은 필수적인 과정이다[12]. 고체 배지에서 지속적인 계대 배양을 통해 단일 콜로니를 얻은 다음 현미경을 통해 형태학적 분류를 수행하였다 (Figure 1).

18s rRNA의 염기서열의 계통도 분석은 종의 규

명을 위해 널리 사용하고 있으며 진핵 미세조류의 분류를 위한 신뢰성이 있는 자료를 제공 한다 [13]. 결과는 Figure 2 와 같다. 규조류 (Diatom)에 속하며, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus obliquus* 와 같은 녹조류 (Green algae)와는 다른 종임을 알 수 있었다. 규조류 중 *Nitzschia* sp. 와 가장 유사한 염기 서열을 보였다. 이 결과를 통해 영흥도 해수에서 분리된 *Phaeodactylum tricoratum*을 본 논문에서는 *Phaeodactylum tricoratum*-yh라 명명 하였다.



Figure 1. Microscope figure x1000 of *Phaeodactylum tricoratum* isolated from Youngheung Island.

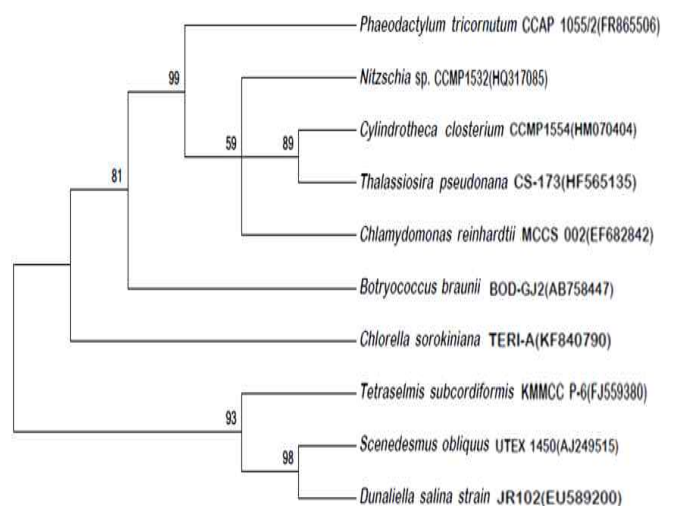


Figure 2. Phylogenetic analysis of the 18s rRNA of indigenous microalgae isolated YoungHeung island. The sequece aliments were generated using the NCBI from MEGA-6 software.

균체의 성장성 및 지질 분석

Phaeodactylum tricornutum-yh의 성장은 배양 6 일차까지 대수증식기를 나타냈었고, 배양 7 일차 부터 정체기에 들어 최종 세포 세포농도 3.2×10^7 cells mL⁻¹이었다(Figure 3). 이 농도는 기존에 보고된 다른 *Phaeodactylum tricornutum* 농도에 비해 5배이상 높은 수치이다[14]. 그러나 FAME 함량은 기존에 보고된 양의 반 정도인 12.8%였다 (Table 1). FAME 함량으로만 보면 *Phaeodactylum tricornutum*-yh이 반 정도 밖에 함유 하고 있었지만, 세포 농도를 감안하여 FAME 생산성을 비교 한다면 약 2.5배 높았음을 알 수 있었다(Table 1). *Phaeodactylum tricornutum*-yh의 생육 특성과 생산성은 Table 1 과 같다. 최근의 추세는 FAME이—함량보다 biomass productivity를 중시하므로[15] 기존에 보고된 종에 비해 우수한 종임을 확인하였다. 바이오 디젤 생산을 위해분리된 다른 미세 조류들과 바이오매스 생산성을 비교해 본다면, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus obliquus*를 포함 하여 8종에서[16] 최대 2배 높은 결과를 보여 주었고. FAME 생산성을 비교하면, *Scenedesmus obliquus* 보다 약 0.5배 높은 결과를 보여주었다(Table 2). *Phaeodactylum tricornutum*-yh의 지방산 조성은 Table 2와 같았다. 전체 FAME 조성 중, 가장많은 조성을 차지하는 palmitoleic acid (C16:1)포함하여 MUFA는

총 43.1%를 차지하였다. *Phaeodactylum tricornutum*의 MUFA 조성은 26.4%로[14], *Phaeodactylum tricornutum*-yh이 16.7% 높은 결과를 얻었다[17]. 또한, 최근 바이오디젤의 생산을 목적으로 분리된 미세조류 12종 중 *Botryococcus braunii*를 제외한 11종 보다 MUFA의 조성은 2배에서 최대 4배 정도 높은 결과 였다. 미세조류 배양에 많이 사용되는 *Tetraselmis* sp., *Chlorella ulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* LB999 및 *Spirulina maxima* 등의 균주에서 MUFA가 차지하는 조성은 전술한 바와같이 약4-7배 높은 수치를 나타냈다(Table 2) *Phaeodactylum tricornutum*-yh의 FAME 함량이 비교적 낮지만, MUFA의 비율이 높아 배양액 부피 당 무게(w/v)기준으로 봤을 때는 MUFA의 함량이 우수함을 보였다.

바이오디젤의 산화 안정성에 감소에 영향을 미치는 PUFA의 함량을 비교해 본다면, *Phaeodactylum tricornutum*-yh 18.1%로 *Phaeodactylum tricornutum*[14]보다 4.9% 낮았고 다른 종들 중에서 특히, *Dunaliella tertiolecta* LB999와 비교 했을 때 37.4% 낮았다. 이 결과를 통해 *Phaeodactylum tricornutum*-yh로 부터 FAME을 추출하여 바이오디젤을 생산한다면 다른 미세 조류 유래 바이오 디젤보다 산화 안정성과 저온 유동성이 향상 될 것으로 보인다.

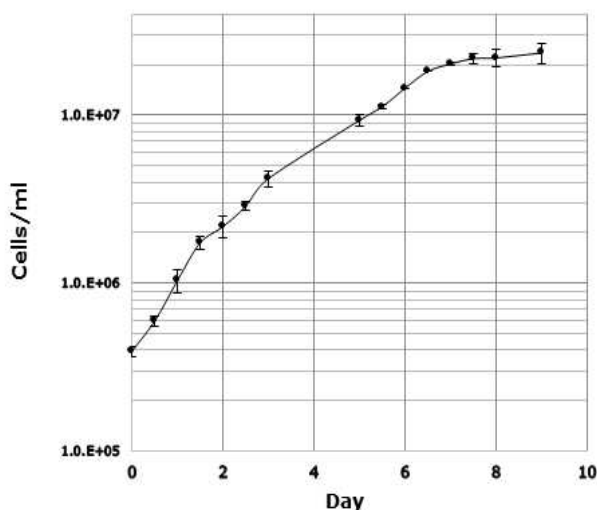


Figure 3. Growth rate of *Phaeodactylum tricornutum*-yh during 9 day batch culture.

Table 1. Growth characteristic and productivity of *Phaeodactylum tricornutum*-yh

Parameter	<i>P. tricornutum</i> -yh
μ^{exp} (d ⁻¹)	1.17
Doubling time (d ⁻¹)	0.62
Biomass concentration (gL ⁻¹)	2.21
Biomass productivity (gL ⁻¹ d ⁻¹)	0.29
FAME contents (%)	12.8
FAME productivity (mgL ⁻¹ d ⁻¹)	37.1

Table 2. Comparison of fatty acid composition *phaeodactylum tricornutum*-yh and other microalgae.

Fatty acid	Total FA%					
	<i>P.tricornutum</i> -yh	¹⁴⁾ <i>P.tricornutum</i>	¹⁸⁾ <i>Dunaliella Tertiolecta</i> LB999	¹⁸⁾ <i>Tetraselmis</i> KCTC12236BP	¹⁷⁾ <i>C. vulgaris</i>	¹⁷⁾ <i>S. maxima</i>
C14:0	3.2	5.3	-	-	0.7	-
C16:0	19.9	15.9	19.5	17.5	14.4	35.8
C16:1	38.9	23.9	2.0	2.6	4.1	0.9
C16:2	-	-	-	-	5.3	4.6
C16:3	-	-	-	-	4.9	-
C16:4	-	-	12.4	2.2	-	-
C18:0	3.0	2.7	-	-	1.9	1.5
C18:1	4.1	2.5	10.0	26.2	17.6	5.0
C18:2	-	-	10.7	32.8	12.0	16.3
C18:3	9.0	2.7	32.4	8.0	15.8	18.2
C20:5	9.0	20.3	-	-	-	-
ΣOthers FA	12.8	26.8	13.0	10.7	23.2	17.7
ΣSFA	26.0	23.9	19.5	17.5	16.3	37.3
ΣMUFA	43.1	26.4	12.0	28.8	21.8	5.9
ΣPUFA	18.1	23.0	55.5	43.0	38.0	40.0
ΣUFA	61.1	49.4	67.5	71.8	59.8	45.8
ΣTFA	100	100	100	100	100	100

[14] Zhi-Kai Yang et. al. [17]Yang et. al. [18] 석유품질관리원

결 론

Phaeodactylum tricornutum-yh의 성장성, 바이오매스 생산성, 지질함량 및 지방산 조성 분석을 하였다. 특히, 지방산 조성 분석을 통해 산화 안정성과 저온 유동성 개선에 도움이 되는 MUFA 함량이 다른 미세조류들 보다 우수한 것을 확인 하였다. 따라서, 본 논문에서 분리된 미세조류가 생산해내는 FAME이 향후 산화안정성과 저온 유동성 향상에 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 해양생명공학기술개발사업(PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발)과 해양 에너지 융복합 인력양성 사업의 지원을 받아 수행되었습니다. 저자들 모두 연구개발비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

References

1. Razeghifard, R. 2013. Algal biofuels. *Photosynthesis*

- research. **117**, 207-219.
2. Dwivedi, G., and M. Sharma. 2013. Cold Flow Behavior of Biodiesel-A Review. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*. **3**, 827-836.
 3. Zhukova, N. V., and N. A. Aizdaicher. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*. **39**, 351-356.
 4. Moser, B. R. 2011. Biodiesel production, properties, and feedstocks. pp. 285-347. *Biofuels*. Springer, City.
 5. Sendzikiene, E., V. Makareviciene, and P. Janulis. 2005. Oxidation stability of biodiesel fuel produced from fatty wastes. *Polish Journal of Environmental Studies*. **14**, 335-339.
 6. Cao, Y., W. Liu, X. Xu, H. Zhang, J. Wang, and M. Xian. 2014. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology for biofuels*. **7**, 59.
 7. Hoekman, S. K., A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, and M. Natarajan. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **16**, 143-169.
 8. Ping, B. T. Y., and M. Yusof. 2009. Characteristics and properties of fatty acid distillates from palm oil. *Oil Palm Bulletin*. **59**, 5-11.
 9. Mittelbach, M., and S. Gangl. 2001. Long storage stability of biodiesel made from rapeseed and used frying oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **78**, 573-577.
 10. Dunn, R. O. 2005. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). *Fuel Processing Technology*. **86**, 1071-1085.
 11. Tyson, K. 2009. Biodiesel handling and use guidelines. *DIANE Publishing*.
 12. Tripathi, R., J. Singh, and I. S. Thakur. 2015. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy*. **74**, 774-781.
 13. Fujii, K., S. Matsunobu, and Y. Takahashi. 2014. Characterization of the new microalgal strains, *Oogamochlamys* spp., and their potential for biofuel production. *Algal Research*. **5**, 164-170.
 14. Yang, Z.-K., Y.-F. Niu, Y.-H. Ma, J. Xue, M.-H. Zhang, W.-D. Yang, J.-S. Liu, S.-H. Lu, Y. Guan, and H.-Y. Li. 2013. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol. Biofuels*. **6**, 1-67.
 15. López Barreiro, D., W. Prins, F. Ronsse, and W. Brilman. 2013. Hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae for biofuel production: state of the art review and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. **53**, 113-127.
 16. Zhang, X., J. Rong, H. Chen, C. He, and Q. Wang. 2014. Current Status and Outlook in the Application of Microalgae in Biodiesel Production and Environmental Protection. *Frontiers in Energy Research*. **2**, 32.
 17. Ötleş, S., and R. Pire. 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *Journal of AOAC international*. **84**, 1708-1714.
 18. 한국석유관리원, 2012. 미세조류 유래 바이오디젤 품질기준 연구. pp 25-30.