

플라스크 배양에서 *Chlorella* sp. KR-1의 균체 성장 및 지질 생산에 대한 질소원 및 유기탄소원의 영향

Effects of nitrogen and organic carbon sources on growth and lipid production of *Chlorella* sp. KR-1 in flask cultures

이자연, 서경애, 오유관*

Ja-Youn Lee, Kyoung Ae Seo, You-Kwan Oh*

한국에너지기술연구원, 대전, 305-343, 한국

Korea Institute of Energy Research, Daejeon 305-343, Republic of Korea

(Received 2 January 2015, Revised 13 January 2015, Accepted 13 January 2015)

Abstract Recently microalgae have been proposed as a promising biodiesel feedstock, owing to their higher lipid productivity and non-arable land based cultivation system. Biomass and lipid productivities of microalgae are largely affected by various environmental and nutritional factors. In this study, the effects of nitrogen (nitrate and ammonium) and organic carbon (glucose and glycerol) sources on the cell growth and lipid production of *Chlorella* sp. KR-1 were examined in flask cultures. Under autotrophic culture conditions for 15 days, overall cell growth and lipid (fatty acid methyl ester, FAME) production with nitrate were better than those of ammonium, resulting in 1.06 g cell/L and 333 mg FAME/L, respectively. Maximal intracellular lipid contents (348 - 352 mg FAME/g cell) were observed at low concentrations of 1 mM for both nitrate and ammonium. In the supply of light, addition of glucose in the range of 1 - 20 g/L showed higher cell densities than the autotrophic cell growth condition. Higher lipid accumulation of 375 mg FAME/g cell could achieved at 5 g glucose/L albeit of relatively short incubation of 7 days. With glycerol, intracellular lipid contents were ~1.9 times lower than glucose cases although similar cell growths were observed for both carbon sources.

Keywords : Microalgae, *Chlorella*, cell growth, lipid, nitrogen source, carbon source

서 론

바이오디젤 (Biodiesel)은 식물성 기름 또는 동물성 유지로부터 생산된 지방산의 메틸 또는 에틸 에스테르 화합물로 전 세계적으로 경유 대체연료로 많은 관심을 받고 있다 [6, 12, 18]. 그러나 현재 바이오디젤은 주로 콩, 유채 등의 식용작물에서 추출한 식물성 기름을 이용해 생산하고 있다. 이는 곡물가격

상승 유발과 함께 빈곤 국가와 저소득층의 식량난을 가중시킨다는 비판을 받고 있다. 또한 늘어나는 바이오디젤의 수요에 맞추어 광범위한 열대우림 또는 산림이 개발되고 있어, 오히려 지구온난화를 부추킨다는 지적도 있다 [7].

이와 같은 문제점을 해결하기 위해 기존 식용작물 대신 미세조류 (Microalgae)를 바이오디젤 원료로 활용하는 기술이 ‘차세대 바이오디젤 기술’로 많

* Corresponding author
Phone: +82-42-860-3697 Fax: +82-42-860-3495
E-mail: ykoh@kier.re.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>)

은 관심을 받고 있다 [1, 8]. 미세조류는 성장조건에 따라 생체 내에 많은 양의 지질 (~70%)을 축적할 수 있으며, 단위 면적당 지질 생산량이 기존 식용작물에 비해 상당히 높아 대체 생물원유로서의 가능성이 높다. 또한 미세조류는 황무지, 해안가, 바다 등 어디서든 배양할 수 있어 기존 육상작물과 공간 측면에서 상호 경쟁하지 않으며, 해수, 폐수, 하수 등 다양한 물을 활용하여 배양할 수 있다 [2].

미세조류 바이오디젤 생산기술은 친환경 연료, 지구온난화 가스인 CO₂ 저감, 새로운 산업 창출 등 여러 장점이 있지만, 아직 경유 및 식용작물 바이오연료 기술보다 상대적으로 경제성이 떨어진다 [4, 5]. 미세조류 바이오디젤 기술은 크게 1) 고지질 함유 미세조류 생산, 2) 미세조류 수확, 3) 오일 추출, 4) 바이오디젤 전환 등 4개 공정으로 구성되며, 미세조류 바이오매스 생산비용이 본 기술의 실용화에 앞서 가장 큰 제한요인으로 보고되고 있다 [5].

미세조류 바이오매스 및 지질 생산성은 사용 균주, 배양시스템, 배지조성, 환경조건 등에 크게 영향을 받는다 [1]. 특히 질소원과 유기탄소원은 미세조류의 균체성장 뿐만 아니라 지질의 축적에 대한 중요한 인자로 보고되고 있다. *Chlorella* sp. 227의 경우 질소원으로 암모늄을 사용했을 때 생체내 지질 함량은 0.2 mM의 경우가 2 mM 보다 2.3 배 높았다 [1]. Wan 등은 독립 (autotrophic) 또는 종속 (heterotrophic) 영양조건보다 혼합 (mixotrophic) 영양조건에서 *Ch. sorokiniana*의 균체성장 속도가 4.2배 정도 높았다고 보고하였다 [17]. *Ch. vulgaris*의 경우도 균체성장이 빛이 있는 조건에서 포도당을 공급하여 배양하였을 때 독립/종속 영양조건보다 우수하였다고 보고되었다 [7]. 한편 글리세롤은 바이오디젤 부산물 (오일 + 3 알코올 → 3 바이오디젤 + 글리세롤)로 생산되며 [18], 현재 높은 정제 비용으로 인해 처리 및 활용에 많은 어려움을 겪고 있다.

Ch. sp. KR-1은 광생물반응기 시스템에서 고농도 CO₂ (~15%) 및 저해가스 (SO_x, NO_x) 함유 석탄 발전배가스를 이용한 고농도 바이오매스 생산 및 바이오디젤 원료로서의 활용 가능성이 높은 것으로 앞서 보고되었다 [13, 14]. 그러나 바이오매스 생산성 향상을 위한 CO₂ 생물고정화 효율 측면에서는 자세히 연구되었으나, 지질 조성, 축적 및 그 생산성을 높이

기 위한 영양조건 연구는 부족한 상황이다. 본 연구에서는 대용량 광생물반응기 실험에 앞서 플라스틱 배양조건에서 질소원 (질산염, 암모늄염) 및 유기탄소원 (포도당, 글리세롤)의 종류 및 농도에 따른 KR-1 균주의 균체성장 및 지질합성에 대한 영향을 조사하였다. 또한 독립, 혼합, 종속 영양조건에서의 균체성장 및 지질축적 정도를 상호 비교하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 *Ch. sp.* KR-1은 영월 지역 화력 발전소 인근에서 분리되었다 [9]. 균체배양에 사용된 배지는 N8 배지였고 [14], 기본 조성은 KNO₃ 5.0 mM, KH₂PO₄ 5.44 mM, Na₂HPO₄ 1.83 mM, MgSO₄ · 7H₂O 0.20 mM, CaCl₂ 0.12 mM, FeNaEDTA 0.03 mM, ZnSO₄ · 7H₂O 0.01 mM, MnCl₂ · 4H₂O 0.07 mM, CuSO₄ 0.07 mM 및 Al₂(SO₄)₃ · 18H₂O 0.01 mM이었다. 배지는 제조 후 pH 보정과 필터 멸균을 하여 사용하였다. 고체배지는 각 배지에 agar (15 g/L)를 첨가하여 습식멸균 (121°C, 15분) 한 후 sodium thio-sulfate (279 g/L)를 10 mL/L로 첨가하여 제조하였다. 유기 탄소원으로 포도당과 글리세롤은 시약급을 사용하였다.

플라스틱 배양은 조도를 공급하는 6개의 형광등이 달린 진탕배양기 (IS-971RF, Jeio Tech, Korea)에서 시행하였다. 플라스틱로는 다공성 실리콘 스폰지 마개가 달린 250 mL 용량의 삼각 플라스크를 사용하였다. 표준 배양조건으로는 온도 25°C, 빛 세기 39 μmol/m²·s이었다. 배양액 부피 및 교반속도는 각각 100 mL 및 150 rpm이었다. 집중 방법으로 고체 배지에서 3~4일간 배양한 균주를 실험 조건의 플라스틱에서 예비 배양한 후 본 배양액의 10% 수준으로 집중하였다. 빛이 없는 조건은 플라스틱 외부를 알루미늄 호일로 감싸 실험을 하였다.

세포농도 측정

세포농도는 분광광도계를 이용, 파장 660 nm에서 흡광도 (Absorbance, A₆₆₀)로 측정하였다. 이 때 흡광도와 건조 균체중량 (Dry cell weight, DCW)간의 관계를 미리 구하여 검량선을 얻었고, 이 검량선을 이용하여 시료의 흡광도를 DCW로 환산하였다. DCW

는 배양액 시료를 2번 증류수로 세척하고, 100°C 에서 12시간 이상 건조시켜 측정하였다 [13].

pH 및 빛 세기의 측정

시료의 pH와 빛 세기는 각각 HM-30R pH meter (DKK-TOA Co., Japan) 및 조도측정기 (LI-250, Li-Cor Inc., USA)를 사용하여 측정하였다 [14].

지질 분석

균체내 지질함량은 지방산의 직접 전이에스테르 화법으로 측정하였고, fatty acid methyl ester (FAME) 양으로 나타내었다 [13, 14]. 세포 배양액 50 mL 정도를 채취하여 고속원심분리기 (Combi-514R, Hanil, Korea)를 이용하여 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 증류수로 세척하고 원심분리를 2회 반복하였다. 세포를 동결건조기 (FD5512, Ilsin, Korea)로 4일 이상 충분히 건조시켰다. 테프론 마개를 가진 유리튜브 (11 mL, Daihan Scientific, Korea)에 질량을 측정된 건조세포 10 mg 정도를 넣고 클로로포름-메탄올 (2:1, vol/vol) 2 mL 을 주입한 후 상온에서 10분간 vortex mixer (Vorex Genius 3, Ika, Italy)로 섞었다. 내부표준물질인 non-adecanoic acid를 함유한 클로로포름 1 mL (500 µg/L), 메탄올 1 mL, 황산 300 µl를 순차적으로 유리튜브에 첨가한 후 5분간 mixer로 섞었다. 튜브를 항온 수조에 넣고 100°C 에서 10분간 반응시켰다. 상온까지 냉각시킨 후 증류수 1 mL을 주입하고, mixer로 5분 정도 격렬히 섞은 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 증분리를 시켰다. 아래층 (유기상)을 1회용 PP 재질 주사기 (Norm-ject, Germany)로 뽑아 1회용 0.22 µm PVDF 실린지필터 (Millex-Gv, Millipore, USA)로 여과 후 자동 주입기를 가진 가스크로마토그래피 (Model 7890, Agilent, USA)로 분석하였다. 표준물질로는 Fatty acid methyl ester mixture인 Mix RM3와 Mix RM5 (Supelco, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

질산염의 영향

Figure 1은 질소원으로 질산염 농도에 따른 *Chlorella* sp. KR-1의 균체성장과 지질 (FAME) 함량 및 생산량 변화를 보여준다. 15일 배양 후 최종 균체

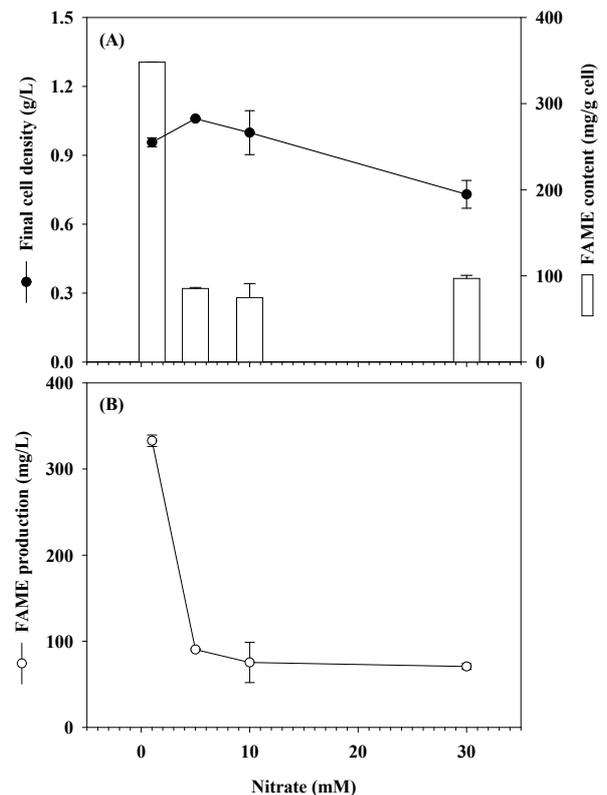


Figure 1. Effect of nitrate concentration on final cell density (●), intracellular FAME content (□), and FAME production. KR-1 was cultivated for 15 days.

농도는 질산염 농도 5 mM에서 1.06 g/L로 최대를 나타내었다. 그러나 5 mM 이상에서는 균체농도가 질산염 농도에 따라 감소하는 경향을 나타내었고, 질산염 농도 30 mM에서 0.73 g/L의 낮은 농도를 나타내었다. pH는 질산염 농도와 상관없이 초기 pH와 별 차이가 없었다. 질소원 농도 5 mM 이상에서 균체 성장이 더 이상 증가하지 않는다는 것은 주어진 환경조건에서 질소원이 제한요인이 아님을 뜻한다. 이는 교반 플라스크 배양의 특성상 공기 (0.035% CO₂ 함유)의 확산에 의존한 CO₂ 공급과 낮은 빛 세기 (39 µmol/m²·s)의 영향을 받은 것으로 판단된다. 한편 nitrate는 nitrate reductase 효소에 의해 NH₄⁺로 전환되어 질소원으로 이용된다 [13]. 따라서 높은 농도의 nitrate 사용으로 유도된 과도한 NH₄⁺의 축적도 어느 정도 미세조류 세포의 대사활동을 저해했을 것으로 판단된다 [3]. 질소원을 첨가하지 않은 경우 균체성장은 거의 관찰되지 않았다.

균체내 지질 함량은 질산염 농도 1 mM에서 348 mg FAME/g cell로 가장 높았고, 그 이상의 질산염

농도에서는 질산염 농도에 상관없이 75 - 97 mg FAME/g cell의 낮은 지질 함량을 나타내었다 (Figure 1B). 최대 지질 생산량 (333 mg FAME/L)은 양호한 균체 성장과 높은 균체내 지질 함량으로 인해 질산염 1 mM에서 관찰되었다. 주요 지방산으로 caproic acid (1.4 - 8.2%), myristic acid (0.3 - 1.2%), palmitic acid (24.5 - 27.0%), stearic acid (1.3 - 4.2%), oleic acid (2.8 - 23.1%), linoleic acid (27.2 - 35.9%), α -linoleic acid (8.9 - 12.8%)가 관찰되었다 (Table 1). 특히 oleic acid가 낮은 질소원 농도인 1 mM에서 상대적으로 크게 증가하였다. 위의 결과로부터 바이오디젤의 원료인 지질의 생산량을 높이기 위해서는 균체 성장과 균체내 지질 함량을 고려한 적절한 질산염을 공급하는 것이 필요한 것으로 판단된다.

Table 1. Effect of nitrate concentration on intracellular FAME composition.

Fatty acid (%)	Nitrate (mM)			
	1	5	10	30
Caproic acid (C10:0)	1.4	8.2	7.4	8.0
Myristic acid (C14:0)	0.3	1.2	1.2	1.0
Palmitic acid (C16:0)	27.0	24.5	26.3	26.1
Stearic acid (C18:0)	4.2	1.3	1.4	1.7
Oleic acid (C18:1)	23.1	2.8	3.0	3.6
Linoleic acid (C18:2)	27.2	34.2	33.5	35.9
α -linoleic acid (C18:3)	8.9	12.8	12.5	10.8
Others	7.9	15	14.7	12.9
Sum	100	100	100	100

Samples were analyzed in duplicate and averaged.

Chlorella 배양시 질소원 부족 또는 결핍 조건이 생체 에너지 저장물질인 지질 또는 탄수화물의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 [6, 11]. 동일한 질소원 결핍조건에서 *Ch. ellipsoidea* SK, *Ch. pyrenoidosa* 82 균주에서는 지질 축적이, *Ch. pyrenoidosa* 82T, *Ch. pyrenoidosa* TKh-7-11-05, *Ch. sp. K* 및 *Ch. vulgaris* 157에서는 탄수화물 축적이 보고되었다 [11]. 질소결핍 조건에서는 대사과정을 유지하기 위해 광합성 색소로부터 질소원을 주로 사용하게 된다 [15]. 이 경우 광합성 속도와 관련된 대사흐름속도 (Metabolic flux analysis)가 느려지고, 이는 생체내 NADH의 축적을 유도한다. 과도한 NADH는 citrate synthase의 활성을 저해하고, TCA cycle

내에서의 acetyl CoA의 이용을 방해한다. 증가된 acetyl CoA는 acetyl CoA carboxylase (acetyl CoA를 malonyl CoA로 전환)의 활성을 촉진하고, 이를 통해 지질합성이 증진될 수 있다.

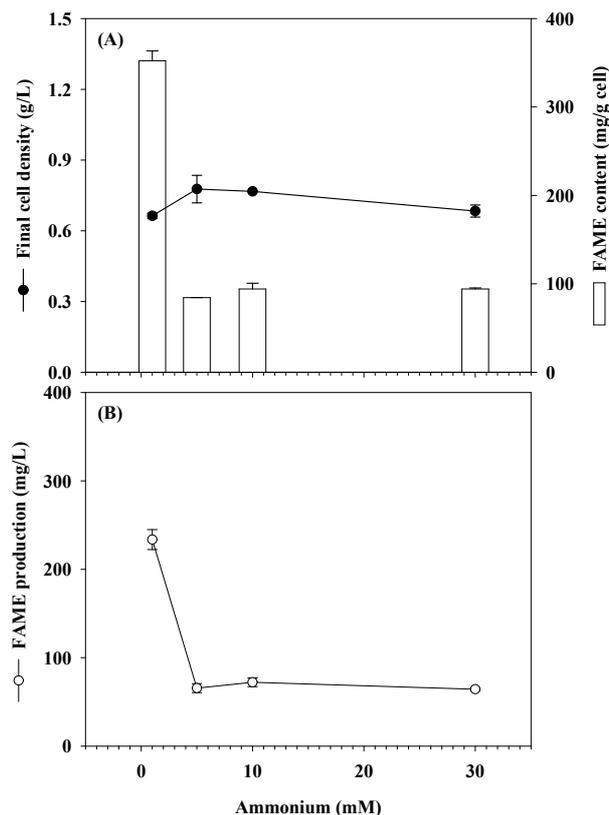


Figure 2. Effect of ammonium concentration on final cell density (●), intracellular FAME content (□), and FAME production. KR-1 was cultivated for 15 days.

암모늄염의 영향

질소원으로 암모늄 농도 1 - 30 mM 범위에서 *Ch. sp. KR-1*의 균체 성장과 지질 함량 및 생산량 변화를 조사하였다 (Figure 2). 미세조류는 15일간 배양하였다. 암모늄염을 질소원으로 사용한 경우 세포농도 (~0.78 g/L)는 전체적으로 질산염 (~1.06 g/L)의 경우보다 낮은 경향을 보였다. 최대 균체농도는 암모늄염 5 mM에서 관찰되었고, 이후 농도 증가에 따라 균체농도는 소폭 감소하는 경향을 나타내었다. pH는 암모늄염 1 mM에서는 pH 6.5 정도를 유지하였으나, 5 mM 이상에서는 암모늄염 농도에 상관없이 pH가 4 이하로 감소하였다 (data not shown). 이러한 pH 감소는 *Ch. sp. KR-1*의 균체 성장에 영향을 끼쳤

을 것으로 판단된다. Lee 등은 *Chlorella* sp.는 pH 4 이상에서 안정적인 세포성장을 나타내었으나 그 이하에서는 상당한 저해효과가 있었다고 보고하였다 [16]. 또한 과도한 NH₄⁺ 첨가도 미세조류 세포의 대사활동에 영향을 나타냈을 것으로 여겨진다 [3]. 암모늄염을 전혀 첨가하지 않은 경우 균체성장은 거의 관찰되지 않았다.

균체내 지질 함량은 암모늄염 농도 1 mM에서 352 mg FAME/g cell로 가장 높았고, 이는 질산염 1 mM의 경우 (348 mg FAME/g cell)와 유사하였다 (Figure 2B). 5 mM 이상의 암모늄염 농도에서는 지질 함량이 84 - 94 mg FAME/g cell로 대폭 감소하였다. 최대 지질 생산량 (234 mg FAME/L)은 높은 균체내 지질 함량으로 인해 암모늄염 1 mM에서 관찰되었다. 주요 지방산은 질산염의 경우와 유사하게 palmitic acid (25.7 - 27.9%), oleic acid (1.6 - 23.4%), linoleic acid (27.6 - 32.5%)가 관찰되었다 (Table 2). Oleic acid 조성은 암모늄염 1 mM에서 23.4%로 최대 값을 나타내었고, 5 mM 이상의 농도에서는 2% 수준으로 대폭 감소하였다. 현 플라스크 배양조건 하에서는 *Ch. sp. KR-1*의 균체성장과 지질 생산량 측면에서 질소원으로 암모늄염 보다 질산염이 우수한 것으로 판단된다. Oh 등은 해양 미세조류 *Isochrysis galbana* Parke 배양시 균체성장은 암모늄염보다 질산염이 유리하다고 보고하였다 [10].

Table 2. Effect of ammonium concentration on intracellular FAME composition

Fatty acid (%)	Ammonium (mM)			
	1	5	10	30
Caproic acid (C10:0)	1.6	7.4	7.3	7.7
Myristic acid (C14:0)	-	0.9	0.7	-
Palmitic acid (C16:0)	27.0	26.5	25.7	27.9
Stearic acid (C18:0)	4.3	-	1.0	1.3
Oleic acid (C18:1)	23.4	2.9	1.6	1.6
Linoleic acid (C18:2)	27.6	32.5	31.4	31.5
α-linoleic acid (C18:3)	7.9	14.4	16.1	14.6
Others	8.2	15.4	16.2	15.4
Sum	100	100	100	100

Samples were analyzed in duplicate and averaged.

-, not detected.

포도당의 영향

*Chlorella*를 포함한 몇몇 미세조류는 배양조건에

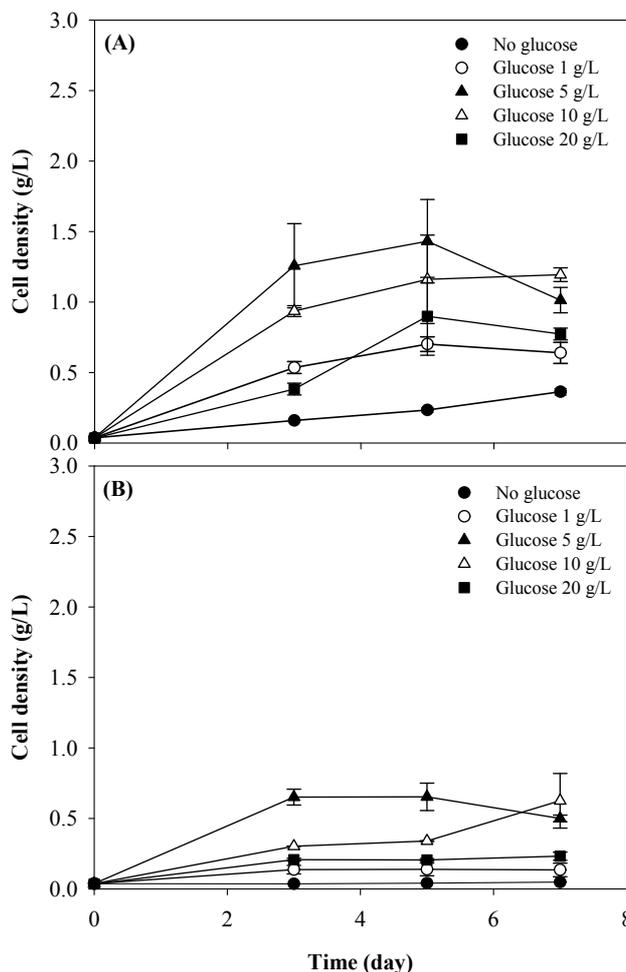


Figure 3. Effect of glucose concentration on cell growth of *Ch. sp. KR-1* with (A) and without (B) light supply.

따라 무기탄소원 (CO₂) 뿐만 아니라 유기탄소원을 탄소원으로 이용할 수 있다 [14]. 본 실험에서는 빛을 공급한 조건 (혼합영양, mixotrophic condition)과 빛이 없는 조건 (종속영양, heterotrophic condition)에서 *Ch. sp. KR-1*의 균체성장 및 지질 생산에 대한 포도당의 영향을 조사하였다. 포도당 농도는 0 - 20 g/L로 조절하였다. 이 때 배양시간 및 질산염 농도는 각각 7일 및 5 mM이었다.

Figure 3A는 빛을 공급한 조건에서 균체성장에 대한 포도당 영향을 나타내고 있다. 포도당을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 독립영양 조건보다 균체성장이 우수하였다. 포도당 농도 1 g/L에 비해 포도당 농도 5 - 10 g/L에서 높은 균체농도 (1.2 - 1.4 g/L)가 관찰되었다. 그러나 포도당 농도 20 g/L에서는 오히려 균체농도가 감소하였다. 포도당을 첨가하지 않았거나 포도당을 5 g/L 이하로 첨가한 경우 pH는 초기

pH 6.5에서 큰 변화를 나타내지 않았다. 그러나 상대적으로 많은 양의 포도당 (10 - 20 g/L)이 공급된 경우 pH는 최하 3.8까지 떨어지는 경향이 관찰되었다. 앞서 언급한 대로 pH 감소는 미세조류 세포의 대사활동에 저해효과를 나타내었을 것으로 판단된다 [16].

빛이 없는 조건에서 포도당을 첨가했을 때 전체적으로 균체성장과 pH 변화는 빛을 공급한 조건과 유사한 경향을 나타내었지만 균체성장은 상대적으로 좋지 않았다 (Figure 3B). 7일간 배양했을 때 최대 균체농도는 포도당 농도 5 - 10 g/L에서 관찰되었고 (0.6 - 0.7 g/L), 이는 빛을 공급한 조건보다 약 2배 낮은 값이었다. 빛이 없는 조건에서 포도당을 첨가하지 않은 경우 균체성장은 관찰되지 않았다. 본 결과는 실험한 조건 범위에서 포도당을 공급하였을 때 빛이 KR-1의 균체성장에 큰 도움이 된다는 것을 나타낸다.

Figure 4는 빛 공급 유무 및 포도당 농도에 따른 KR-1의 지질함량 변화를 나타내고 있다. 빛이 공급된 조건에서 최대 지질 함량은 포도당 5 g/L에서 375 mg FAME/g cell로 관찰되었고, 포도당을 첨가하지 않은 경우 (135 mg FAME/g cell)보다 2.8배 높았다. 포도당을 1 g/L으로 소량 첨가하거나 10 g/L 이상 공급한 경우 균체내 지질 함량은 크게 감소하였다. 포도당 5 g/L의 경우 균체성장은 5일까지 증가하다 이후 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 3A). 중성 지방은 주로 균체성장이 정체기에 도달한 이후 대폭 증가하는 것으로 알려져 있으므로 배양시간도 지질 축적에 많은 영향을 준 것으로 판단된다 [10]. 이들 결과는 적당량의 포도당 첨가가 KR-1의 균체성장과 지질생산을 향상시킬 수 있다는 것을 보여준다. 빛이 없는 조건에서 포도당을 5 g/L 이상 첨가한 경우 지질 함량은 90 mg FAME/g cell 이하로 빛을 공급한 경우보다 상당히 낮았다. 본 결과는 KR-1 배양시 유기탄소원으로 포도당을 공급할 때 빛이 지질 축적에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 이들 결과들은 KR-1의 경우 혼합영양 조건이 중속영양 조건보다 바이오매스 및 지질 생산성에 유리함을 의미한다.

글리세롤의 영향

본 실험에서는 탄소원으로 포도당 대신 글리세롤을 이용하여 KR-1의 균체성장 및 지질생산에 대한

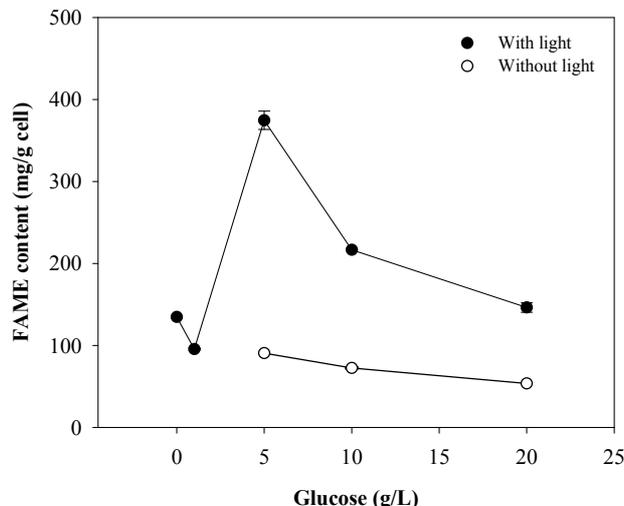


Figure 4. Effect of glucose concentration on intracellular FAME content of *Ch. sp.* KR-1 with and without light supply at 7 days cultivations.

영향을 조사하였다 (Figure 5). 포도당을 이용한 앞선 실험에서 빛을 공급한 조건이 빛이 없는 조건보다 균체성장 및 지질 생산이 우수하였으므로 본 실험은 빛을 공급하여 진행하였다. 배양시간 및 질산염 농도는 각각 7일 및 5 mM이었다.

글리세롤을 첨가하지 않았을 때 보다 첨가 했을 때 전반적으로 KR-1의 균체성장이 우수하였다 (Figure 5A). 글리세롤 1 - 5 g/L 범위에서는 균체성장이 글리세롤 첨가량 증가에 따라 증가하는 경향이 관찰되었고, 최대 균체량 (1.6 g/L)은 글리세롤 5 g/L에서 관찰되었다. 그러나 글리세롤을 10 g/L 이상 첨가하였을 때 균체성장은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 과도한 글리세롤 첨가는 KR-1 균체성장에 저해효과를 가진다는 것을 나타낸다.

Figure 5B는 글리세롤 첨가량에 따른 지질함량 변화를 나타내고 있다. KR-1의 지질 함량은 글리세롤 5 g/L에서 최대값 (209 mg FAME/g cell)을 나타냈다. 글리세롤 농도 5 g/L 이상에서는 포도당의 경우와 유사하게 글리세롤 농도 증가에 따라 균체내 지질 함량이 감소하는 경향이 관찰되었다. 현 플라스틱 실험조건에서 글리세롤과 포도당을 비교할 때 최대 균체량은 비슷하였으나, 균체내 지질 함량은 포도당의 경우가 1.9배 높았다. 이는 KR-1을 이용한 지질 생산 측면에서는 글리세롤보다 포도당이 더 우수한 유기탄소원임을 나타낸다.

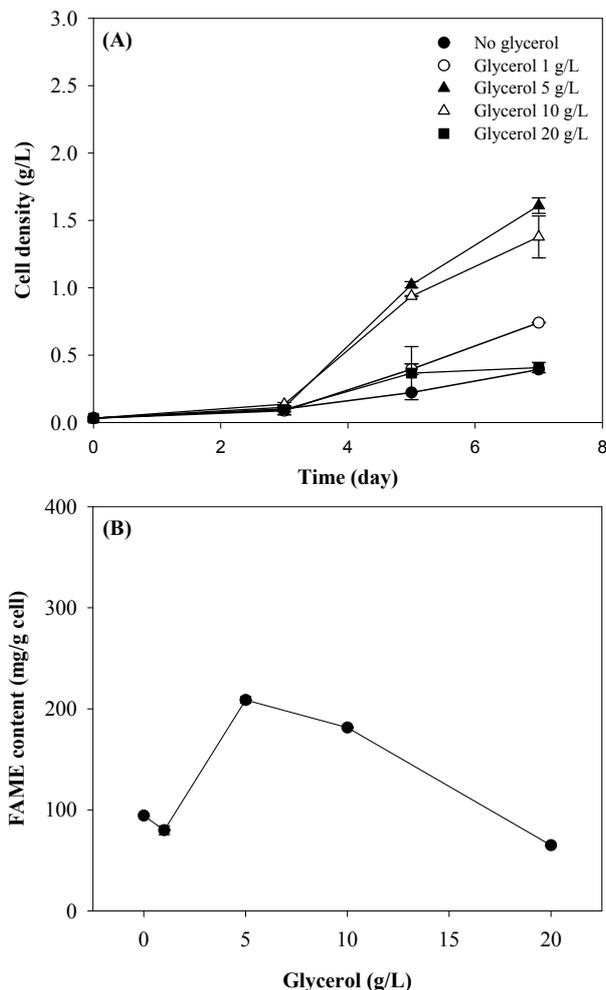


Figure 5. Effect of glycerol concentration on cell growth (A) and intracellular FAME content (B).

결론

본 연구에서는 플라스크 배양조건에서 *Ch. sp. KR-1*의 균체성장과 지질 축적 및 생산에 대한 질소 원 및 유기탄소원의 영향을 조사하였다. 독립 영양 조건에서 균체성장과 지질생산에 있어서 질소원으로 암모늄에 비해 질산염의 경우가 유리하였다. 최종 균체농도는 질산염 농도 5 mM에서 1.06 g/L로 가장 높았다. 암모늄과 질산염 모두 저농도 (1 mM)에서 최대 지질함량 (348 - 352 mg FAME/g cell)이 관찰되었다. 빛을 공급한 조건에서 포도당을 첨가한 경우가 독립영양 조건보다 균체성장 (1.2 - 1.4 g/L)이 우수하였고, 지질 축적량도 2.8배 높았다. 글리세롤을 유기탄소원으로 공급한 경우 최대 균체량은 포도당의 경우와 비슷하였으나, 균체내 지질 함량은

포도당의 경우보다 1.9배 낮았다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국에너지기술평가원의 에너지 효율향상·자원기술연구개발 과제인 “미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품 전환 공정의 실증” 과제 (과제번호 : 2012-T-100201516)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사의 뜻을 전합니다. 또한 이 논문은 2012년 정부(미래창조과학부)의 재원으로 (재)차세대 바이오매스 연구단(글로벌프론티어연구사업)의 지원을 받아 수행되었습니다 ((재)차세대바이오매스연구단- 2012 M3A6A2053880).

References

1. Cho, S., Lee, D., Luong, T. T., Park, S., Oh, Y.-K., and Lee, T. 2011. 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.
2. Cho, S., Luong, T. T., Lee, D., Oh, Y.-K., and Lee, T. 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour. Technol.* **102**, 8639-8645.
3. Jeanfils, J., Canisius, M.-F., and Burlion, N. 1993. Effect of high nitrate concentration on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *J. Appl. Phycol.* **5**, 369-374.
4. Jones, C.S. and Mayfield, S.P. 2012. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 346-351.
5. Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., and Yang, J.-W. 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **31**, 862-876.
6. Lee, Y.-C., Lee, K., and Oh, Y.-K. 2014. Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: A review. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.145>.
7. Liang, Y., Sarkany, N., and Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under auto-

- trophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1043–1049.
8. Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 217–232.
 9. Na, J.-G., Lee, H.-S., Oh, Y.-K., Park, J.-Y., Ko, C. H., Lee, S.-H., Yi, K.-B., Chung, S. H., and Jeon, S. G. 2011. *Biotechnol. Lett.* **33**, 957-960.
 10. Oh, Y.-K., Kim, Y.-J., and Park, S. 1997. Production of EPA and DHA from Marine Microalga *Isochrysis galbana* Parke. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 328-335.
 11. Oh-Hama, T. and Miyachi, S. 1988. *Chlorella*. In: Borowitzka, M. and Borowitzka, L. J. (eds), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University, pp 3 - 26.
 12. Pragma, N., Pandey, K.K., and Sahoo, P.K. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **24**, 159 - 171.
 13. Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Cho, S., Hyun, J.-S., Park, J.-Y., Lee, Y.-C., Lee, H., Lee, J.-S., and Oh, Y.-K. 2014. Mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella* sp. KR-1 mediated by actual coal-fired flue gas for biodiesel production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **37**, 2083-2094.
 14. Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.-Y., Lee, J.-S., Lee, Y.-C., and Oh, Y.-K. 2014. Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue gas. *Bioresour. Technol.* **171**, 500-505.
 15. Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., and Thajuddin, N. 2012. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass Bioenerg.* **37**, 60-66.
 16. Sung, K.-D., Lee, J.-S., Shin, C.-S., Park, S.-C., and Choi, M.-J. 1999. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresour. Technol.* **68**, 269-273.
 17. Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Betenbaugh, M. J., Nie, Z., and Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 831-844.
 18. Zhang, X.L., Yan, S., Tyagi, R.D., and Surampalli, R.Y. 2013. Biodiesel production from heterotrophic microalgae through transesterification and nanotechnology application in the production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **26**, 216–223.