

유가식 배양에서 배양조건에 따른 *Chlorella minutissima*의 생육 및 지질생산

오성호¹ · 한재건¹ · 김나영² · 조정섭³ · 임태빈³ · 이신영² · 이현용^{1,4*}

¹강원대학교 BT특성화학부대학, ²강원대학교 공과대학, ³두산에코 비즈넷, ⁴강원대학교 생명과학연구소

Cell Growth and Lipid Production from Fed-batch Cultivation of *Chlorella minutissima* according to Culture Conditions

Sung Ho Oh¹, Jae Gun Han¹, Na Young Kim², Jeong Sub Cho³, Tae Bin Yim³,
Shin Young Lee², and Hyeon Yong Lee^{1,4*}

¹College of Bioscience and Biotechnology Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ²College of Engineering Department of Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ³DooSan EcoBizNet, Chuncheon 200-161, Korea, ⁴Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

Abstract The culture condition of growing *Chlorella minutissima* was optimized to produce biodiesel for fed-batch cultivation. First, under heterotrophic cultivation, the optimum level of glucose was determined to be 10 g/L for 20 days. After, three cultivation conditions were operated: autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth. The lipid level and the maximum cell concentration from the fed-batch heterotrophic process were 32.0 (% v/v) and 15.0 (g-dry wt./L) in 20 L flask, respectively. In addition, since the relatively constant specific lipid production rate was observed as 0.040 (% lipid/g-dry wt./day) at the latter period of cultivation time, the fed-batch process could maintain continuous lipid production. Fed-batch process is higher than those values from the batch process. The lipids from the fed-batch process contained over 38% of C₁₈, known as the suitable composition for the biodiesel application. For mixotrophic and heterotrophic growth under fed-batch condition, glucose was proved to be an appropriate carbon source for a large scale outdoor cultivation. For fed-batch cultivation, the feeding rate of seawater medium containing glucose was decided to be 0.5 L/day. The mixotrophic cultivation maintained maximum cell concentration of 24 (g-dry wt./L) and the lipid level of 43 (% w/w). The lipid composition from this process was also proved to be suitable for the biodiesel production. The fatty acids from the mixotrophic growth contains 18% of C₁₇ and 49% of C₁₈, implying It also tells that *C. minutissima* is a suitable resource of biodiesel. Especially, the mixotrophic cultivation with fed-batch process might be useful for the large scale cultivation for the biodiesel production.

Keywords: autotrophic, heterotrophic, mixotrophic, *Chlorella minutissima*

서 론

화석 연료를 이용함으로써 인류는 발전해 왔지만, 부분

별한 화석 연료의 사용은 온실 가스를 대량 배출 시 킴으로써 지구 온난화라는 환경 파괴를 가속화 시켰다. 이러한 환경 파괴 뿐 만 아니라 자동차 및 석유제품 사용량의 급격한 증가는 한정되어 있는 화석 연료 고갈을 유발 시키고 있다. 따라서 이에 대한 대책으로 바이오 디젤유에 대한 관심 및 연구가 선진국을 중심으로 고조되고 있다 (1-4). 바이오디젤은 재생 가능한 생물학적 연료로 CO₂ 저감과

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6455, Fax: +82-33-250-6560
e-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

배출가스를 저감하는 등 장점이 다양하여 화석 연료의 대체 에너지로 주목하고 있다. 그러나 가장 중요한 원료 수급의 문제점을 가지고 있을 뿐만 아니라 대부분의 원료가 옥수수, 콩, 곡물 등의 작물이므로 식량 부족의 원인으로 지적받고 있다(5).

이와 같은 문제점을 해결하기 위한 것이 바로 미세 조류로부터 생산된 지질 연료에 대한 연구로 1980년대부터 시작하였다(6-8). 그 중 본 연구에서는 지질 함량이 풍부하다고 알려진 *Chlorella minutissima* 미세조류를 가지고 실험을 하였다(9). 특히 *C. minutissima*는 바이오매스로서 경제성 면에서도 생산 경쟁력을 가지며, 또한 미세조류 생성물의 형성을 위한 유발 요소로 알려진 carotenoids, 빛 그리고 우수한 배지 조성만 이루어진다면, 단위 면적당 원료 생산성이 높아 풍부한 원료 수급이 가능하다. 그러나 아직까지 *C. minutissima* 미세조류를 이용한 독립영양 (autotrophic), 종속영양 (heterotrophic), 혼합영양 (mixotrophic)에 의한 지질 함량의 변화에 대한 연구가 거의 전무하다. 다른 연구에서는 지질 함량이 풍부하다고 알려진 *C. protothecoides* 미세조류를 가지고 실험하였는데, 종속배양 (heterotrophic)에 의한 바이오디젤용 지질 생성이 보고되고 있는 연구가 있지만(8, 10, 11), 지질 함량의 변화에 대한 연구가 그리 많은 편은 아니며, 또 다른 연구에서는 *C. sorokiniana*를 이용하여 빛 에너지와 glucose를 사용하면 *Chlorella* 같은 미세조류의 혼합배양 (mixotrophic) 성장 능력이 있는 연구가 전해지고 있다(12). 이러한 혼합배양 (mixotrophic) 배양에 빛은 해조류의 형성을 위하여 유도하는 것으로 이를 통한 바이오디젤용 지질 생산 및 이산화탄소의 광합성 고정, sugar-carbon의 동화작용을 위한 에너지원으로 적합하다.

따라서 C₁₆-C₂₂가 풍부하여 바이오디젤 생산용 지질로 적합한 *Chlorella* 미세조류를 유기식 배양을 통한 최대 생육도 및 지질 생산의 관계를 통해 바이오 디젤의 원료로서의 적합성을 밝히고, 각 배양 조건의 실험을 통해 지질 생성을 위한 효율적인 배양 조건을 밝히고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 해양 미세 조류는 *C. minutissima* (UTEX, USA)으로부터 분양 받아 이용 하였으며, 독립영양 (autotrophic), 종속영양 (heterotrophic), 혼합영양 (mixotrophic) 배양을 균체 생성 및 지질 생성량에 대한 연구를 수행하였다. 배양 배지는 고압멸균기 (한국기 제작 HK-AC120, Korea)를 이용해 121°C, 15분간 가압 살균한 Enrichment Solution (NaNO₃(4.7 g/2 L), sodium glycerolphosphate (5H₂O) (0.7 g/2 L), ES Fe Solution (325 mL/2 L), P-II Metal solution (325 mL/2 L), HEPES buffer (6.5 g/2 L), Vitamin B12 (3 mL/2 L), Biotin

Vitamin solution (3 mL/2 L), Thiamine Vitamin solution (3 mL/2 L))과 0.45 μm 여과지로 여과 후, 해수를 2 L 혼합한 배지를 이용하였으며, mixotrophic 배양의 경우 carbon source로 10 g/L의 glucose를 첨가하여 배양하였다(9, 13).

배양방법

본 실험은 shaking incubator (JS Research Inc. JSSI-100T(C))를 이용하여, 초기 많은 양의 *C. minutissima*를 획득하기 위해, 500 mL의 플라스크에 90 rpm, 35°C에서 fed-batch 배양을 통하여, 균체를 모은 후, 20 L배양기 (한국발효기, KF-20L control panel)를 이용해 최적의 배양 방법을 찾기 위해(Fig. 1), 회분식 (batch) 배양과 유기식 (fed-batch) 배양을 carbon source로써 glucose를 넣어주는 heterotrophic 배양조건에서 45일 동안 배양하였다. 배양 조건은 190 rpm의 교반 속도와 35°C를 유지했으며, 초기 부피 4 L까지 배지를 공급하여 채웠으며, 그 이후 신선한 배지를 0.5 L/day로 45일 동안 공급해 최종 부피가 총 부피 14 L가 되도록 하여 배양을 실시해 생육과 지질을 비교하였다. 이 후, fed-batch 배양 방법을 통한 autotrophic 배양은 빛과 carbon source로써 CO₂를 이용하여 배양하는 방법으로 본 연구에서는 40 W fluorescent lamps으로 10 w/m²의 광원 (light intensity)을 계속 조사 (illumination)하며, 5%의 CO₂를 0.3 L/min의 속도로 공급하여 주었다. Heterotrophic은 autotrophic의 배양과는 달리 광원의 조사 없는 완전한 암 배양 조건에서 carbon source로 CO₂대신 10 g/L로 glucose의 농도를 달리해 공급하였다. Mixotrophic 배양은 carbon source로써 CO₂와 함께, 10 g/L glucose를 공급하는 방법으로, 40 W fluorescent lamps으로 10 w/m²의 광원 (light intensity)을 조사 (illumination)하였다.

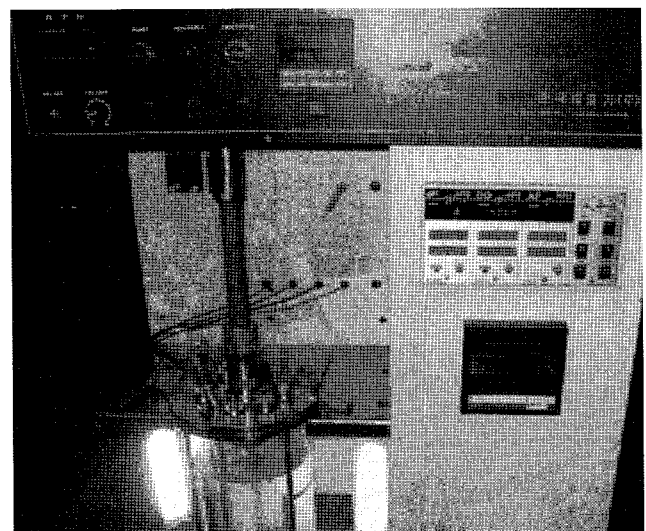


Fig. 1. A photograph of a 20 L photobioreactor for growing *Chlorella minutissima* in enriched seawater medium.

균체생육 및 지질조성분석

균체 생육을 측정하기 위해 배양조에서 3일 간격으로 30 mL의 배지와 균체를 취한 후, UV/Visible spectrophotometer (Kontron Instruments)를 이용하여, 540 nm의 파장 영역에서 측정하였다. 건조균체량 측정을 위해 채취한 시료를 0.45 μm 여과지로 여과한 후, 80°C 항온기에 24시간정도 두어 건조한다. 그 후, 건조무게를 정확하게 측정하였다(11, 14, 15).

균체내 지질 측정위해 건조균체를 동결 건조 후 분쇄하는 전처리 후 Folch법을 이용해 분쇄된 시료 적당량 (1 g)에 20배의 용매 CHCl₃ : methanol (2 : 1 v/v)를 넣고 상온에서 30~90분 동안 교반 후 원심분리 하여 상등액을 취하여 0.9% NaCl 용매를 넣고 수조간 교반 한 후 원심 분리 하여 상등액은 버리고 지질이 포함된 추출액을 건조해 무게를 칭량하고 지방함량으로 하였다(14-18). 지방 조성 분석을 위해 Gas Chromatograph (5890 SERIES II)를 통해 지질 조성을 분석했다. GC의 검출기는 불꽃 이온화 검출기 column의 HP-88column (100 m × 0.23 mm × 0.2 μM)으로 oven 온도는 100°C에서 240°C까지 4°C/min로 설정 되었다. injection 온도와 detector 온도는 각각 250°C, 280°C이고 column flow는 1.0 mL/min, split ratio는 30 : 1로 1 μL씩 injection하여 확인하였다(19).

결과 및 고찰

Fig. 2는 500 mL flask를 통하여, 20일 동안 fed-batch의 heterotrophic 조건을 통해, glucose가 specific growth rate와 바이오매스 생산성에 어느정도 영향을 미치는지 알아 보고자 한 것으로 glucose 초기농도를 순차적으로 변화시켜 배양한 결과를 나타냈다. 그림을 보면 알 수 있듯, glucose 초기농도 10 g/L까지는 가장 높고 안정한 형태의 specific growth rate를 보였으나, 12.5 g/L 이상의 더 높은 농도에서는 성장을 억제하고 20 g/L에서 가장 낮았 수치를 보였다. 따라서 바이오디젤 생성을 위한 미세 조류 배양 시, 고농도의 미세 조류 배양을 통한 지질 생성을 위해 초기농도 10 g/L가 가장 효율적인 조건임을 확인할 수 있으며, 이러한 탄소원을 첨가하였을때, carbon chain length가 증가하는 이유는 당류가 세포내로 흡수되어 호흡작용과 여러 대사작용에 관여하는 효소의 활성도를 증가시켜 균체 생육이 활성화 되는데, 지방의 생합성에 효과적인 탄소원으로 관찰된 것은 glycolipid의 합성에 많이 이용되어 총 지질 생성량이 증가하며, 인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량에 영향을 미치는 것으로, Knivett와 Cullen(1965)의 보고가 전해진다. 또한 당류를 처리한 *C. ellipsoidea*의 엽록체에 인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량변화에 대한 실험에서는 지방의 생합성에서 glucose가 효과적으로 이용되었으며, 지방산의조성과 함량도 다양하게 나타났다는 연구 결과가 있다(20). 이처럼, 고농도의 균체 생육을 통한 지질

생성을 높이기 위해, Batch와 fed-batch에 의한 heterotrophic 조건에서 배양된 *C. minutissima*의 균체 생성량 및 지질 생성량을 Table 1에 나타내었다. 각 배양 방식 모두, 20 L 배양기를 통한 암배양 조건에서 10 g/L glucose를 공급하여, 45일 동안 배양 되었는데, 일정량의 영양 배지를 공급하여 주고 더 이상 공급이 이루어 지지 않는 batch 배양의 경우 균체의 생육이 30일 이후 거의 균체 생육이 이루어 지지 않았으며, 신선한 배지를 2회 공급하여준 fed-batch 배양의 경우 최대 균체량이 15.0 (g-dry wt./L)로 10.9 (g-dry wt./L)인 batch 배양에 비해 상당히 효율적 이었다. 미세조류 생육에 따른 지질 생성량은 총 지질 함량 32.0 (% , w/w)인 fed-batch 배양의 경우 19.7 (% , w/w)인 batch 배양에 비해 높았다. 이 결과 신선한 배지를 주기적으로 공급하여준 fed-batch 배양이 월등히 효율적인 생육 및 총 지질 생성량을 보였으며, carbon source로 이용한 glucose가 대사 과정에서 균체 내 지질 축적이 이루어 질 수 있다는 가능성을 암시한다. 지방산 조성의 분석결과 batch 배양의 경우 C₁₉의 조성이 20%였으며, 디젤용으로 가장 적합하다고 알려진 C₁₆-C₂₂중 C₁₈경우 모두 40%의 조성을 보였다(21). 그 외, 24%의 조성은 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₂₄등으로 이루어져 있었다. 반면 fed-batch 배양의 경우 C₁₇, C₁₈의 조성이 각각 18%, 49%의 조성을 보였다. 이는 생육 속도에 따른 지속적인 영양 공급을 하는 fed-batch 배양에 의해 급격한 고농도의 균체 량을 이룬 후, 배양 말기에 영양 공급의 부족을 통한 미세조류 내의 지방산 함량 축적이 증가하는 것으로, 바이오디젤 생산을 위해 효율적인 배양 방법임을 알 수 있다. 나머지 16%의 지방산 조성은 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₂₄등으로 소량 이루어져 있었다.

Table 1. Comparison of cell growth and lipid production in a 20 L photo-bioreactor under two different cultivation conditions

cultivation conditions	maximum cell density (g-dry wt./L)	Total lipid concentration (% ,w/w)	Fatty acid composition (%of total fatty acids)			
			C _{17:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{19:1}
Batch	10.9	19.7	16%	20%	20%	20%
Fed-batch	15.0	32.0	18%	25%	24%	17%

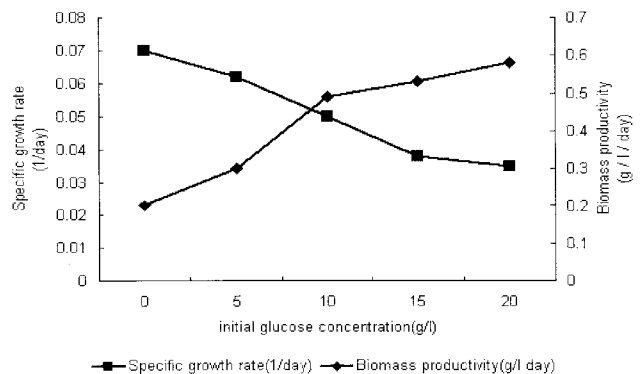


Fig. 2. Effect of initial glucose concentrations on specific growth rate and lipid production from *Chlorella minutissima* in fed-batch cultivation for 20 days.

Batch와 fed-batch 배양을 통한 고농도의 균체 생육이 가능하며, 이를 통한 바이오디젤용 지질의 높은 생산성을 나타내는 조건을 확립 하였다. 같은 class에 속하는 *C. protothecoides* 미세조류를 이용한 바이오디젤용 지질 생성을 비교한 결과 heterotrophic 배양에서 55%, autotrophic에서 15%로 3~4배 정도 높은 지질을 생성한다는 결과가 있어(8, 22), Fig. 3에서 20 L 배양조를 통하여, 각 배양 조건에 따른 균체 생육과 세포내 총 지질 생성 양을 비교했다. CO₂를 주 탄소 원으로 하는 autotrophic 배양의 경우 15 (% w/w)의 지질 함량을 나타내었다. 이에 반해 앞의 실험 결과에서 고농도의 균체 생성을 위한 최적 초기농도가 10 g/L임을 적용하여, CO₂대신 glucose (10 g/L)를 유기 탄소원으로 이용한 heterotrophic과 mixotrophic 배양의 경우는 각각 32 (% w/w), 43 (% w/w)의 높은 지질 함량을 나타내었다. 가장 효율적인 배양 조건이라 사료되는 mixotrophic 배양의 경우 24 (g-dry wt./L)의 최대 균체 농도와 함께 높은 지질 생성량을 보였다.

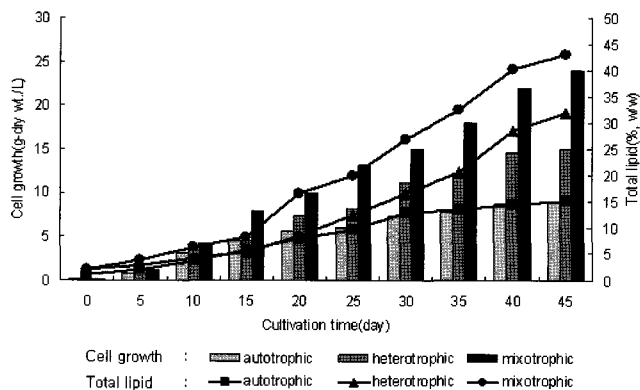


Fig. 3. Cell growth and total lipid production of *Chlorella minutissima* in fed-batch cultivation in a 20 L photobioreactor for 45 days.

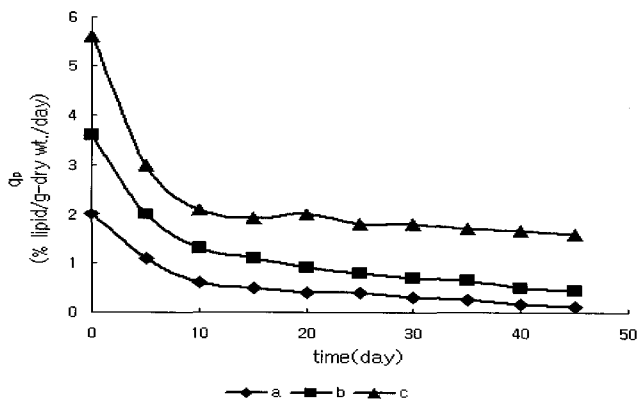


Fig. 4. Specific lipid production rates from *Chlorella minutissima* in fed-batch cultivation under three different cultivation conditions.

- a : Autotrophic growth.
b : Heterotrophic growth.
c : Mixotrophic growth.

이는 기존의 *C. pyrenoidosa*의 균주를 이용한 연구에서 혼합영양 배양의 경우 독립영양에 비해 균체 생육 및 지질 생성을 위해 효율적인 배양 방법임을 입증하는 결과와 유사하며(23), 따라서 대량 배양을 위한 암 배양 시 탄소원의 선택이 가장 중요함을 알 수 있다. Fig. 3의 균체 생육은 autotrophic 배양의 경우 9 (g-dry wt./L)를 나타냈으며, glucose를 이용한 heterotrophic과 mixotrophic 배양은 각각 15 (g-dry wt./L), 24 (g-dry wt./L)의 최대 균체량을 보이며, mixotrophic 배양이 균체 생육에 가장 효율적임을 나타냈다. 또한 균체 생육과 세포내 총 지질 양을 비교해 보면 배양 후, 0.5 L/day의 fed-batch 배양 실시로 균체 생성량이 급격히 증가하며 배양 기간이 45일 이상 균체 생육이 지속적으로 증가함을 알 수 있으며, 지질 생성 역시 균체 생성량과 비슷한 형태로 15일 이후에 급격히 증가하며 지속되는 경향을 보이고 있다. 이는 *C. protothecoides* heterotrophic 배양의 경우 55%의 높은 지질 생성을 나타낸 연구 결과와 비교하여(8), 암 배양은 heterotrophic 배양 시 glucose에 의한 지질 생성이 효율적임을 나타내는 사실은 동일하다. 또한 바이오 디젤용 지질 생산을 위해서는 빛과 CO₂, glucose를 이용한 mixotrophic 배양을 통해 균체 농도를 최대로 올린 후, 더 이상의 영양 공급을 주지 않음으로써, 지질의 축적이 활성화 되므로, 옥 내외 대량 배양 시 mixotrophic 배양이 가장 효율적인 것으로 예상된다.

Fig. 4는 세 배양 조건하에서의 지질의 비 생산 속도를 비교한 것이다. autotrophic의 경우 지질의 균체 당 비 생산 속도가 배양 10일 까지 급격히 감소하여 그 이후 지속적으로 감소해 0.12 (% lipid/g-dry wt./day)을 얻었으며, 15일 이후 어느 정도 일정하게 유지하는 것을 알 수 있다. heterotrophic의 경우 역시 10일 이후 일정한 균체 당 비 생산 속도를 나타내며, 0.45 (% lipid/g-dry wt./day)의 비생산 속도를 나타내었다. Mixotrophic 배양의 경우 가장 급격하게 감소하며, 10일 이후 1.58 (% lipid/g-dry wt./day)의 비생산 속도를 유지하였다. Heterotrophic, mixotrophic 배양 모두 autotrophic 배양의 경우보다 높으며, 암 배양의 경우 일정 균체 농도를 유지하는 경우 지속적인 지질 생성이 가능함을 보여준다. 이는 *C. minutissima*를 이용하여 온도의 영향을 많이 받는 옥외 배양의 경우 알맞은 온도 조건만 유지 된다면, 균체농도의 유지가 가능하므로 높은 지질의 비 생산 속도를 통해 옥외 대량 배양을 통한 바이오디젤 생산이 가능함을 보여주는 결과로 사료된다.

Table 2는 가장 높은 균체 생육을 보이는 fed-batch의 각 배양 조건에 따른 균체 비 생육속도와 지질 조성을 나타냈는데, autotrophic의 경우 0.032 (1/day)의 비 생육속도를 나타냈다. Glucose를 주 탄소원으로 사용한 heterotrophic의 경우 0.04 (1/day)의 비 생육속도를 나타냈으며, mixotrophic의 경우는 0.047 (1/day)로 최대 비 생육속도를 나타내었다. 또한 지방산 조성의 경우 특히 heterotrophic의 경우 C₁₈ 지질의 생성량이 38%로 빛을 조사한 autotrophic의 경우보다 큰 차이를 보이지 않지만 높은 것을 알 수 있다.

Mixotrophic의 경우 바이오 디젤로 가장 선호하는 C_{18:1}, C_{18:2}의 함량이 각각 25%, 24%로 다른 조건에 비해 상당히 높으며, 앞선 table 1의 지방산 함량과 비교하여, 균체 당 총 양질의 바이오 디젤용 지방산의 생성은 좋은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 glucose가 세포내로 흡수되어 호흡작용과 여러 대사 작용에 관여하는 효소의 활성도를 증가시켜, 균체 생육이 왕성해지며, 이러한 성장을 통한 인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성 및 함량에는 영향을 미친다고 사료되며, 이는 *C. minutissima* 조류를 이용한 옥외 혹은 대량 배양 시 mixotrophic 배양으로 빛 과 적절한 유기 탄소원의 적절한 공급으로 장기간 배양 시 균체 내 지질 함량을 높일 수 있고, 바이오 디젤 생산 공정의 scale-up에 유리한 것임을 재 입증한 결과이다.

Table 2. Comparison of specific growth rate and lipid concentration in *Chlorella minutissima* according to different cell culture conditions under fed-batch cultivation for 40 days

Cultivation conditions	Cell density (g-dry wt./L)	Specific growth rate (1/day)	Total lipid (% w/w)	Fatty acid composition (% of total fatty acids)			
				C _{17:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{19:1}
^{a)} Autotrophic	9	0.032	15	13%	16%	20%	17%
^{b)} Heterotrophic	15	0.040	32	16%	20%	18%	16%
^{c)} Mixotrophic	24	0.047	43	18%	25%	24%	17%

- a) Autotrophic : 24 h light and CO₂ (5%, 0.3 L/min).
 b) Heterotrophic : dark and glucose (10 g/L).
 c) Mixotrophic : 24 h light and glucose (10 g/L).

요약

본 연구는 다양한 조건에서의 실험을 위한 *C. minutissima*의 500 mL flask의 중 배양을 통해 고농도의 균주 획득 후, 가장 효율적인 배양 방식을 보인 fed-batch를 통한 autotrophic, heterotrophic, mixotrophic 조건하에서 바이오 디젤용 지질 생산의 최적 배양 조건을 찾아야 했다. 먼저, fed-batch의 Heterotrophic 배양 시 유기 탄소 원으로 glucose의 가장 효율적인 안정한 초기농도가 10 g/L임을 확인했다. 이후, 20 L 배양기를 이용한 batch, fed-batch의 heterotrophic 배양에서 fed-batch 배양의 경우 지질 생성량이 1.62배 정도 더 높았으며, 최대 균체량 역시 4 (g-dry wt./L)정도 높으며, 또한 디젤용 지질로 적합한 C₁₈의 조성 역시 49%이상 차지하여, 옥외 대량 배양 시 유기탄소 원으로 적절한 glucose의 이용을 통한 효율적인 배양방법임을 알 수 있다. 이 결과를 바탕으로, glucose를 포함한 배지를 0.5 L/day로 공급하여 유가 식 배양을 각 배양 조건에 따라 비교 실시했다. 그 결과 mixotrophic의 경우 다른 배양 조건에 비해 각각 24 (g-dry wt./L)의 최대 균체 농도와 함께 43 (% w/w)의 높은 지질 생성량을 보였다. 또한 생성되는 지질의 조성이 균체 당 바이오 디젤용 양질의 지질 생성이 가능하였다.

또한 fed-batch 배양 이후 0.047 (% lipid/g-dry wt./day)의 비 생산 속도를 유지하며, 일정 균체 농도를 유지하는 경우 지속적인 지질 생성이 가능함을 보여주었다. 이러한 세 가지 배양 조건하에서 지질 추출을 통한 지방산 조성을 살펴본 결과 mixotrophic 배양 하에 디젤용으로 잘 알려진 C₁₇, C₁₈의 지방산 조성은 각각 18%와 49%의 생성을 보여주었다.

이 결과들을 바탕으로 이 균주를 이용해 옥외 배양이나 배양 조에서 대량 배양이 가능함을 확인했으며, 특히, 옥외 배양을 위한 혼합영양 배양조건하에 배양 공정의 scale-up에 대한 추가적인 연구를 통해 *C. minutissima* 미세조류로부터 바이오 디젤의 보다 경제적 생산이 가능하도록 하고자 한다.

감사의 글

본 연구논문은 지식경제부의 지원으로 수행한 에너지인력양성사업의 연구결과입니다(2008-N-BL-HM-E-06).

접수 : 2009년 3월 6일, 게재승인 : 2009년 8월 23일

REFERENCES

- Lim, Y. K., S. C. Shin, E. S. Yim, and H. O. Song (2008), The effective product method of biodiesel, *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **19**, 137-144.
- Choi, J. D., D. K. Kim, J. Y. Park, Y. W. Rhee, and J. S. Lee (2008), Optimization of esterification of Jatropha oil by amberlyst-15 and biodiesel production, *Chem. Eng. J.* **46**, 194-199.
- Choi, S. H., Y. T. Oh, and J. D. So (2006), Characteristics of exhaust emission by the application of biodiesel fuel and oxygenates as an alternative fuel in an agricultural diesel engine, *J. of Biosystems Eng.* **31**, 457-462.
- Hyeon, Y. Z and H. S. Kim (2002), Conversion of vegetable oils into biodiesel fuel by continuous process, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **19**, 327-334.
- Demirbas, A (2007), Progress and recent trends in biofuels, *Pro. Ener. Comb. Sci.* **33**, 1-18.
- Al-Widyan, M. I. and Al-Shyoukh, A. O. (2002), Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel, *Bioresour. Technol.* **85**, 253-256.
- Jeon, S. M., I. H. Kim, J. M. Ha, and J. H. Lee (2008), Overview of technology for fixation of carbon dioxide using microalgae, *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **19**, 145-150.

8. Xiaoling, M. and W. Qingyu (2006), Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **97**, 841-846.
9. Haigh, W. G., T. F. Yoder, and L. Ericson (1996), The characterisation and cyclic production of a highly unsaturated homoserine lipid in *Chlorella minutissima*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1299**, 183-190.
10. Xian, M. S., W. Z. Xue, and C. Feng (2000), Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen source, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 312.
11. Xiong, W., X. Li, J. Xiang, and Q. Wu (2008), High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 29-36.
12. Lee, Y. K., S. Y. Ding, C. H. Hoe, and C. S. Low (1996), Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor, *J. Appl. Phycol.* **8**, 163-169
13. <http://www.utex.org/> (2009).
14. Jung, M. M. and S. Rho (1999), Comparison of notochord length, dry weight and survival rate of flat fish, *paralichthys olivaceus* Temminck etschlegel larvae on different, *Bulletin of the Marine Research Institute.* **23**, 23-28.
15. Yi, Y. J., H. Yin, and K. Luo (2005), Culture Conditions effect on the mycelium dry weight activating proteins produce, *Hunan Nong Ye Da Xue Xue Bao.* **31**, 76-78.
16. Tan, W. and G. D. Hogan (1998), Dry weight and N partitioning in relation to substrate N supply, internal N status and developmental stage in Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings, *Implications for Modelling, Ann. Bot.* **81**, 195-201.
17. Iverson, S. J. S. L. C. Lang and M. H. Cooper (2001), Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids.* **36**, 1283-1287.
18. Cohen, Z., A. Vonahak, and A. Richmond (1988), Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum* correlation to growth rete, *J. Phycol.* **24**, 328-332.
19. Yoon, H. R., M. J. Paik, H. S. Shin, C. Yu, and P. Rinaldo (2000), Analysis of plasma free fatty acid cyanomethyl derivatives by GC-NPD for the diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders, *Chromatographia.* **52**, 538-543.
20. Kark, H. S. and S. L. Chong (1990), Effect of carbon source on the synthesis of phospholipid and fatty acid composition in chloroplast of *Chlorella ellipsoidea*, *Korean J. Bot.* **33**, 49-54.
21. Han X., M. Xiaoling, and W. Qingyu (2006), High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* **126**, 499-507.
22. Xiaoling M. and W. Qingyu (2004), High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*, *J. Biotechnol.* **110**, 85-93.
23. Chen, Y., H. Qiang, and S. Kazuyuki (2000), Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions, *Biochem. Eng. J.* **6**, 87-102.