

Scenedesmus sp.로 부터의 지방 추출, 정제 및 특성

김나영 · 오성호¹ · 최운용¹ · 이현용¹ · 이신영*

강원대학교 생물공학과, ¹강원대학교 바이오산업산업공학부

Extraction, Purification and Property of the lipid from *Scenedesmus* sp.

Na-Young Kim, Sung-Ho Oh¹, Woon Yong Choi¹, Hyeon-Yong Lee¹, and Shin-Young Lee*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract Lipid from *Scenedesmus* sp. was extracted, fractionated and purified by silicic acid column chromatography. Total lipid content of extract was 21.38 ± 1.03 wt%, and triacylglycerol, an index lipid for biodiesel production was detected. Ten species of C₁₆~C₂₂ with saturated and unsaturated fatty acid were identified showing the very adequate fatty acid profiles for biodiesel production with a good flow property at low temperature. The fractions of glycolipid, neutral and phospholipid were 52.64, 28.10 and 19.26% of total lipid, respectively. The triacylglycerol of 12.63% and chlorophyll a of 49.47% was fractionated using stepwise elution of n-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v) solvent. The high content of chlorophyll was considered as a potential source of value-added co-product.

Keywords: *Scenedesmus* sp., lipid, solvent extract, fractionation, property

서 론

미세조류는 광에너지와 탄산가스를 이용하는 단세포의 광합성 미생물이며, 현재 지질, 단백질, 색소, 고분자 및 생리 활성물질 등의 생산을 위한 유용 생물자원소재로서 널리 인식되고 있다 [1,2]. 주로 고부가가치 식품 및 제약제품과 같은 여러 응용이 전개되고 있지만 최근에는 미세조류 지질의 바이오 연료로의 전환용도가 크게 주목받고 있다 [2-5].

이는 미세조류가 농작물보다 광합성 효율이 높고, 성장이 빠르며, biomass의 생산성이 클 뿐 아니라, 특히 지질함량이 높아서 각종 원료작물들의 단위면적당 지방수율로 비교할 때 옥수수의 300배 이상, 팜유의 9배 이상의 뛰어난 지질 생산성을 갖기 때문이다 [6-8]. 그러므로 미세조류의 지질로부터 친환경 바이오 연료로 주목되고 있는 제 2세대의 바이오디젤 생산에 관한 연구가 널리 이루어지고 있는 실정이다 [8-13].

하지만 미세조류의 지질은 상업적인 이용도가 낮은 막 결합성의 극성지질로부터 바이오연료의 주원료가 되는 막과 결합하지 않은 triacylglycerol (TAG)과 같은 중성지질에 이르는 광범위한 지질형태를 함유한다. 따라서 미세조류로부터의 바이오연료 개발의 첫 단계는 높은 지질생산성 (지질함량 × biomass 생산성, mg/L/day)이며, 바이오디젤화를 위한 지질의 적합성 즉, 지방산의 사슬길기와 포화정도가 적절하며, 추출될 수 있는 중성지질의 대량저장 균주를 선정하는 것이라 할 수 있다 [5,14].

Scenedesmus sp.는 담수 및 해양에 널리 분포하는 *Chlorococcales* 목의 *Scenedesmaceae* 과에 속하는 녹조류이다. 배양조건에 따라 세포형태나 세포성분 조성들이 크게 달라지는데 [15,16], 그동안의 보고에 의하면 지질함량이 16~40%나 되어 바이오디젤 생산을 위한 대표적인 우수 공급원의 하나로 알려지고 있다 [5,6,17]. 하지만 *Scenedesmus* sp.의 바이오디젤 관련 연구는 다른 미세조류에 비하여 매우 미흡하며, 특히, 높은 지방의 축적에도 불구하고 이들 지방의 조성이나 특성에 대해서는 별로 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 *Scenedesmus* sp.의 biomass를 바이오디젤의 원료로 사용하거나 이의 지질 소재화를 위한 자료

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350

e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

를 구축하기 위하여 중성지질 함량 및 조성 등을 조사하였고, 지방 추출물의 몇몇 특성을 TLC와 silicic acid의 column chromatography를 통한 분획 및 정제 실험을 통하여 조사, 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 균주는 *Scenedesmus* sp.이며, 조절된 조건하에서 배양한 배양액을 원심분리 (3000 rpm, 10 min)하여 균체를 수확한 후 동결건조하고 분쇄 (100 mesh)한 것을 한국해양수산연구원에서 제공받아 실험에 사용하였다. 동결건조시료는 밀봉하여 4°C의 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

지방함량의 측정

지방 함량의 측정은 chloroform-methanol 혼합용매 추출법 [18]으로 실시하였다. 즉, 일정량 (3 g)의 시료를 용량 250 mL의 환저 플라스크에 정확히 칭량하여 넣고 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 용매 60 mL를 첨가하여 냉각관에 연결한 후 65°C의 수조에서 1시간 동안 추출하였다. 추출 후 냉각관으로부터 플라스크를 분리하여 추출 혼합액을 여지 (Advantec, No.2)로 여과한 다음 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 용매 5 mL로 3회 세정하였다. 추출 혼합액을 65°C로 유지한 수조에서 용매를 증산시킨 후 석유 에테르 25 mL를 가하여 무수황산 나트륨 15 g을 첨가하였고 1분간 흔들어 섞은 후 석유 에테르 층을 원심분리 (3000 × g, 5분)하였다. 그 후 미리 항량을 구하여 둔 칭량병에 원심분리된 상층액 10 mL를 취하여 100~105°C의 건조오븐에서 30분간 건조하였고 desiccator에서 45분간 방치시킨 후 건조중량을 측정하여 항량을 구하였다. 지방의 함량은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{시료중의 지질 (\%)} = \frac{(W_1 - W) \times D}{S} \times 100$$

여기서 W는 칭량병의 항량, W1은 추출액의 건조 후의 항량, D는 회석배수 (본 실험에서는 25 mL 중에서 10 mL를 취하였으므로 2.5)이고, S는 시료의 중량 (g)이다.

지방산 분석

지방산 조성은 다음의 두 가지 방법 (Procedure A 및 B)으로 시료를 처리하고 GC (HP 6890 Series/Hewlett Packard, U.S.A)로 분석하였다. 이때, column은 HP-INNOWAX (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)를 사용하였고, flame ionization

detector (FID)를 사용하였으며, 온도 프로그램은 다음과 같이 실시하였다.

150°C (4°C/min) → 190°C (3°C/min) → 214°C (4°C/min) → 260°C (10.5 min)

Procedure A: Acid catalyzed esterification

Folch 법 [18]에 따라 CHCl₃ : methanol (2 : 1, v/v)을 용매로 하여 지방을 추출한 후, 얻어진 지방을 다음과 같이, acid catalyzed esterification하였다 [19]. 즉, screw-capped glass tube에 Folch 법 [18]으로 추출한 지방추출물 10 mg을 넣고 BF₃/methanol 1 mL를 넣어주었다. Tube 내부를 질소로 치환한 후 뚜껑을 닫고 100°C의 heating block에서 90분간 반응시켰다. 반응 후 상온으로 냉각한 다음 증류수 1 mL와 pentane 2 mL를 넣고 약 1분간 vortexing하였으며, 200 rpm으로 원심분리하여 층분리한 다음 상층액을 취하여 바이알에 옮겼다. 이를 질소가스로 pentane을 제거한 후 즉시 n-hexane 50 μL로 녹인 다음 GC로 분석하였다.

Procedure B: One step methylation

Sukhija와 Palmquist의 방법 [20]에 따라 10~50 mg의 지방을 함유하는 시료를 뚜껑이 테프론 screw cap인 tube에 넣고 toluene 1 mL와 5% methanolic HCl (acetyl chloride : methanol (5 : 100, v/v))을 넣어주었다. Tube 내부를 질소로 치환한 후 뚜껑을 닫고 혼합하여 70°C의 수조에서 2시간 동안 반응시켜 상온에서 냉각하여였고, 6% K₂CO₃ 5 mL와 toluene 2 mL를 넣어주었다. 1,100 rpm으로 5분간 원심분리하여 상을 분리하였고, organic 층을 취하여 다른 바이알에 옮긴 다음 Na₂SO₄로 수분을 제거한 후 GC로 분석하였다.

Nile red 염색 및 형광현미경 관찰

미세조류 세포내의 지방구 (lipid droplet)를 검출하기 위하여 세포를 Matsunaga 등 [21]의 방법에 따라 Nile red (9-(Diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one) 염색하고 형광현미경 (Fluorescence microscope/Eclipse 50i, Nikon, Japan)으로 관찰하였다. 즉, 동결건조한 시료를 생리식염수에 재현탁 (400 rpm, 12 h)하고 일정량 (5 mL)을 취하여 원심분리 (1500 × g, 10 min)한 다음 침전물을 생리식염수로 여러 번 세척하였다. 세포를 수확하고 생리식염수 0.5 mL를 가하여 재현탁하였으며, Nile red 용액 (0.1 mg/mL in acetone)을 세포현탁액에 가하였다 (1 : 100, v/v). 10분간 염색한 후 형광현미경으로 사진촬영 하였다.

TLC (thin layer chromatography)

추출한 지방성분은 TLC로 확인하였다. 즉 시료지질을 HPTLC plate (10 × 10, Merck, Darmstadt, Germany)에

표준물질 (mono-, di- 및 tri-glyceride mix, Supelco., USA) 과 함께 spotting하여 benzene : diethyl ether : ethyl acetate : acetic acid (80 : 10 : 10 : 0.2, v/v)의 전개용매로 전개시킨 후 요오드 증기를 발색제로 발색하고 표준물질의 R_f 값과 비교하여 지질성분을 확인하였다.

중성 지질, 당지질 및 인지질의 분획 및 정량

농축한 시료를 Rouser의 방법 [22]에 의해 silicic acid column chromatography하고 중성지질, 당지질 및 인지질로 분리하였다. 100~200 mesh의 silicic acid (Sigma-Aldrich Inc., USA)를 증류수로 3회 세척하여 콜로이드성 미립자를 제거하고, methanol로 2회 세척하여 110°C의 건조오븐에서 12시간 활성화시켰다. 활성화된 silicic acid 10 g을 40 mL의 chloroform으로 slurry를 만들고 기포가 혼입되지 않도록 하면서 glass column (i.d. 20 mm × 40 cm)에 채우고 chloroform을 조금씩 흘러내리면서 세척하였다. 이 때, silicic acid가 공기와 접촉하지 않도록 1 cm 정도의 용매가 채워지도록 조절하였다.

총 지질량 100~300 mg을 칼럼에 주입한 후 2~3 mL/min의 속도로 흘러나오도록 조절하면서 중성지질은 chloroform 250 mL, 당지질은 acetone 300 mL, 그리고 인지질은 methanol 250 mL로 용출시켜 분획하였다.

분획된 각각의 시료액은 40°C에서 회전진공농축기 (EYELA rotary vacuum evaporator, N-N type, Tokyo Rikakikai Co. Ltd.)로 용매를 제거하고 수분을 증발시킨 후 중량법에 의해 각각의 함량을 계산하였다.

Hexane-diethyl ether 용매를 이용한 분획

Hexane과 diethyl ether 용매를 stepwise로 혼합하여 사용하는 방법 [23]을 이용하여 추출된 지방을 분획하였다. 즉, silicic acid는 상기방법과 같이 활성화하였고 18 g을 칭량하여 hexane : ether (1 : 10, v/v)로 slurry를 만들었다. 이를 기포가 혼입되지 않도록 하면서 glass column (i.d. 20 mm × 40 cm)에 채우고 hexane을 조금씩 흘러내리면서 세척하였고, silicic acid가 공기와 접촉하지 않도록 1 cm 정도의 용매가 채워져 있도록 조절하였다. 지질 추출물 1 mL (건조중량 320 mg)을 칼럼에 주입한 후 2~3 mL/min의 속도로 흘러나오도록 조절하면서 hexane에 ether 용매를 혼합하고 농도 별 (0%, 2%, 5%, 15% 및 100%)로 분획하였다. 분획한 각각의 시료액은 40°C에서 회전진공농축기로 용매를 제거하고 수분을 증발시킨 후 중량법에 의해 이들 함량을 각각 계산하였다.

또한 triacylglycerol만을 용출시키기 위해 triacylglycerol의 용출용매인 *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v)를 이용하여 3~5 mL/min의 속도로 5 mL 씩 분획하고 각 분획별 건조중량을 측정하여 용출되는 지질의 함량을 계산하였다 [24].

Chlorophyll의 확인

Chlorophyll의 확인은 chlorophyll로 추정되는 fraction을 용출용매인 *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v)로 희석하여 시료액으로 하였고, 이를 분광광도계 (UV-Vis spectrophotometer, Genesys 5, Milton Roy, USA)를 이용하여 400~700 nm에서 주사 (scanning)하여 얻은 흡수스펙트럼으로부터 확인하였다.

결과 및 고찰

Scenedesmus sp.의 지방함량 및 중성지방의 확인

미세조류로부터의 바이오디젤화나 지질의 소재화를 위해서는 추출될 수 있는 다량의 지질을 함유하는 것이 우선되는 필수조건이다. 따라서 *Scenedesmus* sp.를 세포파쇄한 후 chloroform-methanol의 혼합용매 추출법에 의해 지방을 추출하고, 지질함량을 구하였다.

지질함량은 $21.38 \pm 1.03\%$ (w/w, d.b.)로, *Scenedesmus quadricauda*의 1.9%나 *Scenedesmus obliquus*의 12~14% 보다는 높았으나 *Scenedesmus dimorphus*에서 보고된 16~40%와 비교 하였을 때는 낮은 값 수준이었고 [6,17], 통상 총 균체중량의 상당량이 무기회분 중량임을 고려한다 하더라도 다소 낮은 값 범위이었다.

하지만 녹조류의 평균값 (23%) 범위이었고, 대표적인 우수 오일생산 미세조류로 알려진 *Akistrodesmus* sp., *Dunaliella* spp., *Isochrysis* sp., *Nannochloris* sp., *Nitzschia* sp. 등 균주들의 평균 지방함량 (25%)에 달하는 값 범위이었다 [5,25].

일반적으로 미세조류의 지방축적은 배양조건의 영향을 많이 받는 것으로 보고되었다. 주로 성장에 바람직하지 못한 환경이나 스트레스 환경하에서는 막지질 합성에서 triacylglyceride와 같은 중성지질의 저장으로 지질대사의 전이가 일어나 중성지질의 지질함량이 높아지는 것으로 알려지고 있다 [14]. 최근 Matsunaga 등 [21]은 해수를 이용한 *Scenedesmus* sp.의 배양에서 균체 내 지질의 축적이 영양성분의 함량에 따라 달라지며, 특히 배지 내 영양성분이 낮은 스트레스환경에서 균체 내 lipid의 축적이 높아진다고 보고하였다. Griffiths와 Harrison [5]은 영양분이 풍부할 때 녹조류의 지방함량은 13~31%로 평균 23%라고 하였다. 그러나 영양분이 결핍되면 2배나 증가한다고 하였다. 따라서 본 균주의 지방함량을 향상시키기 위해서는 질소원 결핍이나 염도증가 조건 등 배양조건의 검토가 뒤따라야 할 것으로 생각되었다.

한편, 미세조류가 생산하는 지방은 크게 중성지질 (triacylglycerol, cholesterol 등)과 극성지질 (phospholipids, galactolipids)로 나뉘어지며, 이 중 biodiesel 생산의 주요 원료물질로 이용되는 것은 triacylglycerol이다 [10,14].

결국 TAG 함량이 높은 것이 중요한데, Nile red 염색

은 극성에 따라 세포내 지방을 특이적으로 염색할 수 있어 hydrocarbon을 포함하는 지방이나 triglyceride는 노란색으로, 그리고 극성지방은 붉은색으로 염색시키며, 이를 형광현미경이나 공초점현미경을 통해 관찰할 수 있다고 알려져 있다 [10,26].

따라서 본 실험에서도 본 균주가 추출 가능한 중성 지방구를 대량저장하고 있는지의 여부를 알아보기 위해 균주를 Nile red 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

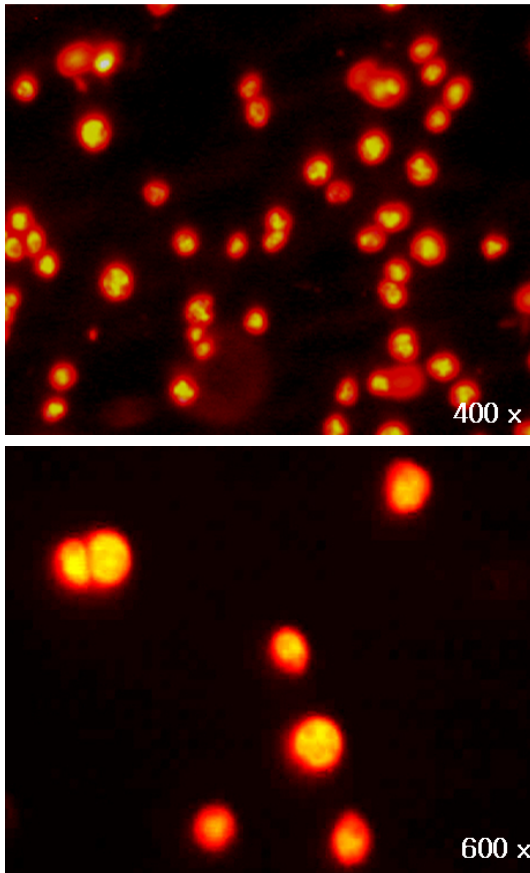


Fig. 1. Fluorescence microscopic image of *Scenedesmus* sp. stained with Nile red.

세포 안쪽에 넓은 부위의 노란색과 붉은 색의 바깥 테두리 부위가 모두 확인되어 시료는 hydrocarbon을 포함하는 지방과 triglyceride 및 극성지방을 모두 함유하고 있음을 확인할 수 있었다. 이를 재확인하기 위해 *Scenedesmus* sp.로부터 추출된 지방을 TLC하였으며, 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이, mono-, di- 및 triglyceride standard의 R_f 값과 비교하였을 때, mono-, di-acylglyceride는 검출되지 않았으나 triacylglycerol 성분의 검출은 확인되었다.

그러므로 본 균주는 녹조류의 평균값 범위의 비교적 높은 지방함량과 추출 가능한 중성 지방구를 다량 함유하는 것으로 판단하였다.

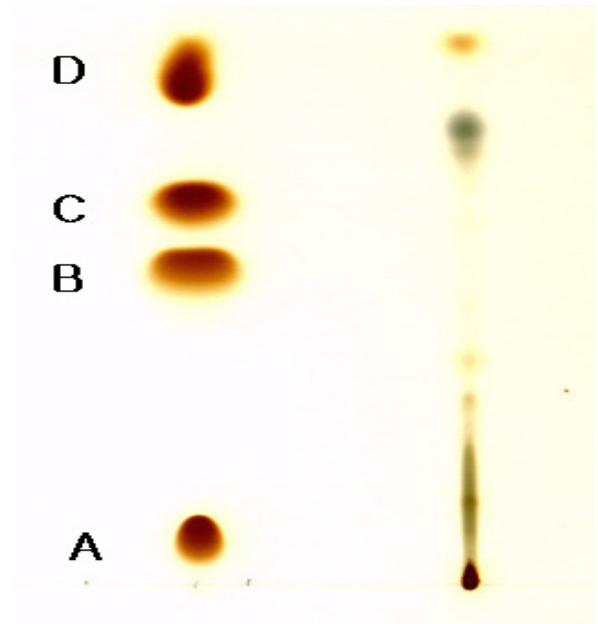


Fig. 2. TLC separation of lipid extract on HPTLC plate. (A) Monoolein (18 : 1), (B) 1,2-Diolein (18 : 2), (C) 1,3-Diolein (18 : 2), (D) Triolein (18 : 3).

지방산 조성 및 포화도

Scenedesmus sp.의 동결건조시료를 용매추출하고 이 추출물을 두 가지 방법 즉, Procedure A 및 B의 방법으로 지방산을 분석하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같으며, 이들에 근거한 조성비를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Comparison between fatty acid analysis of *Scenedesmus* sp. using the two procedures

Fatty acid	Procedure A (Area %)	Procedure B (Area %)
16 : 0	19.08	15.63
16 : 1	1.93	0.38
16 : 2	19.19	21.88
18 : 0	0.29	0.30
18 : 1 cis-9	3.08	2.75
18 : 2	46.60	46.85
18 : 3 cis-9,12,15	2.37	2.22
20 : 0	0.27	0.08
20 : 1	0.26	0.25
22 : 1 cis-13	0.14	0.04
Saturated	19.64	16.01
Unsaturated	73.57	74.37

분석방법에 상관없이 대체로 지방은 standard로 사용한 8종을 포함한 10종의 $C_{16} \sim C_{22}$ 의 포화 및 불포화 지방산을 함유하였다. 검출된 peak 중 standard에 속하지 않은 두 개의 peak는 fatty acid standard의 GC 분석 그래프에서 retention time을 비교한 결과, 각각 $C_{16}:2$ 및 $C_{18}:2$ 지방산인 것으로 확인하였다. 매우 긴사슬길이를 갖는 C_{20} 이상의 지방산은 미량에 불과하였고, EPA (eicosapentaenoic

acid), DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 다가 불포화 지방산도 함유하지 않았다. 바이오디젤에 사용되는 식물유의 경우는 주로 C16 및 C18이며, 본 균주의 지방산도 이와 비슷하였다 [27].

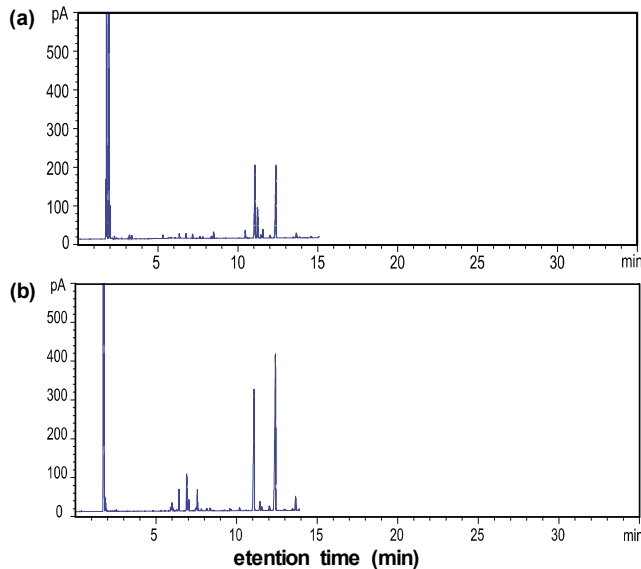


Fig. 3. GC chromatograms of FAMES from *Scenedesmus* sp. (a) acid catalyzed esterification, (b) one step methylation procedure.

Wiltshire [28]는 *Scenedesmus obliquus*의 지방산 조성은 C₁₄~C₂₀의 포화 및 불포화 지방산을 함유하며, C18:3의 함량이 가장 높았고 이어서 C16:0과 C18:2의 순서임을 보고하였다. 본 연구결과를 이와 비교하면 역시 서로 비슷한 조성을 나타내었다. 하지만 함량의 순서는 C18:2 > C16:2 > C16:0 > C18:3의 순서로 다소의 차이를 보였는데, 이는 시료의 차이로 보인다. 특히, linolenic acid methyl ester (C18:3) 및 polyunsaturated methylester (≥4 double bonds) 함량은 각각 2.37 및 0.27%로 biodiesel의 최소 요구도를 규정하는 품질규격인 European standard EN 14214 (최대 12 및 1%)에 매우 적합하였다 [29].

한편, Kinney 등 [30]은 바이오디젤의 물리화학적 특성이 원료 내 지방산의 조성 및 그로부터 유래되는 methyl ether의 조성에 따라 달라진다고 보고하였다. 예를 들어 palmitic acid나 stearic acid와 같은 포화지방산이 많이 함유된 원료물질로부터 생성된 바이오디젤의 경우 저온 유동성이 나빠지며, linoleic acid 또는 linolenic acid와 같은 불포화 지방산으로부터 생성된 바이오디젤은 포화지방산에 비해 산화 안정성이 저하 된다고 보고한 바 있다.

따라서 Table 1에서 검출된 총 지방산을 포화 및 불포화 지방산으로 나누어 그 함량비율을 계산한 결과, acid catalyzed esterification (procedure A) 처리시의 불포화지방산은 포화지방산에 비해 약 3.8 배나 많았고 one step methylation (procedure B)으로 처리시에는 약 4.6배의 많은 함량으로 검출되었다.

이상의 결과에서 *Scenedesmus* sp.로부터 생성된 바이오디젤은 불포화 지방산의 함량이 높아 저온 유동성이 좋으나 산화 안정성이 다소 낮을 것으로 생각되었다.

또한 시료로부터 지방을 추출하여 methyl ether화한 acid catalyzed esterification에 비해 시료의 지방추출과 methyl ether화를 동시에 처리한 one step methylation의 지방산 함량을 비교해 보면, A 방법의 경우는 지방산의 총 함량이 93.21%인 반면, B 방법에서는 90.38%로 미미하나 A 방법으로 처리하였을 때의 지방산 함량이 다소 높았다.

따라서 본 실험의 *Scenedesmus* sp. 균주는 다른 미세조류에 비해 지방함량이 높고, 디젤화에 필요한 추출 가능한 중성지질을 함유하며, 지방산 조성도 매우 긴 사슬 (≥ C₂₀)의 지방산을 함유하지 않고 C18:3의 함량이 낮은 C16 및 C18의 주요 조성을 보여 바이오디젤의 소재원료의 잠재력을 갖는 것으로 판단하였다.

중성지질의 분획 및 정제

지방추출액 중의 지질종류의 비율을 알아보기 위해 silicic acid에 의해 column chromatography하고 chloroform, acetone 및 methanol로 극성도를 증가시켜 용출하여 각각으로부터 중성지질, 당지질 및 인지질을 분획하였다. 각각을 회전진공 농축기로 용매를 제거한 후 얻어진 각 분획의 총 지질 중의 함량을 구하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Contents of lipid fraction from *Scenedesmus* sp. extract. eluted by chloroform, acetone and methanol

Lipid fraction	Contents (%)
Neutral lipid	28.10
Phospholipid	19.26
Glycolipid	52.64
Total lipid	100

조지방의 총 질량에 따른 각 분획의 함량은 당지질이 52.642%로 가장 높았고, 중성지질 및 인지질은 각각 28.10% 및 19.26%이었다.

중성지질은 저장지질인 반면, 당 및 인지질은 세포벽에 포함된 구조지질인데, 통상 동물 및 미생물의 극성지질 비율은 60~85%이다 [31]. 따라서 본 균주의 중성지질 비율 28.1%는 비교적 높은 수준이며, 고지질 함량의 미세조류로 알려진 *I. galbana* (26.5%)나 *P. tricornutum* (23.2%)보다 다소 높은 것을 알 수 있다 [32,33]. 하지만 막 지질의 TAG 전환 등에 의해 중성지질의 함량을 높일 필요가 있다고 생각된다 [14].

그러나 각 분획을 TLC한 결과 (Fig. 4), 그림에서 볼 수 있는 바와 같이, 중성지질 분획에서는 중성지질 이외의 다른 화합물이 혼재하는 것이 관찰되었다. Kates [31]에 의하면 이 chloroform 용출분획에는 hydrocarbon, 색소 (carotenoid, chlorophyll), sterol, 유리지방산 등이 함유된다.

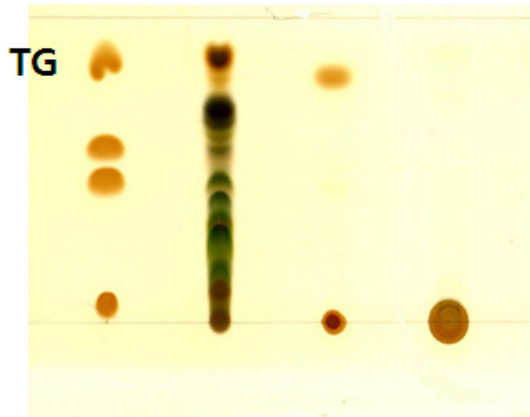


Fig. 4. TLC separation of lipid fraction on HPTLC plate eluted by chloroform, acetone and methanol from *Scenedesmus* sp. extract.

이와 같이 지방추출물의 중성지질 분획이 혼합물로 관찰 되었으므로 각 성분을 분리하기 위해 다시 silicic acid column chromatography하고 hexane-diethyl ether 혼합용매로 용출 하였다. 그 결과 용출곡선 및 각 분획의 TLC 크로마토그램은 Fig. 5와 같다.

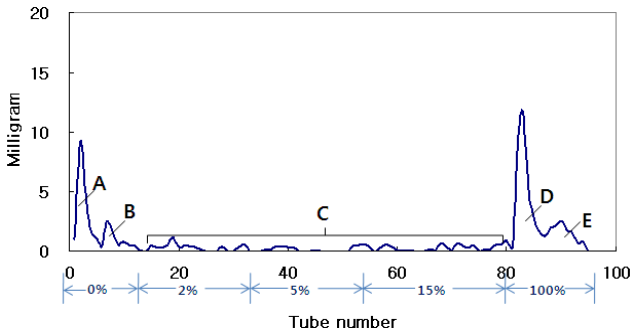
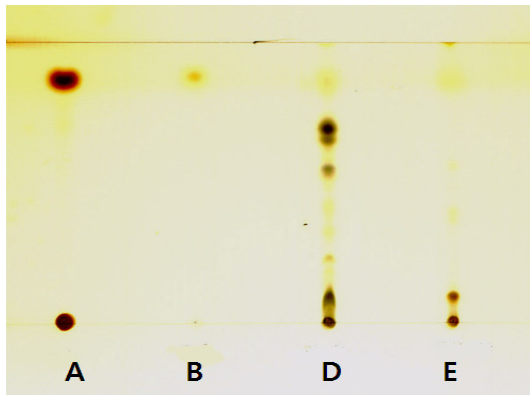


Fig. 5. Chromatographic separation of lipid from *Scenedesmus* sp. and TLC separation of each lipid fraction on HPTLC plate by varying concentrations (v/v) of ether in hexane.

용출분획은 크게 A~E의 5개 분획으로 나눌 수 있었다. 0% ether 용매에서 용출된 peak A, B 분획은 TLC로 확인한 결과, triacylglycerol이 검출되었다. 그러나 2~15%의

ether 용매로 용출된 분획 (C)에서는 많은 peak를 보였으나 지방함량은 매우 낮았다. 반면, 100% ether 용매에서 용출된 peak D 및 E의 분획은 triacylglycerol 성분은 포함되지 않았으나 이외의 성분이 검출되었다.

따라서 지표물질인 triacylglycerol만을 분획정제하기 위해 *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v) 용매를 사용하여 추출된 지방을 silicic acid column chromatography하고 분획하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

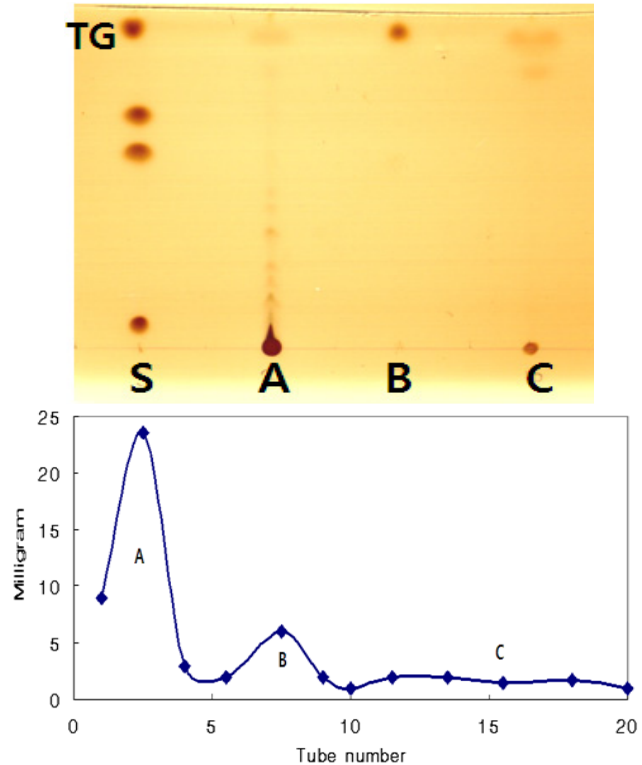


Fig. 6. Chromatographic separation of chlorophyll and triacylglycerol fraction from *Scenedesmus* sp. and TLC separation of each fraction on HPTLC by *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v) solution.

세 가지 분획 (A, B, C)이 얻어졌으며, 추출된 지방으로부터 서로 색깔이 다른 두 가지 성분이 분획되었다. 즉, tube No. 2~3의 fraction A는 짙은 초록색을 보인 반면, No. 7~9의 fraction B는 노란색을 띄었다. TLC한 결과, 역시 Fig. 6에서 보는 바와 같이, 지표물질인 triacylglycerol은 분획 B의 tube No. 7~9에서만 확인되었으며, 그 함량은 12.63%이었다. 반면, 초록색을 진하게 띄는 분획 (A)은 분광광도계로 400~700 nm에서 주사 (scanning)하였을 때 Fig. 7에서와 같이 430 및 680 nm에서 최대 흡수를 나타내었다. 이러한 흡수특성은 Trumit [34]가 보고한 chlorophyll a와 잘 일치하였고, 그 함량은 매우 높아서 약 49.47%이었다. 한편, 노란색을 띄는 triacylglycerol 분획 (B)에서는 β -carotene의 존재도 확인되었는데, Sanchez 등 [28]도 *Scenedesmus almeriensis*로부터 Lutein, β -carotene과 같은 carotenoid

를 확인한 바 있다.

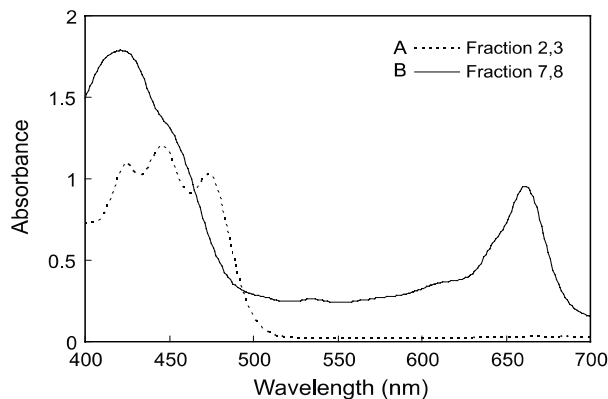


Fig. 7. UV absorption spectra of fractions eluted by *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v) solvent from *Scenedesmus* sp. extract.

Hu 등 [14]은 부가가치 높은 부산물 혹은 co-product (생물고분자, 단백질, 다당, 색소 등)의 생성은 바이오원료로서의 조류가 갖는 잠재적 장점이라고 하였다.

따라서 매우 높은 chlorophyll의 함량 (약 50%)은 이 chlorophyll의 효율적 제거 및 활용방안의 강구에 따라 경제성의 이점을 가져올 수 있다고 생각되었다. 그동안 천연 chlorophyll은 식품첨가제 (색소)나 냄새제거제로 사용되어 왔다 [35-37]. 최근에는 항산화, 항변이원성, 항암과 같은 건강 효과도 주목되고 있어 [38-41], 디젤제조 시 부산물로서의 고부가가치 활용 가능성도 충분한 것으로 기대된다.

결론

본 연구는 미세조류인 *Scenedesmus* sp.에 의한 바이오디젤 및 지질 소재화 연구의 일환으로, 이 균주로부터 용매지방을 추출하였고, silicic acid로 칼럼 크로마토그래피하여 분획, 정제하였다. 또한 추출된 지방의 종류와 함량, 지방산의 조성 및 특성 등을 조사하고 다음의 결과를 얻었다.

Scenedesmus sp.로부터 chloroform-methanol 혼합용매 추출법에 의해 지방을 추출하고 구한 총 지방 함량은 21.38 ± 1.03% (w/w, d.b.)이었다. 이 중 TLC에 의해 biodiesel 생산의 주요 원료물질인 triacylglycerol이 mono- 및 di-acylglyceride의 검출없이 확인되었다. 추출된 지방을 GC로 분석한 결과, 10종의 C₁₆~C₂₂ 포화 및 불포화 지방산을 함유하였고, 그 함량의 순서는 C₁₈:2 > C₁₆:2 > C₁₆:0 > C₁₈:3로 바이오디젤의 품질규격에 적합한 지방산조성분포를 나타내었다. 주로 불포화지방산이 포화지방산에 비해 3.8~4.6배의 많은 함량을 보여 저온유동성은 좋으나 산화 안정성이 다소 낮은 것으로 예상되었다. 한편, 추출된 지방을 silicic acid에 의한 column chromatography로 분획 및 정제한 결과, 총 질량에 따른 당지질의 함량은 52.64%로 가장 높았고, 이어서 중성 지질이 28.10%이었으며, 인지질은 19.26%로 가장 낮았다.

지표물질인 triacylglycerol만을 분리정제 하기위해 *n*-hexane-diethyl ether (95 : 5, v/v) 용매를 사용하여 분획한 결과, 지표물질인 triacylglycerol이 노란색의 분획으로 분획되었다. TLC로 확인되었으며, 그 함량은 12.63%였다. 반면, triacylglycerol보다 앞서 분획된 녹색의 분획은 chlorophyll a인 것으로 확인되어 부가가치 높은 co-product로서 기대되었으며, 그 함량은 49.47%로 매우 높았다.

감사의 글

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

접수 : 2010년 1월 19일, 게재승인 : 2010년 8월 25일

REFERENCES

- Joo, D. S. and E. H. Lee (1998) Searching of antimicrobial active compounds from microalgae. *Korean J. Life Science* 8: 173-180.
- Pulz, O. and W. Gross (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635-648.
- Plaza, M., M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibanez (2009) Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7159-7170.
- Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, M. D. Borghi (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process* 48: 1146-1151.
- Griffiths, M. J. and S. T. L. Harrison (2009) Lipid productivity as a key characteristics for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.
- Becker, E. W. (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Miao, X. and Q. Wu (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97: 41-846.
- Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- Raetz, K. (2009) Challenges and advances in making microalgae biomass a cost efficient source of biodiesel. *Basic Biotech.* 5: 37-43.
- Huang, G. H., F. Chen, D. Wei, X. W. Zhang, and G. Chen (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy* 87: 38-46.

11. Schenk, P. M., S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, and B. Hankamer (2008) Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
12. Campbell, M. N. (2008) Biodiesel: Algae as a renewable source for liquid fuel. *Guelph Eng. J.* 1: 2-7.
13. Sharif Hossain, A. B. M., A. Salleh, A. N. Boyce, P. Chowdhury, and M. Naquiuddin (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Am. J. Biochem. & Biotech.* 4: 250-254.
14. Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, and A. Darzins (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant J.* 54: 621-639.
15. Ann, S. S. and K. C. Yoon (1985) Morphological variation of *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) de brébisson and *Scenedesmus armatus* (Chodat) G. M. Smith in culture. *Korean J. Bot.* 28: 305-315.
16. Lee, O. M., J. H. Ahn, and B. R. Moon (2007) A study of ten taxa of newly reported green algae (division Chlorophyta) in Korea. *Korean J. Limnol.* 40: 50-60.
17. Mandal, S. and N. Mallick (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Microbiol. Biotechnol.* 84: 281-291.
18. Folch, J., M. Lees, and S. G. H. Sloane (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
19. Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964) Preparation of fatty acid methyl ester and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5: 600-608.
20. Sukhija, P. S. and D. L. Palmquist (1988) Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1202-1206.
21. Matsunaga, T., M. Matsumoto, Y. Maeda, H. Sugiyama, R. Sato, and T. Tanaka (2009) Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. *Biotechnol. Lett.* 31: 1367-1372.
22. Roiser, G., G. Kritchevsky, G. Smon, and G. J. Nelson (1967) Quantitative analysis of bran and spinach leaf lipids employing silicic acid column chromatography and acetone for elution of glycolipids. *Lipids* 2: 37-40.
23. Christie, W. W. (1982) *Lipid Analysis*. 2nd ed., pp. 96-98. Pergamon Press, Oxford, UK.
24. Hannahan, D. J. (1997) *A Guide to Phospholipid Chemistry*. pp. 53-54. Oxford University Press, Cambridge, UK.
25. Ben-Amotz, A., T. G. Tornabene, and W. H. Thomas (2004) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
26. Greenspan, P., E. P. Mayer, and D. F. Stanley (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. cell Biol.* 100: 965-973.
27. Harrington, K. J. (1986) Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance. *Biomass* 9: 1-17.
28. Sanchez, J. F., J. M. Fernandez, F. G. Acien, A. Rueda, J. Perez-Parra, E. Molina (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochem.* 43: 398-405.
29. European Standard EN 14214 (2004) Automotive fuels-fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines (Biodiesels)-requirements and test methods.
30. Kinney, A. J. and T. E. Clemente (2005) Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Process. Technol.* 86: 1137-1147.
31. Kates, M. (1988) Separation of lipid mixture. pp. 186-278. In: *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. 2nd ed., Burdon, R. H. and P. H. Van Knippenberg (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
32. Molina Grima, E., A. Robles Medina, A. Gimenez Gimenez, J. A. Sanchez Perez, F. Garcia Camacho, and J. L. Garcia Sanchez (1994) Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 955-959.
33. Cartens, M., E. Molina, A. Robles, A. Gimenez, and M. J. Ibanez (1996) Eicosapentaenoic acid (20:4n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1025-1031.
34. Trurnit, H. J. and G. Colmano (1959) Chloroplast studies. I. Absorption spectra of chlorophyll monolayers at liquid interfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* 31: 434-471.
35. Mortensen, A. (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* 78: 1477-1491.
36. Brocklehurst, J. C. (1953) An assessment of chlorophyll as a deodorant. *Br. Med. J.* 1: 541-543.
37. Mabe, G. P. I. and S. A. de C. V. (2005) Use of chlorophyll for controlling unpleasant odors in disposable absorbent articles. EP 1 543 847 A1.
38. Dashwood, R., T. Negishi, H. Hayatsu, V. Breinholt, J. Hendricks, and G. Bailey (1998) Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutat. Res.* 399: 245-253.
39. Ferruzzi, M. G., V. Bohm, P. D. Courtney, and S. J. Schwartz (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* 67: 2589-2595.
40. Lanfer-Marquez, U. M., R. M. C. Barros, and P. Sinnecker (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International* 38: 885-891.