

미세조류 *Botryococcus braunii*의 배양조건 최적화 및 지질축적 향상

권성현 · 이은미¹⁾ · 조대철^{1)*}

경상대학교 해양과학대학 해양환경공학과, ¹⁾순천향대학교 에너지환경공학과
(2012년 1월 2일 접수; 2012년 4월 23일 수정; 2012년 7월 9일 채택)

Optimal Culturing and Enhancement of Lipid Accumulation in a Microalga *Botryococcus braunii*

Sung-Hyun Kwon, Eun-Mi Lee¹⁾, Daechul Cho^{1)*}

Department of Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

¹⁾Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

(Manuscript received 2 January, 2012; revised 23 April, 2012; accepted 9 July, 2012)

Abstract

Several tests and experimental work have been done for identifying the best growth conditions and accumulated amount of lipid moiety in *B. braunii*, a microalga(UTEX 572) in terms of media composition. The specific growth rate was found to be the highest at 0.15 g/L-day when the phosphorus concentration was doubled with the other ingredients at the normal level. Experiments for varied media compositions revealed that the accumulation of lipid was the highest at 48% (dry cell weight based) in the nitrogen deficient medium and its corresponding specific growth rate was comparative to that in the normal BG 11 medium. In the bubble column experiments, carbon dioxide containing air produced four times more cell mass than air only. Light and glucose addition also enhanced cell mass with maximum, 1.8 g/L and accordingly 42% of lipid composition, which turned out to be a better strategy for higher lipid-producing microalgal culture.

Key Words : *Botryococcus braunii*, Lipid content, Optimal culturing

1. 서론

인간과 환경의 지속적, 균형적 발전의 핵심요소로서 신에너지에 대한 탐구가 범세계적으로 진행중이다. 특별히 에너지 안전성, 기후 변화, 화석에너지의 경제적 안정성 등 최근의 추세와 관련하여 신에너지 및 연료에 대한 정책적 선택과 그를 뒷받침할 기술적

대안이 매우 중요해지고 있다. 이와 같이 증대되는 미래 에너지 수요에 대한 적절한 기술적 방식이 바이오 근원의 에너지연료인 데 여기에는 곡류 등 농작물 및 식물을 이용하는 방법과 해양생물을 이용할 수 있다. 이 중 농작물이나 식물의 인위적 경작은 필요한 연료 수요를 충족하려면 광대한 면적이 필요하고 더구나 식량과의 경쟁관계 때문에 활성화에 문제를 내포하고 있다(Chisti, 2007). 이에 대량수급이 가능한 생물 자원으로 미세조류를 이용한 연료생산이 주목받고 있다. 조류배양의 장점은 작물생산에 적합하지 않은 염분농도가 높거나 강한 알칼리 등의 극한 환경에서도 성

*Corresponding author : Daechul Cho, Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea
Phone: +82-041-530-1341
E-mail: daechul@sch.ac.kr

장 가능하다는 점이다(Yongmanitchai와 ward, 1991). 또한 이산화탄소를 광합성을 통해 고정화시키기 때문에(오 등, 1998) 온난화의 내재원인인 이산화탄소를 저감하는 이중효과를 얻을 수 있다. 태양빛을 사용한 조류의 지질 또는 오일 생산은 식물의 그것보다 생산성이 월등히 높다. 무엇보다 미세조류는 생장이 빨라 대량생산이 용이하며 성분중 목표산물인 지질의 함량이 매우 높은 것이 장점이다. 현재 지질을 고농도로 함유한 미세조류(Chisti, 2007; Table 1)를 대량생산하기 위한 기술적 진보가 꾸준히 이루어지고 있다.

Table 1. Oil content of some important microalgae which have been investigated

Microalga	Oil content (wt%,dry based)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella prmolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	20 or more
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

균체성 녹조류인 *Botryococcus braunii*는 건조중량의 15-75%가 바이오디젤로 전환될 수 있는 탄화수소로 구성되어 있다(Barclay 등, 1988; Kosaric과 Velikonja, 1995; Lee 등, 1998). 이 미세조류는 타 조류에 비해 지질함량이 높을 뿐 아니라 생성되는 지질 및 탄화수소의 질적 측면에서도 바이오디젤을 제조하는데 매우 경쟁력이 강한 종이며(Metzger와 Largeau, 2005) 또한 *B. braunii*에 의하여 생산된 바이오디젤의 연소 시 방출되는 배출 가스는 기존의 디젤유와 비교하여 CO는 20%이하, NO_x는 55%, 총 매연은 5% 수준이고 SO₂방출은 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 생분해성이며 독성이 거의 없으므로 환경 친화적이라고도 할

수 있다(Grima 등, 1994; Wolf 등, 1985). 한편, 미세조류의 대량생산은 raceway pond와 photobioreactor (tube형)를 중심으로 일부 산업화되고 있는데 대체에너지의 대두와 더불어 갈수록 경쟁력 및 경제적 타당성을 얻어가고 있는 추세이다(Lorenz와 Cysewski, 2003; Spolaore 등, 2006). 조류에 의한 바이오디젤 생산은 단위면적당 생산성, 기름 추출 비용절감 등 에너지 니어링 비용의 최소화를 통해 최적화될 수 있다. 다만 유럽연합 등(Standard EN 14214와 EN 14213)에서 제시한 지질의 불포화 지방산 및 그 유도체의 함량 기준에 못미치는 질적 차이가 존재하나(Kenyon 등, 1972; Belarbi 등, 2000) 촉매 전환과 같은 현재의 상용기술로 충분히 극복 가능하다고 보고되고 있다(Dijkstra, 2006).

미세조류의 최적 성장조건과 최적 지방산 생산조건은 영양원의 제한, 질소/인 비의 변화, 질소원의 종류, 환경조건(pH, 온도, 빛의 세기), 성장 시기 등에 영향을 받는다. 특히 배지 조성은 세포의 성장 및 지질 합성에 큰 영향을 미친다(Bajpai와 Bajpai, 1993; Endo 등, 1977; Lee 등, 1998; Xu 등, 2006). 본 연구는 텍사스주립대에서 분양받은 *B. braunii*를 사용하여 균체의 고밀도 생산과 더불어 성분중 지질함량을 제고하기 위한 최적 배지 및 광주기 등 환경요인을 고찰하기 위해 수행되었다. 플라스크 배양 및 버블칼럼을 이용한 lab-scale의 실험이 병행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미세조류

미세조류 중에서 탄화수소함량이 높은 것으로 알려진 *Botryococcus braunii* UTEX 572는 The University of Texas at Austin에서 분양 받았으며, 미세조류의 보존 및 배양을 위하여 BG 11배지를 사용하였다.

2.2. 배지조정

배지의 영양물질 구성에 따른 미세조류의 성장률과 지질함량의 변화를 알아보기 위해 배지를 조정해서 실험을 하였다. 1 L 플라스크에 200 mL의 배양액을 넣어 실험하였고 광은 2000 lux로 조절하였다. 표준 BG(for Blue Green Algae) 11배지와 미량 금속성분을 제외한 실험실 기초배지, 질소와 인의 변화 또는 결핍,

염도의 조건으로 배지를 구성하였다. 미세조류의 생장에 필수적인 염류인 질소와 인의 영향을 분석하기 위하여 질소:인의 비율을 4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1 로 조절하였다. 질소는 NaNO_3 로, 인은 K_2HPO_4 로 조절하였다. 또한 염도에 따른 배양은 0.15M NaCl로 배지를 구성하였다. 지질 측정은 배양 25일째에 시행하였다.

2.3. 버블칼럼

이산화탄소의 농도에 따른 지질함량 변화를 알아보기 위해 0.1%(v/v)와 0.5%(v/v)의 혼합공기로 유량 1000 mL/min으로 조절하여 주입하였다. 버블칼럼의 총부피는 500 mL이고 60%만큼 배양액을 넣어 실험하였다. 광은 12000 lux로 조절하였다. 7일에 1회 pH를 7.0-7.5로 조절하였고 부족해진 부피를 보충해 주었다. 지질함량은 18일째와 25일째에 측정하였다.

2.4. 탄소원 첨가

*B. braunii*의 탄소원에 대한 성능을 비교하기 위해 BG 11배지에 포도당 10 g/L를 첨가하였다. 250 mL-플라스크에 100 mL의 배양액을 넣어 실험하였다. 빛에 의한 포도당(탄소원) 효과를 알아보기 위해 2000 lux의 광으로 조절하여 실험하였고, 다른 한 플라스크에서는 알루미늄 호일로 플라스크를 감싸 빛을 차단한 가운데 탄소원 효과를 관찰하였다. 그리고 25일째 지질을 측정하였다.

2.5. 배지에서의 성장

*B. braunii*의 배양에서 건조중량과 흡광도($y = 0.5511x + 0.0127$, $r^2 = 0.9986$)는 매우 높은 상관관을 보였다. 따라서 *B. braunii*의 배양시 680nm에서 흡광도 값을 측정하여 간편하고 신속하게 건조중량을 추정할 수 있었다. 미세조류의 비증식속도(specific growth rate, μ)는 배양시간 t_0 (day)와 t_1 (day)에서의 건량인 N_0 (mg/L)와 N_1 (mg/L)을 조류의 세포밀도로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\mu = \ln(N_1/N_0)/(t_1 - t_0) \quad (1)$$

2.6. 지질측정

미세조류의 세포내 지질함량은 수확된 *B. braunii*를 초음파분쇄기(Sonics VCX 500)로 분쇄하고 분액여두를 이용하여 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합

용매로 추출하였다. 조류 추출액에 증류수를 첨가하여 chloroform:methanol:water의 비율이 1:1:0.9가 되게 조절하여 분리된 chloroform층을 건조시켜 지질함량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 배지 조정

3.1.1. N/P의 변화에 따른 성장

N/P의 비율에서 인을 변화시켰을 때는 그림과 같이 BG 11의 N/P비인 36:1일 때 속도인 0.06 g/L · day보다 인을 두 배 증가시켰을 때의 18:1에서의 성장속도는 0.15 g/L · day로 증가했다. 하지만 네 배 증가시켰을 때는 오히려 성장속도가 작은 것으로 나타났다. 인의 양이 부족할 경우 성장속도도 감소하는 것을 볼 수 있는데 *B. braunii*의 생장은 인의 농도가 적당히 높을 때 잘 자라는 것으로 판단된다.

N/P의 비율에서 질소를 변화시켰을 때는 그림 2와 같이 BG 11의 N/P비인 36:1보다 질소를 두 배 감소시켰을 때의 18:1에서의 성장속도는 0.13 g/L · day로 증가했다. 인과는 달리 질소의 양은 오히려 그 양이 많을 경우 성장속도도 감소하는 것을 볼 수 있는데 *B. braunii*의 성장에 너무 많은 질소는 부영양으로 인해 독성으로 작용한 것으로 판단된다.

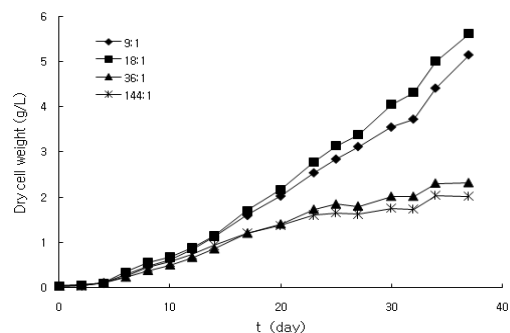


Fig. 1. Growth of *B. braunii* for varying phosphorus concentrations.

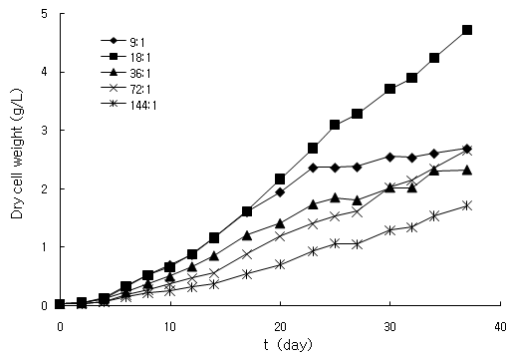


Fig. 2. Growth of *B. braunii* for various nitrogen concentrations.

3.1.2. 배지 조성에 따른 성장과 지질 함량

배지 성분에 따른 성장률은 실험실 기초배지에서 질소를 결핍시킨 배지와 BG 11배지의 성장속도가 비슷하고, 미량금속성분을 넣지 않은 실험실 기초배지에서도 잘 자라는 것을 볼 수 있다. 이에 비해 인이 결핍된 배지와 0.15M의 염도가 있는 배지에서는 생장이 억제되었다. 이 결과는 인이 *B. braunii*의 성장조건에 필요한 성분이라는 것을 알 수 있다.

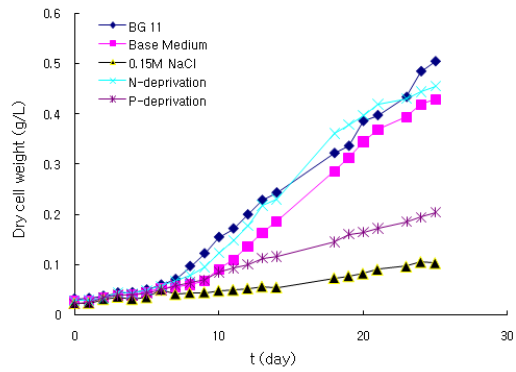


Fig. 3. Growth of *B. braunii* for varying media.

지질 추출하였을 때는 질소성분이 결핍되었을 때가 건조 중량의 48%로 가장 많은 지질을 함유하였다.

Table 2. Total lipid content produced under various media

Medium	BG 11	Base medium	Nitrogen deprivation	Phosphorus deprivation	0.15M salinity
Lipid content (% biomass)	31	27	48	45	27

인성분이 결핍된 배양액은 성장률이 낮았음에도 불구하고 지질은 건조 중량의 45%로 높은 지질함량이 나타났다. 이 결과는 배지내의 영양물질인 인이나 질소가 결핍되면 광합성을 할 때 아미노산으로의 합성보다 지방산으로 합성이 더욱 일어나는 것을 예측할 수 있다. 이것은 일반적으로 질소가 부족할 때 지질 축적을 한다는 사실의 근거가 된다(Livne와 Sukenik, 1992; Molina 등, 1991).

3.2. 버블칼럼 실험

3.2.1. 버블칼럼에서 이산화탄소 농도에 따른 *B. braunii*의 성장

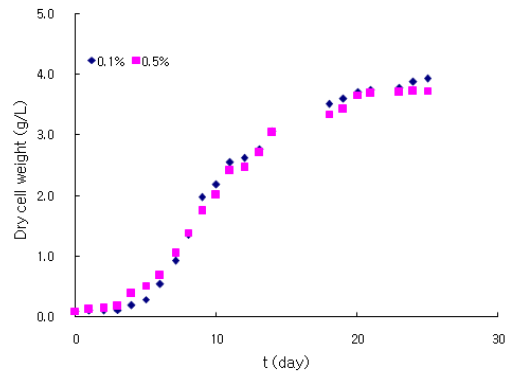


Fig. 4. Growth of *B. braunii* at 0.1% CO₂+air and 0.5% CO₂+air in a bubble column.

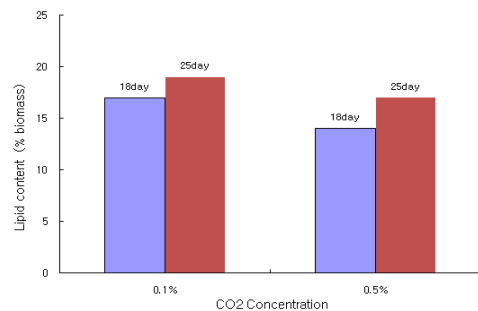


Fig. 5. Lipid content accumulated in cell mass with two different CO₂ concentrations in 18 and 25 days.

버블칼럼에서는 CO₂ 혼합공기 0.1%와 0.5%의 성장속도가 비슷했다. 일반 플라스크 실험에서보다 성장속도가 약 4배정도 빠른 것으로 나타났다. 버블칼럼은 CO₂혼합공기의 주입에 의한 활발한 혼합과 CO₂(혹은 용존 CO₂) 공급량 증가로 광합성효율이 증가하는 것으로 판단된다.

3.2.2. 버블칼럼에서 이산화탄소 농도에 따른 *B. braunii*의 지질 함량

버블칼럼에서 얻은 *B. braunii*의 지질을 측정된 결과 빠른 성장속도와 많은 건조 중량에 비해 지질 함량은 낮았다. 시간에 따른 지질 함량을 보았을 때 두 경우 모두 18일째의 조류보다 25일째의 조류의 지질 함량이 높은 것을 볼 수 있다. 이것은 지수성장을 할 때보다 생장률이 감소할 때 지질 함량이 높은 것으로 판단된다.

3.2.3. N결핍배지와 광주기 실험(0.1% CO₂ 혼합공기)

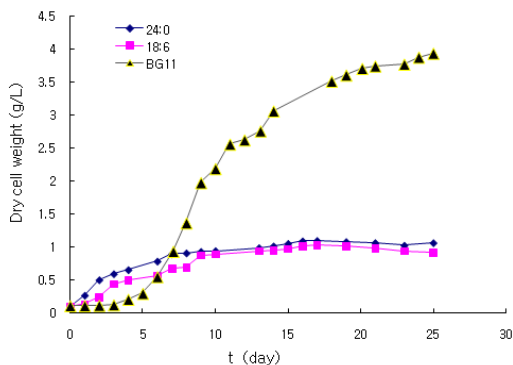


Fig. 6. Growth of *B. braunii* at two different light shedding methods (24h light only; 18h light and 6h in darkness; natural light as control).

버블칼럼 실험에서는 지질축적에 우수했던 BG 11 배지에서 질소를 제외한 배지로 실험하였다. 그리고 0.1% 이산화탄소 혼합공기를 주입하였다. 초기에 빠른 성장속도를 보였지만 일찍 정체기에 들어서는 것을 볼 수 있다. 이것은 조류의 필수영양소인 질소의 결핍으로 생장이 억제되는 것으로 볼 수 있다. 녹색을 띄고 있는 조류의 엽록소가 소실되고 카로티노이드가 증가로 노랗게 변했다고 생각된다. 카로티노이드는 질소를 함유하지 않은 색소이며 벤젠, 이황화탄소, 에

테르 등의 지용성 용매에 녹는 것으로 보아 카로티노이드의 증가는 지질함량에 영향을 주는 것으로 보인다. 광주기에 따른 지질함량은 24시간 빛을 줄때 성장속도가 빠르고 지질함량이 높은 것으로 나타났다. 이는 지질합성은 빛이 있을 때 이루어지기 때문으로 판단된다.

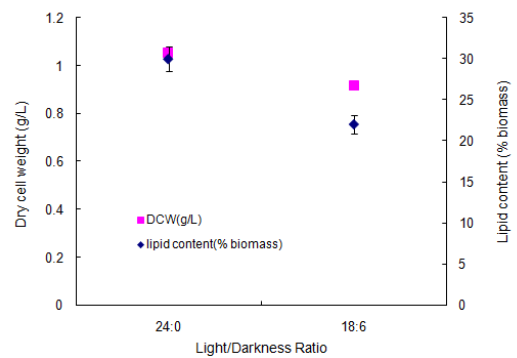


Fig. 7. Comparison of growth and lipid content with varied lighting times.

3.3. 탄소원 첨가에 따른 *B. braunii*의 지질 함량

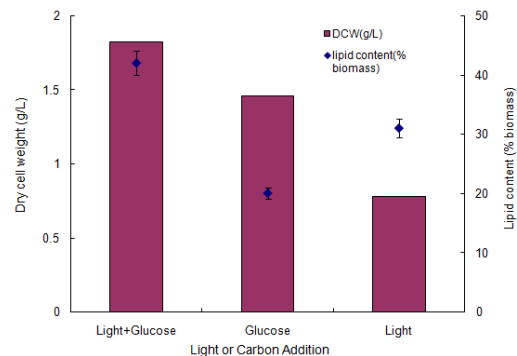


Fig. 8. Effect of light and glucose(carbon source) addition on growth and lipid content of *B. braunii*.

빛과 포도당을 함께 사용한 경우, *B. braunii*의 건조 중량과 지질 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 그에 비해 어두운 곳에서 포도당만을 사용한 조류는 광합성만 했을 때보다 생장률을 높였지만 지질 함량은 그다지 높지 않은 것으로 나타났다. Fig. 8로 보아 포도당은 빛과 함께 광합성을 할 때 생장률을 높여주고 단백질보다는 지질로의 합성이 이루어지는 것으로 판

단된다. 광합성을 하지 않을 때 포도당첨가는 *B. braunii*의 성장에는 기여하지만 더 많은 지질의 합성은 기대하기 어렵다는 것을 알 수 있다. 이와 달리 *Chlorella* sp.의 유기물질에 의한 생장은 바이오매스의 높은 생산과 세포 안에 높은 지질을 축적한다(Endo 등, 1977). 종속영양으로 자란 *C. protothecoides*의 세포로부터 지질의 추출(55.2%)은 독립영양으로 자란 세포보다 약 3.4배 높다는 보고가 있다(Wyman과 Goodman, 1993).

3.4. 배지실험

BG 11배지와 BG 11배지내 구연산 및 ammonium ferric citrate green을 제외한 배지에서의 성장과 지질 함량을 알아보았다. 그 결과 성장속도는 비슷했지만 유기물 함량이 좀 더 높은 BG 11배지에서의 지질함량(28%)이 유기물이 제외된 배지의 지질함량 24%보다 높았다.

3.5. 시간에 따른 지질축적

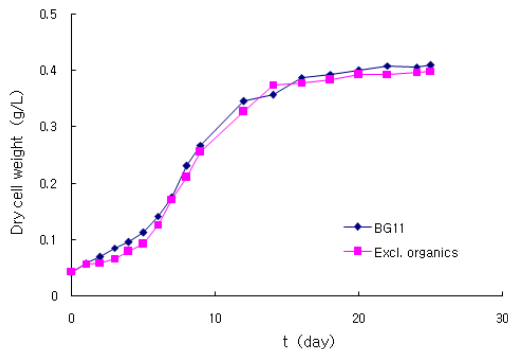


Fig. 9. Growth of *B. braunii* in BG medium and in organics-deficient BG medium.

BG 11배지에서 시간에 따른 성장 및 지질 축적량을 알아보았다. 새로운 배지에서 영양분을 섭취한 *B. braunii*는 23%의 초기 지질이 추출되었고, 시간에 따라 서서히 지질함량이 증가(28%)하는 결과를 얻었다. 15일 이후 지질함량은 탄소원 등 주 영양성분의 결핍으로 추가적 지질 생전환이 어려워졌기 때문에 사료된다.

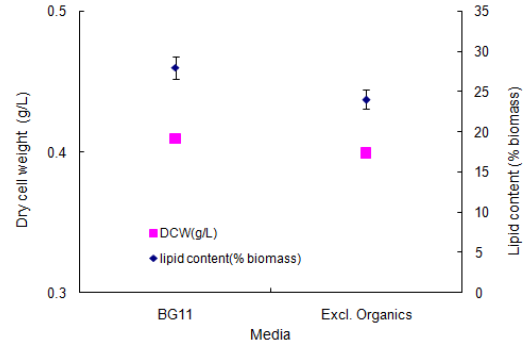


Fig. 10. Comparison of growth and lipid content of *B. braunii* in BG medium and in organics-deficient BG medium.

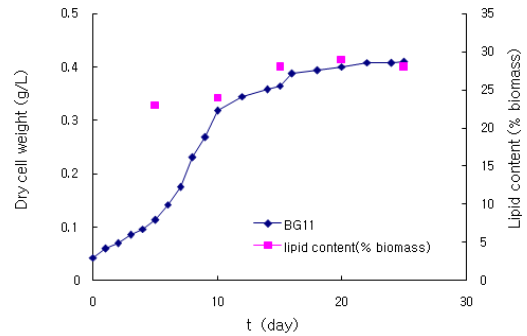


Fig. 11. Algal growth related lipid accumulation with time in a bubble column.

4. 결론

탄화수소의 함량이 높은 것으로 알려진 *B. braunii*로 여러 가지 배지의 구성에 대해 보다 효과적인 생장률과 지질 함량을 위해 실험을 수행하였다. 그 결과 배지에서 질소의 양을 고정하고 인의 양을 두 배로 증가시켰을 때 성장속도는 $0.15 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 로 가장 빨랐고, 인의 양을 고정하고 질소의 양을 두 배로 감소시켰을 때 성장속도는 $0.13 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 로 가장 빠르게 나타났다. 배지 구성에 따른 실험에서는 질소가 결핍되었을 때 성장속도가 기존 BG 11배지와 비슷했고 지질도 건조 중량의 48%로 가장 높은 지질이 측정되었다.

버블칼럼에서는 25일 배양한 결과 CO_2 혼합공기의 주입으로 인한 활발한 혼합과 공기에 존재하는 CO_2

보다 더 많은 양을 공급해 줌으로써 4배 빠르게 성장했다. 0.1% CO₂ 혼합공기에서 25일째 성장한 조류에서 건조 중량의 19%의 지질이 측정되었다. 또한 탄소 원 첨가 배지의 영향을 알아본 결과 빛과 포도당을 함께 사용한 *B. braunii*의 건조 중량은 약 1.8 g/L로 가장 높았고, 지질 함량 역시 약 42%로 가장 높았다. 성장과 지질 함량을 함께 고려해 보았을 때 CO₂ 혼합공기를 주입해 준 버블칼럼의 총지질 생산량이 약 1.1 g/L로 가장 높았다. 따라서 지질 함량과 생장이 비교적 뛰어난 빛과 포도당을 사용하는 *B. braunii*를 버블칼럼을 이용하여 배양하면 더 많은 지질이 축적될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 오희목, 김정석, 이석준, 1998, 미세조류에 의한 지구온난화기체의 고정화, Korean J. Environ. Biol., 16(4), 291-297.
- Bajpai, P., Bajpai, P. K., 1993, Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review, Journal of biotechnology, 30(2), 161-183.
- Belarbi, E. -H., Molina, G. E., Chisti, Y., 2006, A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil, Enzyme Microbiol. Technol., 26, 516-529.
- Chisti, Y., 2007, Diesel from microalgae, Biotechnology Advances, 25, 294-306.
- Dijkstra, A. J., 2006, Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 108(3), 249-264.
- Endo, H., Hosoya, H., Koibuchi, T., 1977, Growth yields of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous cultures using acetate. J. Ferment. Technol., 55, 369-370.
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Perez, J. A. S., 1994, Biochemical productivity and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* Parke and *Tetraselmis sp.* as a function of incident light intensity, Process Biochemistry, 29(2), 119-126.
- Kenyon, C. N., Rippka, R., Stanier, R. Y., 1972, Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae, Archiv für Mikrobiologie, 83(3), 216-236.
- Kosaric, N., Velikonja, J., 1995, Liquid and gaseous fuels from biotechnology: Challenge and opportunities, FEMS Microbiol. Rev., 16, 111-142.
- Lee, S. J., Kim, S. B., Kim, J. E., Kwon, G. S., Yoon, B. D., Oh, H. M., 1998, Effects of harvesting time and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*, Lett. Appl. Microbiol., 27, 14-18.
- Lee, S. J., Yoon, B. D., Oh, H. M., 1998, Rapid method for the determination of lipids from the green alga *Botryococcus braunii*, Biotechnol. Tech., 12, 553-556.
- Livne, A., Sukenik, A., 1992, Lipid Synthesis and abundance of Acetyl CoA carboxylase in *Isochrysis galbana*(Prymnesiophyceae) following nitrogen starvation, Plant and Cell Physiology, 33(8), 1175-1181.
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R., 2003, Commercial potential for Haematococcus microalga as a natural source of astaxanthin, Trends Biotechnol., 18, 160-167.
- Metzger, P., Largeau, C., 2005, *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids, Appl. Microbiol. Biotechnol., 66, 486-496.
- Molina, E., Martinez, E., Sanchez, S., 1991, The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis sp.*, Process Biochemistry, 26(3), 183-187.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006, Commercial applications of microalgae, J. Biosci. Bioeng., 101, 87-96.
- Wolf, F. R., Nonomura, A. M., Bassham, J. A., 1985, Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*(Chlorophyta). J. Phycol., 21, 388-396.
- Wyman, C. E., Goodman, B. J., 1993, Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass, Appl. Biochem. Biotech., 39/40, 41-59.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of biotechnology, 126(4), 449-507.
- Yongmanitchai, W., Ward, O. P., 1991, Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid, Phytochemistry, 30(9), 2963-2967.