

질소원 고갈조건에 대한 *Nannochloropsis oculata* K-1281의 세포 성장과 지방산 생산 연구

Effect of Nitrogen Deficiency on Cell Growth and Fatty Acids Production of *Nannochloropsis oculata* K-1281

홍성주, 임나래, 한미애, 유단비, 이철균*

Seong-Joo Hong, Narae Yim, Mi-Ae Han, Danbee Yoo, Choul-Gyun Lee*

인하대학교 해양바이오에너지센터 & 생명공학과, 인천광역시 남구 인하로 100, 22212, 대한민국

National Marine Bioenergy Center & Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

(Received 18 October 2016, Revised 6 January 2017, Accepted 9 January 2017)

Abstract Most of microalgae shift their metabolic pathways toward the fatty acid biosynthesis following nitrogen deprivation. Recent studies on *Nannochloropsis* species, oleaginous microalgae, have been performed to investigate the regulation of contents and compositions of fatty acids under stressful condition. The objective of this experiment is to identify the effect of nitrogen on cell growth and fatty acids production in *Nannochloropsis oculata* K-1281 and compare fatty acid composition response to nitrogen deficiency between *N. oculata* LB2164 and K-1281. The fatty acids content in *N. oculata* K-1281 was increased up to 210%, while the growth rate was decreased under nitrogen deficient condition. The contents of C16:0 and C16:1 increased dramatically in both *N. oculata* K-1281 and LB2164, while the contents of C20:4 and C20:5 increased in *N. oculata* LB2164. The fatty acids content and composition in *N. oculata* K-1281 returned following addition of nitrogen after nitrogen starvation. These results demonstrated that fatty acid contents and compositions under nitrogen deficiency will provide the understanding of fatty acid synthesis in microalgae.

Keywords : microalgae, *Nannochloropsis oculata*, nitrogen deficiency, fatty acids

서 론

미세조류는 태양에너지를 이용하여 에너지를 확보하고, 확보된 에너지로 무기탄소원인 이산화탄소를 화합물로 변환시키는 광합성 작용을 한다. 이때 합성되는 세포 내 대사체는 카로티노이드, 피코빌리 단백질 등과 같은 고부가가치 물질을 생산하여 산업

적 유용성이 높으며 [1], 다양한 환경조건에 적응이 가능한 대사기작을 가지고 있어 유기적으로 합성이 불가능한 화합물을 합성가능하여 세포공장이라고 불린다 [2]. 최근 고유가와 지구온난화 등의 문제가 대두되면서 이산화탄소를 지질로 변환 가능한 미세조류가 친환경적인 대안으로 주목받고 있다. 미세조류 중 *Botryococcus braunii*의 경우 세포량의 70% 이상

* 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/by-nc/4.0/>)

지질을 축적하고 있는 것으로 알려져 있으며, *Chlorella* sp.와 *Phaeodactylum tricorutum* 등도 20% 이상 지질함유량을 나타낸다 [3]. 또한, 미세조류는 해양을 이용하여 배양할 경우 농작물과 경쟁하지 않는 이점을 가지고 있다 [4].

미세조류 기반 바이오연료 생산 최적화를 위해 미세조류의 지질함유량을 높이기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 배지 중 질소원의 고갈은 *Nannochloropsis* sp., *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, *Scenedesmus* sp. 등과 같은 미세조류의 지질함유량을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [5-7]. *Chlamydomonas reinhardtii*와 *Phaeodactylum tricorutum*은 탄수화물로 가는 대사경로를 차단한 돌연변이를 이용하여 질소원 고갈조건에서 지질 생산량을 높인 연구가 보고되고 있다 [8; 9]. 그러나 질소원이 고갈되는 조건에서 미세조류의 수용성단백질과 광합성 색소가 감소되고 광합성 효율이 감소하면서 성장속도 또한 질소원 충분조건보다 느려지게 된다 [10]. 이러한 문제는 질소원 고갈조건에서 지질 생산성을 저하시키는 문제점을 야기한다. 따라서 질소원 고갈에 대한 세포 성장과 지질, 지방산 합성과의 관계를 확인하는 것이 중요하다.

지방산의 포화도는 산화안정성과 필터막힘점(CFP; Cold Filter Plugging Point)와 같은 바이오연료의 특성에 영향을 미친다. 산화안정성은 지방산의 불포화도와 관련되며, 바이오연료의 생산, 사용, 저장과정에 영향을 준다. 필터막힘점은 낮은 온도에서 바이오디젤의 흐름을 예측하도록 하는 특성으로 낮은 필터막힘점을 가진 바이오디젤은 추운 겨울에 결정화가 되어 연료시스템에 문제를 일으킨다. 필터막힘점은 지방산의 포화도가 높을수록 부정적으로 작용하게 되지만, 반대로 산화안정성은 좋아진다. 따라서, 기후 조건에 따른 지방산의 포화도 조절을 통해 필터막힘점과 산화안정도를 유지하는 것이 필요하다. 미세조류의 경우 종에 따라 혹은 배양조건에 따라 지방산의 포화도가 변화하게 되어 산화안정성과 필터막힘점에 차이를 나타낸다 [11].

*Nannochloropsis oculata*는 진안점조강(eustigmatophyceae)으로 분류되는 단세포인 해양미세조류이다. 높은 지질함유량을 나타내 바이오연료 생산을 위한 균주로 주목받고 있다. 본 연구는 저온균주(15°C)인 *Nannochloropsis*

oculata K-1281를 이용하여 질소원 고갈에 대한 세포 성장과 지방산 합성에 대하여 알아보고, 상온균주(20°C)인 *N. oculata* LB2164와 비교를 통해 저온적응에 대한 지방산 조성 변화에 대해 알아보고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 *Nannochloropsis oculata*로 SCCAP (The Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa)에서 15°C로 유지된 *N. oculata* K-1281과 UTEX (The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)에서 20°C로 유지된 *N. oculata* LB2164를 분양받아 사용하였다. 이 균주의 성장 배양에 사용된 배지는 *N. oculata* LB2164는 인공해수(NaCl: 24.7 g/L, KCl: 0.66 g/L, MgCl₂ · 6H₂O: 8.48 g/L, CaCl₂ · 2H₂O: 1.9 g/L, MgSO₄ · 7H₂O: 6.318 g/L, NaHCO₃: 0.18 g/L), *N. oculata* K-1281은 인천연안의 자연해수를 기본으로 질산염과 인산염이 3배 들어간 f2 배지(NaNO₃: 0.075 g/L, NaH₂PO₄ · H₂O: 0.005 g/L, FeCl₃ · 6H₂O: 3.15 mg/L, Na₂EDTA · 2H₂O: 4.36 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O: 0.0098 mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O: 0.0063 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O: 0.022 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O: 0.01 mg/L, MnCl₂ · 4H₂O: 0.18 mg/L)를 추가하여 배양하였다.

성장 배양조건

*N. oculata*의 성장을 위해 광도는 50 ± 5 μE/m²/s, 광원은 인공 광원으로 형광등을 사용하였다. 배양기는 BC-PBR (Bubble column-photobioreactor)로 배양액 400 mL에서 99%의 air와 1%의 이산화탄소가 0.1 vvm으로 공급되었다. 초기세포농도는 1×10⁶ cells/mL로 접종하였다. *N. oculata* K-1281은 15°C에서, *N. oculata* LB2164는 20°C에서 배양하였다.

질소원 고갈 배양조건

세포량을 충분히 확보하기 위해 정상기로 도달했을 때 질소원 고갈 배지로 교체하였다. 정상기 전까지는 질산염과 인산염이 3배 들어간 f2 배지에서 키우다가 정상기 이후부터는 질산염을 제외한 인산염이 3배 들어간 f2 배지로 교체하여 배양하는 방식을 취했다. 대조구는 질산염과 인산염이 3배 들어간

f/2 배지에서 배양된 세포이고, 실험구는 질산염 없이 인산염만 존재하는 배지에서 배양된 세포이다.

세포량 및 지방산 분석조건

세포의 성장은 세포 농도와 평균 세포 크기를 Coulter counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, USA) 를 이용하여 측정하였다. 측정된 세포 농도와 평균 세포 크기를 이용하여 생체중량(fresh cell weight, FCW) 를 계산하였고 건조중량(dry cell weight, DCW)과의 비율 0.3을 이용하여 세포 내 지방산 함량(% DCW) 을 계산하였다.

지방산 분석은 동결건조 시킨 세포를 에스테르 교환 반응(transesterification)을 이용하였다. 지방산을 1시간동안 80°C에서 5% (v/v) 염화아세틸을 포함한 메탄올에서 추출하였다. 지방산의 분석은 FID (Flame Ionization Detector)가 장착된 가스 크로마토그래피 (model Acme 6000, 영린기기)를 이용하였다. 컬럼은 두께 0.2 m, 내부직경 0.25 m, 길이가 30 m인 capillary column (HP-INNOWAS)을 사용하였고, 운반기체는 헬륨을 사용하였다. 오븐의 분석조건은 운반속도, 3 mL/min; 초기온도, 140°C; 초기정체시간, 2 min; 승온속도, 4°C/min; 최종온도, 240°C으로 약 32분간 분석을 진행하였다 [4].

모든 실험은 duplicate로 진행되었으며, 각각의 샘플은 세 번 반복측정 후 얻어진 값들의 평균값으로 나타났다. 질소원 고갈 후 충분조건에 대한 실험에 대한 *N. oculata* K-1281의 지방산 함량은 평균±표준편차로 나타났다.

결과 및 고찰

질소원 고갈에 대한 *Nannochloropsis oculata* K-1281의 세포 성장 및 지방산 합성

배지 내 질소원 충분/고갈 조건에 대한 *N. oculata* K-1281의 세포 성장과 지방산 합성의 변화를 확인하기 위해 정상기에 도달한 시점인 10일차에 질소원이 충분한 배지와 질소원이 고갈된 배지로 옮겨 변화를 관찰하였다. 샘플 채취 시기는 배지를 교체해준 시점을 0일로 기준 삼고 0.5, 1.5, 3.5일에 세포량을 분석하였다. 질소원이 고갈된 조건은 배양기간이 길어짐에 따라 세포량의 증가율이 적어 3.5일에는 질소원 충분조건에 비해 12.5% 적은 것을 확인할 수 있었다 (그림 1(a)). 그에 비해 세포량 대비 지방산 함량은 질소원 충분조건인 경우 일정한 수준을 유지했으나, 질소원 고갈조건에서는 0일인 17.5%부터 서서히 증가하다가 3.5일에서는 41.7%까지 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 3.5일에 질소원 충분조건에 비해 2.4배 증가하는 모습을 나타냈다 (그림 1(b)). 따라서 질소원 고갈조건에서 세포량은 질소원 충분조건보다 적게 증가하지만 지방산 합성 증가량이 커졌기 때문에 지방산 생산량은 질소원 고갈조건이 2.1배 더 높게 나타났다 (표 1). 배지 내 질소원 유무에 따른 세포 성장과 지방산 합성의 차이는 기존 연구에서도 유사하게 나타났다. 녹조류 *Parietochloris incisa*는 질소원 고갈시 세포의 성장성이 질소원 충분조건보다 낮으며, 특히 광도가 높아짐에 따라 그 차이가 더 커지는 것을 밝혔다. 이때 본 연구와 같이

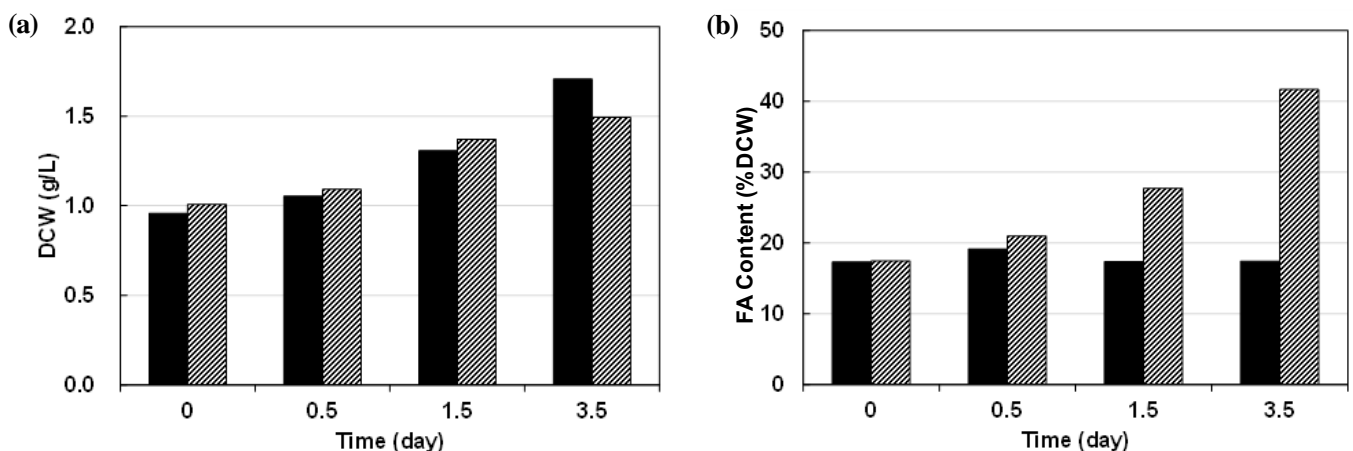


Figure 1. Effect of nitrogen on cell growth and FA content in *N. oculata* K-1281. (a) Dry cell weight (DCW, g/L), (b) FA content (% DCW) (nitrogen sufficient (■) and nitrogen depleted (▨) conditions)

질소원 고갈 조건에서 지방산 합성량이 증가하는 모습을 나타냈다 [12]. 또한 *Nannochloropsis oculata*를 25°C에서 질소원 고갈조건에 두었을 때 지질 축적량이 질소원 충분조건에 비해 7.7배 증가했다 [7].

질소원이 고갈된 경우 세포의 단백질 합성이 이루어지지 않아 단백질과 광합성 색소를 안정화시키는 이중막이 손실되면서 틸라코이드막이 파괴되어 광합성 효율이 낮아지는 것으로 알려져 있다 [13]. *Nannochloropsis gaditana*의 경우도 틸라코이드막을 구성하는 지질인 모노 갈락토실 디아실 글리세롤 (MGDG, Monogalactosyldiacylglycerol)와 디갈락토실디아실글리세롤(DGDG, Digalactosyldiacylglycerol)이 감소되고 이때 지질에서 분해된 지방산이 중성지방(TAG, Triacylglycerol)으로 전환된다. 그러나, 광계 I과 광계 II, 시토크롬 *b₆f* 복합체의 재배열에 의해 광합성 효율을 유지하는 것으로 밝혀졌다 [14]. 또한, 세포 활성을 유지하기 위해 glutamate를 α-ketoglutarate로 변환하면서 필요한 질소원을 제공하는 것으로 전자체 분석을 통해 보고되었다 [15]. 따라서, 질소원 고갈 조건에서 광합성 기구의 변화와 단백질 변환을 통한 질소원 공급을 통해 세포 내 대사가 유지되기 때문에 세포의 성장속도는 질소원 충분조건보다 감소하지만 세포량이 감소하지 않는다. 이는 질소원 고갈조건에서 세포 손실 없이 지방산을 대량 생산하는 것이 가능하다는 것으로 보였다.

Table 1. Fatty acids (FA) concentration (g/L) of *N. oculata* K-1281

	FA concentration (g/L)			
	Day 0	Day 0.5	Day 1.5	Day 3.5
N sufficiency	0.17	0.20	0.23	0.30
N deficiency	0.18	0.23	0.38	0.62

상온균주 *Nannochloropsis oculata* LB2164와 지방산 함량 및 조성 변화 비교

서로 다른 배양 온도인 상온 20°C와 저온 15°C에서 자라는 *N. oculata* LB2164와 *N. oculata* K-1281이 질소원 고갈조건에 있을 때 지방산의 함량과 조성의 변화에 대하여 알아보려고 진행하였다. 또한 상온이나 저온에서 특이적으로 나타나는 지방산 조성의 변화나 특정 지방산이 두드러지는지도 확인하고자 하였다.

N. oculata K-1281의 건조중량 당 지방산 함량은 질

소원 고갈조건에서 질소원 충분조건에 비해 3.5일동안 2.4배 증가된 것으로 질소원 고갈조건에서 *N. oculata* LB2164가 같은 기간 동안 2.1배 증가한 것에 비해 높게 나타났다 (표 2). 그러나 지방산 함량을 100%라고 보았을 때, 두 균주 모두에서 포화지방산과 불포화지방산의 상대적인 비율은 0일에는 3:7(포화지방산 : 불포화지방산)의 비율로 존재하다가 3.5일로 갈수록 4:6으로 변화하는 것을 보였다. 따라서 포화지방산과 불포화 지방산의 비율의 변화 양상은 동일하다는 것을 실험 결과를 통해 알 수 있었다 (표 3).

N. oculata K-1281의 지방산 조성 변화를 보면 질소원 충분조건과 질소원 고갈조건에서 C14:0의 상대적인 비율은 10% 미만을 보였다. 질소원 충분조건에서 주를 이루는 지방산으로는 C14:0과, C16:0, C16:1, C20:5이고, 탄소가 18개인 지방산들(C18:0, C18:1, C18:2)은 비율이 상대적 함량은 약 10% 정도이고 정량적 함유량은 4% 미만이었다. 또한, 시간에 따른 변화가 세포 내 조성의 변화가 나타나지 않았다 (그림 3(a)). 이에 비해 질소원 고갈조건인 경우 C16:0과 C16:1, C18:1의 상대적인 비율이 증가하고 C20:5는 감소하는 모습을 나타냈다 (그림 2(a)). 단위 세포량 당 정량적인 지방산 함량은 질소원 고갈조건에서 탄소사슬이 18개 이하의 지방산에서 전체적으로 증가했으며, C16:0과 C16:1은 20 mg FA/g DCW 이상 증가하였다. 그에 비해 C20:5는 약 60 mg/g DCW로 질소원 고갈 스트레스에도 일정한 수준을 유지하였다 (그림 2(b)). *N. oculata* LB2164의 상대적인 지방산 조성은 질소원 고갈조건에서 C16:0과 C16:1, C18:3이 증가하는 모습을 나타냈고, C20:5는 K-1281과 마찬가지로 감소하는 모습을 나타냈다 (그림 3(a)). 단위 세포량 당 정량적인 지방산 함량은 C16:0과 C18:3, C20:4이 증가하였고 C20:5는 질소원 고갈 스트레스에도 일정한 수준을 유지하였다 (그림 3(b)).

미세조류의 지질대사는 고등 식물과 유사한 유전자와 효소가 관여한다고 알려져 있으며, 지질합성을 위한 지방산 생산은 다른 진핵미생물과 달리 엽록체에서 생산된다 [16]. 광합성에 의해 이산화탄소가 고정화되면서 생산되는 C3-화합물로부터 acetyl-CoA를 만드는 것으로 지방산 합성이 시작되어 탄소사슬이 16개 혹은 18개로 이루어진 지방산을 합성한다. 합성된 C16:0과 C18:0은 acyl ACP desaturase에 의해 이중결합을 1개 포함한 불포화 지방산으로 생산될

수 있다. 이후 사슬의 연장이나 불포화는 엽록체에서 소포체로 이동하여 일어난다. *N. oculata* K-1281의 지방산 조성은 엽록체에서 생성되는 C16:0과 C16:1, C18:1의 변화를 통해 질소원 고갈에 대해 반응하는 것을 알 수 있다. *N. oculata* LB2164 또한 엽록체에서 생성되는 C16:0과 C16:1이 크게 증가하면서 지방산의 정량적인 함량이 높아졌다. *N. oculata* K-1281과 *N. oculata* LB2164의 조성 차이는 K-1281의 경우 C18:0를 포함하고 있지만, LB2164는 C18:0이 없고 C18:3과 C20:4를 포함하고 있다. 저온환경에서 세포의 대사를 유지하기 위해서는 지질막의 기능이 보존 되어야 하며, 이는 지방산 구성에 따른 세포막 유동성의 영향을 받는다. 세포막의 유동성은

불포화 지방산의 증가나 지방산 사슬 길이의 감소를 통해 조절된다 [17]. 저온균주 *N. oculata* K-1281과 상온균주 LB2164는 질소원 고갈에 대한 포화지방산 및 불포화지방산 비율이 유사하게 나타났고 엽록체에서 생산되는 짧은 사슬 지방산인 16:0과 16:1이 주로 생산되는 모습을 보였다. 반면, 저온균주 *N. oculata* K-1281은 질소원 고갈 스트레스에 대해 엽록체에서 생산되는 짧은 사슬 지방산의 조성이 더 높아짐을 확인할 수 있었고, 상온균주 *N. oculata* LB2164는 소포체에서 탄소 사슬이 연장된 C20:4, C20:5의 조성이 높음을 알 수 있었다. 따라서, 스트레스에 대한 반응이 저온균주와 상온균주에서 각각 엽록체와 소포체에서 지방산 사슬 연장을 통해 변화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

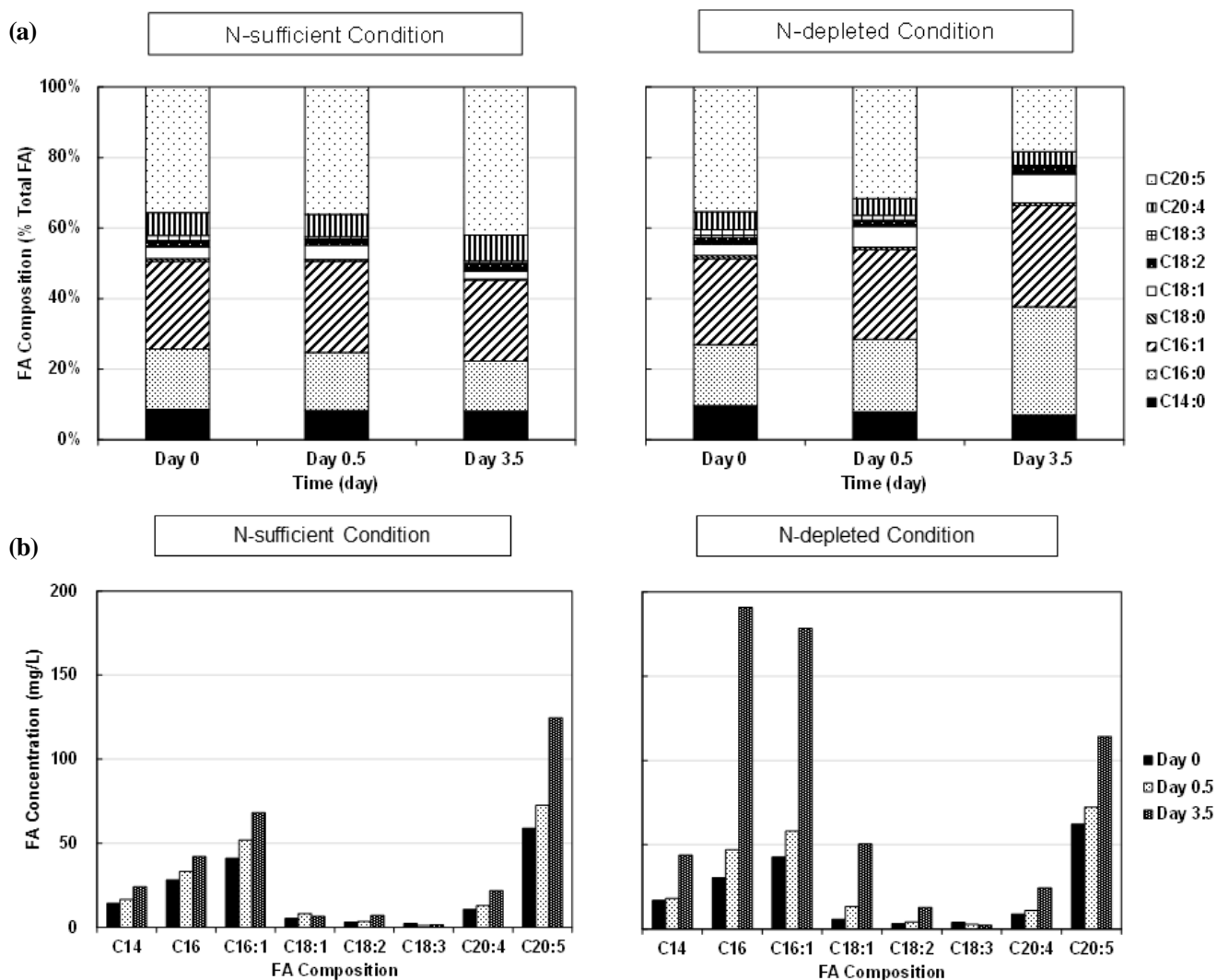


Figure 2. Changes in (a) FA composition (% total FA) and (b) FA concentration (mg/L) in the presence or absence of nitrogen in *N. oculata* K-1281

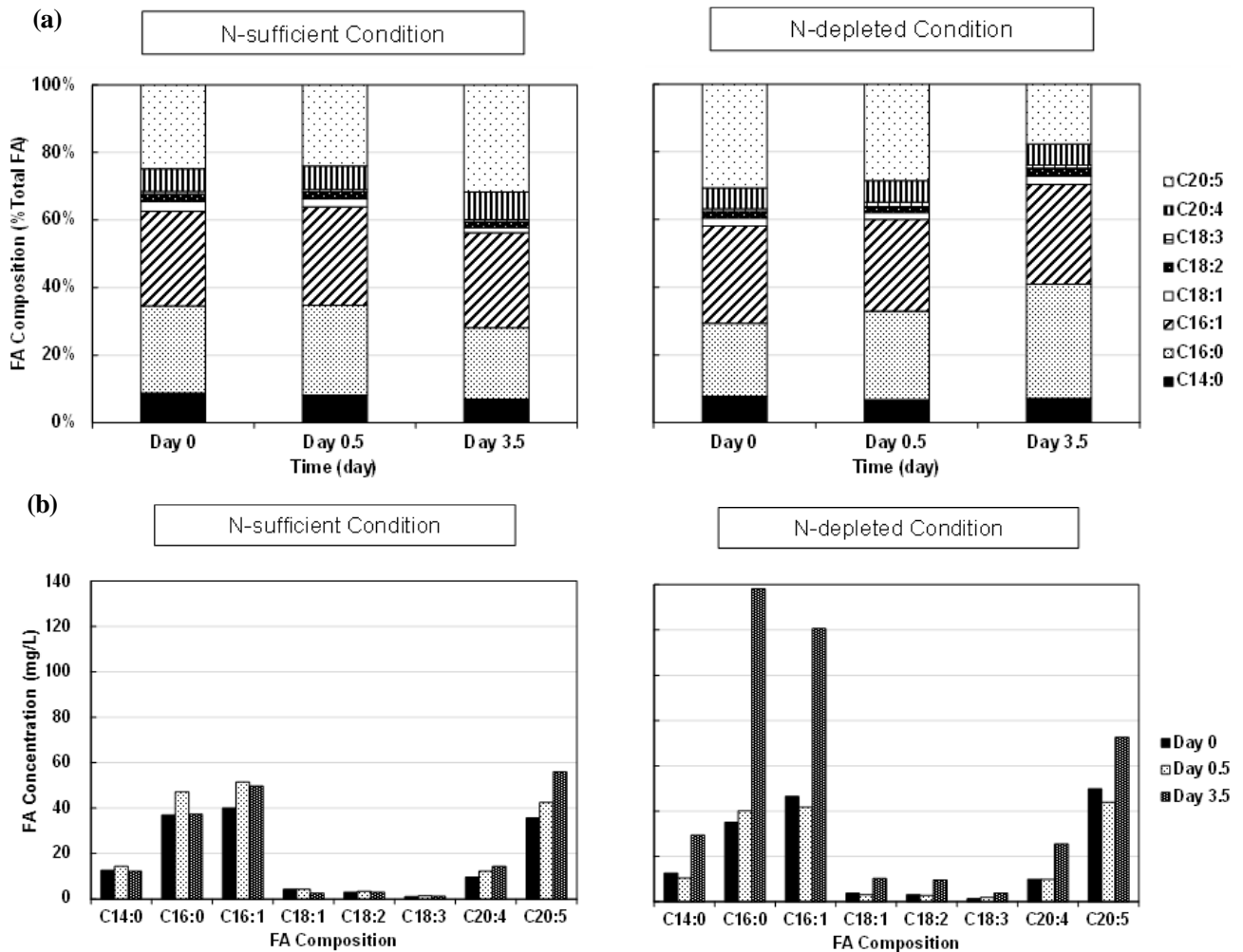


Figure 3. Changes in (a) FA composition (% total FA) and (b) FA concentration (mg/L) in the presence or absence of nitrogen in *N. oculata* LB2164

Table 2. Ratio of FA content (% DCW of N sufficiency/% DCW of N deficiency) between *N. oculata* K-1281 and *N. oculata* LB2164

	Ratio of FA content			
	Day 0	Day 0.5	Day 1.5	Day 3.5
<i>N. oculata</i> K1281	1.01	1.10	1.60	2.39
<i>N. oculata</i> LB2164	1.01	0.84	1.33	2.11

Table 3. Comparison of saturated FA (SFA) and unsaturated FA (UFA) content between *N. oculata* K-1281 and *N. oculata* LB2164

		FA content (% DCW)		
		Day 0	Day 0.5	Day 3.5
<i>N. oculata</i> K1281	SFA	25.83	29.90	40.34
	UFA	73.44	69.51	59.48
<i>N. oculata</i> LB2164	SFA	29.42	32.90	40.89
	UFA	70.58	67.10	59.11

질소원 고갈 후 충분 조건으로 변경시 *Nannochloropsis oculata* K-1281의 지방산 함량과 조성의 확인

질소원 고갈조건에서 배양하고 난 후의 *N. oculata* K-1281을 다시 질소원 충분조건으로 배양했을 때 지방산의 함량 및 조성 변화 양상을 확인하였다. 지방

산 함량 변화를 보면 질소원 충분조건인 경우 질소원 고갈조건과 달리 질소원이 계속해서 공급되었기 때문에 지방산 함량의 변화는 미비했다 (그림 4(a)). 반면 질소원 고갈조건인 경우 마지막 날인 3.5일까지는 지방산 함량이 증가하다가 질소원이 충분한 배지로 옮겨진 후에는 지방산 함량이 감소하여 6.5일

에서는 질소원 고갈조건을 주기 전 지방산 함량과 비슷한 값을 나타냈다. 질소원 충분조건인 경우 세포가 6.5일까지 질소원이 풍부한 조건에서 배양되기 때문에 지방산이 증가하지 않았으며, 포화지방산과 불포화지방산의 상대적인 함량 또한 3:7의 비율로 유지되는 것을 보였다. 그러나 질소원 고갈조건인 경우 이전 실험에서와 마찬가지로 3.5일에 4:6 비율로 변

화했다가 균주가 질소원 충분조건으로 바뀌자 다시 3:7 비율로 돌아가는 것을 확인할 수 있었다 (표 4).

질소원 충분조건에서 전체 지방산 함량 중 상대적인 지방산 비율을 볼 때 탄소 14, 16, 18개로 이루어진 지방산의 함량이 약 50~60%였고, 탄소 20개인 지방산이 나머지 부분을 차지하였다 (그림 4(b)). 질소원 고갈/충분조건에서 지방산 비율 변화는 질소원 고갈 유무 조건에 따라 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 질소원 고갈조건인 3.5일까지는 탄소 14, 16, 18개인 지방산의 비율이 75%까지 증가하다가 질소원이 충분해지는 조건인 4.5일부터는 서서히 감소하여 6.5일이 되면 질소원 고갈조건을 주기 전인 0일 때와 같은 비율을 나타냈다. 질소원 고갈과 질소원 충분조건에 따른 실제 함량의 변화는 질소원 고갈조건에서 C16:0, C16:1, C18:1의 함량이 높아지고 다시 질소원을 추가한 4.5일 이후부터 감소하는 모습을 나타냈다. 이러한 함량 변화는 질소원이 고갈되면 엽록체 내에서 C16:0, C16:1, C18:1이 합성되는 것을 의미하는 것으로 *Nannochloropsis oceanica*의 장기간 질소원 고갈시 지방산 합성 관련 단백질 발현의 증가와 동일한 결과를 나타냈다 [18]. 또한, 질소원 고갈 후 다시 질소원을 충분히 추가하였을 때 다시 고갈되기 이전의 상대적인 지방산 비율과 실제 함량으로 되돌아가는 것을 확인하였다. 따라서, 질소원 고갈조건에 대해 엽록체 내의 지방산이 조절되는 것으로 볼 때 질소원에 대한 지방산 조절기작이 엽록체 내에서 작용하고 있는 것으로 나타났다.

Table 4. Comparison of saturated FA (SFA) and unsaturated FA (UFA) content under nitrogen sufficient condition and nitrogen depleted/sufficient condition in *N. oculata* K1281

		FA content (% DCW)				
		Day 0	Day 0.5	Day 3.5	Day 4.5	Day 6.5
Nitrogen sufficiency	SFA	26.51	25.31	22.60	26.35	26.56
	UFA	73.49	74.69	77.40	73.65	73.44
Nitrogen deficiency	SFA	27.87	29.21	38.48	28.21	25.71
	UFA	72.13	70.79	61.52	71.79	74.29

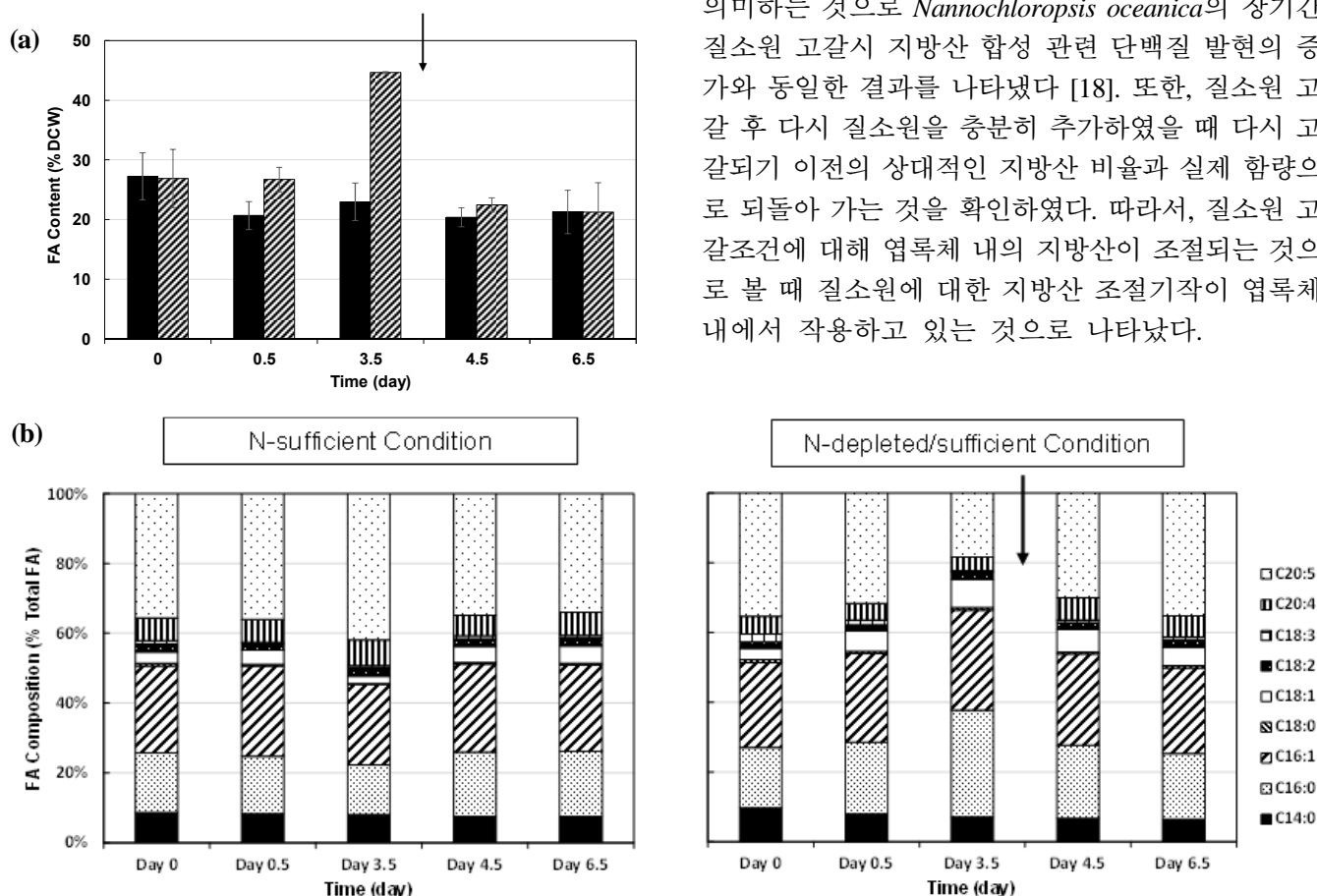


Figure 4. Comparison of FA content and FA composition under (nitrogen sufficient (■) and nitrogen depleted/sufficient (▨) conditions in *N. oculata* K-1281. (a) FA content (% DCW), (b) FA composition (% Total FA). Arrow indicates the time point to add nitrogen in the nitrogen depleted medium

결 론

본 연구에서는 *Nannochloropsis oculata*의 질소원 고갈/충분조건에서 세포 성장 및 지방산 함량에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 또한, 저온과 상온에 각각 적응한 *N. oculata*를 이용하여 지방산 조성 변화에 대하여 연구하였다. *N. oculata* K-1281은 질소원 고갈조건에서 세포 증가 속도는 감소했으나 세포량은 계속적으로 증가하는 모습을 나타냈으며, 지방산 함량은 2.1배 증가하였다. 상온균주인 *N. oculata* LB2164와 질소원 고갈조건에서 지방산 조성을 비교한 결과 불포화도는 유사한 결과를 나타냈으나, 소포체에서 생산되는 C20:4, C20:5의 조성이 상대적으로 높게 나타났다. 이와 반대로 저온균주인 K-1281의 경우 엽록체에서 생산되는 16:0과 16:1이 주로 생산되는 모습을 보였다. 또한, K-1281 균주를 질소원 고갈조건에서 다시 질소원을 추가하면 질소원 고갈 전의 지방산 함량과 조성으로 돌아가는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 질소원 고갈 조건을 통해 *N. oculata*의 지방산 생산량을 높일 수 있을 것으로 보이며, 저온과 고온에 다르게 적응한 *N. oculata*의 지방산 조성 또한 질소원 고갈에 따라 탄소 사슬 길이의 차이가 나타나는 것을 통해 탄소 사슬 길이 조절에 대한 연구의 기초자료가 될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부, 교육부)의 재원으로 한국연구재단 해양·극지·기초원천기술개발사업(NRF-2016M1A5A1027462)과 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2059288)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Leon-Banares, R., Gonzalez-Ballester, D., Galvan, A., and Fernandez, E. 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.* **22**, 45-52.
- Burja, A. M., Dhamwichukorn, S., and Wright, P. C. 2003. Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. *Trends Biotechnol.* **21**, 504-511.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294-306.
- Kim, Z.-H., Park, H., Ryu, Y.-J., Shin, D.-W., Hong, S.-J., Tran, H.-L., Lim, S.-M., and Lee, C.-G. 2015. Algal biomass and biodiesel production by utilizing the nutrients dissolved in seawater using semi-permeable membrane photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **27**, 1763-1773.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., and Harrison, S. T. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* **24**, 989-1001.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M. R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100-112.
- Su, C.-H., Chien, L.-J., Gomes, J., Lin, Y.-S., Yu, Y.-K., Liou, J.-S., and Syu, R.-J. 2011. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J. Appl. Phycol.* **23**, 903-908.
- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., and Beurdeley, M. 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. *Nat. Commun.* **5**, 3831.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., and Hu, Q. 2010. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 258-268.
- Da Silva, A. F., Lourenco, S. O., and Chaloub, R. M. 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquat. Bot.* **91**, 291-297.
- Francisco, E. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., and Franco, T. T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 395-403.
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., and Merzlyak, M. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J. Appl. Phycol.* **20**, 245-251.

13. Thomas, D. N., and Dieckmann, G. S. 2002. Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. *Science* **295**, 641-644.
14. Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Marechal, E., Finazzi, G., and Morosinotto, T. 2013. The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes *de novo* biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot. Cell* **12**, 665-676.
15. Shin, H., Hong, S. -J., Kim, H., Yoo, C., Lee, H., Choi, H. -K., Lee, C. -G. and Cho, B. K. 2015. Elucidation of the growth delimitation of *Dunaliella tertiolecta* under nitrogen stress by integrating transcriptome and peptidome analysis. *Bioresour. Technol.* **194**, 57-66
16. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **54**, 621-639.
17. Russell, N. J. 1997. Psychrophilic bacteria-Molecular adaptations of membrane lipids. *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* **118**, 489-493.
18. Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D.-z., Xie, Z.-X., Hsia, R.-c., Jenck, A., Halden, R., Chen, F., and Place, A. 2013. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiol.* **162**, 1110-1126.