

<http://dx.doi.org/10.15433/ksmb.2016.8.1.024>

ISSN 2383-5400 (Online)

발광다이오드를 이용한 광파장에 따른 *Chlorella vulgaris*의 성장과 지방산 생산에 미치는 효과

Effect of Light Quality on Growth and Fatty Acid Production in *Chlorella vulgaris* Using Light Emitting Diodes

김지훈, 김동건, 이철균*

Z-Hun Kim, Dong Keun Kim, Choul-Gyun Lee*

해양바이오에너지 생산기술개발연구센터 & 인하대학교 생물공학과, 인천광역시 남구 인화로 100, 22212, 대한민국

National Marine Bioenergy R&D Center & Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon-si 22212, Republic of Korea

(Received 3 June 2016, Revised 17 June 2016, Accepted 17 June 2016)

Abstract Microalgae are considered as superior biodiesel producers, because they could effectively produce high amount of lipid with fast growth rate. In this study, *Chlorella vulgaris* was exposed to various light wavelengths (λ_{\max} 470 nm, λ_{\max} 525 nm, and λ_{\max} 660 nm) using light emitting diodes (LEDs) to examine effect of light quality on their growth and fatty acid production in 0.4-L bubble column photobioreactors. Fluorescent lamps were also used as polychromatic light sources (control). From the results, biomass productivity was varied by light wavelength from 0.05 g/L/day to 0.30 g/L/day. Maximum biomass productivity was obtained from red LED among tested ones. We also observed that contents of oleic acid and linolenic acid, which affect biodiesel properties, were significantly changed depending on supplied wavelength. These results indicated that production of algal biomass, and fatty acid content and productivity could be improved or controlled by supplying specific light wavelength.

Keywords : Biodiesel, *Chlorella vulgaris*, light quality, fatty acid, light emitting diode

서 론

미세조류는 높은 광합성 효율을 가진 미생물로서 이산화탄소를 고정화하고 이를 통해 바이오에너지, 카로테노이드(carotenoids), 단백질, 불포화 지방산, 색소 등과 같은 고부가가치 생산자로서 오랜 기간 중요한 생물자원으로 주목 받고 있다 [1- 3]. 최근에는 급격하게 진행되고 있는 지구 온난화의 주범인 대기 중의 이산화탄소를 효율적으로 고정하면서도 화석연료

를 대체할 수 있는 친환경 제 3세대 바이오에너지원으로서 많은 연구가 활발히 진행되고 있다 [4].

바이오에너지 생산자로서의 미세조류의 주요 특징은 성장 속도가 빠르고, 고밀도의 에너지원인 탄수화물, 지질, 탄화수소와 같은 에너지 전구체들(precursor)을 대량으로 생산이 가능하다는 장점 등이 있다 [5]. 이 중에서도 미세조류 지질을 이용하여 비교적 간단한 공정을 통해 생산이 가능한 바이오디젤 생산 연구가 집중적으로 이뤄지고 있다. 미세조류의

* Corresponding author

Phone: +82-32-872-7518 Fax: +82-32-873-7518

E-mail: leecg@inha.ac.krThis 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 효율적으로 생산하기 위해서는 배양 환경 인자에 대한 특성을 규명하는 것이 무엇보다도 중요하다. 미세조류는 종에 따라 지질의 함량과 조성이 다양하게 존재할 뿐만 아니라 [6], 배양 조건에 따라 크게 영향을 받는다고 알려져 있기 때문이다 [7].

일반적으로 미세조류의 지질 생산에 영향을 미치는 인자로는 배양 온도, 광 조건, 영양염, 염도, pH 등이 있다. 이 중에서도 광관련 인자(e.g. 광도, 광과장, 광 공급 주기)는 미세조류의 성장뿐만 아니라 지질 대사에 영향을 미쳐 생산성에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, *Nannochloropsis oculata*에 녹색광 (λ_{\max} 520 nm)을 조사 시에는 지질의 함량이 최대 균체의 56%까지 증대되는 것으로 나타났다 [8]. Schulze *et al.* [9]의 연구에 따르면 *Tetraselmis chuii*의 경우 단과장의 광원 공급 보다는 적색광(λ_{\max} 660 nm)과 청색광(λ_{\max} 405 nm)을 혼합하여 공급할 때 탄수화물과 지질과 같은 탄화수소 화합물의 생산을 향상시킨다고 보고하였다. 또한 Seo *et al.* [10]가 발표한 연구 결과에 따르면, *Chlorella* sp.의 배양 시 적색광을 조사시켜 다른 광조건에 비해 향상된 균체와 지질 생산성을 얻을 수 있었다. 상기 연구 결과들이 시사한 바는 미세조류 종간의 광과장에 대한 세포의 반응이 동일하게 나타나지 않는다는 점이다. 따라서 광과장이 세포의 지질 생산성과 조성에 미치는 영향에 대한 특성을 규명하는 것이 중요하다.

Light emitting diode(LED)는 특정 영역의 광과장을 조사가 가능한 광원으로서 미세조류 배양 연구에 널리 사용되어 왔다 [11, 12]. 본 연구에서는 다양한 광과장의 LED를 이용하여 광과장에 따라 *Chlorella vulgaris*의 성장과 바이오디젤의 전구체인 지방산 조성 및 생산성에 미치는 영향에 대해 시험 및 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 미세조류는 *Chlorella vulgaris*로 University of Texas at Austin의 Culture Collection of Algae (Austin, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. 균주의 배양은 N-8 배지를 사용하였으며, 조성은 다음과 같다. 증류수에 KNO_3 1 g/L, KH_2PO_4 0.74 g/L

NaPO_4 0.26 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L CaCl_2 0.01 g/L $\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$ 0.01 g/L, $\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 3.58 mg/L, $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12.98 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.83 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.2 mg/L를 첨가하여 제조하였다. 본 배양을 위한 종균은 0.4-L bubble column photobioreactor (BC-PBR)에서 광도 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 온도 25°C, 5% CO_2 0.1 vvm 폭기 조건에서 유지되었다.

광과장에 따른 *C. vulgaris*의 성장과 지질 생산성에 대한 실험은 종균 유지와 같은 조건에서 0.4-L BC-PBR을 이용하여 실시하였다. 각 과장별 광도는 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 지속적으로 공급하였다. 배양은 7일간 유지하였으며, 배양 종료 시점에서 세포를 회수하여 지방산의 분석을 실시하였다.

세포 농도 및 질소 농도 측정

세포수, 세포크기, 생체중량은 Coulter Counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA)를 이용하여 정밀하게 측정하였다. 세포 건조 중량은 채취한 배양액을 3,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 세포만을 수집하였다. 수집된 세포에 있는 이온을 제거하기 위해 증류수로 2회 세척 후 다시 원심 분리한 뒤 60°C 오븐에서 하루 동안 건조하였다. 건조된 세포를 실온의 desiccator에서 보존한 후 무게를 측정하였다.

배양액 내의 질소원의 농도는 spectrometer(Model HP8453B, Hewlett Packard, Waldron, Germany)를 이용하여 분석하였다. 채취한 배양액에서 원심분리를 통해 세포를 제거한 뒤, 배양액과 1 N HCl 용액을 혼합하여 표준분석법을 이용하여 분석하였다 [13].

광원 및 광도 측정

본 실험에서 3가지의 LEDs를 이용하여 청색광(λ_{\max} 470 nm; U-Jin LED Co., Ltd., Koyang, Korea), 적색광(λ_{\max} 665 nm; U-Jin LED), 녹색광(λ_{\max} 525 nm; U-Jin LED)을 공급하였다. LED로부터 조사되는 광도는 직류 전원장치로부터 공급되는 전압의 세기를 이용하여 조절하였다 [11]. 대조군으로서 14 W 형광등 (FL-14X-W, Feelux Lighting Co., Ltd., Yangju, Korea)을 사용하였다 (Figure 1). LEDs 실험군의 경우 PBR 외부의 광에 대한 영향을 막고자, LEDs 설치 후 알루미늄 호일을 이용하여 차단하였다. 광도 측정은 LI-COR Quantum Sensor (LI-190SA, LI-COR,

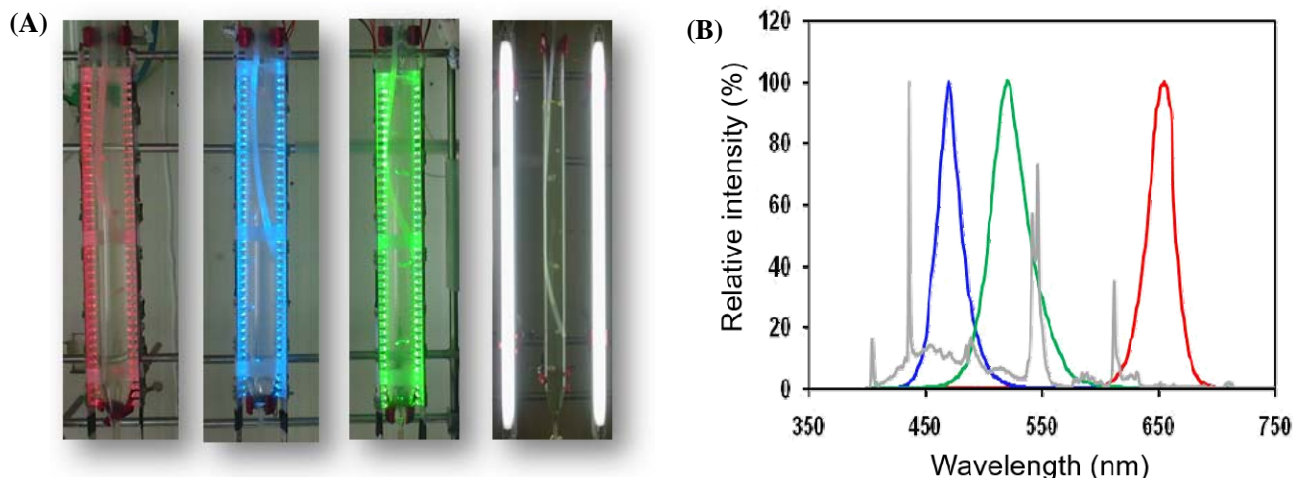


Figure 1. A photograph of LEDs and fluorescent lamp illuminated photobioreactors used in this study (A) and a comparison between the spectra of various LEDs (blue, green, and red lines) and fluorescent lamp (grey line) (B).

Lincoln, NE, USA)를 이용하여 photosynthetically active radiation (PAR; wavelength 400 - 700 nm) 범위의 광도를 측정하였다. 공급되는 광도는 반응기의 내부 표 면에서 광도계를 이용하여 8방향 ($\pi/4$ radian)에서 측정한 후 평균값이 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 설정하였다.

Fatty Acid Methyl Ester 분석

균체내의 지방산을 transesterification화법으로 측정하였으며, fatty acid methyl ester(FAME)의 양으로 나타내었다. 동결 건조된 세포 10 mg과 내부 표준물질인 C19:0 지방산(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 2 mL의 acetylchloride/methanol (5:100, v/v) 용액에 혼합한 후에, 80°C에서 1 시간 동안 전처리 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후 2 mL의 *n*-hexane을 넣어 FAME를 추출하였다. FAME함량과 조성은 flame ionization detector가 설치된 gas chromatograph (Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용해 분석하였다. 분석에는 capillary column (HP-INNOWax, Agilent, CA, USA)을 사용하였고, 유량 3 mL/min의 헬륨가스를 이동상으로 이용하였다. 오븐의 분석조건은 초기 오븐 온도 140°C에서 1분간 정치하여 240°C까지 5°C/min로 승온하여 최종온도에서 10분간 정치하였다. FAME standards mixture (F.A.M.E. MixC4-C24, Supelco)와 미세조류 유래 FAME의 정체시간을 비교하여 FAME의 정성분석을 실시하였고, 각 정체시간 동안의 면적을 내부 표준물질의 면

적과 비교하여 정량하였다.

결과 및 고찰

광과장에 따른 *C. vulgaris*의 성장과 지질 생산에 대한 영향을 알아보고자, 특정 과장을 조사하는 LEDs와 형광등을 이용하여 7일 동안 배양을 실시하였다. Figure. 2에서 보는 것과 같이 다른 광과장 조건에서 세포의 성장성은 배양 초기부터 두 그룹으로 극명하게 나뉘는 것으로 나타났다. 형광등과 적색광을 공급하여 배양한 세포는 초기부터 빠른 성장 속도를 나타내는 반면 (specific growth rate: 1.27 /day), 청색광과 녹색광하에서는 상기 그룹에 비해 약 64%의 수준 (specific growth rate: 0.82 /day)으로 나타났다. 이에 비례하여, 7일간 배양 후 최종 세포 농도는 적색광과 형광등으로부터 각각 2.1 ± 0.22 , 1.9 ± 0.1 g/L를 얻었으며, 청색광과 녹색광에서는 각각 0.36 ± 0.03 , 0.34 ± 0.01 g/L로 낮았다. 이러한 결과는 *C. vulgaris* 배양에 있어 적색광이 높은 균체 생산성을 나타낸다는 것으로 일반적인 녹조류에서 얻은 결과들과 일치한다. 이러한 이유는 녹조류는 chlorophyll a와 b를 주요한 색소로 가지고 있어, 청색 영역과 적색 영역의 광에너지 흡수 효율이 높은 것에 기인한다 [14]. 따라서 과장에 따른 녹조류의 성장성은 주로 상기 과장 영역에서 나타난다. 그러나 전술한 바와 같이 같은 녹조류라고 하더라도, 종간의 광반

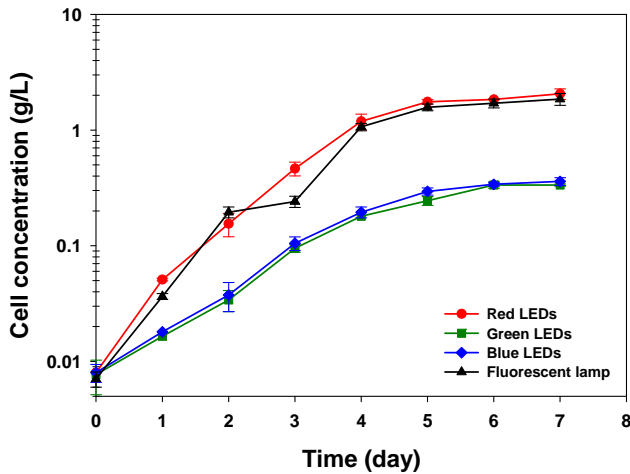


Figure 2. Time profiles of *Chlorella vulgaris* growth (g/L) cultured under different light wavelengths in 0.4-L bubble column photobioreactors.

응은 서로 다르게 나타나는 경우가 있으며, 사용한 광원의 특성(e.g. λ_{max} and half-power band width of wavelength)에 기인해 달라 질 수 있다. Katsuda *et al.* [15]의 연구 결과에 의하면 녹조류의 한 종인 *Haematococcus pluvialis* 배양 시 청색 영역의 광이라도, 파장의 상이성이 균체 생산에 영향을 미치는 것으로 보고한 바 있다.

Figure 3는 7일간 배양 후 얻은 세포를 이용하여 지방산의 조성과 함량을 분석하였다. *C. vulgaris*의 주요한 지방산의 조성은 palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1), linolenic acid (C18:3) 순으로 많은 것으로 분석되었다. 다른 광과장에서 배양시 특징적인 것은 불포화 지방산인 oleic acid와 linolenic acid의 비율이 변화이다 (Figure 4). 형광등과 적색광에서는 oleic acid의 지방산 비율이 53%에 이르는 반면 linolenic acid는 10%와 13%를 각각 가지고 있었다. 이에 반해, 공급되는 광과장이 적색광에 비해 상대적으로 짧은 녹색광과 청색광에서는 oleic acid는 48%와 38%로 점차적으로 낮아지는 경향성을 보였다. linolenic acid의 경우에는 이와는 반대로 녹색광과 청색광에서 증가하는 경향성을 나타냈으며, 전체 지방산의 18%와 22%로 변화하는 것으로 관찰되었다. 이러한 주요 불포화 지방산의 비율이 변화는 포화와 불포화 지방산의 비율을 변화시켜, 바이오디젤의 품질에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로 불포화지방산의 함량이 증가 할수록 산화안정도는 높아지며, 연료가 겔(gel) 혹은 결정화가 시작되어 필터가 막히는 온도인 cold

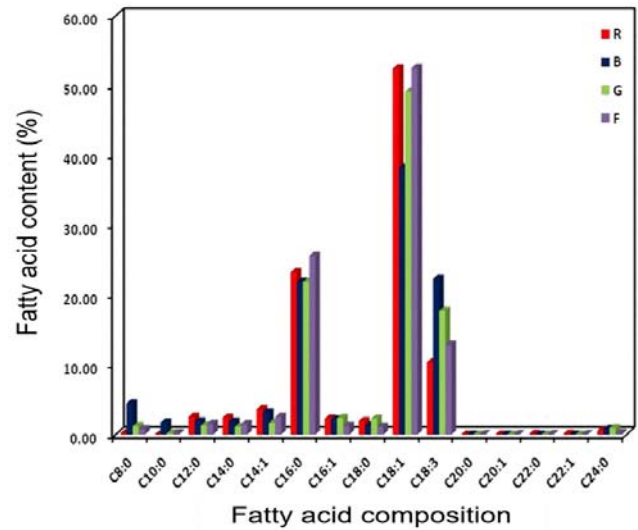


Figure 3. Analysis of fatty acid content and composition cultured under different light wavelengths in 0.4-L bubble column photobioreactors. R, B, G, and F stand for red LED, blue LED, green LED, and fluorescent lamp, respectively.

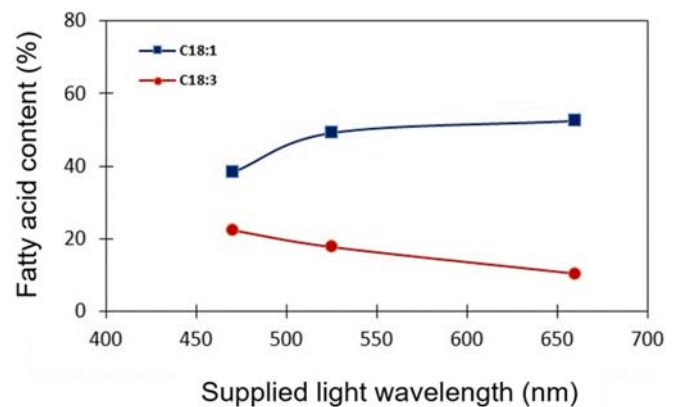


Figure 4. Variations of oleic acid (C18:1) and linolenic acid (C18:3) contents within *Chlorella vulgaris* as a function of supplied light wavelength.

flow plugging point에는 긍정적인 영향을 미친다 [16]. 특히 청색광에서의 불포화도가 높은 linolenic acid (C18:3)의 증가는 저온 유동성을 높일 것으로 기대된다. 따라서 배양조건에 따른 지방산의 함량 변화는 미세조류 바이오디젤을 사용하는 환경에 따라 적합한 품질의 생산이 가능 할 것으로 판단된다.

다른 측면으로는 *C. vulgaris*는 불포화지방산, 단백질, 비타민 함량이 풍부해 가장 성공적으로 상업화된 미세조류이다 [17]. Linolenic acid와 같은 불포화 지방산은 인간의 혈중 지질 농도를 개선하여, 특히 심혈관과 뇌혈관 질병의 개선에 탁월한 효과가 있다고 알려져 있다 [18, 19]. 특정 지방산의 함량을

증가시킨 본 연구는 바이오디젤뿐만 아니라 영양학적으로 가치 있는 미세조류 생산에도 활용 될 수 있을 것이다.

지방산의 생산성의 경우, 적색광에서 54 mg/L/day로 가장 높았다. 녹색광과 청색광에서는 34 mg/L/day와 32 mg/L/day로 미세조류의 성장성에 비례적 이었다. 대조군인 형광등의 경우에는 지방산 조성은 적색광과 유사하게 나타났으나, 생산성 측면에서는 50 mg/L/day로 약 10% 낮은 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 같은 광에너지를 이용하여 지방산 생산 시 형광등과 같은 복합 광과장 광원보다는 단일 파장을 *C. vulgaris* 배양에 조사시 효과적이라고 판단된다.

결 론

본 연구에서는 LED를 이용하여 공급되는 광과장에 따른 미세조류의 성장과 지방산의 변화에 대해 실험하고자 하였다. 본 연구 결과로부터 적색광 과장은 다른 광과장에 비해 *C. vulgaris*의 균체 및 지방산 생산에 가장 효율적인 것으로 나타났다. 또한 광과장에 따른 불포화 지방산의 조성변화는 미세조류 유래 바이오디젤 생산 시 생산성을 향상시키고, 품질을 조절에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 재원으로 해양생명공학 기술개발사업 (Project No.: 200255), 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발 연구개발비 지원과 해양에너지 융복합 인력양성 사업 (Project No.: 53169-1)에 의해 수행되었습니다.

References

- Borowitzka, M. A. and Moheimani, N. R. 2013. Sustainable biofuels from algae. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change* **18**(1), 12-25.
- Lee, H.-S., Kim, Z.-H., Park, H. and Lee, C.-G. 2016. Specific light uptake rates can enhance astaxanthin productivity in *Haematococcus lacustris*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **39**(5), 815-823.
- Hong, S.-J. and Lee, C.-G. 2008. Statistical optimization of culture media for production of phycobiliprotein by *Synechocystis* sp. PCC6071. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **13**(4), 491-498.
- Heimann, K. 2016. Novel approaches to microalgal and cyanobacterial cultivation for bioenergy and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **38**, 183-189.
- 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**(4), 621-639.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**(3), 294-306.
- 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.
- Ra, C., Kang, C., Jung, J., Jeong, G. and Kim, S. 2016. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresour. Technol.* **212**, 254-261.
- Schulze, P. S. C., Pereira, H. G. C., Santos, T. F. C., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., Perales, J. A. and Varela, J. C. S. 2016. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Res.* **16**, 387-398.
- Seo, Y. H., Cho, C., Lee, J. and Han, J. 2014. Enhancement of growth and lipid production from microalgae using fluorescent paint under the solar radiation. *Bioresour. Technol.* **173**, 193-197.
- Kim, Z.-H., Lee, H.-S. and Lee, C.-G. 2009. Red and blue photons can enhance the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Algae* **24**(2), 121-127.
- Lee, C.-G. and Palsson B. Ø. 1994. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**(10), 1161-1167.
- Choi, S., Suh, I. S. and Lee, C.-G. 2003. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rates as a control parameter. *Enzyme Microb. Technol.* **33**(4), 403-409.
- Richmond, A. 2003. Handbook of microalgal culture:

- biotechnology and applied phycolgy. In: Masojídek, J., Koblížek, M., Torzillo, G. (Eds.), *Photosynthesis in Microalgae*. Blackwell Publishers, pp. 20–39.
15. Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K. and Katoh, S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 81-86.
 16. Dunn, R. O. 2005. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). *Fuel Process. Technol.* **86(10)**, 1071-1085.
 17. Spolaorea, P., Joannis-Cassana, C., Duran, E. and Isamberta, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101(2)**, 87-96.
 18. Simopoulos, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54(3)**, 438-463.
 19. Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C., McCullough, R. and Pierce, G. N. 2010. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can. J. Cardiol.* **26(9)**, 489-496.