

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2018.10.2.073>

ISSN 2383-5400 (Online)

*Chlorella protothecoides*의 밀킹 전후 연속 배양 시스템을 통한 유용물질 분석

Analysis of High-Value Materials through Continuous Cultivation System from Pre-and Post-Milking of *Chlorella protothecoides*

정유정^{1,2}, 김성학¹, 이원영¹, 김성천^{1,2*}

Yu Jeong Jeong^{1,2}, Seong Hak Kim¹, Won Young Lee¹, Sung Chun Kim^{1,2*}

¹주식회사 바이오이즈, 서울시 구로구, 08390, 대한민국

²주식회사 인바이오팜, 서울시 구로구, 08390, 대한민국

¹Biois. Co., Ltd., Seoul, Guro-gu 08390, Republic of Korea

²Inbiofarm. Co., Ltd., Seoul, Guro-gu 08390, Republic of Korea

(Received 22 June 2018, Revised 14 December 2018, Accepted 17 December 2018)

Abstract *Chlorella* are source of valuable compounds as lipids, proteins, carbohydrates, bioactive compounds. To continuous obtain the high-value materials of *Chlorella protothecoides*, we performed continuous cultivation after applying milking techniques to *C. protothecoides* grown with culture for 7 days in optical panel bioreactor (OPBR) system. Fatty acid and lutein in extracts from pre- and post-milking of *C. protothecoides* were analyzed using gas chromatography and high performance liquid chromatography, respectively. *C. protothecoides* were rich in unsaturated fatty acids with a high content of oleic acid(C18:1), which is suitable as a biofuel feedstock. The fatty acid content in pre- and post-milking of *C. protothecoides* was decreased from 126.424mg/g d.w. to 119.341mg/g d.w., and the lutein content decreased from 0.258mg/g d.w. to 0.178mg/g d.w. The results of this study demonstrate the feasibility of milking *C. protothecoides* for production of lipids for biofuels production. It was confirmed that microalgae can continuously obtain lutein present in a trace amount through a continuous culture from milking.

Keywords : *Chlorella protothecoides*, Milking, Continuous cultivation, Fatty acid, Lutein

서 론

클로렐라(*Chlorella* sp.)와 스피루리나(*Spirulina* sp.)는 고함량 단백질, 탄수화물, 지질과 함께 다양한

생리활성물질을 포함하고 있으며, 베타 카로테인과 크산토펴 등을 다량으로 함유하고 있어 카로티노이드 생산을 위한 천연자원으로 보고되고 있다 [16]. 루테인을 포함한 카로티노이드 고함량 미세조류 중

* Corresponding author

Phone: +82-2-6959-0361 Fax: +82-2-864-9954

E-mail: kimgp@biois.co.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/>)

을 중심으로 지속적 연구결과, 효능에서 1등급 원료로 검증되어 여러 종에서 루테인 생산을 증가시킬 수 있는 배양조건 연구가 진행 중이다 [12, 15, 30]. 루테인은 체내 혈액을 통해 안구조직 수정체와 황반에 침착되고, 시력보호, 면역항암활성, 피부손상방지, 심혈관 관련 질환 예방과 관계되어 있음이 보고되고 있다 [1, 13, 14, 26]. 또한, 항산화능, 자외선 흡수능, 백내장 및 노인 황반변증 발생위험을 낮춰 기능성 성분으로써 주목받고 있다 [8, 32]. 또한, 카르테노이드에 속하는 루테인(lutein)을 비롯한 아스타잔틴 등은 색소계 물질과 불포화지방산을 함유하고 있어 건강기능식품 및 식품 첨가제, 화장품, 의약품 등으로 활용되고 있다. 루테인은 체내에서 합성되지 않아 외부로부터 섭취해야 하는데 이러한 여러 가지 이유로 세계적인 루테인 시장이 증가하는 추세이다 [40]. 현재 금잔화에서 추출하여 사용하고 있으나 함량이 낮고 추출에 대한 단점이 있어 단백질 함량이 높은 미세조류에서 이들 대체 천연원료를 획득하고 있다 [37]. *Chlorella vulgaris*의 경우 루테인이 카로티노이드 대부분을 차지하고 있으며 *Chlorella protothecoides*의 경우 종속영양에서 루테인 생산 증가가 보고 되어 있다 [34, 35].

생리활성물질을 포함한 기능성물질과 지방산 함량, 성장특성은 미세조류 종과 배양형태에 따라 차이를 나타내는데 목적하는 물질을 얻기 위해서 최적의 배양방식 선정이 중요하다 [2, 3, 19, 30]. *C. vulgaris* 성장 조건에서 포도당 공급 배양 시 독립영양과 종속영양 조건보다 우수하다고 보고되어 있다 [3, 4, 25, 28]. *C. protothecoides*는 독립영양(authotrophic), 종속영양(heterotrophic), 혼합영양(mixotrophic) 배양에서 성장 가능하며 독립영양 조건에서 지질함량은 14.5%인데 반해 종속 및 혼합영양 조건에서 지질함량은 각각 40%, 55%로 증가하는 것으로 배양환경에 따라 차이를 보인다 [11, 21]. 미세조류는 건중량 대비 지질함량이 1~85%로, 육상식물보다 다양한 종류의 지질을 생산하며 대표적 지방산은 C16인 palmitic acid로 보고되어 있다 [20, 31]. 배양방식에 따른 미세조류의 지질함량 변화에 반해 이들의 지방산 조성 및 함량 변화 연구는 아직 미미한 실정이다.

미세조류에서 지질 추출을 위하여 기계적 추출, 초임계유체 추출, 데칸을 이용한 물리적 미세조류 밀킹(milking) 방법들이 제안되고 있다. 밀킹은 생장

하는 미세조류로부터 지용성 물질을 추출하기 위하여 용매 및 화합물질을 사용하는 것으로 용매에 의한 독성 및 세포벽 붕괴로 인해 일부 종에서는 적합하지 않을 수 있는 것으로 보고되고 있다 [18, 27]. 현재는 화학물질로 직접 추출하는 방법을 많이 사용하고 있다. 본 연구진은 밀킹 방법으로 미세조류에서 유용물질을 확보함으로써, 추출 공정비용 등의 경제성 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구진은 *C. protothecoides*에 유기용매인 데칸을 사용하여 세포 비파괴 추출 방법인 밀킹을 통하여 데칸 아래 하층부의 *C. protothecoides*를 회수, 연속 재배양하여 바이오매스를 연속적으로 얻는 방법을 제시하고자 한다. 이를 바탕으로 바이오에너지 관련 물질 및 미량으로 존재하는 활성 물질을 연속적으로 획득할 수 있음을 제시하여 클로렐라로부터 카르테노이드계 대량생산 및 다양한 용도로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

미세조류 및 배지·배양 조건

본 연구에 사용한 클로렐라 *Chlorella protothecoides* ATCC30407 (=UTEX 25)의 계대배양은 1% protease peptone 과 1.5% agar가 첨가된 Bristol 사 면배지를 사용하였다. 액체 배지(pH 6.8) 조성은 2.94 mM NaNO₃, 0.17 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.3 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.43 mM K₂HPO₄, 1.29 mM KH₂PO₄ 및 0.43 mM NaCl로 구성된 Bristol 기본 배지에 질소 원으로 0.01% urea와 유기탄소원으로 4.0% glucose를 구성으로 하였다. 이들 조성으로 배지 1L를 제조하여, 5L 배양장치 (LiFlus GX, Biotron Inc., Korea)에 넣고 121°C에서 15분간 멸균, 냉각 후 접종액 4.8x10⁶ cells/ml 넣고, 광주기 14h light/10h dark로, 배양온도 20°C, 광도 3200 lux, 150rpm이 공급되는 혼합배양조건에서 배양하였다 [22].

밀킹 처리를 활용한 연속 재배양 시스템

본 연구에서 사용된 실험실 규모의 배양장치에 밀킹 후 지용성 추출 용매인 데칸 하층부의 클로렐라를 포함한 배양액을 회수하여 연속적으로 재배양하는 OPBR (optical panel bioreactor) 장치를 제작하였고 그 모식도는 Fig. 1과 같다. 클로렐라를 배양할

수 있는 공기 펌프가 장착된 교반 가능한 5L 배양장치에 유기용매를 일정 흐름으로 주입할 수 있는 밸브를 장착하고, 밀킹으로 하층부에 있는 클로렐라를 포함한 배양액을 회수할 수 있는 연결관을 장착하여 교반 가능한 5L 새 배양장치에 연결하였다. 이 연결관을 통해 회수된 클로렐라는 배지 공급을 받으면서 연속 재순환 배양이 되도록 편리한 OPBR 시스템을 갖추었다. 이를 바탕으로 7일 동안 생장시킨 *C. protothecoides* 1L에 1차 밀킹 실험 즉, 지용성 추출 용매, 소수성(hydrophobic), 비중 0.726인 데칸(n-decane, Sigma, USA)을 동량으로 첨가하고 동시에 150rpm으로 교반을 수행하여 10분 동안 완전히 혼

합 후 데칸층(상층)과 배양액(하층)으로 분리하였다. 층 분리 시간 10분 후 유기용매 아래 즉, 배양액(하층)의 클로렐라 배양액 500 ml를 연결관을 통하여 회수, 새로운 배양장치로 이동시킨 후, 0.01% urea와 4.0% glucose가 첨가된 Bristol 배지 500 ml를 첨가하여 7일 동안 1차 연속 배양하였다. 여기에 같은 방법으로 2차 밀킹 후 데칸층 아래, 즉 하층부의 클로렐라 배양액을 회수하여 새 배양장치로 이동 후, 질소원과 유기탄소원이 첨가된 Bristol 배지 500 ml를 첨가하여 7일 동안 2차 연속 재배양하였다. 1·2차 밀킹 후 데칸층(상층)과 2차 연속 재배양액 전체를 회수하여 지방산과 루테인 분석에 사용하였다.

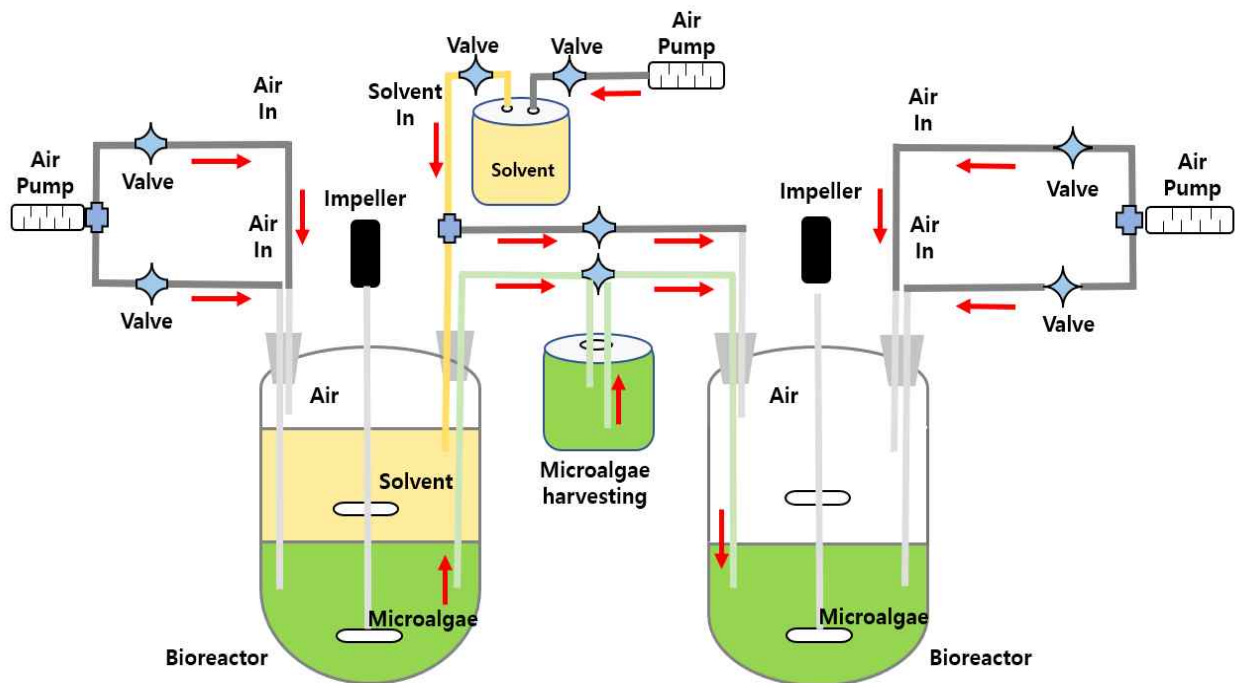


Figure 1. A scheme of OPBR (optical panel bioreactor) system used in continuous culture through milking.

세포 성장 측정

OPBR 장치를 이용하여 밀킹 후 데칸층 아래, 즉 하층부에서 회수된 클로렐라를 새 배양장치에 이동시킨 후 혼합배양 배지를 넣고 시간이 지남에 따라 1·2차 연속 재배양액의 *C. protothecoides*(post-milking)와 대조구(pre-milking)의 *C. protothecoides*의 cell density를 각각 측정하였다. 측정 시 일정 시간 간격으로 배양액 10 μl를 취해 혈구측정기인 hemocytometer에 주입 후 세포 수를 직접 광학 현미경(MCX-300, Austria)으로 측정하여 단위 부피당 세포

수(cells/ml)를 계산하였다.

분석 방법

클로렐라 시료 수확

혼합영양 배양한 *C. protothecoides*를 대상으로 밀킹 전과 밀킹 1·2차 처리 후, 즉 2차 연속 재배양액 시료는 증류수로 세척 하여 783 x g에서 10분간 원심 분리 후 동결 건조하여 분석에 사용하였다. 혼합영양 배양한 *C. protothecoides* 대조구와 밀킹 1·2차 처리 후 데칸층(상층)를 각각 수거하여 동결 건조

한 시료를 분석에 사용하였다.

지방산 분석

Garcés & Mancha의 방법에 따라 밀킹 전후 동결 건조된 동량 샘플에 methylation mixture (methanol: Benzen:2,2-dimethoxypropane:Con. $H_2SO_4=39:20:5:2$, v/v/v/v)를 $340 \mu l$, heptane $200 \mu l$ 를 넣어 혼합 후 $80^\circ C$ 에서 2시간 동안 반응시켰다 [10]. 상온냉각 후 fatty acid methyl esters (FAMES)가 함유된 상등액을 취해 gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID)를 이용하여 분석하였다. GC는 Agilent 7890A (Agilent, USA)을 사용하였으며 고정상으로 DB23 capillary column ($60mm \times 0.25mm$, $0.25 \mu m$, Agilent), detector는 FID ($280^\circ C$, H_2 35, Air 350, He 35ml/min)를 사용하였다. Oven 온도는 $50^\circ C$ 에서 1분간 유지, $25^\circ C/min$ 으로 $175^\circ C$ 까지 승온, $4^\circ C/min$ 으로 $230^\circ C$ 까지 승온 시킨 후 10분간 유지하였으며 주입량은 $1 \mu l$ (split ratio 20)로 하여 지방산을 분석하였다. 지질 표준물질 FAME 혼합물 (C14-C22, 37종, Supelco, USA)을 heptane에 용해시켜 사용하여 지방산 37종의 retention time을 기준으로 지방산 종류를, 지방산 함량은 내부표준물질(internal standard, ISTD) pentadecanoic acid (C15:0, Sigma, USA)을 기준으로 크로마토그램 상에서 검출된 ISTD의 피크 면적에 대한 각 성분 피크 면적으로 정량하였다.

루테인 분석

동결 건조된 각 시료를 대상으로 루테인 산화 방지를 위하여 pyrogallol (> 99%, Sigma, USA)이 첨가된 ethanol을 넣어준 뒤 초음파 추출한 다음 60% KOH 넣어 진탕 항온수조에서 $75^\circ C$, 100rpm 조건으로 1시간 비누화 반응을 시켰다. 찬물을 이용하여 냉각 후 2% NaCl과 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT)를 포함하는 추출 용매 n-hexane과 ethyl acetate 혼합액(85:15, v/v)을 첨가하여 vortex로 완전히 혼합하고 상층액 회수 단계까지 3번 반복하여 추출하였다. 회수된 추출액을 HPLC 바이알 병에 옮겨 질소가스를 이용하여 건조 농축시킨 후 이동상으로 용해하였다. Membrane filter를 이용하여 추출물을 여과한 후 Ultimate 3000 (Dionex, USA) HPLC과 VDSpher 100C18-E ($4.6mm \times 250mm$, $5 \mu m$, Germany)을 사용하여 분석하였다. 이동상 유속은 $1 ml/min$, 시료 주입

량은 $10 \mu l$ 로 조정 하였으며, 루테인 검출은 최종 $425nm$ 에서 실시하였다. 표준물질 루테인(Sigma, USA)은 적정 농도로 희석하여 표준 용액 조제 후 검량 곡선을 작성하여 루테인 함량을 산출하였으며, 분석 시스템 (Chromeleon Ver. 6.8 Chromatography Data Software, Dionex, USA)을 이용하였다.

결과 및 고찰

빠른 증식속도와 배양이 용이한 미세조류는 산업적 비용 절감 차원에서 배양조건을 최적화하여 항산화 소재를 포함한 유용물질을 증가시켜 고부가가치 소재로 활용하고 있다. 본 연구진은 *C. protothecoides*의 혼합영양 배양 시스템을 통해서 GABA 생성 증가를 보고하였고 [22], 동일 조건에서 *C. protothecoides*의 지방산 조성을 gas chromatography(GC)로 분석하였다. 그 결과 Table 1과 같이 총 19종의 지방산이 분석되었으며 불포화지방산 (UFA)이 총지방산의 대부분인 약 72%를 차지하였다. 단일불포화지방산(MUFA)의 조성비가 49.084%, 포화지방산(SFA)과 다가불포화지방산(PUFA)이 27.927%와 22.989% 순으로 나타났다. 주요 구성 지방산은 oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0)로, oleic acid 함량이 총 지방산 대비 48.402%로 가장 높고, linoleic acid와 palmitic acid가 각각 19.839%와 18.863%로 총 지방산의 약 87%를 차지하였다. SFA 분석 결과, 미세조류에서 합성되는 대표적 지방산 C16-C18인 palmitic acid, stearic acid, margaric acid가 다수를 차지하였으며, palmitic acid가 주요 지방산을 차지하였다 [11]. 또한, 식물류에서 높은 특이성을 보이는 linoleic acid가 본 연구진의 지방산 분석 결과에서도 높게 나타났으며, n6:n3 분석 결과 약 6.4:1로 n-6 비율이 높은 식물성 유지인 대두유 (6.6)와 비슷한 값을 가진다 [23, 39].

바이오디젤 품질 좌우는 Palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 지방산 조성과 밀접한 관계가 있으며 다량의 oleic acid는 산화안정성과 저온유동성이 높아, 전환 공정을 통해 바이오디젤 원료에 유리하다 [6, 7, 29]. 따라서, 혼합영양 배양한 *C. protothecoides*의 지방산 조성과 함량 분석을 통해 바이오디젤 생산에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

Table 1. Fatty acid contents and compositions identified in extracts from pre- and post-milking of *C. protothecoides* grown in culture during 7 days.

Fatty acid	Common name	Fatty acid contents					
		Pre-milking		2 nd Post-milking			
		Whole layer		Whole layer		Decan layer	
		(mg/g d.w)	(%)	(mg/g d.w)	(%)	(mg/g d.w)	(%)
Saturated Fatty Acid (SFA)							
6:0	Caproic acid	0.418	0.331	0.438	0.367	0.000	0.000
10:0	Capric acid	0.110	0.087	0.136	0.114	0.017	2.029
12:0	Lauric acid	0.040	0.031	0.038	0.032	0.003	0.358
14:0	Myristic acid	0.308	0.243	0.289	0.242	0.003	0.358
16:0	Palmitic acid	23.847	18.863	22.521	18.871	0.197	23.508
18:0	Stearic acid	9.903	7.833	9.261	7.760	0.022	2.625
20:0	Arachidic acid	0.138	0.109	0.140	0.117	0.002	0.239
22:0	Behenic acid	0.160	0.126	0.146	0.122	0.002	0.239
23:0	Tricosanoic acid	0.095	0.075	0.080	0.067	0.000	0.000
24:0	Lignoceric acid	0.290	0.229	0.268	0.225	0.000	0.000
Total SFA		35.307	27.927	33.317	27.917	0.246	29.356
Monounsaturated Fatty Acid (MUFA)							
16:1(n-9)	Palmitoleic acid	0.712	0.563	0.668	0.560	0.016	1.909
18:1(n-9)	Oleic acid	61.191	48.402	57.688	48.339	0.299	35.680
20:1(n-9)	Eicosenoic acid	0.151	0.119	0.122	0.102	0.003	0.358
Total MUFA		62.054	49.084	58.478	49.001	0.318	37.947
Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA)							
18:3(n-3)	α -Linolenic acid	3.925	3.105	3.705	3.105	0.148	17.661
20:4(n-3)	Eicosatetraenoic acid	0.025	0.019	0.037	0.031	0.000	0.000
Total n-3		3.950	3.124	3.742	3.136	0.148	17.661
18:2(n-6)	Linoleic acid	25.081	19.839	23.763	19.912	0.126	15.036
20:2(n-6)	Eicosadienoic Acid	0.032	0.025	0.041	0.034	0.000	0.000
Total n-6		25.113	19.864	23.804	19.946	0.126	15.036
Total PUFA		29.063	22.989	27.546	23.082	0.274	32.697
Total USFA		91.117	72.073	86.024	72.083	0.592	70.644
n6:n3 ratio		6.358	6.358	6.361	6.361	0.851	0.851
Total FA		126.424	100.000	119.341	100.000	0.838	100.000

USFA: Unsaturated Fatty Acid
d.w: dry weight, %: % of total fatty acids

이들 혼합영양 배양에서의 지방산 분석 결과를 바탕으로 세포벽에 물리적인 타격을 주지 않는 범위 내에서 안정적으로 2차 대사산물을 포함한 지용성 물질을 추출하기 위하여 밀킹 방법을 적용한 연속 재배양 장치인 OPBR을 제작하였다 (Fig. 1). 실험 방법에서 보여주는 바와 같이 OPBR은 배양할 미세조류의 생물학적 및 생리학적 특성에 맞게 최적화할 수 있는 유연한 시스템으로서 온도, 혼합, 산소 등의

배양조건과 오염 방지 등 성장 요인을 잘 제어할 수 있는 장점이 있다 [27]. 또한, 증발 방지와 이산화탄소 손실을 감소시켜 미세조류 세포 수를 증가시켜, 최적의 생산성을 가질 수 있는 환경을 제공한다. 따라서, 이러한 장점을 바탕으로 본 연구진이 제작한 OPBR을 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

밀킹이 *C. protothecoides*의 성장에 미치는 영향 및 밀킹 후 연속 재배양 가능 여부를 알기 위하여 세포비

파괴적 방법으로 지질을 쉽게 용해시키는 유기용매인 데칸을 처리하였다. 유용물질을 추출하기 위하여 *C. protothecoides*의 생장곡선 정체기에 혼합배양액에 데칸을 동량 첨가하여 10분, 150rpm으로 반응시켰다. 밀킹 후 *C. protothecoides*를 포함하는 배양액(하층) 50%를 새로운 배양장치에 이동 후 50% 혼합영양 배양 배지 첨가와 함께 7일 동안 1차 연속 재배양하면서 *C. protothecoides* 세포 수를 측정하였다. 측정 후 8일째에 다시 밀킹을 재수행하고 *C. protothecoides*를 포함하는 배양액(하층)을 회수하여 배양기에서 동일 방법으로 7일 동안 2차 연속 재배양하면서 *C. protothecoides* 세포 수를 대조구와 함께 측정하였다. 그 결과, 밀킹 전 즉, 대조구의 *C. protothecoides* 혼합영양 배양 시 초기 배양 후 2~7일 동안 세포가 급격히 증가하였으나, 밀킹 후 회수된 1, 2차 연속 재배양 장치의 *C. protothecoides*의 혼합영양 배양 시 세포 생장은 대조구의 배양과는 다른 낮은 비성장 속도를 보였다(Fig. 2). 즉, 배양시간이 경과 함에 따라 대조구 1일과 7일 차의 세포 농도는 2.2×10^7 cells/ml에서 16.6×10^7 cells/ml로 높은 성장률을 보인 반면 1·2차 재배양에 의한 *C. protothecoides*의 세포 농도는 각각 6.4×10^7 cells/ml에서 10.1×10^7 cells/ml, 6.8×10^7 cells/ml에서 9.2×10^7 cells/ml로 대조구와 비교해서 상대적으로 낮은 성장률을 보였다.

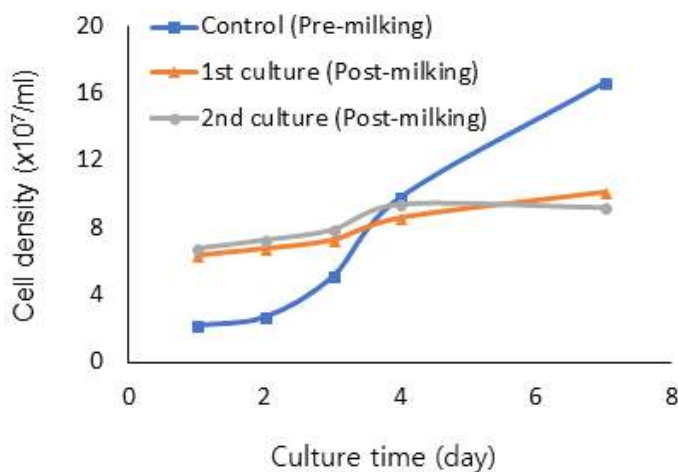


Figure 2. Growth rate of *C. protothecoides* sample in continuous culture during 7 days.

밀킹 후 *C. protothecoides*의 연속 재배양 시 대조구와 비교되는 낮은 성장률로 인해 지방산 조성 및 함량 변화를 알아보기 위하여 연속적으로 2차 밀킹

후 데칸층(상층)과 2차 연속 재배양한 *C. protothecoides*를 회수하여 지방산 조성 및 함량을 측정하였다. 그 결과, 밀킹 전후 *C. protothecoides*의 지방산 조성에는 변화가 없고 총 지방산 함량만이 126.424mg/g d.w.에서 119.341mg/g d.w.으로 감소하였다. 이는 밀킹 후 배양시간에 따른 *C. protothecoides*의 상대적으로 낮은 성장률 및 생장이 느려지면서 세포 내 지질이 축적된 것으로 사료 된다. 2차 연속 재배양한 *C. protothecoides*의 총 지방산 함량 분석 결과는 MUFA(49.001%)>SFA(27.917%)>UFA(23.082%) 순으로 나타났다(Table 1). 또한, 주요 구성 지방산 조성 등을 포함하여 n-6:n-3 ratio=6.4:1 등 함량비가 밀킹 전과 비슷하였다.

밀킹 후 데칸층에서 지방산 분석 결과 지방산 총 함량은 0.838mg/g d.w.으로 지방산이 소량으로 적게 추출되었다. 지방산 함량비는 MUFA(37.947%)>UFA(32.697%)>SFA(29.356%) 순으로 주요 지방산은 oleic acid(35.680%), palmitic acid(23.508%), α -linolenic acid(17.661%), linoleic acid(15.036%)였으며, 데칸층 지방산 총 지방산 함량 대비 91.89%를 차지하였다(Table 1). 밀킹 후 데칸층 주요 지방산으로 분석된 oleic acid와 linoleic acid는 식물유지의 주성분으로 유채기름에는 22%와 55%, 대두유 22%와 55%, 옥수수유 26%와 60%를 각각 차지한다 [19].

α -Linolenic acid (ALA, ω -3)와 linoleic acid(LA, ω -6)는 식물에서 합성되며, 사람과 동물에서 합성되지 않는 필수지방산으로, ω -3는 심혈관과 뇌혈관 질환 개선 등 혈중지질농도를 개선시키는데 반해 ω -6는 생체 내 불포화 과정에 의해 DHA로 전환되는 지방산으로 관상동맥질환을 방지, 항염증효과, 항혈전 효과가 보고되어 있다 [2, 17, 36, 37]. 본 연구진의 밀킹 결과 데칸층에서 n-6:n-3 ratio는 0.85:1로 밀킹 전의 6.4:1과 차별되는 결과를 보여주었으며, n-6:n-3 비율의 편중은 심혈관 질환 및 염증과 자가 면역 질환 발생 원인으로 보고되어 있어 밀킹 처리를 통한 균형 있고 유의한 지방산 함량 확보가 가능할 것으로 판단된다. 미세조류 혼합영양 배양에 따른 지방산 함량 연구는 광독립과 중속영양 배양보다 연구가 아직은 미진한 실정이다. 따라서, 이들 혼합영양 배양법의 최적화를 통한 유용물질의 대량생산 연구가 필요하다.

7일 동안 혼합배양한 *C. protothecoides*에서 밀킹을 통해 데칸층 아래 하층부에 있는 클로렐라를 포함

한 배양액을 회수할 수 있는 연결관을 장착하여 클로렐라 배양액을 회수하여 새로운 배양장치로 이동시킨

후, 혼합영양 배양을 첨가하여 연속 재배양한 단계별 실험 과정 모식도를 Fig. 3과 같이 간단히 정리하였다.



Figure 3. Flow diagram of continuous culture system through milking of *C. protothecoides* grown in culture during 7 days

연속 재배양을 통하여 *C. protothecoides* 에서 비수용성으로 유기용매에 잘 녹는 항산화 소재 활성 물질인 루테인을 추출하기 위하여 밀킹 전과 1·2차 재배양 7일 후 밀킹 실험하여 얻은 데칸층 및 2차 연속 재배양된 클로렐라 전체 배양액을 회수하여 루테인 함량을 HPLC로 비교 분석하였다. 그 결과는 Table 2와 같으며 1·2차 밀킹 후 데칸층의 루테인 함량은 각각 0.02mg/g d.w.와 0.15mg/g d.w.으로 2차 밀킹 후 루테인 함량이 약간 감소를 나타내었다 이는 밀킹 후

1·2차 연속 재배양한 세포 성장곡선 즉, 세포 수 때문일 것으로 사료 된다(Fig. 2). 루테인은 공액이중결합 구조이기 때문에 열과 빛에 매우 불안정한 것으로 보고되고 있다 [9]. 밀킹 전 대조구와 2차 밀킹 후 재배양한 것을 회수하여 루테인 함량을 계산한 결과 각각 0.258mg/g d.w.와 0.178mg/g d.w.로 밀킹 후 감소되었다. 현재 클로렐라로부터 루테인 함량 증가를 위한 고품량 균주 개발 및 배양기술에 대한 생산 관련 등의 여러 연구가 보고되고 있다 [5, 24, 33].

Table 2. Lutein contents identified in extracts from pre- and post-milking of *C. protothecoides* grown in culture during 7 days.

Lutein contents (mg/g d.w)			
Pre-milking	Post-milking		
Whole layer	Whole layer	Decan layer	
	(2 nd final culture)	(1 st Post-milking)	(2 nd Post-milking)
0.258	0.178	0.020	0.150

d.w: dry weight

바이오에너지 생산을 위해 국가별 해당 부존자원을 이용하고 있는데 미국은 옥수수, 브라질 사탕수수 등을 바이오에탄올로 이용하고 있으며, 독일은 유채씨를 이용하여 바이오디젤을 많이 생산하고 있다. 그러나 옥수수, 콩, 유채, 팥 등 식물 경우 대규모 경작 과정에서 많은 양의 물소비 및 식량, 사료 가격 경쟁 문제가 있어 새로운 소재 발굴 개발이 절실히 요구된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 광합성이 가능한 *C. protothecoides*를 대상으로 배양조건에 따른 밀킹을 통한 연속 배양으로 재생 가능한 미세조류 바이오연료 획득에 기여할 수 있을 것으로 사료 된다. 이들 결과를 바탕으로, 세포에 손상을 주지 않는 범위 내에서 *C. protothecoides*에 밀킹 실험하고 유기용매 아래층을 회수하여 연속적으로 재배양하는 시스템을 제시하였다. 이 시스템을 통해 혼합 영양 배양조건에서 연속적으로 바이오매스를 획득함과 동시에 바이오디젤 생산에 효과적으로 활용될 수 있을 것이며 루테인을 포함한 카르테노이드계 물질의 지속적 생산 가능성을 확인하였다.

결 론

기존에 *C. protothecoides*의 배양조건을 최적화하여 고부가가치 유용성 물질을 증가시키고 살아있는 미세조류를 연속적으로 재순환 배양하기 위하여 실험실 규모의 배양장치에 밀킹 후 유기용매 하층부의 클로렐라를 포함한 배양액을 회수하여 연속적으로 재배양하는 OPBR 장치를 제작하였다. OPBR 장치를 이용하여 혼합 배양조건에서 성장한 *C. protothecoides*의 지방산 분석 결과 UFA가 총 지방산의 약 72%를 차지하였으며, MUFA(49.084%)>SFA(27.927%)>PUFA(22.989%) 순으로 나타났다. 주요 구성 지방산은 oleic acid(48.402%)>linoleic acid(19.839%)>palmitic acid(18.863%)로 바이오디젤 생산에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다. OPBR 장치를 이용하여 데칸 유기용매로 밀킹 하였고, 밀킹한 *C. protothecoides*를 회수하여 연속 재배양하는 시스템으로 바이오매스를 연속적으로 얻을 수 있도록 개발하였다. 이 시스템을 통하여 밀킹 전후 클로렐라 배양액의 지방산 조성에는 변화가 없는 반면 함량에 작은 변화를 보였다. 밀킹 전과 1·2차 밀킹 후 연속

배양한 *C. protothecoides*의 총 지방산과 총 루테인 함량 분석 결과 각각 126.424mg/g d.w.에서 119.341mg/g d.w, 0.258mg/g d.w에서 0.178mg/g d.w.으로 밀킹 전보다 조금 감소하였다. 그러나, 본연구 결과 미량으로 존재하는 루테인을 클로렐라에서 유기용매인 데칸을 처리하여 연속적으로 획득 가능성을 확인하였다. 따라서, 최적의 배양조건으로부터 밀킹에 따른 효율적 추출과 연속 배양을 통한 바이오매스 생산 증가 및 카르테노이드계 물질의 산업적 이용을 높이고 클로렐라로부터 카로티노이드 제품화에 기여 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 중소기업 기술혁신개발사업 과제(Project No. S2083787)의 지원으로 수행된 연구로, 이에 감사드리며 지방산 및 루테인 분석을 도와주신 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM) 분석팀에 감사드립니다.

References

1. Bone, R. A., Landrum, J. T. and Tarsis, S. L. 1985. Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision Res.* **25**, 1521-1535.
2. Burdge, G. 2006. Metabolism of α -linolenic acid in humans. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty acids.* **75**, 161-168.
3. Canter, C. E., Blowers, P., Handler, R. M. and Shonnard, D. R. 2015. Implications of widespread algal biofuels production on macronutrient fertilizer supplies: Nutrient demand and evaluation of potential Alternate Nutrient Sources. *Appl. Energy.* **143(1)**, 71-80.
4. Chojnacka, K. and Marquez-Rocha, F. J. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Bio-Technol.* **3**, 21-34.
5. Cordero, B. F., Obratsova, I., Couso, I., Leon, R. Vargas, M. A. and Rodriguez, H. 2011. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine Drugs.* **9**, 1607-1624.
6. Fakhry, E. M. and Maghraby, D. M. 2013. Fatty acids composition and biodiesel characterization of *Dunaliella salina*. *J. Water Resour. Protect.* 894-899.
7. Farooq, W., Lee, Y. C., Ryu, B. G., Kim, B. H., Kim,

- H. S., Choi, Y. E. and Yang, J. W. 2013. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresour. Technol.* **132**, 230-238.
8. Gale, C. R., Hall, N. F., Phillips, D. I. and Martyn, C. N. 2001. Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract. *Ophthalmology* **108**, 1992-1998.
9. Gao, Y. X., Nagy, B., Liu X, Simandi., B. and Wang, Q. 2009. Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *J. Supercrit. Fluids* **49**, 345-350.
10. Garcés, R. and Mancha, M. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methylester preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* **211(1)**, 139-143.
11. Gong, Y. M. and Jiang, M. L. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1269-1284.
12. González, S., Astner, S., An, W., Goukassian, D. and Pathak, M. A. 2003. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. *J. Invest Dermatol.* **121**, 399-405.
13. Granado, F., Olmedilla, B. and Blanco, I. 2003. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.* **90**, 487-502
14. Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I. and Rojas-Hidalgo, E. 1992. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetable. *J. Agr. Food Chem.* **40**, 2135-2140.
15. Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G. and Pollio, A. 2013. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food Funct.* **4**, 144-152.
16. Guedes, A. C., Amaro, H. M. and Malcata, F. X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs.* **9**, 625-644.
17. Gurr, M. I., Harwood, J. L. and Frayn, K. N. 2002. Lipid Biochemistry 5th (eds). Blackwell Science Oxford.
18. Hejazi, M. A. and Wijffels, R. H. 2004. Milking of microalgae. *Trends Biotechnol.* **22**, 189-194.
19. Hou, C. T. 2005. Production of value-added industrial products from vegetable oils, In Handbook of Industrial Biocatalysis, C. T. Hou (Eds), CRC Press, Boca Raton. pp 7-1.
20. 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.
21. Huerlimann, R., de Nys, R. and Heimann, K. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* **107(2)**, 245-257.
22. Jeong, Y. J., Kim, S. H., Min H. G. and Kim S. C. 2018. The content analysis of amino acids including GABA of *Chlorella protothecoides* under mixotrophic culture. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **10(1)**, 18-25.
23. Kamal-Eldin, A. and Andersson, R. 1997. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 375-380.
24. Li, H. B., Jiang, Y. and Chen, F. 2002. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1070-1072.
25. Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1043-1049.
26. Mares-Perlman, J. A., Millen, A. E. and Ficek, T. L., Hankison, S. E. 2002. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutr.* **132**, 518S-524S.
27. Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14(1)**, 217-232.
28. Pittman, J. K., Dean, A. P. and Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* **102(1)**, 17-25.
29. Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L. and Pérez, A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* **100**, 261-268.
30. Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Ación, F. G., Rueda, A. and Pérez-Parra, J. 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochem.* **43**, 398-405.
31. Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J. and Posten, C. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* **1**, 20-43.
32. Semba, R. D. and Dagnelie, G. 2003. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health. *Med. Hypotheses.* **61**, 465-472.
33. Shi, X., Wu, Z. and Chen, F. 2006. Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 763-768.
34. Shi, X., Zhang, X. and Chen, F. 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 312-318.
35. Shi, X. M., Jiang, Y. and Chen, F. 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* **18**, 723-727.

36. 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.
37. Spector, A. A. 1999. Essentiality of fatty acids. *Lipids.* **34**, S1-S3.
38. Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., Zhu, H. and Manolis, T. 2004. Separation of geometric isomers of native lutein esters in marigold (*Taget Eserecta L.*) by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1045**, 65-70.
39. van Niekerk, P. J. and Burger, A. E. C. 1985. The estimation of the composition of edible oil mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 531-538.
40. Wang, C., Kim, J. H. and Kim, S. W. 2014. Synthetic biology and metabolic engineering for marine carotenoids : new opportunities and future prospects. *Mar. Drugs.* **12**, 4810-4832.