

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.1.014>

ISSN 2383-5400 (Online)

오메가-3 지방산 및 푸코잔틴 고함량 토착 규조류 아크난티디움 균주의 분리 및 특성

Isolation and Characterization of Indigenous Marine Diatom *Achnantheidium* sp. BS-001 Producing a high Content of Omega-3 Fatty Acid and Fucoxanthin Production

김우림^{1,2}, 조대현¹, 허진아^{1,2}, 김희식^{1,2*}

Urim Kim^{1,2}, Dae-Hyun Cho¹, Jina Heo^{1,2}, Hee-Sik Kim^{1,2*}

¹한국생명공학연구원 세포공장연구센터, 대전광역시 유성구 과학로 125, 34141, 대한민국

²과학기술연합대학원대학교 환경바이오공학, 대전광역시 유성구 가정로 217, 34113, 대한민국

¹Cell Factory Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), 124 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Republic of Korea

²A Department of Environmental Biotechnology, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology(UST), 217 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Republic of Korea

(Received 28 May 2019, Revised 17 June 2019, Accepted 18 June 2019)

Abstract Omega-3 fatty acids and carotenoids, which are known as representative high-value substances derived from microalgae, are being studied from various diatoms. Most of the diatoms contain fucoxanthin and omega-3 fatty acid. Fucoxanthin produced by diatom has been reported as bioactive compounds exhibiting strong antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities. However, the low growth rate and fucoxanthin content of diatoms are one of the big obstacles to the industrial application. In this study, indigenous marine diatom *Achnantheidium* sp. BS-001 was isolated for a candidate of fucoxanthin producer. Light intensity and temperature for the culture of *Achnantheidium* sp. BS-001 were optimized on PhotoBiobox. Optimization of silicate concentration for increasing BS-001 biomass productivity was confirmed in F/2 medium with various concentration of sodium silicate. As a result, condition of light intensity, temperature, and silicate concentration for optimal cultivation were $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 18°C and 0.106 mM , respectively. Maximum biomass productivity reaches to $154.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, and then the content of omega-3 fatty acids and fucoxanthin were $19.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $9.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. These results indicate that *Achnantheidium* sp. BS-001 has the potential to be used as a source of omega-3 fatty acids and fucoxanthin.

Keywords : Diatom, *Achnantheidium* sp., omega-3 fatty acid, fucoxanthin

서 론

미세조류는 식품 및 건강기능식품 산업의 자원으로

로서 고부가 물질을 생산하는 공급원으로 주목 받고 있다[21]. 광합성 생물인 미세조류는 높은 지질 함량 및 다양한 광합성 색소를 포함하고 있는 것으로 보

* Corresponding author
Phone: +82-42-860-4326 Fax: +82-42-860-4594
E-mail: hkim@kribb.re.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/>)

고되고 있다. 특히 대표적인 미세조류 유래의 고부가 물질로 알려진 오메가-3 지방산 및 카로티노이드는 다양한 종으로부터 연구가 진행되고 있다[18].

오메가-3 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosapentaenoic acid (DPA)는 인체 건강에 유익하며, 태아가 적절하게 발달할 수 있도록 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 이러한 물질들은 경증 알츠하이머병과 관련된 다양한 심혈관계 기능, 체중 및 인지 기능에 영향을 미칠 수 있다[5]. 그러나 이러한 오메가-3 지방산은 체내에서 자체적으로 생산할 수 없기 때문에 식품의 형태로 섭취해야 한다[15]. 그러한 이유로 건강 식품 형태의 오메가-3 지방산 소비가 세계적으로 증가하고 있다. 기존의 EPA 및 DPA는 대부분 어류를 통하여 공급받고 있었으나, 해양 오염과 야생 어종의 고갈이라는 문제로 인하여 대체 공급원인 미세조류의 연구가 더욱 가속화 되고 있다[1]. 일부 미세조류는 높은 수준의 EPA, DPA 등의 오메가 지방산을 생합성 하고 축적할 수 있어 미세조류를 이용한 오메가 지방산의 생산은 기존 공급원의 문제를 해결할 수 있고 대체 가능하며 유망한 접근법이다[20]. 해양 미세조류인 *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum* sp., *Thalassiosira* sp., *Schizochytrium* sp., 그리고 *Cryptocodinium* sp. 등은 오메가 지방산의 원료로서 다양한 연구가 진행되고 있다[11].

미세조류는 오메가 지방산뿐만 아니라 다양한 건강상의 이점을 가지고 있는 카로티노이드를 생산한다[22]. 특히 규조류에 의해 생산되는 카로티노이드 중 하나인 푸코잔틴(fucoanthin)은 항산화, 항염증, 항암, 및 항비만 효과를 비롯한 다양한 효능을 가지고 있으며, 복부 지방 조직을 감소시키는 기능이 있어 석류 종자유와 푸코잔틴이 함유된 식이요법을 통해 비만 여성의 체중을 통계적으로 유의하게 감소시킬 수 있다는 결과가 발표되었다[14]. 이러한 건강상의 이점을 고려할 때, 푸코잔틴은 영양 기능 식품으로 활용될 잠재력이 있다. 현재까지 푸코잔틴을 생산한다고 알려진 규조류는 *Phaeodactylum* sp., *Odontella* sp., *Isochrysis* sp., *Cyclotella* sp., 그리고 *Chaetoceros* sp. 등이 있다[12,13,21].

해양 규조류는 높은 수준의 오메가-3 지방산 및 푸코잔틴의 함량으로 주목을 받고 있지만 낮은 성장

률로 인한 생산성 저하는 이러한 물질들의 생산에 가장 큰 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 규조류의 배양 최적화 연구, 지방산 및 카로티노이드의 함량 증대 방법, 그리고 생산성 높은 새로운 해양 규조류 자원이 요구되고 있다.

이 연구에서는 국내 토착 환경에서 신규 규조류 *Achnanthisdium* sp.를 분리 및 동정하였고, 규조류 성장의 주요 요인인 광량, 온도 그리고 배지의 규소함량의 최적 조건을 분석하여 바이오매스, 오메가-3 지방산 그리고 푸코잔틴의 생산성을 분석하였다. 이 결과를 바탕으로 기존 오메가-3 지방산 및 푸코잔틴 생산 균주와 비교를 통해 새로운 공급원으로서 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

대한민국 부산 태종대 앞 바닷물에서 시료를 채취하고 이를 Combi 514 (Hanil, Korea)를 이용하여 원심 분리(3000 rpm, 20 min) 방법으로 농축하였다. 농축한 바닷물 시료를 마이크로피펫팅(micropipetting) 방법을 통하여 각각의 미세조류로 분리하였다. 분리된 미세조류는 멸균된 F/2배지가 첨가된 5 L 크기의 병에서 25°C, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광원 하에서 100 rpm으로 배양되었다. 분리된 미세조류는 광학현미경 (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Japan)과 형광현미경 (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Japan), 그리고 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)(Jeol, Japan)으로 관찰되었으며, 이를 통하여 형태학적 동정을 하였다.

분리된 미세조류의 동정을 위하여 유전학적 방법이 사용되었다. 18S rRNA 염기서열 분석 실험이 진행되었으며, DNA 추출 키트(iNtRON, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 18S rRNA 염기서열 분석을 위하여 프라이머 쌍 D512F (5'-ATTCCAGCTCC AATAGCG-3')와 D978R (5'-GACTACGATGGTATC TAATC-3')이 사용되었으며[3], 해당 DNA의 일부를 Taq DNA 중합효소(Takara, Japan)를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭시켰다(GeneAmp PCR system2700, ABI, USA). PCR 조건으로는 초기 변성(pre-denaturation)이 95°C에서 5분간 1회 진행되었으며, 그 후 94°C, 59°C, 그

리고 72°C에서 변성(denaturation), 결합(annealing) 그리고 확장(extension)이 각각 30초씩 30회 반복되었다. 마지막으로 최종 신장(post-elongation)이 72°C에서 7분간 진행되었다. 염기서열 분석은 솔젠트(주)에 의뢰하여 수행되었으며, 분석한 DNA의 염기서열을 NCBI blast 프로그램으로 동정하였다.

최적 배양 조건 탐색

배양 최적화는 광량과 배양 온도를 대상으로 분석하였다. 광량은 백색 LED를 이용하여 광량 0~250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 온도 10~26°C 범위에서 96 well plate에 200 μL F/2 배지 용량으로 PhotoBiobox를 이용하여 배양하였다[9]. 배양 7일 후, Tecan plate reader를 이용하여 흡광도 680 nm에서 최적 조건을 확인하였다.

균체 생산

규조류의 균체 생산을 위해 2 L 광생물반응기(Photobioreactor)를 이용하여 규조류의 바이오매스를 생산하였다. 배양에 사용된 배양 배지는 F/2배지에 다양한 규소 농도를 $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 의 형태로 공급 해주었다[19]. 규소의 농도는 구체적으로 0 mM (F/2), 0.058 mM (F/2-1x Si), 0.106 mM (F/2-2x Si), 그리고 0.174 mM (F/2-3x Si)의 농도로 조정하였고 광량 및 온도 최적 조건에서 120 rpm의 속도로 교반하여 7일 간 배양을 수행하여 세포건조중량(dry cell weight)으로 미세조류의 성장을 확인하였다.

지질 함량 분석

지질의 추적 확인을 위해 형광염색 방법을 수행하였다. 염색에 사용된 시약은 Nile red이며, 이를 이용하여 중성지질을 염색하였다. Nile red 염색은 아세톤에 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 Nile red 가루를 용해시킨 용액을 1 mL의 BS-001 배양액에 1 μL 를 넣고 약 1분간 혼합하여 반응시켰다. 반응 후 Nikon Eclipse (Nikon, Japan) 형광 현미경을 이용하여 Nile red 염색을 확인한다. 모든 실험 과정은 빛이 없는 곳에서 진행되었다.

총 지질 추출 방법은 Bligh and Dyer method를 변형하여 사용하였다[2]. 비교를 위하여 미세조류 연구에 주로 사용되는 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*와 본 연구에 사용된 균주인 *Achnantheidum* sp. BS-001, 그리고 하루 동안 규소 제한 상태에서 반응한 *Achnantheidum* sp. BS-001을

클로로포름 및 메탄올을 2:1로 혼합한 용매에서 지질을 추출한 뒤 무게를 측정하여 지질의 총 함량을 확인하였다. 약 5.0×10^7 cell No./mL 정도의 배양액 10 mL를 4000 rpm, 20분간 원심 분리하여 균체를 모은 후 15 mL의 추출 용매(chloroform:methanol = 2:1)를 첨가하여 초음파파쇄기(ultrasonicator)를 이용하여 5분간 세포를 파쇄 하였다. 그 후 funnel shaker에서 300 rpm으로 15분간 지질을 추출하고 추출된 용액에 증류수 10 mL를 첨가하여 원심분리 하였다. 이 때 유기 용매와 물 층으로 분리 되는데, 분리된 유기용매 층을 유기용매용 PTFE (polytetrafluoroethylene) 필터(0.2 μm , Watman, UK)로 여과하여 세포의 잔해물을 제거하였다. 세포의 잔해물이 제거된 시료를 20 mL 유리병에 넣고 회전감압농축기(rotary vacuum evaporator)를 이용하여 유기용매를 완전히 증발시킨 후 건조된 오일의 무게를 측정하여 세포의 건조 중량 대비 지질의 함량(오일의 무게/세포 건조 중량 $\times 100$)을 계산하였다.

지방산 조성 분석

분리된 균주로부터 fatty acid methyl ester (FAME) 분석을 실시하였다. 배양한 균주로부터 추출한 지질을 메틸화 하여 분석하였다. BS-001의 배양액 5 mL를 4000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 미세조류 균체를 모은 후 유리 튜브에 옮겨 비누화 시약(saponification, NaOH 45 g, methanol 150 mL, 증류수 150 mL) 1 mL를 첨가하였다. 미세조류 균체가 잘 분산되도록 vortexing 시킨 후, 100°C에서 5분간 반응 시키고 다시 vortexing 후 25분간 100°C에서 반응 시켰다. 반응시킨 시료의 온도를 상온 정도로 낮아지게 한 후 메틸화 시약(methylation, 6 N HCl 325 mL, methanol 275 mL)을 2 mL 넣은 후 혼합하여 80°C에서 10분간 반응 시킨 후 빠르게 냉각 시켰다. 냉각된 반응물에 추출 용매(extraction, hexane 200 mL, methyl tert-butyl ether 200 mL)를 1.25 mL 넣어 10분간 funnel shaker로 교반하여 FAME을 추출하였다. 마지막으로 추출 용매를 3 mL 넣어 세척한 후 시료에서 1 mL를 취하여 PTFE 유기 용매 필터를 이용하여 거른 후 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC) 분석용 유리병으로 옮겼다. C17 내부표준물질(international standard, Fluka) 50 μL 를 첨가하여 분석용 샘플을 제작하였다[16].

FAME 분석은 GC (Shimadzu GC-2010, Japan)를 이용하였으며, wax column (Zebron, ZB-WAX, 최고 온도: 250°C, phenomenex, USA)과 FI detector (flame ionization detector, 최고 온도: 300°C)를 사용하여 FAME를 검출하였다. 검출을 위해 주입된 용량은 1 µL였고, 총 검출 시간은 25분으로 한정하였다. FAME 분석을 위한 표준물질로서 Supelco의 FAME mix 18918 (C8-C24)를 사용하였다. 각 샘플의 피크 지점과 표준물질의 피크 지점을 상대 비교한 뒤, 반응 조건에 따른 FAME의 값을 정량하였다.

색소 조성 분석

Achnanthydium sp. BS-001의 색소 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 수행하였다. 건조된 미세조류 균체 2.3 mg을 갈색 튜브에 취하여 100% ethanol 1 mL과 silica bead를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 30초 씩 두 번, 1분간 세포를 파쇄 하여 색소를 추출하였다. 30초의 bead beating 후 얼음에 튜브를 넣어 주어 열에 의한 색소 변성을 방지한 후 다시 한 번 bead beating 과정을 반복하는 방식으로 진행되었다. 추출한 시료를 13,000 rpm으로 1분간 원심 분리 하여 상층액과 bead를 분리하였고, 분리된 상층액을 1 mL NORM-JECT syringe (Henke-Sass Wolf, Germany)와 유기용매용 PTFE 필터를 사용하여 분리 및 여과하였다. 여과된 추출물은 HPLC 분석용 유리병에 옮겨졌으며, Agilent technologies사의 HPCL 기기(1260 Infinity, Agilent technologies, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석을 위하여 20 µL의 시료가 주입되었으며, 25분간 분리가 진행되었다. 이 때 사용된 컬럼은 Waters SHERISORB 5 µm ODS1 4.6×250 mm Analytical Column (Waters, USA)이 사용되었고 컬럼의 온도는 40°C로 설정하였다. 색소를 분리하기 위하여 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (15%), acetonitrile (84%), methanol (2%)을 혼합한 용매를 0-15분간 흘려주었으며 methanol (68%)과 ethyl acetate (32%)를 혼합한 용매를 15~19분간 흘려주었다. 그 후 6분간 처음 시작할 때의 용매와 동일한 용매를 사용하여 post-run 하였다. 용매와 시료는 분당 1.2 mL의 속도로 컬럼 내에 유입되었으며, 분리된 색소는 Agilent technologies사의 detector (Infinity 1260, Agilent technologies, USA)를 사용하여 분석하였고, 표준물질 fucoxanthin (Supelco), diadinox-

anthin (Supelco), β-carotene (Sigma-aldrich), chlorophyll-a (Supelco)의 정량곡선에 의해 미세조류 추출물의 색소 함량을 분석하였다[10].

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

분리된 미세조류를 형태학적으로 동정한 결과 폭은 5 µm, 길이는 10 µm 그리고 두께는 2.5 µm이었으며, 직사각형의 형태로(Figure 1) 규조류 땅콩돌말과의 *Achnanthydium brevipes*와 매우 유사한 형태임을 확인하였고, 크기는 작은 변종으로 예상된다. *A. brevipes*는 한국의 하수, 기수 그리고 연안에서 발견되는 종으로 보고되어 있다[8].

분리된 규조류의 18S rRNA 유전자 부분 염기서열 분석을 통해 계통수를 분석 한 결과 가장 상동성이 높은 규조류는 98%의 *Parlibellus harffianus*로 확인되었으나, 크기 및 형태가 분리된 BS-001과 차이가 확인하여 최종 *Achnanthydium* sp. BS-001 (KM892970)로 명명하였다.

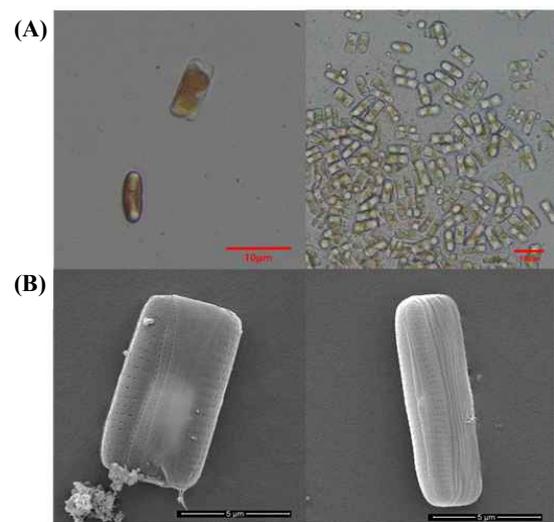


Figure 1. Morphological analysis (A) optical microscope and (B) electron microscope images

최적 배양 조건 탐색

PhotoBiobox를 이용하여 분리된 *Achnanthydium* sp. BS-001의 최적 광량 및 온도를 분석하였다. 광량 및 온도 분석 모두 96 well plate에서 4 반복으로 진행되었으며, 균체 증가는 초기 OD 값을 제외하여 계산하였다. 최적 광량 조건을 확인하기 위해 기존에 알려

진 규조류의 배양 온도인 18°C에서 광량 0, 50, 100, 150, 200 그리고 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 배양하여 680 nm에서 OD를 측정하여 최적 광량을 분석하였다. 분리된 규조류 *Achnanthisdium* sp. BS-001의 성장을 위해서 광은 매우 중요한 조건이었다. 배양 7일 후, 증가한 OD 값으로 측정된 바이오매스 생산은 광량 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 매우 미비하였다. 하지만 저광량인 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서도 균체 생산은 급증하였고, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 OD 0.126으로 최대 균체량을 확인하였다(Figure 2A). 최적 광량 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 온도조건 10, 15, 18, 22, 그리고 26°C에서 최적 온도 조건을 확인한 결과 10~22°C는 15% 내외로 18°C에서 가장 높은 OD 0.114의 균체량을 확인하였고, 26°C에서는 급감하여 OD 0.054의 균체량을 확인하였다(Figure 2B). 이 결과를 통해 분리된 *Achnanthisdium* sp. BS-001은 광량 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 온도 18°C가 미세조류 성장을 위한 최적 조건임을 확인하였다.

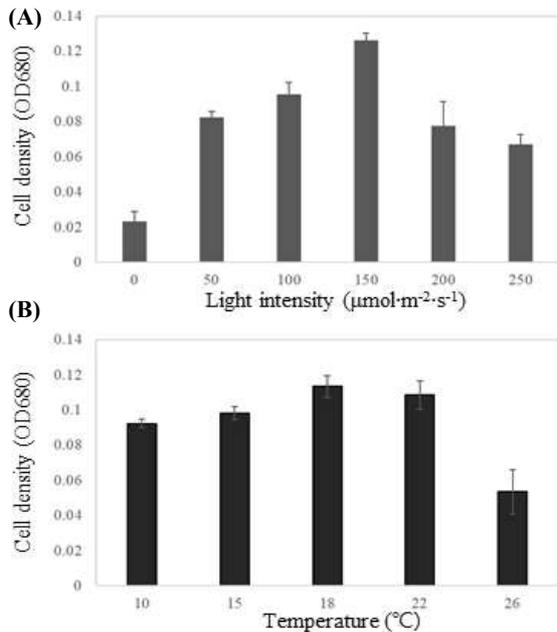


Figure 2. Optimization of culture condition (A) light intensity (B) temperature

규소 농도 최적화 및 생산성 분석

최적 광량 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 최적온도 18°C의 조건에서 최대 균체 생산성에 도달하기 위해 다양한 규소농도로 2 L PBR를 이용하여 *Achnanthisdium* sp. BS-001의 배양을 수행하였다. 배양 기간은 총 7일로 4가지의 다른 농도의 규소를 포함한 F/2배지를 이용

하였으며 매일 DCW를 측정하여 성장선을 작성하였다(Figure 3A). 규소를 첨가해준 배지의 경우 1 일째까지는 비슷한 세포 밀도를 보였지만, 3 일째부터 그 차이가 확연히 보이기 시작하였다. 배양 5 일까지는 규소를 3배 넣어준 배지(F/2-3x Si)에서 가장 높은 세포 농도를 보이지만, 최종 균체량은 규소를 2배 넣어준 배지(F/2-2x Si)에서 균체량 1.08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 세포 농도가 역전하는 것을 확인하였다.

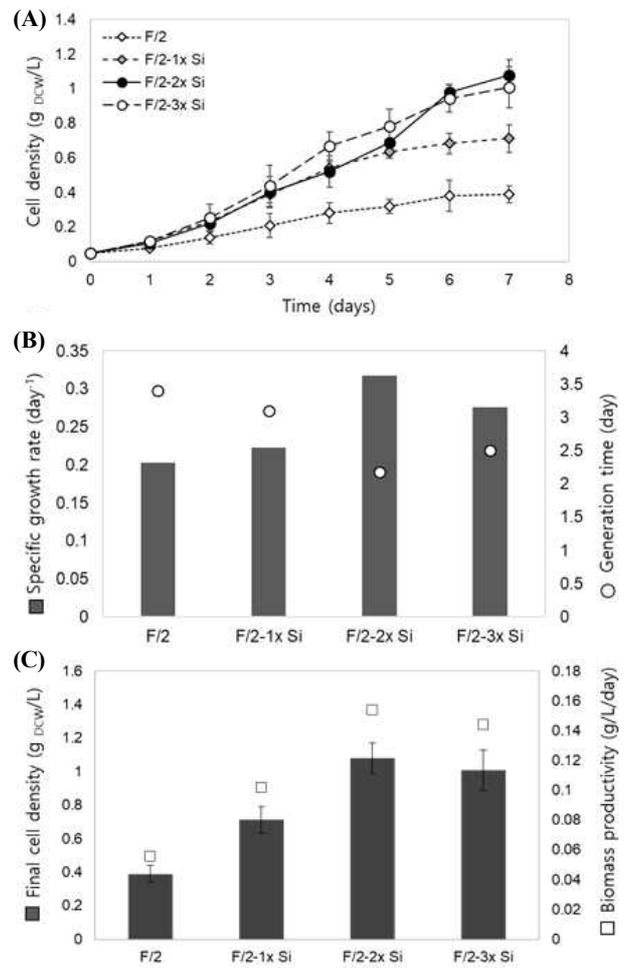


Figure 3. Cultivation under various silicate concentration (A) cell density (B) specific growth rate and generation time and (C) final cell density and biomass productivity

이때 각각의 최종 세포 밀도는 F/2배지 0.39 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (F/2), F/2-1x Si배지 0.71 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 그리고 F/2-3x Si배지는 1.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 였다(Figure 3A). DCW의 세포 농도를 바탕으로 비성장속도(specific growth rate)를 분석한 결과, 규소를 2배 넣어준 배지(F/2-2x Si)에서 0.32 day^{-1} 로 가장 높은 것을 확인하였으며,

규소를 넣어주지 않은 배지(F/2)에 비하여 1.6배로 *Achnanthisdium* sp. BS-001의 배양을 위해 규소의 농도가 중요한 것을 확인하였다. 이때 배가 시간 (generation time)은 2.18 day로 균체의 배가를 위해 가장 적은 시간이 요구되는 것을 확인하였다(Figure 3B). 균체 생산성은 각각 0.05 g·L⁻¹·day⁻¹ (F/2), 0.10 g·L⁻¹·day⁻¹ (F/2-1x Si), 0.15 g·L⁻¹·day⁻¹ (F/2-2x Si), 0.14 g·L⁻¹·day⁻¹ (F/2-3x Si)였다(Figure 3C). 위의 결과를 바탕으로 본 균주를 배양하기 위하여 규소는 농도는 성장을 위해 매우 중요하지만, 적정량 이상의 규소를 첨가할 경우 오히려 미세조류의 생장이 저해되는 것을 확인하였다.

균주의 지질 생산

Achnanthisdium sp. BS-001의 지질 함량을 분석한 결과, 총 지질의 함량이 28%로 다른 오일 생산을 위해 많은 연구가 진행 중인 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*에 비하여 17%, *Chlorella vulgaris*에 비하여는 약 33%가량 높은 것을 확인하였다(Figure 4A). 성장률이 낮은 규소 제한 배지에서는 지질 함량 38%로 지질의 함량이 규소를 포함한 배지에서보다 36% 증가하였다. 또한 Nile red 염색법을 통하여 중성 지질의 양을 확인한 결과 규소 제한 조건에서 *Achnanthisdium* sp. BS-001의 중성 지질이 크게 증가한 것이 관찰되었다(Figure 4B).

균주의 FAME 조성

Achnanthisdium sp. BS-001의 지방산(FAME) 성분을 분석한 결과, 균체 생산성이 가장 높은 F/2-2x Si에서 탄소 16개의 지방산인 palmitic acid (C16), palmitoleic acid (C16:1), hexadecadienoic acid (C16:2) 그리고 hexadecatrienoic acid (C16:3)가 전체 지방산의 64% 정도로 존재하였으며, 오메가-3 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA) 14%, docosapentaenoic acid (DPA) 8%로 높은 함유량을 보였다(Figure 4C). 규소 제한 배지(F/2)에서 배양한 경우에는 주요 지방산인 palmitoleic acid (C16:1)가 47%에서 33%로 감소하였지만, 오메가-3 지방산인 EPA와 DPA가 각각 15%, 30% 증가하였다. 오메가-3 지방산의 전체 함량은 규소 제한 조건에서 21% 증가한 것을 확인하였다. 지질의 생산성과 오메가-3 지방산의 생산성을 분석한 결과 규소 농도 0.106 mM 배지(F/2-2x Si)에서 각각

43.2 mg·L⁻¹·day⁻¹, 8.3 mg·L⁻¹·day⁻¹로 규소를 제한한 배지(F/2)에서 배양했을 경우인 21.1 mg·L⁻¹·day⁻¹, 4.9 mg·L⁻¹·day⁻¹보다 2배가량 높은 생산성을 확인하였다(Table 2).

오메가-3 지방산과 오메가-6 지방산의 비율은 오메가 지방산 제품의 질에 매우 중요한 지표로서 오메가-6 지방산을 오메가-3 지방산에 비하여 많이 섭취할 경우 여러 가지 병을 일으키는 원인이 될 수 있다. 따라서 오메가-3 지방산에 대한 오메가-6 지방산의 비율은 적절한 오메가 지방산의 가치의 척도로 활용될 수 있다[17]. *Achnanthisdium* sp. BS-001의 오메가-3 지방산에 대한 오메가-6 지방산의 비율을 비교해 보았을 때, BS-001의 ω3/ω6의 값이 1.37~1.74로 적절한 오메가 지방산 공급원으로서의 잠재력을 가지고 있음을 알 수 있다(Table 1)[6].

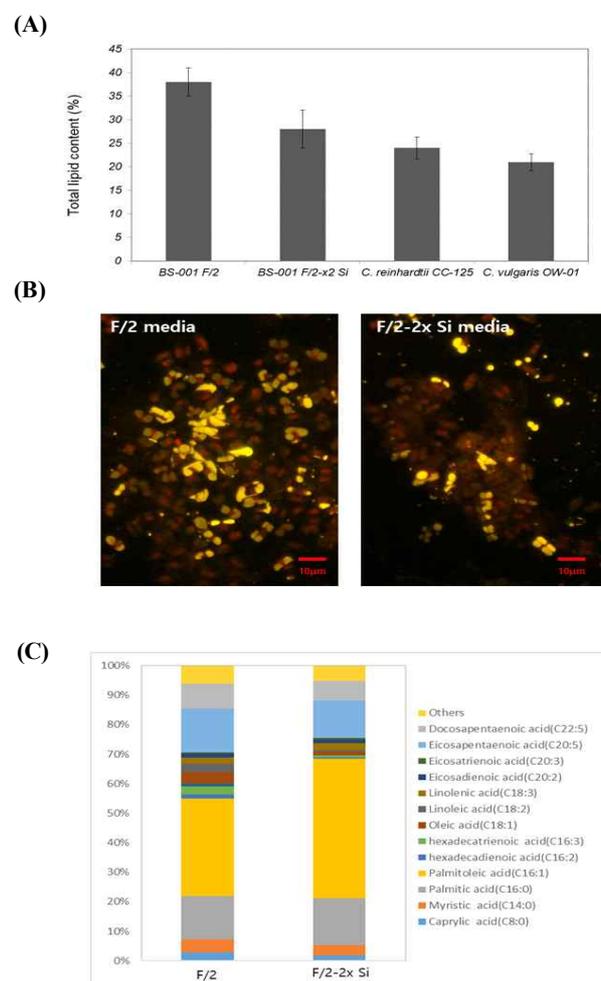


Figure 4. Lipid analysis of *Achnanthisdium* sp. BS-001 (A) total lipid content, (B) Nile red staining and (C) FAME composition

Table 1. Comparison of SFA, MUFA, and omega fatty acids with other marine microalgae

Saturates (%)	SFA	MUFA	PUFA	omega-6	omega-3	ω3/ω6	References
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	49.88	16.87	31.37	3.96	12.91	3.25	Su et al.(2017)
<i>Isochrysis galbana</i>	32.56	25.97	41.48	4.45	21.52	4.87	Su et al.(2017)
<i>Skeletonema costatum</i>	40.45	9.65	49.89	3.59	6.06	1.7	Su et al.(2017)
<i>Odontella sinensis</i>	36.27	13.26	50.11	2.37	11.26	4.77	Su et al.(2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	41.83	26.54	31.63	3.96	20.58	5.7	Su et al.(2017)
<i>Saccharina japonica</i>	46.23	31.2	22.57	23.49	3.31	0.14	Su et al.(2017)
BS-001 F/2	22.2	37.22	40.57	17.06	23.5	1.37	<u>This study</u>
BS-001 F/2-2x Si	21.23	48.19	30.58	11.17	19.41	1.74	<u>This study</u>

카로티노이드 분석

Achnanthisdium sp. BS-001의 색소를 HPLC로 분석한 결과, 규소 농도에 의한 색소 함량의 차이는 존재하지 않았다. 푸코잔틴이 전체 색소의 50%로 가장 많은 양을 차지하였다. 그 다음으로는 베타카로틴이(β-carotene) 14%, 클로로필-a (chlorophyll-a)가 7%, 다이아디노잔틴(diadinoxanthin)이 6%의 함량을 보였고, 동정되지 않은 색소는 총 23%를 차지하였다(Figure 5A). 전체 카로티노이드의 72%가 푸코잔틴으로 가장 높은 수치를 보였으며, 베타카로틴이 20%, 다이아디노잔틴이 8%를 차지하는 것을 확인하였다(Figure 5B). 푸코잔틴의 생산성은 바이오매스 생산성이 가장 높은 규소농도 0.106 mM에서 0.14 mg·L⁻¹·day⁻¹로 확인되었다(Table 2). 보고된 다른 규조류와 BS-001의 카로티노이드 함량과 푸코잔틴의 함량을 비교한 결과는 Table 3에 정리하였다. 푸코잔틴 함량이 보고된 다른 *Achnanthisdium* sp.는 확인되지 않았다. BS-001의 푸코잔틴 양은 보고된 규조류가 포함하는 푸코잔틴 함량에 비해 매우 높은 함량을 포함하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 *Achnanthisdium* sp. BS-001이 푸코잔틴을 포함한 카로티노이드의 생산을 위해 활용될 가능성을 시사한다.

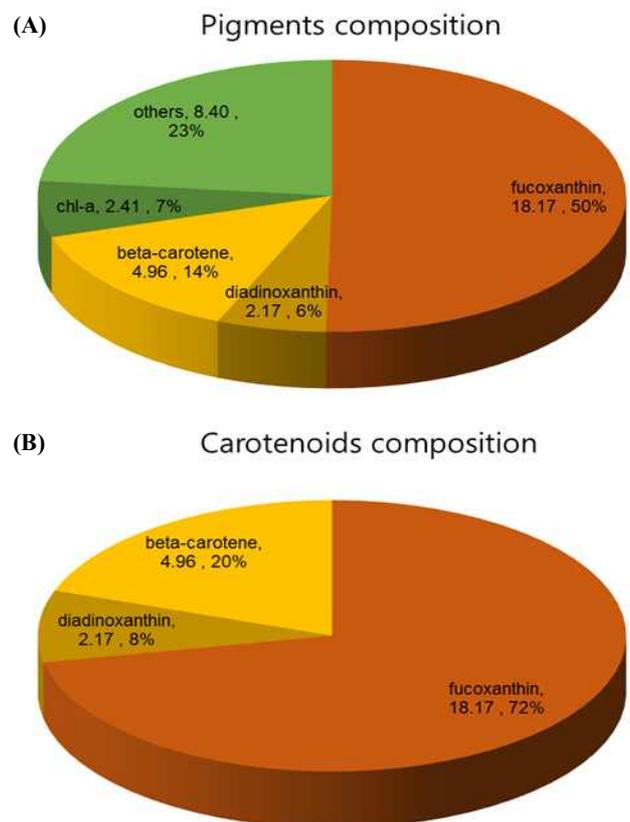


Figure 5. Pigment analysis of *Achnanthisdium* sp. (A) pigments composition and (B) carotenoid composition

Table 2. Summary of biomass, omega-3 fatty acid and Fucoxanthin productivity

Silicate concentration	Maximum cell density (g·L ⁻¹)	Biomass productivity (g·L ⁻¹ ·day ⁻¹)	Omega 3-fatty acid productivity (mg·L ⁻¹ ·day ⁻¹)	Fucoxanthin productivity (mg·L ⁻¹ ·day ⁻¹)
F/2 (0 mM)	0.39	0.05	4.9	0.05
F/2-2x Si (0.106 mM)	1.01	0.05	8.3	0.14

Table 3. Comparison of total carotenoids and fucoxanthin content with other diatoms

Species	Total carotenoid content (mg·g ⁻¹ DCW)	Fucoxanthin content (mg·g ⁻¹ DCW)	References
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	6.13	5.13	Su et al.(2017)
<i>Isochrysis galbana</i>	4.33	2.19	Su et al.(2017)
<i>Skeletonema costatum</i>	0.97	0.36	Su et al.(2017)
<i>Odontella sinensis</i>	2.66	1.18	Su et al.(2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.18	0.07	Su et al.(2017)
<i>Saccharina japonica</i>	0.05	0.03	Su et al.(2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-	8.55	Kim et al.(2012)
<i>Chaetoceros gracilis</i>		2.24	Kim et al.(2012)
<i>Isochrysis galbana</i>		6.04	Kim et al.(2012)
<i>Nitzschia sp.</i>		4.92	Kim et al.(2012)
<i>Achnanthisp.</i> BS-001	12.57	9.05	<u>This study</u>

결 론

본 연구는 국내 연안에서 분리된 새로운 규조류 *Achnanthisp.* BS-001의 배양을 위한 광량, 온도 그리고 배지 내의 규소함량을 최적화하여 성장률 및 바이오매스 생산성을 분석하였고, 확보된 균체에서 오메가-3 지방산 및 푸코잔틴을 포함한 색소의 함량을 분석하여 생산자로서의 가치를 평가한 연구로, 최적 배양 조건에서 규소의 함량에 따른 바이오매스 생산성 및 푸코잔틴과 오메가 3-지방산의 함량을 분석하였다. 바이오매스 생산성은 규소 농도 0.106 mM에서 154.3 mg·L⁻¹·day⁻¹로 규소 제한 조건과 비교하여 2.8배 높은 생산성을 확인하였고, 오메가 지방산과 푸코잔틴의 생산성 역시 규소 농도 0.106 mM에서 각각 8.3 mg·L⁻¹·day⁻¹, 0.14 mg·L⁻¹·day⁻¹로 규소 제한 조건에서보다 높은 수치를 보였다. 본 연구를 통해 *Achnanthisp.* BS-001의 바이오매스, 오메가-3 지방산 그리고 푸코잔틴 생산성 연구는 기존의 *Achnanthisp.*의 고부가 소재 생산을 위한 연구가 매우 미비한 환경에서 학문적으로 연구 가치가

높으며, 본 균주의 푸코잔틴 및 오메가-3 지방산의 함량은 기존의 보고된 규조류의 함량보다 높아 오메가-3 지방산 및 푸코잔틴을 활용하는 산업 분야에 새로운 생산자로서 산업적인 가치도 높다는 것을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2019년 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 (재)차세대 바이오매스 연구단-2015M3A6A2065697 (글로벌프린터터사업), 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업 (25150184), 한국생명공학연구원(www.kribb.re.kr)의 주요사업 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall, S.R., Lim, D.K.Y. & Schenk, P.M. 2014. Effects of long chain fatty acid synthesis and associated gene expression in microalga *Tetraselmis sp.* *Mar. Drugs.* **12**, 3381–98.

2. Blich, E.G. & Dyer, W.J. 1959. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–7.
3. Cho, D.H., Choi, J.W., Kang, Z., Kim, B.H., Oh, H.M., Kim, H.S. & Ramanan, R. 2017. Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater. *Sci. Rep.* **7**, 1–11.
4. Delbrut, A., Albina, P., Lapierre, T., Pradelles, R. & Dubreucq, E. 2018. Fucoxanthin and polyunsaturated fatty acids co-extraction by a green process. *Molecules.* **23**, 1–15.
5. Dyall, S.C. 2015. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front. Aging Neurosci.* **7**, 1–15.
6. Foo, S.C., Yusoff, F.M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S.K., Khong, N.M.H., Chan, K.W. et al. 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *J. Biotechnol.* **241**, 175–83.
7. García, J.L., de Vicente, M. & Galán, B. 2017. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1017–24.
8. Gyeongje J. 2012. Algal flora of Korea. In: National Institute of Biological Resources (eds), Freshwater Diatoms V. vol 3 no. 7, *National Institute of Biological Resources : Ministry of Environment*, pp 13-15
9. Heo, J., Cho, D.H., Ramanan, R., Oh, H.M. & Kim, H.S. 2015. PhotoBiobox: A tablet sized, low-cost, high throughput photobioreactor for microalgal screening and culture optimization for growth, lipid content and CO₂ sequestration. *Biochem. Eng. J.* **103**, 193–7.
10. Heo, J., Shin, D.S., Cho, K., Cho, D.H., Lee, Y.J. & Kim, H.S. 2018. Indigenous microalga *Parachlorella* sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productivity via regulation of light intensity and carbon source. *Algal Res.*
11. Mahabaleswar V. Hegde, Anand Arvind Zanwar, Sharad P. Adekar. 2016. Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health, *Humana Press*, pp 109.
12. Kim, S.M., Jung, Y.J., Kwon, O.N., Cha, K.H., Um, B.H., Chung, D. & Pan, C.H. 2012a. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1843–55.
13. Kim, S.M., Kang, S.W., Kwon, O.N., Chung, D. & Pan, C.H. 2012b. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **55**, 477–83.
14. Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F. & Wang, J.H. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs.* **9**, 1806–28.
15. Opinion, S. 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* **8**, 1–107
16. Sasser, M. 1987. Identification of bacteria by gas chromatography. *Forum Mikrobiol.* **10**, 341–3.
17. Simopoulos, A.P. 2003. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Rev. Nutr. Diet.* **92**, 1–22.
18. Tsai, H.P., Chuang, L. Te & Chen, C.N.N. 2016. Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chem.* **192**, 682–90.
19. Velasco, L.A., Carrera, S. & Barros, J. 2016. Isolation, culture and evaluation of *Chaetoceros muelleri* from the Caribbean as food for the native scallops, *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **44**, 557–68.
20. Ward, O.P. & Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* **40**, 3627–52.
21. Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q. & Zhang, C. 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *odontella aurita*. *Mar. Drugs.* **11**, 2667–81.
22. Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T. & Chen, F. 2014. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food Funct.* **5**, 413–25.