

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.1.023>

ISSN 2383-5400 (Online)

저온 생장성이 우수한 분리 미세조류 *Tetraselmis* sp. 5개주의 생장 패턴 및 지방산 조성 분석

Isolation and Characterization of Five Isolates of *Tetraselmis* sp. with Rapid Growth Rates in Low Temperatures

박한울^{1,2†}, 허동희^{1†}, 신동우^{1,2}, 김지훈³, 홍성주^{1,2}, 임상민^{1,2}, 이철균^{1,2*}

Hanwool Park^{1,2}, Donghee Hoh², Dong-Woo Shin^{1,2}, Z-Hun Kim³, Seong-Joo Hong^{1,2}, Sang-Min Lim^{1,2}, Choul-Gyun Lee^{1,2*}

¹해양바이오에너지 생산기술개발연구센터, 인하대학교, 인천광역시, 22212, 대한민국

²해양과학·생물공학과, 인하대학교, 인천광역시, 22212, 대한민국

³국립낙동강생물자원관, 상주시, 경상북도, 37242, 대한민국

¹Marine Bioenergy R&D Consortium, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

²Department of Marine Science & Biological Engineering, Incheon 22212, Republic of Korea

³Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongsangbuk-do 37242, Republic of Korea

† Both authors contributed equally to this work

(Received 30 May 2019, Revised 17 June 2019, Accepted 18 June 2019)

Abstract For successful microalgal biodiesel production, the strain should be selected carefully. Fast growth rate and high fatty acid contents are desired traits for algal biodiesel production. In ocean cultivation of microalgae, seawater temperature slowly changes over seasons, and rotating algal strains in accordance with their optimal temperature could improve overall productivity. Additionally, use of indigenous strain is preferred to alleviate potential impacts on the environment. In this study, five strains of *Tetraselmis* sp. from nearshore of Youngheung Island, Incheon, Korea, were isolated during winter and characterized for their growth patterns and fatty acid compositions in the low temperatures (5 - 15°C). The five strains showed various characteristics in optimal growth temperature, fatty acid contents, and compositions. Compared with a strain of *Tetraselmis* sp., isolated from Ganghwa island in a previous study, a rapid-growing strain with 237% higher biomass productivity and an oleaginous strain with twice higher fatty acid contents at 10°C were isolated. The oleaginous *Tetraselmis* strain showed the highest fatty acid productivity among the strains, having 438% higher productivity than the previous strain. Using the new isolates in the seasons with low seawater temperature would improve microalgal fatty acid productivity in ocean cultivation.

Keywords : Microalgae, Biodiesel, Ocean Cultivation, *Tetraselmis*, Marine Algae

서론

산업혁명 이래 수십 년간 지속된 화석연료의 사

용으로 급격하게 높아진 대기 중 이산화탄소에 의해 자연재해가 심화되는 등 기후 변화에 따른 피해가 증가하고 있어 재생가능하고 지속가능한 대체

* 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/>)

에너지원의 개발이 필요하다 [1]. 바이오에너지는 바이오매스의 생산 과정에서 광합성을 통해 이산화탄소를 지질 등 고분자물질로 합성하기 때문에 탄소중립적인 대체에너지로 평가받고 있다. 또한, 바이오디젤의 경우 현존하는 내연기관과 정유 산업의 기반시설을 사용할 수 있고, 에너지밀도가 높은 점에서 다른 대체에너지원과 차별적인 장점을 가지고 있다 [3]. 현재 상용화 되어있는 팜유, 대두유와 같은 바이오디젤 원료들은 대규모 경작지 확보를 위한 열대우림의 파괴, 비료, 물, 경작지 등 자원 사용에 대해서 식량 생산과 경쟁관계라는 단점이 있어 장기적인 지속가능성이 떨어진다는 지적이 대두되어 왔다 [7]. 이에 대한 대안으로 생산성이 우수하고, 바닷물과 오·하수를 활용할 수 있고, 생산에 경작지를 필요로 하지 않는 미세조류가 대체 바이오에너지 원료로 각광받아 많은 연구가 이루어져 왔다 [6].

미세조류 대량 배양 기술 중 해양 배양 기술은 넓은 배양 면적 확보, 안정적인 온도, 농업에 사용할 수 없는 바닷물의 사용, 파도에 의한 배양액 혼합, 바닷물의 부력에 의한 구조물 지지 등의 장점으로 환경 친화적이고 지속 가능한 미세조류 바이오매스 공급을 가능케 할 수 있다 [2,5,6]. 항산화물질 등 고부가가치 제품을 생산하기 위한 기존의 미세조류 육상 대량 배양에서는 한 낮에 배양 온도가 높아지는 것을 방지하기 위해 냉각을 하는 등 높은 생산성을 위해 배양 온도를 조절하는데 에너지를 사용하게 된다. 해양 배양의 경우 바닷물의 높은 비열로 인해 배양 온도의 일일 변화가 매우 작아 이러한 온도 조절이 필요하지 않다. 하지만, 대한민국과 같이 사계절의 온도 변화가 뚜렷한 기후대에서는 바닷물의 온도가 몇 개월에 걸쳐 서서히 변해 겨울과 봄에는 15°C이하로 수온이 내려가 통상적으로 바이오디젤 생산에 사용되는 *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* 등의 미세조류 종 들은 생산성이 낮아져 바이오매스 생산성이 감소한다 [9].

또한, 미세조류 해양 배양에서는 태풍과 폭풍 등에 의해 배양기가 파손될 경우 배양하던 미세조류가 환경으로 바로 유출될 수 있기 때문에 외래종을 사용할 경우 생태계에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 해양 배양이 이루어지는 바다에서 자생하고 있는 미

세조류 중 중 바이오디젤 생산에 유리한 형질, 즉 빠른 성장성과 높은 지방산 함량을 가진 종을 선별하여 사용하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 대한민국 인천광역시 영흥도에 위치한 해양 실증 배양장에서 미세조류 대량 배양에 사용할 균주, 특히 우수한 저온 성장성과 지질 합성 능력을 보유하여 수온이 낮은 봄, 겨울에도 사용이 가능한 균주를 분리하고, 지방산 함량과 조성을 분석하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

대한민국 인천광역시 영흥면에 위치하는 영흥도 인근 해역에 설치되어있는 해양 실증 배양장에서 겨울철에 바닷물을 채취하여 미세조류 균주 들을 분리하였다. 자세한 미세조류 중 분리 방법은 선행 연구에 기재되어있다 [9].

균주의 동정

선별된 균주들의 동정은 18S rDNA의 염기서열 분석을 통해 이루어졌다. DNA 분리 키트 (DNeasy Plant Minit Kit, Qiagen)를 이용하여 배양된 미세조류 세포에서 지놈 DNA를 추출하고, Table 1의 염기서열을 가진 primer를 이용해 18S rDNA를 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭시켰다. PCR은 pfu DNA 중합효소 (PrimeStar HS DNA Polymerase, TAKARA)를 사용하였고, template로는 미세조류 세포에서 추출한 지놈 DNA 40 ng을 사용하였다. 증폭된 18S rDNA 단편의 염기서열은 마크로젠 (Seoul, Korea)에서 분석되었다. 미국 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 선별된 균주들을 동정하였고, Genbank에서 다른 미세조류 종의 18S rDNA를 얻어 Clustal Omega를 이용해 phylogenetic tree를 만들었다.

Table 1. Sequences of Primers Used for Amplification of 18S rDNA

Direction	Sequence
Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

바이오매스 농도 분석

미세조류 배양액의 바이오매스 농도 분석은 Coulter Counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 통해 세포 농도와 부피를 측정 후, 실험적으로 결정된 젖은 세포 중량과 건조 세포 중량의 비율을 이용해 계산하여 결정하였다.

미세조류 배양 실험

저온에서 바이오매스 및 지방산 생산성이 높은 균주를 선별하기 위하여 선행연구에서 강화도에서 분리되었던 해양 미세조류 *Tetraselmis* sp. MBEgh01L (KCTC12236BP) 균주를 대조균으로 사용하여 5°C, 10°C, 15°C에서 배양 실험을 수행하였다. 배양기로는 스폰지로 마개를 한 250 ml 삼각 플라스크를 사용하였고, MBL 배지에 3배 농도의 f/2 배지를 첨가한 용액 100 ml를 배지로 사용하였다 [9]. 초기 바이오매스 접종 농도는 0.03 g/L, 세포 농도로는 9.1×10^4 cells/ml이었고, 진탕 배양기에서 130 rpm으로 교반하고 형광등을 사용해 $35 \pm 5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도로 24시간 연속적으로 빛을 조사해주었다. 바이오매스 생산성은 배양 종료 후의 바이오매스 농도에서 접종 농도를 뺀 뒤 배양 기간으로 나누어 계산하였다.

바이오매스 지방산 함량 및 조성 분석

선별된 균주들의 바이오매스 내 지방산 함량 및 조성 분석을 위해 10°C 배양 실험 종료 후 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 통해 바이오매스를 수확하였다. 수확된 바이오매스는 잔류 염분을 제거하기 위해 탈이온수를 사용해 2회 세척한 후, -20°C에서 12시간 동안 냉동한 뒤, 동결건조 되었다. 동결 건조된 바이오매스에 황산과 메탄올을 첨가하여 전이에스테르화반응을 시킨 뒤 *n*-헥산 추출을 통해 지방산 메틸에스테르를 수득하여 이를 가스크로마토그래피 (Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용해 바이오매스 내 지방산 함량과 조성을 분석하였다. 전이에스테르화반응과 추출, 가스크로마토그래피 분석 방법은 선행 연구에 자세히 기술되어있다 [9].

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

선형 분리하여 얻은 순수한 미세조류 콜로니 들을

24 well plate에서 2 ml의 변형 f 배지에 접종하고 10°C에서 배양하여 가장 빠르게 성장하는 5종을 선별하였다. 선별된 균주들을 100 ml 부피로 규모를 키워 지놈 DNA 추출 및 18S rDNA 염기서열 분석을 위한 바이오매스를 수득하였다. NCBI의 BLAST를 이용해 균주들의 18S rDNA의 염기서열을 분석한 결과, 신규 5개 균주 모두 *Tetraselmis striata*와 근연 관계에 있는 *Tetraselmis* 속에 속하는 균주들로 동정되었고, 대조균인 *Tetraselmis* MBEgh01L과는 유연관계가 상대적으로 먼 것으로 파악되었다 (Figure 1). 이들 중 지방산 함량이 높은 2개 균주를 *Tetraselmis* sp. MBEyh01L (KCTC12429BP), MBEyh02L (KCTC12430BP)로 명명하였고, 저온 성장성이 우수한 3개 균주들을 MBEyh03Gc (KCTC12431BP), MBEyh04Gc (KCTC12432BP), MBEyh05Gc (KCTC12433BP)로 명명하였다. 선행 연구에서도 강화도에서 저온 성장성이 우수한 균주로 *Tetraselmis* sp. MBEgh01L (KCTC12236BP) 균주가 분리되었지만, 다른 연구에서는 5 종류의 *Tetraselmis* 균주가 6°C에서 낮은 성장성을 보여 모든 *Tetraselmis* 속의 미세조류들이 우수한 저온 성장성을 가진다고는 할 수 없을 것이다 [4].

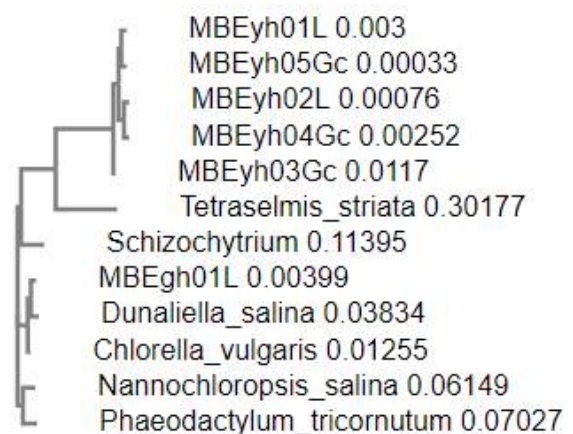


Figure 1. Phylogenetic Analysis of the 18S rDNA of New *Tetraselmis* sp. Isolates.

신규 *Tetraselmis* sp. 균주들의 저온 성장성

모든 영흥도 유래 신규 *Tetraselmis* 균주 들이 5°C - 15°C 범위에서 대조균 보다 높은 바이오매스 성장성을 보였다 (Figure 2). 5°C에서 11일의 배양기간 동안 대조균인 MBEgh01L 균주는 0.12 g/L(4.2×10^5 cells/ml)의

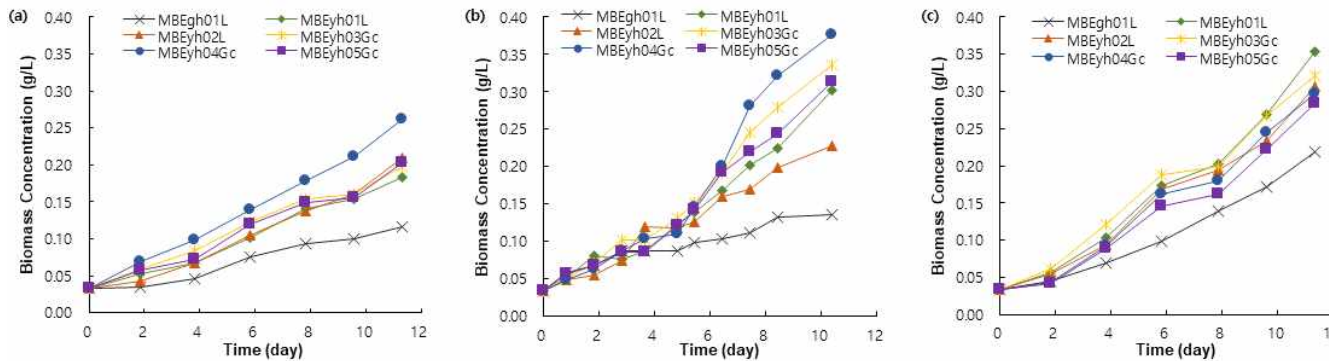


Figure 2. Time Profiles of Biomass Concentrations of *Tetraselmis sp.* Strains at (a) 5°C, (b) 10°C, and (c) 15°C.

최고 농도에 도달한 반면, MBEyh04Gc 균주는 0.26 g/L(9.5×10^5 cells/ml)에 도달하였고, MBEyh03Gc, MBEyh02L, MBEyh05Gc 균주들이 0.20 g/L(7.4×10^5 cells/ml)의 농도, MBEyh01L 균주가 신규 균주 중 가장 낮은 0.18 g/L(1.4×10^6 cells/ml)의 농도에 도달하였다. MBEyh04Gc 균주는 10°C에서도 10일의 배양기간 동안 가장 높은 0.38 g/L의(7.4×10^5 cells/ml) 농도에 도달하였고, MBEyh03Gc, MBEyh05Gc, MBEyh01L, MBEyh02L MBEgh01L 균주 순으로 최종 농도가 낮아졌다. 15°C에서는 더 낮은 온도에서와의 결과와는 달리 11일의 배양기간 동안 MBEyh01L 균주가 가장 높은 농도인 0.35 g/L(1.3×10^6 cells/ml)에 도달하였고, MBEyh03Gc, MBEyh02L, MBEyh04Gc, MBEyh05Gc, MBEgh01L 순으로 최종 농도가 낮아졌다.

각 균주의 바이오매스 생산성을 배양 온도에 대하여 그래프를 도시한 결과, 균주마다 온도에 대한 반응이 다른 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 5°C와 10°C에서는 MBEyh04Gc 균주가 각각 20.2, 32.9 mg/L/d의 바이오매스 생산성으로 7.4, 9.8 mg/L/d의 바이오매스 생산성을 보인 대조군에 비해 2.7배, 3.4 배 높은 수치를 나타내었다. 15°C에서의 바이오매스 생산성은 MBEyh01L 균주가 28.2 mg/L/d로 16.3 mg/L/d의 대조군보다 1.7배 높았다. MBEgh01L와 MBEyh02L 균주는 배양 온도가 5°C에서 15°C 증가함에 따라 계속 바이오매스 생산성이 증가하는 것으로 미루어 최적 성장 온도가 15°C 이상일 것으로 사료된다. MBEyh01L 균주도 바이오매스 생산성이 본 연구의 실험 범위 내에서는 계속 증가하였지만, 그 증가 폭이 MBEgh01L, MBEyh02L 균주보다 작아 해당 균주들 보다는 낮은 온도에 최적 배양 온도가 위

치할 것으로 추산된다. MBEyh04Gc, MBEyh03Gc, MBEyh05Gc 균주들은 15°C에서의 바이오매스 생산성이 10°C보다 낮아 5~15°C 사이에 최적 배양 온도가 존재하는 것으로 판단된다.

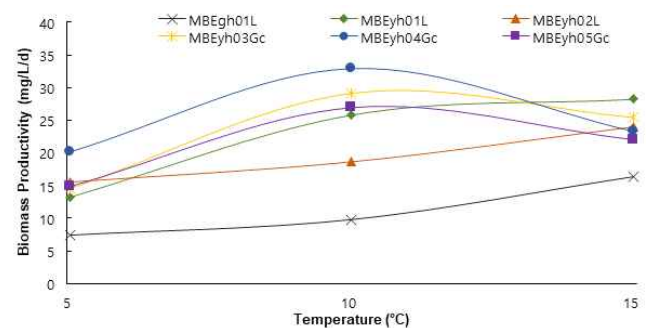


Figure 3. Biomass Productivities by the Microalgal Strains and Temperature.

신규 *Tetraselmis sp.* 균주들의 지방산 조성 및 생산성

10°C에서 배양된 미세조류 바이오매스를 이용하여 신규 균주들의 지방산 함량 및 조성을 분석하였다. MBEyh05Gc의 지방산 함량은 6.0%로 대조군인 MBEgh01L과 같았으며, 다른 균주들은 10°C에서 모두 대조군보다 높은 지방산 함량을 보였다 (Figure 4). 5°C, 10°C에서 가장 높은 바이오매스 생산성을 보였던 MBEyh04Gc는 7.2%의 지방산 함량으로 대조군 대비 20% 높았고, 15°C에서 가장 높은 바이오매스 생산성을 보였던 MBEyh01L은 12.2%의 지방산 함량을 보여 대조군보다 103% 높았다.

지방산의 함량뿐만 아니라 지방산 조성도 균주에 따라 다른 것으로 드러났다 (Table 2). 지방산 종류 중에서는 MBEgh01L, MBEyh04Gc에서는 C16:0 (palmitic acid)가 가장 높은 비율을 차지하였고,

MBEyh02L, MBEyh03Gc, MBEyh05Gc에서는 C16:4 (palmitidonic acid)가 가장 높은 비율을 차지하였다. 가장 지방산 함량이 높았던 MBEyh01L은 C18:3 (linolenic acid)가 25.2%로 가장 높은 비율을 차지하였다. 대조군인 MBEgh01L은 C18:2 (linoleic acid)의 비율이 6%로 낮은 반면 신규 *Tetraselmis* sp. 균주들은 모두 13% 이상의 상대적으로 높은 비율을 보였다. MBEyh05Gc는 특이적으로 C18:3이 1.8%로 다른 균주들과 달리 매우 적었다. 성장성이 우수한 신규 균주들은 다중불포화지방산(Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA)의 비율이 55~63%로 46%인 대조군에 비해 높았다 (Table 2). 불포화지방산의 비율은 세포막의 유동성에 영향을 미치는데, 특히 PUFA의 비율이 높을수록 세포막의 저온유동성이 높아져 미세조류의 저온 저항성이 높아진다고 알려져 있다 [10]. 본 연구에서 분리된 신규 *Tetraselmis* sp. 균주들은 포화지방산을 불포화지방산으로 전환하는 지방산 불포화 효소(fatty acid desaturase)의 활성이 높아 저온 성장성이 더 높았을 것으로 사료된다 [8].

10°C에서 지방산 생산성은 MBEyh01L에서 3.2 mg/L/d로 가장 높았다. 그 뒤로는 MBEyh04Gc, MBEyh03Gc, MBEyh02L, MBEyh05Gc, MBEgh01L

의 순으로 각각 2.4, 2.2, 1.7, 1.6, 0.6 mg/L/d의 지방산 생산성을 보였다. MBEyh04Gc의 바이오매스 생산성 MBEyh01L에 비해 27% 높았지만, MBEyh01L의 지방산 함량이 69% 더 높았기 때문에 이의 효과로 지방산 생산성은 더 높았다. MBEyh02L도 바이오매스 생산성은 MBEyh05Gc에 비해 31% 낮았지만, 지방산 함량이 55% 더 높아 지방산 생산성은 7.3% 더 높은 수치를 보였다. 그러므로 본 결과는 바이오디젤 생산을 위한 미세조류 배양의 균주 선정 시 성장성뿐만 아니라 지방산 함량도 함께 고려해야하는 것을 시사한다.

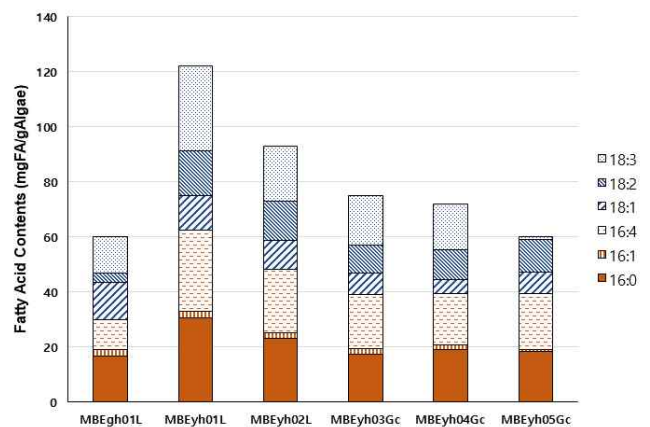


Figure 4. Fatty Acid Contents of the Microalgae at 10°C.

Table 2. Fatty Acid Compositions of the Microalgae.

Strain	MBEgh01L	MBEyh01L	MBEyh02L	MBEyh03Gc	MBEyh04Gc	MBEyh05Gc
C16:0	27.9	25.1	24.7	23.2	26.6	30.8
C16:1	4.1	1.9	2.4	2.7	2.4	1.2
C16:4	18.0	24.3	24.8	26.2	25.7	33.4
C18:1	22.3	10.2	11.4	10.4	7.1	13.4
C18:2	6.0	13.3	15.1	13.6	15.2	19.4
C18:3	21.8	25.2	21.7	23.9	23.0	1.8
SFA	27.9	25.1	24.7	23.2	26.6	30.8
MUFA	26.4	12.1	13.8	13.1	9.5	14.6
PUFA	45.8	62.8	61.5	63.7	63.9	54.6

SFA: Saturated Fatty Acids
 MUFA: Monounsaturated Fatty Acids
 PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids

결론

본 연구에서는 총 5개주의 *Tetraselmis* 속의 균주를 분리하여 저온에서의 성장성과 지방산 함량 및

조성을 보고하였다. 본 연구에 사용된 총 6개의 균주 모두 *Tetraselmis* 속에 속하지만 18s rDNA의 염기서

열 차이와 온도에 따른 바이오매스 생산성, 지방산 함량, 지방산 조성의 차이점을 통해 미세조류 균주의 다양성을 확인할 수 있었다. 또한 저온에서도 높은 지방산 생산성을 보이는 균주를 분리, 사용하여 해양 대량 배양에서 수온 변화에 따라 최적 온도가 다른 균주를 사용하여 미세조류 바이오디젤의 연중 생산성을 높일 수 있는 가능성을 보였다. 실제 해양 대량 배양에서 수온이 낮은 계절에는 MBEyh04Gc 균주를, 수온이 높은 계절에는 MBEyh01L 균주를 사용하는 등의 실험을 수행하여 미세조류 바이오디젤 연중 생산성이 향상되는지 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

이 연구는 해양수산부의 재원으로 해양수산생명공학기술개발사업(20090267, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발), 교육부의 재원으로 기초연구사업(NRF-2016R1A6A3A11931011), 환경부의 재원으로 국립낙동강생물자원관(NNIBR201902113)에서 지원을 받아 수행된 연구입니다.

References

- Jay, A., Reidmiller, D.R., Avery, C.W., Barrie, D., DeAngelo, B.J., Dave, A., Dzaugis, M., Kolian, M., Lewis, K.L.M., Reeves, K., and Winner, D. 2018. Overview. In Impacts, Risks, and Adaptation in the United States. *Fourth National Climate Assessment*. **2**, 33-71.
- Jung, S.G., Kim, S.K., Bun, M.S., Cho, Y., Shin, D.W., Kim, Z-H., Lim, S.M., and Lee, C.G. 2016. Comparison of Biomass Productivity of the Microalgae, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, in Polyvinyl Chloride Marine Photobioreactor and High Density Polyethylene Marine Photobioreactor. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **8**, 18-23.
- Kalghatgi, G. 2018. Is it really the end of internal combustion engines and petroleum in transport? *Appl. Energ.* **225**, 965-974
- Kim, C.W. and Hur, S.B. 1998. Selection of Optimum Species of *Tetraselmis* for Mass Culture. *J. Aquaculture.* **11**, 231-240.
- Park, H., Jung, D., Lee, J., Kim, P., Cho, Y., Jung, I., Kim, Z.H., Lim, S.M. and Lee, C.G. 2018. Improvement of biomass and fatty acid productivity in ocean cultivation of *Tetraselmis* sp. using hypersaline medium. *J. Appl. Phycol.* **30**, 2725-2735.
- Park, H., Lee C.G. 2016. Theoretical calculations on the feasibility of microalgal biofuels: utilization of marine resources could help realizing the potential of microalgae. *Biotechnol. J.* **11**, 1461-1470.
- Popp, J., Lakner, Z., Harangi-Rakos, M. and Fari, M. 2014. The effect of bioenergy expansion: food, energy, and environment. *Renew. and Sust. Energ. Rev.* **32**, 559-578.
- Sakamoto, T. and Murata, N. 2002. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 206-210.
- Shin, D.W., Bae, J.H., Cho, Y.H., Kim, Z-H., Lim, S.M., and Lee, C.G. 2016. Isolation of New Microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, and Biodiesel Production using Its Biomass. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **8**, 39-44.
- Teoh, M.L., Chu, W.L., Marchant, H. and Phang, S.M. 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl. Phycol.* **16**, 421-430.