

미세조류 4종의 성장, CO₂ 동화 및 지질 생성 특성

신채윤, 노영진, 정소연*, 김태관*
부산대학교 미생물학과

Received: September 2, 2020 / Revised: October 12, 2020 / Accepted: October 15, 2020

Characterization of Cellular Growth, CO₂ Assimilation and Neutral Lipid Production for 4 Different Algal Species

Chae Yoon Shin, Young Jin Noh, So-Yeon Jeong*, and Tae Gwan Kim*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 46241, Republic of Korea

Microalgae are a promising resource in energy and food production as they are cost-effective for biomass production and accumulate valuable biological resources. In this study, CO₂ assimilation, biomass, and lipid production of 4 microalgal species (*Chlorella vulgaris*, *Mychonastes homosphaera*, *Coelastrella* sp., and *Coelastrella vacuolata*) were characterized at different CO₂ concentrations ranging from 1% to 9%. Microscopic observation indicated that *C. vulgaris* was the smallest, followed by *M. homosphaera*, *C. vacuolata*, and *Coelastrella* sp. in order of size. *C. vulgaris* grew and consumed CO₂ more rapidly than any other species. *C. vulgaris* exhibited a linear increase in CO₂ assimilation (up to 9.62 mmol·day⁻¹·l⁻¹) as initial biomass increased, while the others did not (up to about 3 mmol·day⁻¹·l⁻¹). *C. vulgaris*, *Coelastrella* sp., and *C. vacuolata* showed a linear increase in the specific CO₂ assimilation rate with CO₂ concentration, whereas *M. homosphaera* did not. Moreover, *C. vulgaris* had a greater CO₂ assimilation rate compared to those of the other species (14.6 vs. ≤ 11.9 mmol·day⁻¹·l⁻¹). Nile-red lipid analysis showed that lipid production per volume increased linearly with CO₂ concentration in all species. However, *C. vulgaris* increased lipid production to 18 mg·l⁻¹, compared to the 12 mg·l⁻¹ produced by the other species. Thus, *C. vulgaris* exhibited higher biomass and lipid production rates with greater CO₂ assimilation capacity than any other species.

Keywords: Microalgae, biomass, CO₂ assimilation, lipid production

서론

온실가스에 의한 지구온난화와 화석 연료의 고갈에 따른 에너지 생산 문제에 대응하여 환경 친화적이며 지속 가능한 신재생 에너지 개발이 요구되고 있다. 이를 위해서 대체에너지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 생물자원을 활용한 대체에너지 개발에 미세조류가 유용한 자원으로써 주목 받고 있다[1, 2]. 미세조류는 담수, 해수 등 지구 전역에 널리 존재하며 대기와 수중의 이산화탄소와 빛, 물을 이용해서 광합성을 통해 성장하고[2], 극한 환경에서도 서식이 가능하

다고 알려져 있다[3]. 미세조류는 해양, 담수 등에서 회수되기 때문에 경작지가 필요 없고 다른 자원(콩, 옥수수, 야자유, 사탕수수 등)에 비해 성장 속도가 빠르고 면적 대비 바이오매스 생산성이 높아 효율적인 바이오매스 생산이 가능하다[2].

미세조류의 바이오매스로부터 다당류, 지질, 단백질, 비타민 등 다양한 고부가 유용 물질의 생산이 가능하기 때문에 식품 첨가물, 건강식품, 에너지, 의약품, 환경 정화, 농업(토양개량제 및 생물비료) 등 여러 산업 분야에서 활용되고 있다[1, 4]. 특히, 미세조류의 높은 지질 함량은 바이오디젤 등 바이오연료 생산 분야에서 크게 주목받는 특성이다[1, 5]. 미세조류를 활용한 바이오디젤 생산 만큼이나 주목받는 것이 미세조류에 의한 CO₂ 고정화(carbon fixation or carbon assimilation)이며[6], 미세조류의 CO₂ 고정화 효율을 증대시키기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다[6, 7]. 또한, 미세조류는 물속에 녹아있는 영양염류를 흡수하여 유기물을 제거하므로 폐수 처리에도 이용할 수 있으며[8], 중금속 흡착에도 활용되고 있다[9].

*Corresponding authors

S.-Y. J.

Tel: 82-51-510-3164, Fax: 82-51-514-1778

E-mail: jeongsy@pusan.ac.kr

T. G. K.

Tel: 82-51-510-2268, Fax: 82-51-514-1778

E-mail: tkim@pusan.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

다양한 산업 분야에서 미세조류를 활용하기 위해서는 고 밀도 대량배양 기술이 핵심이다. 미세조류의 바이오매스와 유용 물질의 생산성을 향상시키기 위해서는 온도, 광도, 광량, CO₂ 농도 등의 환경 조건이 최적화 되어야 하며 미세조류의 특성 규명을 통해 이들의 활용 범위를 확대시킬 수 있다. 미세조류의 바이오매스와 지질 함량 축적은 다양한 환경 요인에 의해 영향을 받는다. 예를 들어, 광도와 배양 온도는 미세조류의 성장 뿐만 아니라 지질 함량에도 영향을 미친다 [10, 11]. 다른 환경 요인으로써 고농도의 CO₂와 열처리된 *Chlorella vulgaris*의 지질 생산성 및 회수율 뿐만 아니라 바이오매스를 증가시켰다 [12]. 이와 같이 배양 환경이나 종에 따라 세포에 축적되는 미세조류의 체성분이 변화한다. 따라서 다양한 기술 분야에서 목적에 적합한 미세조류를 활용하기 위해서는 종 선정이 중요하며 [13], 이를 위해서는 다양한 미세조류의 생물자원 확보 및 특성 규명이 선행되어야 한다.

본 연구에서는 자생 미세조류 4종(*Chlorella vulgaris*, *Mychonastes homosphaera*, *Coelastrella* sp., *Coelastrella vacuolata*)을 선정하여 이들의 성장, CO₂ 동화, 지질 생성에 대한 특성을 분석하였다. *C. vulgaris*는 Chlorellales 목 (order)에 속하며 미세조류 연구 분야에서 가장 활발하게 연구가 진행되고 있는 종 중의 하나로써 이번 연구에서는 다른 미세조류와의 비교 분석과 자생종 특성 규명을 위해 *C. vulgaris*를 선정하였다. *C. vulgaris*를 제외한 3종은 모두 Sphaeropleales 목에 속하며, *M. homosphaera*와 *C. vacuolata*는 바이오매스와 지질 생산성에 대해 연구된 바가 많지 않다. 본 연구에서는 이들의 바이오매스 생성과 CO₂ 동화 특성을 분석하였으며, CO₂ 농도에 따른 미세조류의 지질 함량 특성을 분석하였다. 미세조류의 CO₂ 고정화와 바이오매스 및 지질 생산성 사이의 상관관계를 규명하고자 다양한 환경 요인 중 CO₂ 농도를 주요 환경 요인으로 설정하였으며, 최종적으로 CO₂ 농도에 따른 CO₂ 동화 속도 및 지질 함량 사이의 상관관계를 분석하여 미세조류의 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

미세조류 배양

본 연구에서는 낙동강생물자원관 담수생물자원은행 (<https://fbp.mnibr.re.kr/fbcc>)에서 분양받은 4종의 미세조류 *Chlorella vulgaris* (FBCC 180003), *Mychonastes homosphaera* (FBCC 180001), *Coelastrella* sp. (FBCC 110005), *Coelastrella vacuolata* (FBCC 110003)를 사용하였다. 4종의 미세조류는 대한민국 강에서 분리된 녹조류로서 모두 Chlorophyta 문 (phylum)에 속한다. *C. vulgaris*는 성장 속도가 빠르고 높은 바이오매스 생산성을 나타내며 CO₂ 고정화, 바이오디젤 생산 등 많은 연구에서 활용되고 있다 [14, 15]. 또한, 독립영양

성장 (autotrophic growth), 종속영양 성장 (heterotrophic growth), 혼합영양 성장 (mixotrophic growth)이 모두 가능하다고 알려져 있다 [16]. *M. homosphaera*는 크기가 작으며 다른 미세조류에 비해 높은 지질 함량과 바이오디젤 생산에 적합한 지방산을 많이 함유하는 특성을 가진다 [17, 18]. *Coelastrella* sp.는 내열성 (45–50°C)을 가지며, 지질 생산 이외에도 pigment, carotenoids 등의 색소 생산을 위해 많이 활용되고 있다 [19, 20].

4종의 미세조류 배지 조성은 다음과 같다 [21]; KNO₃ 1000 mg·l⁻¹, K₂HPO₄ 250 mg·l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 250 mg·l⁻¹, NaCl 100 mg·l⁻¹, CaCl₂·2H₂O 10 mg·l⁻¹, EDTA-Na 16 mg·l⁻¹, Fe solution (FeSO₄·7H₂O 2 mg·l⁻¹), Trace mineral composition (H₃BO₃ 2.86 mg·l⁻¹, MnSO₄·4H₂O 1.30 mg·l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 3.20 mg·l⁻¹, CuSO₄·5H₂O 1.83 mg·l⁻¹, NaMoO₄ 0.021 mg·l⁻¹). 110 ml의 혈청병 (serum bottle)에 20 ml의 배지와 접종원 1 ml를 분주한 후 고무 마개로 밀봉하고, CO₂ 가스를 최종 농도 5%(v/v)가 되도록 주입해 주었다. 각 배양액은 광도 2,400 lux, 광주기 24L:0D, 온도 25 ± 1°C, 교반속도 150 rpm 조건에서 배양되었다. 혈청병 상부 가스를 분석하여 CO₂ 농도가 검출 한계 미만이 되면 CO₂ 가스를 재주입하여 미세조류의 농화배양을 진행하였다. CO₂ 농도는 가스 크로마토그래피 (GC-2010 plus, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용해 측정하였다. Rt-Q-BOND 컬럼 (30 m × 0.53 mm × 20 μm, USA)과 열전도성 검출기 (thermal conductivity detector)가 장착되었으며 오븐, 시료 주입부, 검출기의 온도는 각각 50, 100, 150°C로 설정하였다. 이동상 가스로 헬륨 (유량 3 ml·min⁻¹, 25 kPa 압력)을 사용하였다.

미세조류의 성장 특성 분석

각 미세조류의 성장 특성을 규명하기 위해서 농화배양액을 회수하여 균체를 획득한 후 새 배지로 현탁시켜 실험에 사용할 배양액을 준비하였다. 본 연구의 모든 실험 조건은 2반복으로 수행하였다. 모든 미세조류의 초기 바이오매스를 동일하게 하기 위해서 각 미세조류의 건조 균체량 (dry cell weight)과 OD₆₈₀ 값 사이의 상관관계로 검량선을 작성하였다. 각 미세조류의 검량선 수식은 다음과 같다; *C. vulgaris* $y = 0.53x + 0.03$ ($R^2 = 0.99$), *M. homosphaera* $y = 0.21x - 0.00$ ($R^2 = 0.99$), *Coelastrella* sp. $y = 0.66x + 0.05$ ($R^2 = 0.99$), *C. vacuolata* $y = 1.11x + 0.03$ ($R^2 = 0.99$). 건조 균체량은 농도별 배양액 1ml을 감압 여과하여 110°C 오븐에서 2시간 건조시켜 측정하였으며, OD₆₈₀ 값은 UV 분광광도계 (UV-1800, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다. 실험에 사용할 각 배양액의 OD₆₈₀ 값을 측정하여 검량선을 통해 농도를 계산하였으며, 멸균된 새 배지로 최종 농도 0.01 g·l⁻¹가 되도록 희석하였다. 희석시킨 배양액은 110 ml의

혈청병에 20 ml씩 분주한 후 고무마개로 밀봉하였다. CO₂ 가스를 최종 농도 5%(v/v)가 되도록 주입했으며 배양 조건은 미세조류의 농화배양 조건과 동일하게 하였다. UV 분광광도계로 OD₆₈₀ 값을 측정하였으며, OD₆₈₀ 값은 검량선에 대입하여 건조 균체량으로 환산하였다.

CO₂ 농도 및 바이오매스에 따른 미세조류의 CO₂ 동화 속도 분석

CO₂ 농도 및 초기 바이오매스 농도에 따른 각 미세조류의 CO₂ 동화 특성을 규명하기 위해서 실험을 진행하였다. 각 미세조류의 배양액 농도는 0.01 g·l⁻¹으로 동일하게 하였으며, 110 ml의 혈청병에 20 ml씩 분주한 후 고무마개로 밀봉하였다. CO₂ 가스를 최종 농도 1%, 3%, 5%, 7%, 9%(v/v)가 되도록 주입하고 배양 조건은 각 미세조류의 농화배양 조건과 동일하게 하였다. 가스크로마토그래피를 이용해서 혈청병 상부의 CO₂ 농도를 측정하였으며, CO₂가 동화되는 속도를 평균 속도(general rate)와 비속도(specific rate)로 계산하였다. 각 미세조류의 CO₂ 동화 특성을 비교하기 위해서 본 실험의 CO₂ 농도 5% 결과를 활용해 추가 분석하였다.

초기 바이오매스에 따른 CO₂ 동화 속도를 분석하기 위해 각 미세조류의 바이오매스를 최종 농도 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 g·l⁻¹가 되도록 준비하였다. 110 ml의 혈청병에 각 농도의 미세조류 배양액을 20 ml씩 분주한 후 고무마개로 밀봉하고, CO₂ 가스를 최종 농도 5%(v/v)가 되도록 주입하였다. 배양 조건은 이전과 동일하게 설정하고 가스크로마토그래피를 이용해서 혈청병 상부의 CO₂ 농도를 측정하였다.

Nile red 검정을 통한 미세조류의 지질 함량 분석

지질 함량을 측정하기 위해 glyceryl trioleate (Sigma-Aldrich Co., USA)을 스탠다드로 사용하였으며 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg·l⁻¹ 농도의 값으로 검량선을 작성하였다. 각 미세조류의 지질 함량은 Nile red (NR) 검정법을 이용하여 측정하였다[22]. Nile red (Sigma-Aldrich)는 100% dimethyl sulfoxide를 사용해서 용해시켰으며 최종 농도 0.25 mg·ml⁻¹의 stock solution을 제조하고 실험 전까지 빛을 차단하여 보관하였다. 각 샘플의 농도는 OD₆₈₀ = 0.06이 되도록 희석했으며 희석액 1 ml에 NR 용액 0.01 ml을 혼합하였다. 빛을 차단시킨 환경에서 30°C, 10분 동안 정치한 후 형광광도계(F-7000, Hitachi Ltd., Japan)를 이용해 excitation 530 nm 및 emission 575 nm 파장에서 농도를 측정하고 지질 함량을 분석하였다.

미세조류의 현미경 분석

각 미세조류 배양액 20 µl를 슬라이드 글라스에 분주한 후 광학현미경(Axio observer 3, Carl Zeiss Co. Ltd., Oberkochen,

Germany)으로 미세조류의 형태를 관찰하였다. 10 x 100 배 배율로 관찰하여 사진을 확보했으며 ZEN 3.1 프로그램(Carl Zeiss)을 이용하여 각 세포의 크기를 측정하였다(n = 3).

결과 및 고찰

미세조류 4종의 크기, 성장 및 CO₂ 동화 특성

4종의 미세조류 크기를 현미경으로 분석한 결과, 각 세포의 지름은 *C. vulgaris* 3.0–4.4 µm, *M. homosphaera* 3.8–4.0 µm, *Coelastrella* sp. 9.7–15.0 µm, *C. vacuolata* 9.8–12.2 µm로 측정되었다(n = 3). 각 세포의 지름을 기준으로 미세조류의 부피를 계산하였으며, 각각의 부피는 *C. vulgaris* 26.5 ± 19.1 µm³, *M. homosphaera* 31.7 ± 1.9 µm³, *Coelastrella* sp. 1,586.3 ± 980.0 µm³, *C. vacuolata* 1,244.5 ± 180.9 µm³이었다. 미세조류의 크기를 기준으로 50 µm³ 이하의 *C. vulgaris*, *M. homosphaera*와 1,000 µm³ 이상의 *Coelastrella* sp., *C. vacuolata*로 구분할 수 있었다. 본 연구에서 분석한 미세조류의 크기는 기존의 다른 연구 결과와 유사하다. 이전 연구 결과에 따르면 *C. vulgaris*와 *M. homosphaera*는 평균 지름이 5 µm 이하를 나타냈으며[23, 24], *Coelastrella*의 직경은 약 10 µm를 나타냈다[25]. 세포의 크기에 따라 이들의 성장, CO₂ 동화, 지질 함량 특성은 뚜렷한 차이를 나타냈다. 세포 부피는 표면적과 연관되며 미세조류의 표면적은 생리학 특성에 영향을 미친다고 알려져 있다. 예를 들어, 미세조류 표면적은 중금속(카드뮴) 흡수의 주요 인자로 보고되었으며[26], 미세조류의 크기가 작을수록 철 흡수와 성장 속도가 증가했다[27].

4종의 미세조류 성장 결과(Fig. 1)에 따르면 *C. vulgaris*는 74시간 경과 시점에 최대 0.95 g·l⁻¹까지 바이오매스가 증가했으며, *M. homosphaera*의 바이오매스는 100시간 경과 시

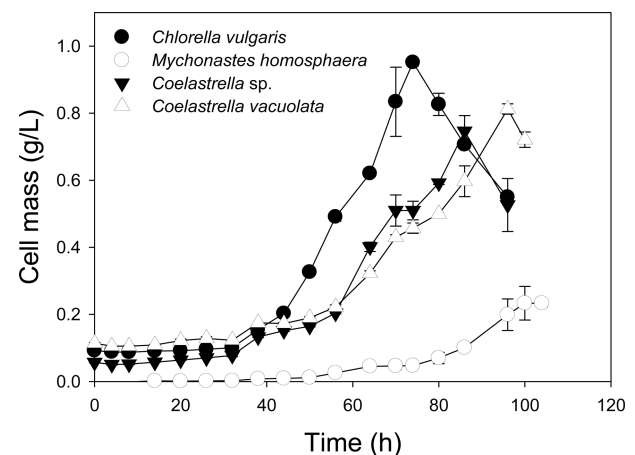


Fig. 1. Growth curves of 4 different microalgal species.

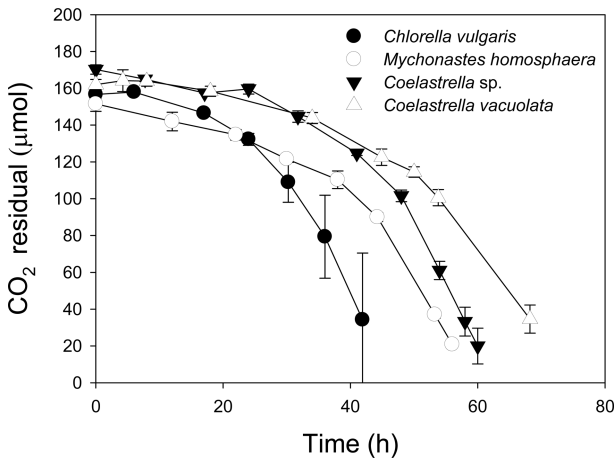


Fig. 2. CO₂ assimilations of 4 different microalgal species at 5% of initial CO₂ concentration.

에 최대 0.23 g·l⁻¹이었다. *Coelastrella* sp.와 *C. vacuolata*는 각각 86시간, 96시간 경과 시에 0.75 g·l⁻¹와 0.81 g·l⁻¹의 바이오매스 값을 보여주었다. *C. vulgaris*의 바이오매스가 최대로 증가한 74시간 경과 시점에 *C. vulgaris*는 *Coelastrella* sp.와 *C. vacuolata* 보다 약 2배($p < 0.05$), *M. homosphaera* 보다 약 20배 더 높은 바이오매스양을 보여주었다($p < 0.05$).

미세조류의 성장은 다양한 환경 요인에 의해 영향을 받는다 [10, 12, 28]. 예를 들어, 8%의 CO₂ 농도에서 *C. vulgaris*의 바이오매스는 대조군(4%의 CO₂ 농도) 대비 23% 증가했다 [12]. 다른 연구 결과에 따르면 혼합영양 배양(mixotrophic cultivation) 조건에서 *Chlorella sorokiniana*의 바이오매스 생산이 가장 효율적이라고 보고되었다[29]. 따라서 다양한 환경 조건을 고려해서 미세조류의 성장과 효율적인 바이오매스 생성을 위한 최적 조건을 도출해야 한다. 미세조류의 CO₂ 동화 결과(Fig. 2)에 따르면 *C. vulgaris*는 42시간 동안 약 122.5 ± 38.3 µmol의 CO₂를 동화시켰으며, *M. homosphaera*는 56시간 동안 약 130.7 ± 2.7 µmol의 CO₂를 동화시켰다. *Coelastrella* sp.는 약 137.0 ± 10.4 µmol의 CO₂를 동화시키는데 58시간, *C. vacuolata*는 127.4 ± 10.4 µmol의 CO₂를 동화시키는데 68.2시간이 소모되었다.

미세조류의 성장과 CO₂ 동화 결과에 따르면 *C. vulgaris*가 가장 빠른 성장을 보이며 CO₂ 또한 가장 빠르게 소모함을 알 수 있다. *M. homosphaera*는 성장 속도는 4종 중에 가장 느리지만 *C. vulgaris* 다음으로 CO₂를 빠르게 소모했다. *M. homosphaera*는 성장 시 가장 긴 lag phase를 가지지만 바이오매스가 증가하면 빠르게 CO₂를 동화시킬 수 있음을 시사한다. *Coelastrella* sp.와 *C. vacuolata*의 바이오매스는 *C. vulgaris* 다음으로 빠르게 증가했지만 CO₂ 동화 시간은

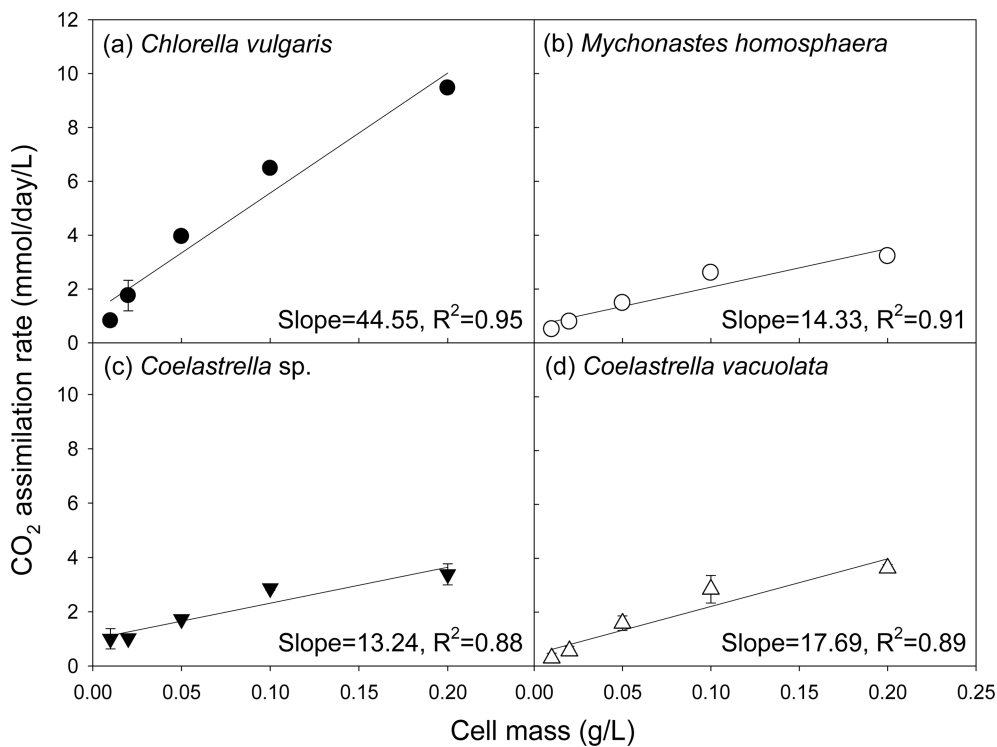


Fig. 3. CO₂ assimilation rates of 4 different microalgal species at different initial cell mass concentrations (0.01, 0.02, 0.05, 0.1 and 0.2 g·l⁻¹).

*C. vulgaris*에 비해 각각 38%, 61% 지연됨을 알 수 있다. *C. vulgaris*는 다른 3종의 미세조류보다 크기가 작기 때문에 동일한 부피의 배양액 내에서 상대적으로 넓은 표면적을 가지게 된다. 세포 크기가 작을수록 단위 부피 당 표면적의 비율은 증가하며, 표면적이 크면 영양분 흡수 등 물질 대사 효율이 높아진다[27]. 다른 미세조류들과 비교해서 상대적으로 넓은 *C. vulgaris*의 표면적이 바이오매스와 CO₂ 동화 속도에 영향을 미쳤을 것이다. 미세조류의 표면적과 CO₂ 고정화 사이의 명확한 상관관계 규명은 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

바이오매스에 따른 미세조류의 CO₂ 동화 특성

각 미세조류의 바이오매스에 따른 CO₂ 동화 속도 특성을 분석하였다(Fig. 3). 4종의 미세조류 모두 바이오매스와 CO₂ 동화 속도 사이에서 양의 상관관계(positive correlation)를 보여주었다. CO₂ 동화 속도의 추세선 기울기 값은 *C. vulgaris*가 44.6으로 가장 높았으며, *M. homosphaera* 14.3, *Coelastrella* sp. 13.3, *C. vacuolata* 17.7를 나타냈다. *C. vulgaris*의 기울기 값은 다른 3종에 비해 최대 3배 이상 높았다. 4종 모두 바이오매스가 0.2 g·l⁻¹일 때 CO₂ 동화 속도는 최대값을 나타냈으며 각각 *C. vulgaris* 9.5±0.2 mmol·day⁻¹·l⁻¹, *M. homosphaera* 3.2±0.1, *Coelastrella* sp. 3.4±0.4, *C. vacuolata*

3.6±0.1이었다. 동일한 바이오매스 조건(0.2 g·l⁻¹)에서 *C. vulgaris*는 다른 3종의 미세조류에 비해 최대 3배 더 빠른 CO₂ 동화 속도를 보여주었다(*p* < 0.05). *C. vulgaris*는 다른 종에 비해 효율적인 CO₂ 동화가 가능하며 미세조류의 특성에 따라 효율적인 CO₂ 동화를 위한 바이오매스의 최적 조건은 상이할 것이다.

CO₂ 농도에 따른 미세조류의 CO₂ 동화 특성

CO₂ 농도에 따른 각 미세조류의 평균 CO₂ 동화 속도(general CO₂ assimilation rate)와 CO₂ 동화 비속도(specific CO₂ assimilation rate)를 분석하였다(Fig. 4). 각 미세조류의 평균 CO₂ 동화 속도의 추세선 기울기 값은 *C. vulgaris* 0.44 (R²=0.83), *M. homosphaera* 0.29 (R²=0.78), *Coelastrella* sp. 0.45 (R²=0.99), *C. vacuolata* 0.38 (R²=0.96)이었다. *C. vulgaris*를 제외한 3종의 미세조류 평균 CO₂ 동화 속도는 *Coelastrella* sp. (4.4±0.1 mmol·day⁻¹·l⁻¹), *C. vacuolata* (3.6±0.1), *M. homosphaera* (3.3±0.9) 순으로 9%의 CO₂ 농도에서 최대값을 나타냈다. *C. vulgaris*는 7%의 CO₂ 농도에서 최대값(4.4±0.4 mmol·day⁻¹·l⁻¹)을 나타냈으나, 9% 농도에서 3.8±0.2 mmol·day⁻¹·l⁻¹로 감소하였다. CO₂ 농도에 따른 모든 미세조류의 평균 CO₂ 동화 속도 사이에는 유의미한 차이가 없음을 알 수 있다(*p* > 0.05).

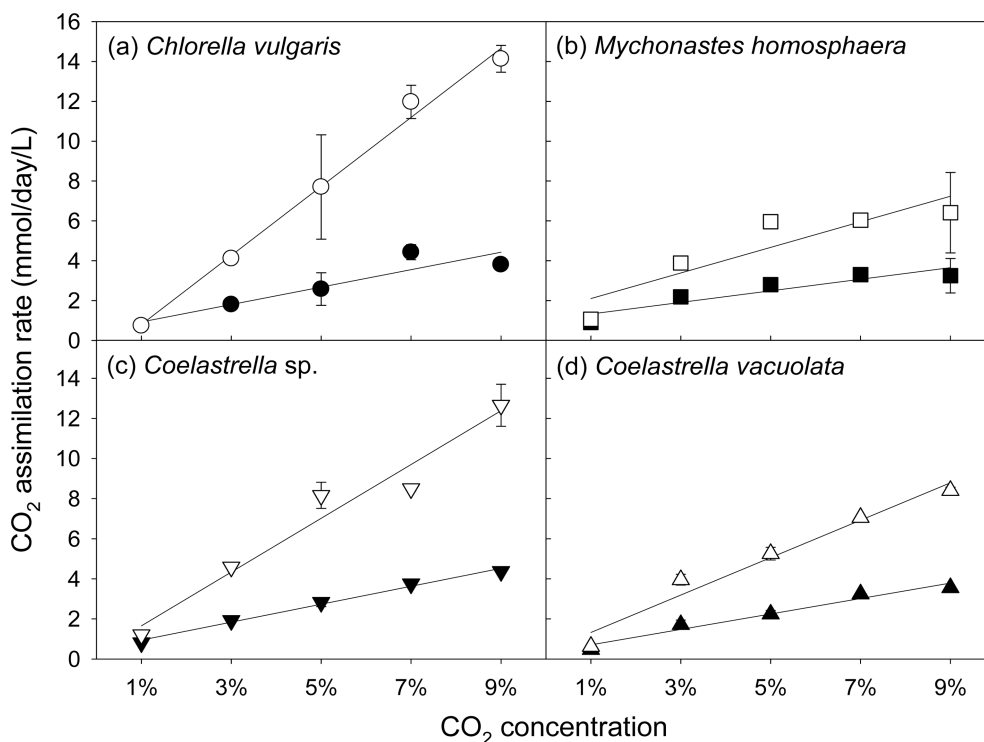


Fig. 4. CO₂ assimilation rates 4 different microalgal species at different initial CO₂ concentrations (1, 3, 5, 7 and 9%). Solid (black) and blank (white) symbols indicate the general CO₂ assimilation rates and specific CO₂ assimilation rates, respectively.

CO₂ 농도에 따른 각 미세조류의 CO₂ 동화 비속도는 *M. homosphaera*를 제외하고 양의 상관관계를 보여주었다. *M. homosphaera*의 비속도는 5% 이상의 CO₂ 농도에서 더 이상 증가하지 않았다. 각 미세조류의 CO₂ 동화 비속도의 추세선 기울기 값은 *C. vulgaris* 1.73 ($R^2=0.96$), *M. homosphaera* 0.64 ($R^2=0.74$), *Coelastrella* sp. 1.34 ($R^2=0.95$), *C. vacuolata* 0.93 ($R^2=0.96$)을 나타냈으며 *C. vulgaris*의 추세선 기울기 값은 다른 3종에 비해 최대 2.7배 더 높았다. 4종의 미세조류 모두 9%의 CO₂ 농도에서 CO₂ 동화 비속도는 최대값을 나타냈으며 특히, *C. vulgaris*는 9%의 CO₂ 농도에서 4종의 미세조류 중 가장 높은 CO₂ 동화 비속도($14.1 \pm 0.7 \text{ mmol} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$)를 보여주었다. 본 연구 결과에서 초기 CO₂ 농도가 증가할수록 미세조류의 CO₂ 동화 비속도가 증가함을 알 수 있었다. 이와 유사하게 CO₂ 농도 증가는 미세조류의 CO₂ 고정화를 증가시킬 수 있다고 보고되었다[30]. 또한, CO₂ 농도 증가는 CO₂ 고정화와 바이오매스 증가 모두에 영향을 미친다[30]. 다른 연구 결과에 따르면 8%의 CO₂ 농도에서 *C. vulgaris*의 바이오매스는 대조군 대비 23% 증가했다[12]. 고농도의 CO₂는 *C. vulgaris*의 바이오매스 생성과 CO₂ 동화 비속도 모두를 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 다른 3종의 CO₂ 동화 비속도는 9%의 CO₂ 농도에서 각각 *Coelastrella* sp. $12.7 \pm 1.1 \text{ mmol} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$, *C. vacuolata* 8.4 ± 0.2 , *M. homosphaera* 6.4 ± 2.0 이었다. *Coelastrella* sp.는 다른 2종에 비해 최대 2배 더 빠른 CO₂ 동화 비속도를 보여주었다. 본 연구 결과에 따르면 *C. vulgaris* 이외에도 *Coelastrella* sp.는 CO₂ 고정화 증대를 위한 효율적인 자원으로 활용될 수 있을 것이라 판단된다.

CO₂ 농도에 따른 미세조류의 지질 함량 특성

미세조류의 지질, 단백질, 탄수화물 등의 구성 함량은 종마다 다르며[31], 그 중에서 지질 함량 및 바이오디젤 생산에 적합한 지방산 비율은 바이오디젤의 품질을 결정하는 주요 요소가 될 수 있다[17]. 따라서 고품질의 바이오디젤 생산을 위해서는 미세조류의 지질 함량 특성 및 생산성이 고려되어야 한다[32]. 본 연구에서는 CO₂ 농도(1–9%)에 따라 각 미세조류의 지질 함량을 분석하였다(Fig. 5). 4종의 미세조류 모두 CO₂ 농도가 높아질수록 지질 함량이 증가하는 양상을 보여주었다. 특히 *C. vulgaris*는 CO₂ 농도가 증가함에 따라 지질 함량이 급격하게 증가해 9% 농도에서 4종의 미세조류 중 가장 높은 값($18.2 \pm 4.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)을 나타냈다. 바이오매스 및 CO₂ 동화 속도 결과와 유사하게 모든 CO₂ 농도에서 *C. vulgaris*의 가장 높은 지질 함량을 예측하였으나 3–7%의 CO₂ 농도에서 *M. homosphaera*보다 낮은 지질 함량을 나타냈다. 본 연구에서는 9% 미만의 CO₂ 농도에서 *M. homosphaera*의 지질 생산성이 *C. vulgaris*보다 뛰어난 것을 알

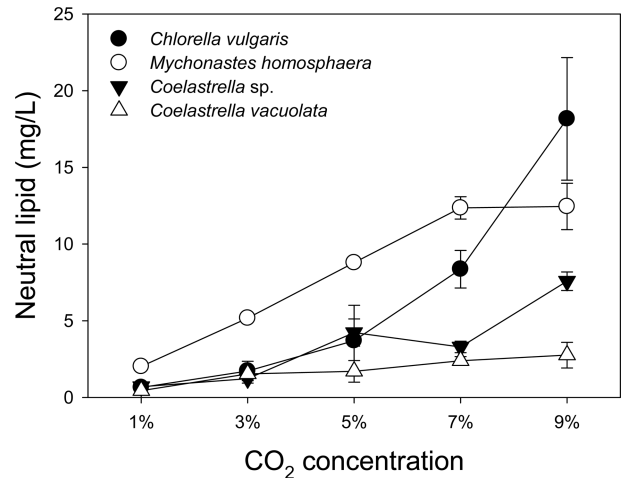


Fig. 5. Neutral lipid production of 4 different microalgal species at different initial CO₂ concentrations.

수 있다. *C. vulgaris*는 CO₂ 농도가 증가함에 따라 지질 함량이 급격하게 증가하므로 고농도의 CO₂ 농도에서 효율적인 지질 생산이 가능함을 보여주었다. 이와 유사하게 다른 연구 결과에 따르면 8%의 CO₂ 농도에서 *C. vulgaris*의 지질 생산성이 대조군(4%의 CO₂ 농도) 대비 94% 증가되었으며, 가벼운 열처리(5–15 min, 50–70°C)는 지질 회수율을 12.5% 증가시켰다[12]. 고농도의 CO₂와 열처리는 *C. vulgaris*로부터 지질 생산성과 회수율을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

*M. homosphaera*는 CO₂ 농도 1%, 3%, 5%, 7%에서 각각 2.0 ± 0.2 , 5.2 ± 0.3 , 8.8 ± 0.1 , $12.4 \pm 0.7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 의 지질 함량을 나타내며 1–7%의 CO₂ 농도에서 4종 중 가장 높은 값을 나타냈다. *M. homosphaera*의 지질 함량은 7%의 CO₂ 농도에서 *C. vulgaris*보다 약 48% 더 높았으며, *C. vacuolata*보다 약 5배 더 높았다($p < 0.05$). 최근 연구 결과에 따르면 높은 지질과 단백질 함량으로 인해 *M. homosphaera*는 고품질의 사료 생산을 위한 유망한 자원으로써 제시되었다[18]. *M. homosphaera*는 다른 14종의 미세조류와 비교해서 가장 높은 지질 함량($40.7 \text{ g dry weight}^{-1}$)을 나타냈으며, 지질, 단백질, 탄수화물 이외에도 9종의 필수 아미노산과 오메가 3 등의 지방산을 함유하고 있음을 나타냈다[18]. 또 다른 연구 결과에 따르면 *M. homosphaera*는 바이오디젤 생산에 유리한 C18:1 지방산 비율이 *Chlorella* sp.보다 더 높았다[17]. *M. homosphaera*는 바이오매스 생성과 CO₂ 동화 속도는 느리지만 지질 생산 분야에서 유망한 자원이 될 수 있을 것이다.

Coelastrella sp.와 *C. vacuolata*는 9%의 CO₂ 농도에서 각각 $7.6 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $2.8 \pm 0.8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 로 최대값을 나타냈으나 고농도의 CO₂ 농도에서 다른 두 종에 비해 낮은 지질 함량을 나타냈다($p < 0.05$). 4종의 미세조류 중 작은 부피($50 \mu\text{m}^3$ 이하)를 가진 두 종(*C. vulgaris*, *M. homosphaera*)

이 부피가 큰(1,000 μm^3 이상) 두 종(*Coelastrella* sp., *C. vacuolata*)보다 지질 함량이 높았다. *Coelastrella* sp.의 지질 함량은 CO_2 농도보다 다른 환경 요인에 의해 영향을 받을 것이라 판단된다. 예를 들어, *Coelastrella* sp.는 3%의 염이 함유된 조건에서 지질 함량이 최대 35%까지 증가했다[33]. 또한, *Coelastrella* sp.의 지질 함량은 광도와 배양 온도에 영향을 받는다고 보고되었다[11]. 미세조류의 지질 함량은 종마다 다양한 환경 요인에 의해 영향을 받으며, 본 연구 결과에 따르면 CO_2 농도는 미세조류의 지질 함량 축적을 위한 주요 환경 요인이 될 수 있을 것이다.

CO₂ 농도에 따른 지질 함량과 CO₂ 동화 사이의 상관관계 특성

CO₂ 농도에 따른 지질 함량과 CO₂ 동화 속도 사이의 상관관계를 3D 산점도 그래프를 통해 분석하였다(Fig. 6). CO₂ 동화 속도와 지질 함량의 각 상대 비율은 1%의 CO₂ 농도에

서의 결과 값을 기준으로 계산하였다. 4종의 미세조류 중 *C. vulgaris*는 CO₂ 농도가 증가함에 따라 CO₂ 동화와 지질 함량의 상대 비율이 급격하게 증가하였다. 9%의 CO₂ 농도에서 CO₂ 동화 비율이 19.1까지 증가했으며 지질 함량의 비율은 2.3까지 증가했다. *C. vulgaris*는 CO₂ 농도 증가에 따라 CO₂의 동화 속도와 지질 함량을 효율적으로 증가시킬 수 있을 것이라 판단된다. *Chlorella* sp. KR-1은 고농도의 CO₂ (20–30%)와 높은 온도(40°C) 조건에서도 안정적으로 성장할 수 있다고 보고되며[34, 35], 환경 변화에 대한 *Chlorella* sp.의 내성은 다양한 환경 조건에서 이점으로 작용될 것이다. *M. homosphaera*는 5% 이상의 CO₂ 농도에서 CO₂ 동화와 지질 함량의 상대 비율이 뚜렷하게 증가하는 양상을 보이지 않았다. CO₂ 동화 비율은 9%의 CO₂ 농도에서 최대 6.0, 지질 함량 비율은 7%의 CO₂ 농도에서 최대 0.9를 나타냈다. *M. homosphaera*는 효율적인 CO₂ 동화와 지질 생성을 위해 5–7%의 CO₂ 농도가 적절함을 알 수 있다. *Coelastrella* sp.

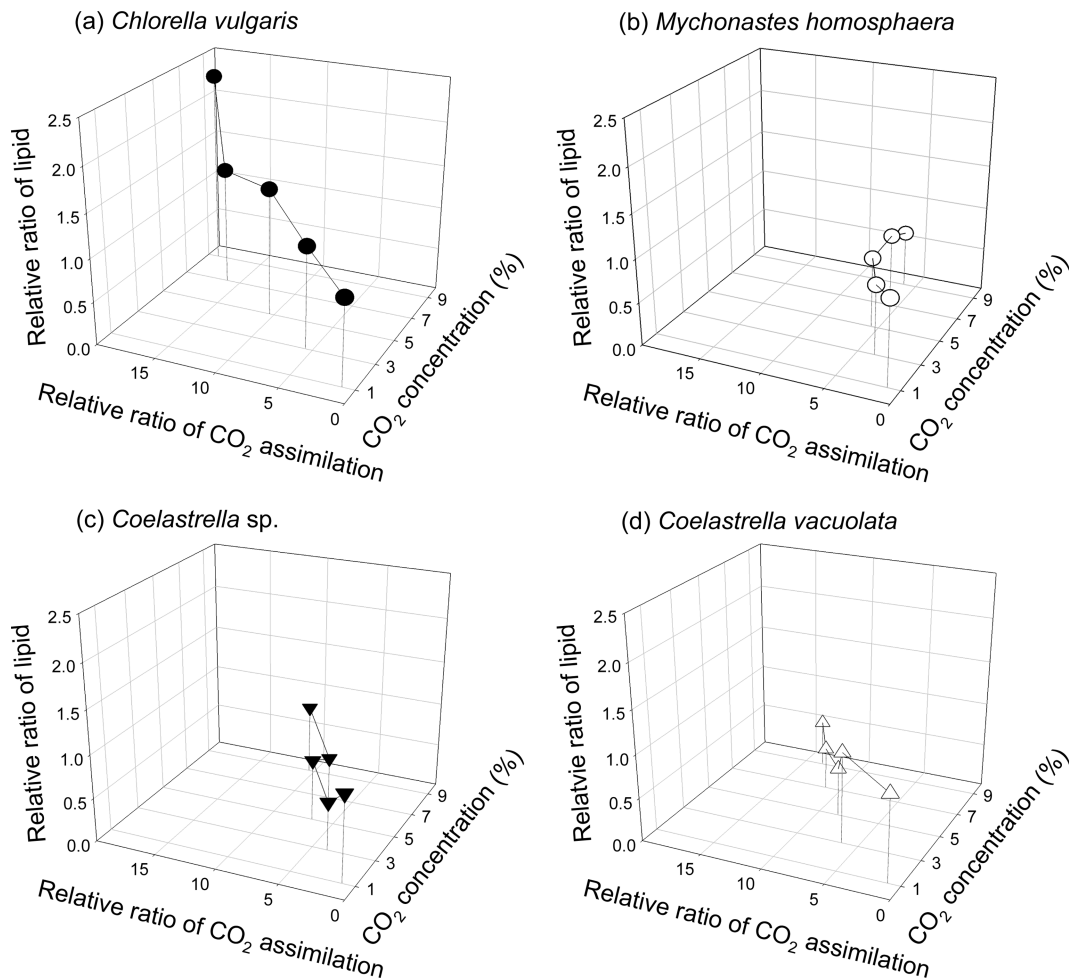


Fig. 6. 3-D scatter plots of 4 different microalgal species.

의 CO₂ 동화 비율은 CO₂ 농도가 증가함에 따라 지속적으로 증가해 9%의 CO₂ 농도에서 최대 10.5를 나타냈지만 지질 함량 비율은 3%와 7%에서 각각 0.6, 0.5로 감소하였다. *C. vacuolata*도 *Coelastrella* sp.와 유사하게 CO₂ 농도가 증가함에 따라 CO₂ 동화 비율이 지속적으로 증가해 9%의 CO₂ 농도에서 최대 13.5를 나타낸 반면, 지질 함량 비율은 5%의 CO₂ 농도에서 0.6으로 감소하였다.

본 연구 결과를 종합해보면 4종의 자생 미세조류 중 가장 빠른 바이오매스 생성과 CO₂ 동화 속도, 높은 지질 함량을 보인 미세조류는 *C. vulgaris*였으며, 이는 다양한 산업 분야에서 유망한 자원으로써 활용될 수 있음을 시사한다. 4종의 미세조류에 대한 바이오매스 생산, CO₂ 동화 속도, CO₂ 농도에 따른 지질 함량은 각 종마다 다른 특성을 보여주었다. 미세조류의 특성을 고려하여 효율적인 바이오매스 생산 및 지질 함량 증가를 위한 환경 요인을 최적화 한다면 더욱 다양한 미세조류의 산업적 이용이 가능할 것이다. 또한, 자생 미세조류의 특성 규명은 국가 생물자원 정보 구축 및 생물 다양성 보전에 크게 기여할 것이며, 자생 미세조류의 활용은 높은 부가가치 창출을 가능하게 할 것이다.

요 약

미세조류는 효율적으로 바이오매스를 증가시킬 수 있으며 유용한 생물학적 자원들을 축적할 수 있기 때문에 에너지 및 식품 생산 등 다양한 분야에서 유망한 자원으로써 주목받고 있다. 본 연구에서는 4종의 미세조류(*Chlorella vulgaris*, *Mychonastes homosphaera*, *Coelastrella* sp., *Coelastrella vacuolata*)를 선정하여 이들의 성장, CO₂ 동화, CO₂ 농도에 따른 미세조류의 지질 생성 특성을 분석하였다. 각 미세조류의 크기는 *C. vulgaris*가 가장 작았으며, *M. homosphaera*, *C. vacuolata*, *Coelastrella* sp. 순으로 큰 크기를 나타냈다. *C. vulgaris*는 다른 3종의 미세조류와 비교해서 크기가 가장 작으며 성장과 CO₂ 동화 속도가 가장 빠르게 나타났다. 또한, 초기 바이오매스가 증가함에 따라 CO₂ 동화 속도는 최대 9.62 mmol·day⁻¹·l⁻¹를 나타냈으며, 다른 3종의 미세조류(약 3 mmol·day⁻¹·l⁻¹)보다 3배 이상 높은 CO₂ 동화 속도를 보여주었다($p < 0.05$). *M. homosphaera*를 제외하고 3종의 미세조류는 CO₂ 농도와 CO₂ 동화 비속도 사이에 양의 상관관계(positive correlation)를 나타냈다. 특히, *C. vulgaris*는 다른 3종의 미세조류와 비교해 더 높은 CO₂ 동화 비속도를 보여주었다(14.6 vs. ≤ 11.9 mmol·day⁻¹·l⁻¹). 4종의 미세조류는 CO₂ 농도가 증가함에 따라 지질 함량이 증가했으며 그 중에서 *C. vulgaris*는 최대 18 mg·l⁻¹를 나타내 다른 3종의 미세조류(최대 12 mg·l⁻¹)보다 최소 50% 이상 높은 지질 함량을 보여주었다. 4종의 미세조류 중 *C. vulgaris*가 효율적

으로 CO₂를 동화하며 다른 미세조류보다 높은 바이오매스와 지질 생산이 가능함을 시사한다.

Acknowledgments

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**: 217-232.
- Williams PJIB, Laurens LM. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energ. Environ. Sci.* **3**: 554-590.
- Shetty P, Gitau MM, Maróti G. 2019. Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. *Cells* **8**: 1-16.
- Chen C-Y, Yeh K-L, Aisyah R, Lee D-J, Chang J-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour. Technol.* **102**: 71-81.
- Kumar SJ, Kumar GV, Dash A, Scholz P, Banerjee R. 2017. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal. Res.* **21**: 138-147.
- Kumar A, Ergas S, Yuan X, Sahu A, Zhang Q, Dewulf J, et al. 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends Biotechnol.* **28**: 371-380.
- Zeng X, Danquah MK, Chen XD, Lu Y. 2011. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**: 3252-3260.
- Li K, Liu Q, Fang F, Luo R, Lu Q, Zhou W, et al. 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresour. Technol.* **291**: 121934.
- Leong YK, Chang J-S. 2020. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresour. Technol.* **303**: 122886.
- Al-Qasbi M, Raut N, Talebi S, Al-Rajhi S, Al-Barwani T. 2012. Presented at the Proceedings of the world congress on engineering.
- Dimitrova P, Marinova G, Alexandrov S, Iliev I, Pilarski P. 2017. Presented at the Youth Scientific Conference, Sofia 2016.
- Lakshmikanandan M, Murugesan A, Wang S, Abomohra AE-F, Jovita PA, Kiruthiga S. 2020. Sustainable biomass production under CO₂ conditions and effective wet microalgae lipid extraction for biodiesel production. *J. Clean. Prod.* **247**: 119398.

13. Griffiths MJ, Harrison ST. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* **21**: 493-507.
14. Anjos M, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA, Dragone G. 2013. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **139**: 149-154.
15. Lv J-M, Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L, Chen H-L. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour. Technol.* **101**: 6797-6804.
16. Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y, Vaca-Garcia C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **35**: 265-278.
17. Sun L-Y, Cui W-J, Chen K-M. 2018. Two *Mychonastes* isolated from freshwater bodies are novel potential feedstocks for biodiesel production. *Energ. Source Part A.* **40**: 1452-1460.
18. Saadaoui I, Cherif M, Rasheed R, Bounnit T, Al Jabri H, Sayadi S, et al. 2020. *Mychonastes homosphaera* (Chlorophyceae): A promising feedstock for high quality feed production in the arid environment. *Algal. Res.* **51**: 102021.
19. Hu C-W, Chuang L-T, Yu P-C, Chen C-NN. 2013. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food Chem.* **138**: 2071-2078.
20. Minhas AK, Hodgson P, Barrow CJ, Adholeya A. 2020. Two-phase method of cultivating *Coelastrella* species for increased production of lipids and carotenoids. *Bioresour. Technol. Rep.* **9**: 100366.
21. Mayo AW, Noike T. 1994. Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Water Res.* **28**: 1001-1008.
22. Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Meth.* **77**: 41-47.
23. Hanagata N, Malinsky-Rushansky N, Dubinsky Z. 1999. Eukaryotic picoplankton, *Mychonastes homosphaera* (Chlorophyceae, Chlorophyta), in Lake Kinneret, Israel. *Phycol. Res.* **47**: 263-269.
24. Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S. 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.* **117**: 257-264.
25. Goecke F, Noda J, Paliocha M, Gislerød HR. 2020. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 149.
26. Khoshmanesh A, Lawson F, Prince IG. 1997. Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chem. Eng.* **65**: 13-19.
27. Sunda WG, Huntsman SA. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* **390**: 389-392.
28. Chen F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* **14**: 421-426.
29. Li T, Zheng Y, Yu L, Chen S. 2014. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenerg.* **66**: 204-213.
30. Singh S, Singh P. 2014. Effect of CO₂ concentration on algal growth: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **38**: 172-179.
31. Abou-Shanab RA, Hwang J-H, Cho Y, Min B, Jeon B-H. 2011. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Appl. Energ.* **88**: 3300-3306.
32. Ahmad A, Yasin NM, Derek C, Lim J. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **15**: 584-593.
33. Karpagam R, Raj KJ, Ashokkumar B, Varalakshmi P. 2015. Characterization and fatty acid profiling in two fresh water microalgae for biodiesel production: lipid enhancement methods and media optimization using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **188**: 177-184.
34. Sung K-D, Lee J-S, Shin C-S, Park S-C, Choi M-J. 1999. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresour. Technol.* **68**: 269-273.
35. Hanagata N, Takeuchi T, Fukuju Y, Barnes DJ, Karube I. 1992. Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. *Phytochemistry.* **31**: 3345-3348.