

신규 분리된 담수미세조류 *Parachlorella* sp. 의 지방산 생산성 향상을 위한 배지 조성 연구

박한울^{1,2}, 임경준³, 민지호¹, 강성모², 한찬우¹, 이창수³, 정지영³, 홍성주^{1,2}, 이철균^{1,2}, 김지훈^{3*}

¹인하대학교 해양과학·생물공학과

²인하대학교 생물산업기술연구소

³국립낙동강생물자원관, 미생물연구실

Received: December 23, 2019 / Revised: April 7, 2020 / Accepted: April 8, 2020

Investigation on Media Composition for Cultivation of a Newly Isolated Freshwater Microalga *Parachlorella* sp. to Enhance Fatty Acid Productivity

Hanwool Park^{1,2}, Kyung June Yim³, Ji-Ho Min¹, Sung-Mo Kang², Chan-woo Han¹, Chang-Soo Lee³, Ji Young Jung³, Seong-Joo Hong^{1,2}, Choul-Gyun Lee^{1,2}, and Z-Hun Kim^{3*}

¹Department of Marine Science and Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

²Institute of Industrial Biotechnology, Inha University, Incheon 22212, Republic of Korea

³Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea

Parachlorella sp. is an efficient fatty acid producer that can be used in the production of biofuels, feeds, and fertilizers. Microalgae show varying responses to culture conditions, even those within the same species. In this study, growth and fatty acid composition of a newly isolated *Parachlorella* sp. from the Nakdong river of Korea in different culture media were investigated. The microalga was cultivated in 400 ml bubble column photobioreactors using BG-11, BBM, TAP, and modified TAP (MTAP) media. It was shown that using BBM led to greater fatty acid accumulation (34%), while using TAP medium led to greater biomass productivity (0.34 g/l/day). Composition of the TAP medium was modified to have the N:P ratio of BBM while also varying concentrations of N and P to improve fatty acid productivity. One of the modified TAP media, MTAP-1 (104.8 mgN/l, 135.2 mgP/l, N:P ratio = 0.77), showed the highest fatty acid concentration of 0.69 ± 0.04 g/l, while those from TAP and BBM were 0.48 ± 0.06 g/l and 0.40 ± 0.02 g/l, respectively. The results showed that microalgal fatty acid productivity could be enhanced by changing the N:P ratio and concentrations.

Keywords: Biodiesel, green microalgae, linolenic acid, media selection

서론

미세조류는 광합성 미생물로 지구온난화의 주범 중 하나인 이산화탄소를 흡수하여 탄수화물, 단백질, 지질, 색소 등 생화학합물을 합성하고, 고등식물보다 광합성 효율이 높고, 연중 생산이 가능하다. 또한 주 식량자원이 아니고, 경작지 뿐만 아니라 바다, 사막 등지에서도 배양이 가능하다는 등의 장점으로 장차 도래할 바이오리파이너리(biorefinery)의 핵

심 원료 중 하나로 평가받고 있다[1–3]. 미세조류 배양에 사용하는 배지의 조성, 공급되는 빛의 파장 및 세기, 온도 등의 환경 인자에 따라서 세포 성장성과 조성 등이 변화하는 특징을 가지고 있다. 배양 환경 인자에 대한 미세조류 세포의 반응은 속, 종마다 다를 뿐만 아니라 같은 종 내에서도 다양한 차이를 보인다[4–8]. 따라서, 지질, 바이오매스, 색소 등 생산하고자 하는 목표 생화학합물에 따라 다른 배양 조건을 주어진 중에서도 다른 종류의 산물의 생산성을 증대할 수 있다.

배지에 세포 성장에 필요한 질소와 인 등이 충분한 조건일 때 미세조류는 세포 성장 및 분열을 하게 되는데, 이러한 영양소가 결핍될 경우 더 이상 분열을 하지 못하고 2차 대사산물을 축적하게 된다. 질소 결핍 조건에서 *Dunaliella*

*Corresponding author

Tel: +82-54-530-0841, Fax: +82-54-530-0849

E-mail: kimzhun@nnibr.re.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

tertiolecta 종은 탄수화물을 주로 축적하고, *Nannochloropsis oculata* 종과 *Porphyridium cruentum* 종은 지방산을 주로 축적하였다[9, 10]. *Haematococcus pluvialis* 종에서는 질소 결핍 조건에서 카로티노이드(carotenoid)인 아스타잔틴(astaxanthin)의 축적이 일어나며 *Dunaliella salina* 종에서는 질소 결핍 및 염도와 광도가 높은 조건에서 베타카로틴(β -carotene)의 축적이 일어난다[11-13]. 본 연구에서 사용된 미세조류와 같은 속(genus)인 *Parachlorella kessleri* CICALA 255 종은 질소, 황, 또는 인의 농도가 낮은 배지에서 지방산을 축적하는 것으로 보고되었다[14].

본 연구에서는 국내 낙동강 수계에서 처음으로 채집, 분리된 *Parachlorella* sp. 종의 지방산 생산성을 높일 수 있는 배양기술을 개발을 위해 여러 배양 인자 중, 배지 조성에 따른 지방산 생산성을 연구하였다. 미세조류 배양에 있어 배양 중간에 세포를 수확한 뒤 질소가 결핍된 배지로 새로 교체하는 2단계 배양 방식으로 영양소 결핍 조건을 줄 수 있지만 이는 에너지와 비용이 많이 들어 대량 배양에 적용이 어렵기 때문에, 대량 배양에 통상적으로 사용하는 회분식 배양(batch cultivation)을 통해 바이오매스와 지방산 생산성을 분석하였다. 담수 미세조류 배양에 일반적으로 사용되는 3 종류의 배지, BG-11 (Blue-Green), TAP (Tris-Acetate-Phosphate), BBM (Bold's Basal Medium), 배지를 사용하여 *Parachlorella* sp.를 배양한 뒤, 바이오매스 생산성과 지질 함량을 분석하여 배지에 따른 지방산 생산성을 확인하였다. 지방산 생산성을 향상시키기 위하여 바이오매스 생산성이 가장 높게 나온 TAP 배지와 지방산 함량이 가장 높게 나온 BBM 배지의 특성을 조합하여 4 종류의 Modified TAP (MTAP) 배지 조성을 고안, N:P 비율, 질소원 종류와 아세트산 첨가 여부에 따른 지방산 생산성의 차이를 조사해 지방산 및 오메가-3 지방산 생산성이 높은 배지 조성을 제안하였다.

재료 및 방법

미세조류 균주 및 종균의 유지

대한민국 경상북도 상주시 낙동강 상주보 인근(36°26'02.6"N128°14'54.3"E)에서 분리한 *Parachlorella* sp. FBCC180029 종을 국립낙동강생물자원관 담수생물자원은행에서 제공받아 본 연구에 사용하였다. 종균은 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 TAP 배지를 사용하여 진탕 배양기(VS-8480SF, Vision Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여 20°C의 온도에서 120 rpm으로 교반시키며 형광등을 이용해 50 μ mol/m²/s의 광도로 24시간 빛을 공급해주어 배양하였다.

배양 배지

Parachlorella sp.의 지방산 생산성을 평가하기 위하여 담수 미세조류의 배양에 널리 사용되는 BG-11, TAP, BBM 세 종류의 배지를 사용하여 배양 실험을 진행하였다. BG-11 배지는 NaNO₃ 1.5 g/l, MgSO₄ 7H₂O 74.9 mg/l, CaCl₂ 2H₂O 36 mg/l, Citric acid 6 mg/l, 0.25M NaEDTA (pH8.0) 11.2 ul/l, H₃BO₃ 2.860 mg/l, MnCl₂ 4H₂O 1.810 mg/l, ZnSO₄ 7H₂O 0.222 mg/l, Na₂MoO₄ 2H₂O 0.390 mg/l, CuSO₄ 5H₂O 0.079 g/l, Co(NO₃)₂ 6H₂O 0.0494 mg/l, Ammonium iron(III) citrate 6 mg/l, NaCO₃ 20 mg/l, K₂HPO₄ 30.5 mg/l로 구성되었고, BBM은 NaNO₃ 250 mg/l, K₂HPO₄ 75 mg/l, KH₂PO₄ 175 mg/l, CaCl₂ 2H₂O 25 mg/l, MgSO₄ 7H₂O 75 mg/l, NaCl 25 mg/l, H₃BO₃ 11.42 mg/l, EDTA 50 mg/l, KOH 31 mg/l, FeSO₄ 7H₂O 4.98 mg/l, H₂SO₄ (96%) 0.1 ul/l, ZnSO₄ 7H₂O 8.82 mg/l, MnCl₂ 4H₂O 1.44 mg/l, MoO₂ 0.17 mg/l, CuSO₄ 5H₂O 1.57 mg/l, Co(NO₃)₂ 6H₂O 0.49 mg/l로 구성되어 있다. TAP은 Tris base 2.42 g/l, MgSO₄ 7H₂O 100 mg/l, CaCl₂ 2H₂O 50 mg/l, NH₄Cl 400 mg/l, K₂HPO₄ 108 mg/l, KH₂PO₄ 56 mg/l, ZnSO₄ 7H₂O 22 mg/l, H₃BO₃ 11.4 mg/l, MnCl₂ 4H₂O 5.1 mg/l, CoCl₂ 6H₂O 1.6 mg/l, CuSO₄ 5H₂O 1.16 mg/l, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O 1.1 mg/l, FeSO₄ 7H₂O 5 mg/l, Na₂EDTA 50 mg/l, CH₃COOH 1 mg/l로 구성되었다. 세 배지 중 주요 차이점인 무기질소, 무기인의 함량 및 N:P 비율과 유기탄소원 사용 여부는 Table 1에 정리되어 있다. NaNO₃와 NH₄Cl 외에 통상적으로 trace mineral supplement로 취급되는 화합물에 포함된 N의 양은 전체의 약 0.1% 이하로 Table 1의 계산에서는 무시하였다.

MTAP 배지는 TAP 배지의 질소와 인의 농도를 조절하여 제조하였다(Table 2). BBM과 N:P 비율이 같도록 TAP 배지 조성 중 phosphate buffer의 K₂HPO₄, KH₂PO₄ 간의 비율은 유지하면서 무기인의 농도를 증가시켰고(MTAP-1), 여기서 무기질소와 무기인의 총량을 75%, 50%로 낮추거나(MTAP-2, MTAP-3), BBM과 같은 수준으로 맞추어 암모니아와 아세트산 사용이 미치는 영향을 조사하였다. BG-11의 ferric

Table 1. Major differences between BG-11, TAP, and BBM media.

Medium	Inorganic Nitrogen (mgN/l)	Inorganic Phosphorus (mgP/l)	N:P Ratio	Acetate (ml/l)
BG-11	246.5	5.4	45.4	-
TAP	104.8	135.2	3.3	1.0
BBM	41.2	53.2	0.8	-

Table 2. Comparison of TAP, MTAP, and BBM media.

Medium	Inorganic Nitrogen (mgN/l)	Inorganic Phosphorus (mgP/l)	N:P Ratio	Acetate (ml/l)
TAP	104.8	31.9	3.3	1.0
MTAP-1	104.8	135.2	0.8	1.0
MTAP-2	78.6	101.4	0.8	1.0
MTAP-3	52.4	67.6	0.8	1.0
MTAP-4	41.2	53.2	0.8	1.0
BBM	41.2	53.2	0.8	-

ammonium citrate는 Fe³⁺ 이온 공급을 위해 사용되며 citrate (citric acid) 또한 포도당, 아세트산과 달리 미세조류 세포의 비선호 탄소원으로 생장에 큰 영향을 미치지 않아 이들에 의한 영향은 고려하지 않았다[15, 16].

미세조류 배양

미세조류 배양 실험은 500 ml 기포탑 광생물반응기를 이용하여 수행하였다. 배양액은 400 ml을 넣어 미세조류를 배양하였으며 2% 이산화탄소가 섞인 기체를 0.1 vvm의 속도로 폭기하여 배양액의 pH를 유지하고 무기탄소를 공급하였다. 광원으로는 3파장 형광등을 사용하여 150 μmol/m²/s의 광도로 빛에너지를 24시간 공급하였다. 배양 온도는 배양실 온도를 에어컨을 이용해 20℃로 유지하였다. 실험군 당 두 개의 기포탑 광생물반응기를 사용해 미세조류를 배양하였으며, 실험 결과는 평균값과 실험값의 범위를 오차범위로 표기하였다.

미세조류 바이오매스 농도 및 지방산 분석

미세조류 배양액의 바이오매스 농도 분석은 Coulter Counter (Multisizer 4e, Beckman Coulter, Inc., USA)를 통해 세포 농도와 부피를 측정 후, 실험적으로 결정된 세포 중량과 건조 세포 중량의 비율을 이용해 계산하여 결정하였다. 미세조류 바이오매스의 약 70%가 수분으로 확인되었다. 바이오매스 생산성(Biomass Productivity, BP)은 아래 식을 이용하여 계산하였다:

$$BP = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1}$$

BP는 바이오매스 생산성(g/l/day), C₂ - C₁은 최종 농도와 접종 농도의 차이(g/l), t₂ - t₁은 배양기간(day)이다.

바이오매스 내 지방산 함량 및 조성 분석을 위해 배양 실험 중 50 ml의 배양액을 채취하여 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리를 통해 바이오매스를 수확하였다. 수확된 바이오매스는 탈이온수를 사용해 2회 세척한 후, -20℃에서 12시간 이상 냉동한 뒤, 동결건조기(LP 10, ilShinBioBase, Korea)에서 동결건조 되었다. 동결 건조된 바이오매스에 황산과 메탄올을 첨가하여 전이에스테르화반응을 시킨 뒤 n-헥산 추출을 통해 지방산메틸에스테르를 수득하여 이를 가스크로마토그래프(Acme 6000 GC, Younglin, Anyang, Korea)를 이용해 바이오매스 내 지방산 함량과 조성을 분석하였다[8].

결과 및 고찰

총 10일간 *Parachlorella*를 배양한 결과, 최종 바이오매스

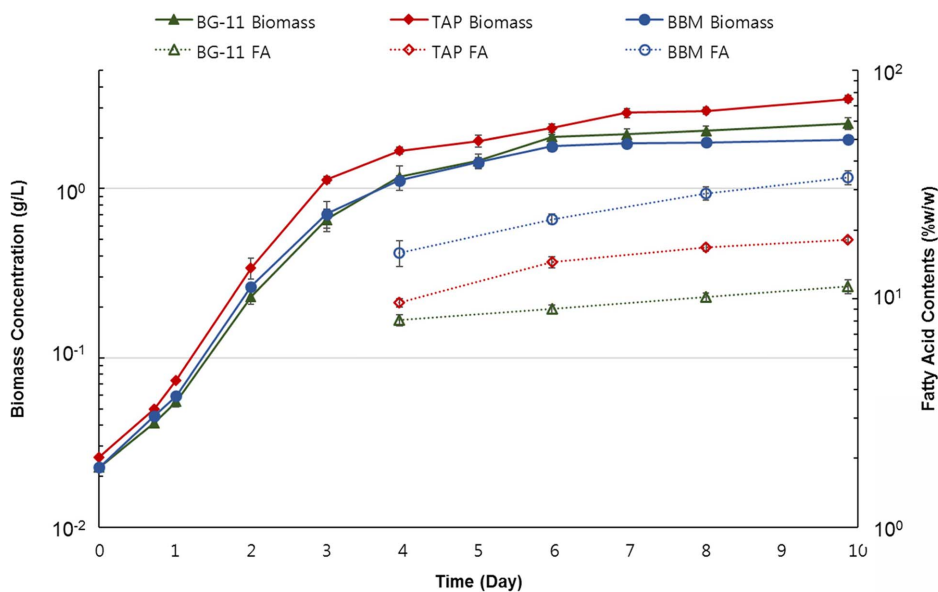


Fig. 1. Changes in biomass concentration and fatty acid content of *Parachlorella* sp. cultures by different media.

농도는 TAP 배지에서 3.4 g/l, BG-11 배지에서 2.4 g/l, BBM 배지에서 2.0 g/l로 바이오매스는 TAP 배지에서 가장 많이 생산되었음을 알 수 있었다(Fig. 1). BP는 TAP, BG-11, BBM 순이었으며 각각 0.34, 0.24, 0.19 g/l/day로 TAP 배지에서 BBM 배지에서 보다 74.8% 높았다. 미세조류 바이오매스 내 N:P 비율은 종과 배양 조건에 따라 다르지만 질소 내지 인 결핍 등의 조건을 주지 않았을 때 통상적으로 7:1 이다[1, 15]. 이 점에 미루어, 바이오매스 생산 제한 인자로 BG-11에서는 낮은 무기인 농도가, BBM에서는 무기질소 농도가 작용한 것으로 판단된다. TAP에는 특이적으로 아세트산이 유기탄소원으로 공급되었지만 2% CO₂를 지속적으로 공급 해주었기 때문에 탄소원은 바이오매스 생산 제한 인자로 작용하지 않았을 것이다. 미세조류를 이용해 축산 오수 등에서 무기질소와 무기인을 제거하려는 연구에서는 N:P 비율을 조절하여 무기영양염 제거 효율을 높이는 기술이 개발되고 있는데, *Chlorella vulgaris*에서는 N:P 비율이 8:1, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia* 등으로 이루어진 미세조류 군체는 14:1 이었다[16, 17]. 미세조류 세포들이 대수적으로 증식할 때 무기영양염을 가장 왕성하게 흡수하기 때문에 본 실험에 사용한 배지 중 N:P 비율이 7:1에 가장 가까운 TAP 배지에서 바이오매스 생산이 가장 높았을 것이다[18].

세포 접종 후, 시간이 흐름에 따라 BBM 배지를 사용한 배양액의 색이 먼저 얼어지기 시작하여 노란색으로 변하였고, TAP 배지를 사용한 배양액은 연두색으로 변하였다. 반면 BG-11을 사용한 배양액은 진한 초록색으로 다른 배지와 달리 탈색이 발생하지 않았다(Fig. 2). 진핵 미세조류는 적색과 청색 파장의 빛을 주로 흡수하여 초록색으로 보이는 클로로필을 주요 광합성 색소로 가지고 있는데, 클로로필은 분자 하나 당 4개의 질소 원자를 가지고 있어, 배양액 내 질소가 부족한 경우 이를 분해하여 질소를 단백질 합성에 사용하는 것으로 알려져 있다[10, 19]. 따라서, N:P 비율이 낮은 BBM 배지를 사용한 배양액에서는 미세조류 세포들이 클로로필을

분해하여 노란색으로 탈색되었고, N:P 비율이 높은 BG-11 배지를 사용한 배양액에서는 질소가 충분하여 클로로필을 분해하지 않아 짙은 초록색으로 배양액의 색이 유지된 것으로 판단된다.

모든 배지에서 접종 후 3일까지는 대수(exponential) 성장 곡선을 보이고, 그 뒤로는 7일까지 빛에너지에 의해 생장이 제한된 성장곡선을 보인 뒤, 정체기에 돌입하였다. 배양 4일, 6일, 8일, 10일에 미세조류 바이오매스의 지방산 함량을 분석한 결과, 모든 배지에서 시간이 지날수록 지방산 함량이 증가하였으나, N:P 비율이 낮아 질소가 상대적으로 부족했던 BBM 배지에서 지방산 함량이 최고 34%까지 증가하였다(Fig. 1). TAP 배지에서는 지방산 함량이 18%, BG-11 배지에서는 지방산 함량이 11%로 나타났다.

미세조류 세포가 성장하여 분열하기 위해서는 단백질 합성이 필수적이기 때문에, 배양액 내에 충분한 질소가 공급되어야 세포 분열이 원활히 이루어진다. 배양액 내에 질소가 부족할 경우, 새로운 단백질의 합성이 불가능하여 세포 분열이 멈추는데, 이 때 빛과 이산화탄소가 계속 공급될 경우 미세조류 세포는 광합성을 계속하게 된다. 분열을 하지 못함에 따라 발생하는 잉여 에너지를 저장하기 위하여 지질, 탄수화물, 색소 등의 고분자물질을 생산하여 축적하게 된다[5, 9-13].

TAP 배지의 지방산 함량이 BBM에 비해 낮은 것에는 N:P 비율 뿐만 아니라 TAP 배지에서의 바이오매스 농도가 높아 세포당 광도가 낮았기 때문일 수도 있다. 미세조류 세포의 2차 대사산물 축적은 상술한 것과 같이 잉여 에너지를 저장하기 위해 일어나는데, 세포 당 에너지가 낮은 경우 지방산 합성을 위한 에너지가 낮아져 지방산 합성이 원활히 일어나지 않을 수 있다. *H. pluvialis*의 경우 아스타잔틴 생산에 적절한 빛에너지를 공급하기 위해 세포 농도에 맞게 광도를 조절하여 아스타잔틴 생산성을 향상시킨 연구가 보고된 바 있다[20]. Fig. 1에서 나타난 것과 같이 BBM에서는 지방산 함

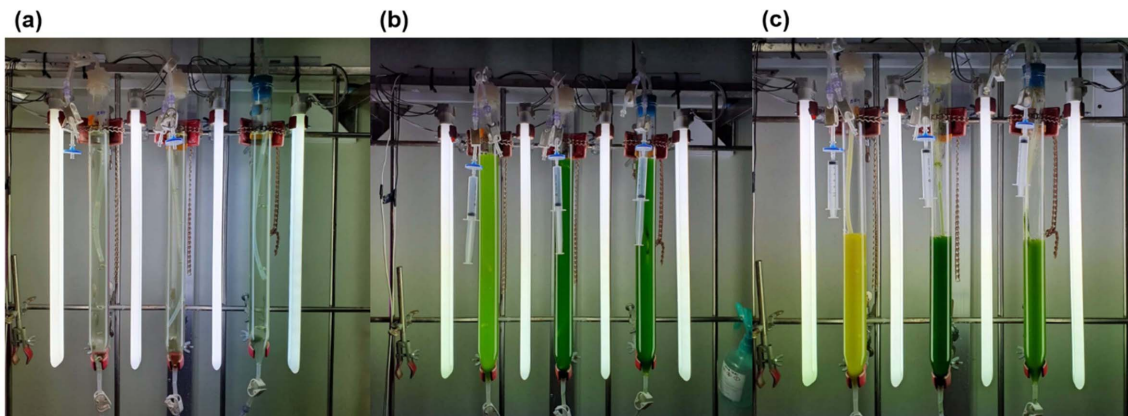


Fig. 2. Color changes of the algal cultures with BBM (left), BG-11 (middle), TAP (right) on the day 0 (a), 4 (b), and 10 (c).

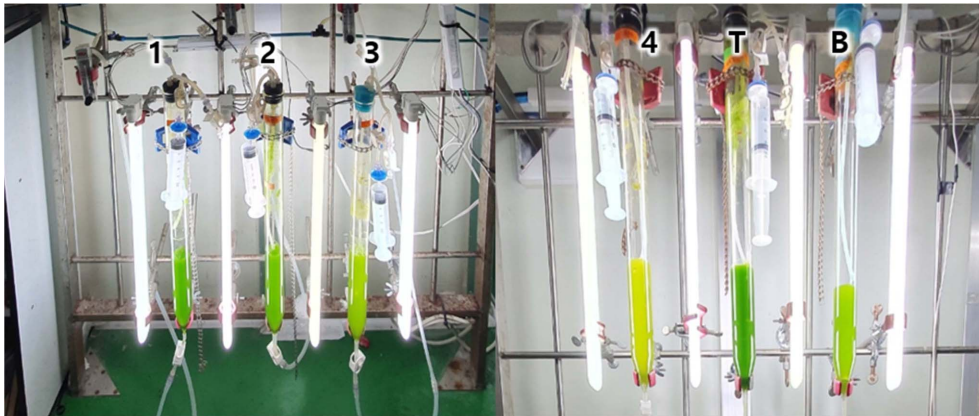


Fig. 3. Photographs of algal cultures with BBM (B), TAP (T), MTAP-1 (1), MTAP-2 (2), MTAP-3 (3), MTAP-4 (4) after 9 days of cultivation.

량이 직선으로 꾸준히 증가한 반면, TAP에서는 6일차 이후로 지방산 함량 증가 폭이 감소하였는데, 세포 당 빛 에너지가 BBM에서 더 높아 지방산 합성이 더 잘 일어났을 수 있다.

본 실험을 통하여 바이오매스 생산에는 TAP 배지가, 미세조류 내 지방산 축적에는 BBM 배지가 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다. 실질적인 지방산 생산성을 분석하기 위하여 세포 당 지방산 함량이 아닌, 배양액 부피당 지방산의 농도를 계산하였다. 최종 세포 농도는 TAP에서 3.4 g/l로 BBM의 2.0 g/l보다 74% 높았지만, 세포 당 지방산 함량은 BBM에서 34%로 TAP에서의 18%보다 87% 높았다. 그 결과, 종합적인 지방산 농도는 BBM에서 639 mg/l로 TAP에서의 615 mg/l보다 4% 높은 생산 농도를 보였다. BG-11은 중간 정도의 최종 세포 농도를 보였으나 지방산 함량이 11%로 다른 배지를 사용했을 때보다 현저히 낮아 276 mg/l의 가장 낮은 지방산 농도를 보였다.

미세조류 내 지방산 함량도 중요하지만, 바이오매스 자체가 많이 생산되어야 단백질, 탄수화물, 카로테노이드 등 다른 유용 물질의 절대 생산량이 증가하기 때문에, 바이오매스 생산성이 가장 높았던 TAP 배지의 질소와 인의 비율, 총량 등을 조절하여 TAP 배지의 높은 바이오매스 생산성과 BBM 배지의 높은 지방산 함량, 각각의 장점을 결합할 수 있는 배지 조성을 찾기 위한 실험을 진행하였다. TAP 배지에, 지방산 함량이 가장 높았던 BBM 배지와 같이 질소와 인의 비율을 조절하고(MTAP-1), 세포 농도와 지방산 합성의 관계가 있는지 조사하기 위해 MTAP-1 배지의 질소와 인의 총량을 줄인 MTAP-2, MTAP-3을 고안하였다. 또한, TAP과 BBM은 질소원이 각각 염화 암모늄, 질산 나트륨으로 다르고, TAP에는 아세트산이 유기산으로 공급되는 차이가 존재하는데, 이에 의한 바이오매스 생산성과 지방산 함량에 대한 효과를 보기 위하여 BBM과 같은 질소와 인의 양을 공급해주는

MTAP-4를 사용하였다(Table 2).

세포 접종 후, 시간이 흐름에 따라 MTAP-4, BBM, MTAP-3, MTAP-2, MTAP-1, TAP 배지 순으로 노란색에 가까이 변한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이를 통해, BG-11, TAP, BBM의 실험결과와 같이 노란색으로 많이 변한 순으로 지방산이 많이 축적됐을 것을 유추할 수 있었다.

*Parachlorella*를 각각의 배지에서 배양한 결과, 최종 바이오매스 농도가 TAP, MTAP-1, MTAP-2, MTAP-3, MTAP-4, BBM에서 각각 2.43, 2.78, 2.14, 1.85, 1.58, 1.36 g/l로 나타났다(Fig. 4). TAP과 MTAP-1, BBM과 MTAP-4는 같은 양의 질소원을 사용하였지만 MTAP-1과 MTAP-4가 각각의 대조군에 비해 14%, 16% 더 바이오매스 농도가 높았다. MTAP-4 배지가 BBM보다 바이오매스 농도가 높게 나온 것은 질소원을 암모니아로 사용하고, 아세트산을 첨가하였기 때문으로 판단된다.

미세조류의 질소 대사과정에서 세포 내로 흡수된 질산이온은 nitrate reductase에 의해 아질산이온으로 환원된 다음, nitrite reductase에 의해 암모늄 이온으로 환원된 뒤 glutamine synthase에 의해 글루탐산과 반응하여 글루타민으로 합성된다[21]. 따라서, 암모늄 이온을 질소원으로 공급해준 MTAP-4 배지에서 미세조류 세포가 더 빠르게 성장할 수 있었을 것이다. MTAP 배지에 공급해준 아세트산 역시 미세조류 세포 내로 흡수된 뒤 Acetyl-CoA로 변환되어 TCA cycle에 빠르게 사용될 수 있기 때문에 세포 내에 에너지를 빠르게 공급하여 세포 성장을 촉진하고, 나아가 지방산 축적을 증가시키는 효과를 낼 가능성이 있다[22].

상술한 효과는 미세조류 세포 크기를 통해 그 근거를 볼 수 있다(Fig. 5). BBM을 공급하여 배양한 *Parachlorella*의 평균 세포 부피는 최고 123 μm^3 이었는데 MTAP 배지에서는 최고 288 μm^3 까지 세포의 부피가 증가하는 것을 확인하

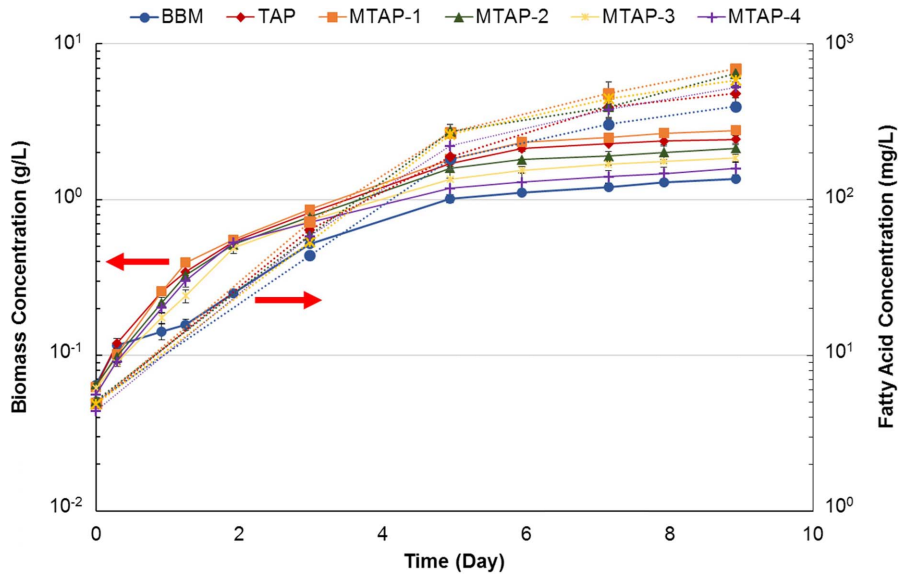


Fig. 4. Changes in biomass concentration (solid line) and fatty acid concentration (dotted line) of *Parachlorella sp.* cultures by media.

였다. 해당 기간 동안(배양일 0-3일) 세포 내 지방산 함량은 크게 증가하지 않아 암모니아와 아세트산에 의해 세포가 매우 빠른 속도로 증식하여 나타난 현상으로 사료된다. 반면에 MTAP-1 배지와 TAP 배지의 차이는 같은 질소원을 사용하였고 모두 아세트산을 첨가해주었기 때문에 두 배지 간 현저히 차이나는 N/P ratio로 인해 세포 내 지방산 함량이 달라졌고, 최고 세포 부피도 MTAP과 TAP 배지에서 각각 $273 \mu\text{m}^3$, $241 \mu\text{m}^3$ 으로 차이가 발생해 바이오매스 농도가 달랐을 것으로 판단된다.

미세조류 유래 지방산은 이중결합의 유무에 따라 포화지

방산과 불포화지방산으로 분류가 되고, 특히 오메가-3 지방산을 포함하는 불포화지방산은 사람과 동물이 섭취할 경우 생리적으로 이로운 효과를 내어 건강기능성식품이나 동물사료로 사용하기 위해서는 불포화지방산의 함량이 높은 것이 좋다[23-25]. *Parachlorella sp.*의 지방산의 질을 확인하기 위하여 함량과 함께 조성을 분석하였다. 최종 지방산 함량은 TAP, MTAP-1, BBM, MTAP-2, MTAP-3, MTAP-4 순으로 높았으며 각각 19.7%, 24.9%, 29.1%, 30.2%, 31.4%, 34.3%였다(Fig. 6). 지방산 축적이 본격적으로 시작되기 전엔 3일 차까지는 팔미트산(Palmitic acid, C16:0), 리놀레익산

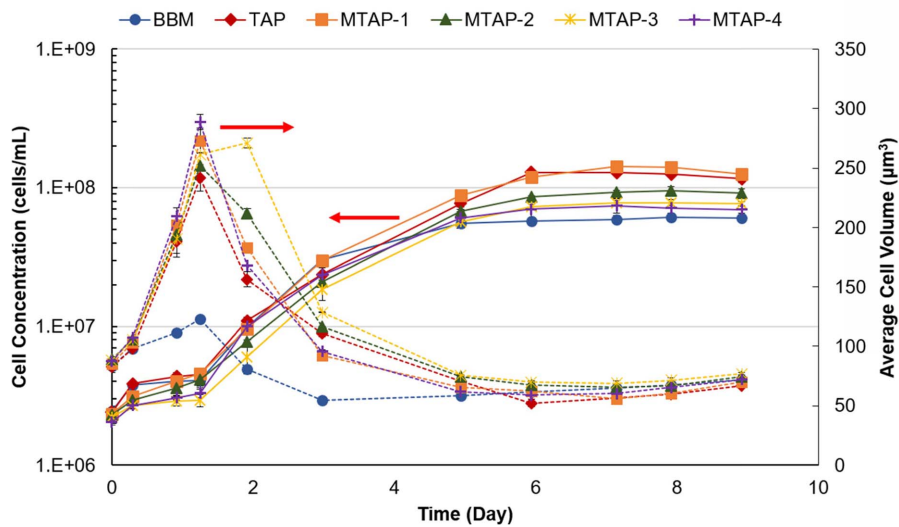


Fig. 5. Changes in cell concentration (solid line) and average cell volume (dotted line) of *Parachlorella sp.* cultures by media.

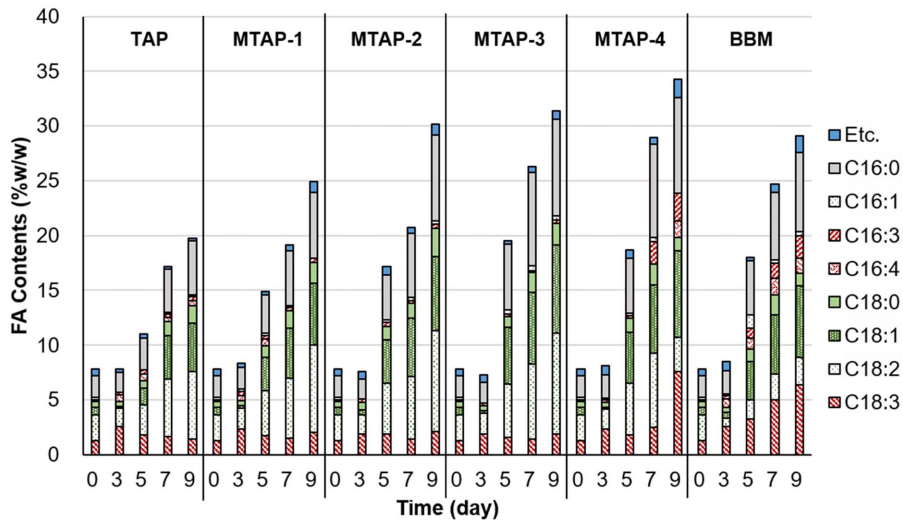


Fig. 6. Fatty acid composition of *Parachlorella* by culture media and time.

(Linoleic acid, C18:2), 리놀레닉산(Linolenic acid, C18:3)이 많은 비율을 차지하였고, 지방산 축적이 시작되자 리놀레익산(Linoleic acid, C18:2), 리놀레닉산(Linolenic acid, C18:3)과 함께 올레산(Oleic acid, C18:1)과 팔미토리놀레닉산(Palmitolinolenic acid, C16:3)이 증가하는 모습을 보였다.

Parachlorella sp.가 생산한 지방산 중 오메가-3 지방산은 팔미토리놀레닉산(Palmitolinolenic acid, C16:3), 팔미티도닉산(Palmitidonic acid, C16:4), 리놀레닉산(Linolenic acid, C18:3)의 세 종류였고, BBM 배지와 신규 배지 중 MTAP-4 배지에서 많이 축적되었다. TAP 및 MTAP-1, 2, 3 배지에서는 오메가 3 지방산의 증가가 보이지 않았는데, TAP 배지에서는 높은 N:P 비율 때문에, MTAP-1, 2, 3 배지에서는 MTAP-4 배지보다 공급된 N과 P의 농도가 상대적으로 높아 최종 바이오매스 농도가 더 높아졌고, 이로 인해 세포 당 빛 에너지 양이 낮았기 때문으로 사료된다.

불포화지방산과 포화지방산의 비율은 TAP 배지와 MTAP-1, 2, 3 배지에서 2.0 ± 0.1 이었고, BBM과 MTAP-4에서 2.5 ± 0.0 으로 질소의 함량이 낮을 때 높았다. 오메가-3 지방산의 함량은 MTAP-4에서 10.1%로 가장 높았고, BBM에서

8.4%, MTAP-1, 2, 3에서 $2.4 \pm 0.1\%$, TAP에서는 1.7%로 가장 낮게 나타났다. 지방산 조성 변화를 보면 C18:1이 증가한 뒤 C18:2가 증가하고, 그 뒤에 C18:3이 증가하였다. 또한 C16:1이 생길 뒤 C16:3, C16:4의 함량이 증가한 것으로 보아 C16:0이 처음 합성된 뒤 여기서 C16:1, C16:3, C16:4로 desaturation이 일어나고, C16:0에서 C18:0, C18:1, C18:2, C18:3으로 순차적으로 elongation과 desaturation이 일어나는 일반적인 미세조류 지방산 생합성 경로를 따른 것으로 보인다[26, 27]. 지방산 생합성과 desaturation에는 에너지가 필요하기 때문에, 지방산 중 특히 오메가-3 지방산의 함량을 높이려면 배지의 N:P 비율을 유지하면서 질소 농도를 낮추어 최고 바이오매스 농도를 감소시키거나 광도를 높이는 전략을 사용해야 할 것으로 판단된다[27].

바이오매스 농도와 지방산 함량을 곱하여 구한 배양액 내 지방산의 농도는 MTAP-1에서 692 mg/l, MTAP-2에서 646 mg/l, MTAP-3에서 582 mg/l, MTAP-4에서 526 mg/l, TAP에서 480 mg/l, BBM에서 397 mg/l였다(Fig. 4). 지방산 함량은 BBM에서 두 번째로 높았지만 바이오매스 농도의 차이로 BBM에서 지방산 농도가 가장 낮은 것으로 나타났고, 바

Table 3. Biomass concentration and fatty acid contents of other *Parachlorella* grown in different media.

Strain	Medium	Culture system (Working Vol.)	Max. biomass concentration (g/l)	FA contents (%)	Ref.
<i>Parachlorella</i> sp. FBCC180029	TAP	BC-PBRs	2.4	20	This study
	MTAP-1	(0.4 L)	2.8	25	
<i>Parachlorella</i> sp. BX 1.5	BG-11	Flask	5.7	16	[27]
	BG-11-N	(0.03-0.05 L)	1.8	27	
<i>Parachlorella kessleri</i> UTEX2229	Modified-BBM	Airlift PBR (1 L)	4.2	37	[28]

이오매스 농도가 높은 MTAP-1에서 지방산 농도가 가장 높았다. 동일한 배양 조건은 아니지만 다른 *Parachlorella* 종을 배양한 연구에서는 N:P ratio가 높은 BG-11의 N을 제거하여 지방산 함량을 16%에서 27%로 증가시켰지만 바이오매스 농도는 약 68% 감소하여 전체적인 지방산 농도는 감소하여 본 연구의 MTAP-4와 유사한 결과를 보였다(Table 3) [28]. 또 다른 연구에서는 BBM 배지의 영양분 함량을 높인 배지를 사용하여 37%의 높은 지방산 함량을 달성하면서도 바이오매스 농도를 높일 수 있었다[29]. 따라서, *Parachlorella*의 지방산 생산성을 향상시키기 위해서는 배지의 N을 제거하는 것보다 P를 공급하여 N:P ratio를 낮추는 것이 유리할 것이다.

지방산 조성 중 가장 유용한 것으로 평가되는 오메가-3 지방산은 BBM에서 115 mg/l, MTAP-1에서 67 mg/l, MTAP-2에서 53 mg/l, MTAP-3에서 41 mg/l, MTAP-4에서 159 mg/l, TAP에서 42 mg/l로 나타나 배지간 지방산 조성 차이에 따라 MTAP-4에서 가장 높은 오메가-3 지방산 생산성을 보였다. MTAP-1에서 총 지방산의 농도가 가장 높았지만, 오메가-3 지방산 농도는 MTAP-4에서 가장 높았다. 이는 MTAP-4을 사용하였을 때 최종 바이오매스 농도가 더 낮아 더 많은 세포당 빛 에너지가 공급되어 오메가-3 지방산의 합성이 더 많이 이루어졌기 때문으로 보인다. 결과적으로 TAP배지의 N:P 비율을 BBM과 동일하게 조성해서 만든 MTAP-1을 사용하여 지방산 생산성을 기존의 TAP 배지보다 44%, BBM 배지보다 74% 향상시켰으며, TAP 배지의 N과 P의 농도를 BBM과 동일하게 만든 MTAP-4을 사용하여 오메가-3 지방산 생산성을 기존의 TAP배지보다 279%, BBM 배지보다 38% 향상시킬 수 있었다. 따라서, *Parachlorella* sp. 배양 시 MTAP-1 또는 MTAP-4 배지를 선택하여 지방산 함량이 높으면서 원하는 지방산 조성을 가지는 미세조류 바이오매스를 생산할 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 국내 낙동강 수계에서 신규하게 분리된 미세조류인 *Parachlorella* sp. 종의 바이오매스 및 지방산 생산성에 대한 배지의 영향을 연구하였다. 미세조류 배양에 통상적으로 사용되는 BG-11, TAP, BBM 배지를 사용하여 바이오매스 생산성은 TAP 배지에서, 지방산 축적은 BBM 배지에서 가장 잘 일어나는 것으로 확인되었고, 지방산 생산성을 향상시키기 위해 암모니아와 아세트산을 사용하는 TAP 배지의 조성을 변화하여 BBM 배지처럼 지방산 축적을 유도하며 바이오매스 생산성을 증가시킨 MTAP 배지를 개발하였다. 전체적인 바이오매스와 지방산 생산성을 높이기 위해서는 MTAP-1 배지가 적합하여 바이오매스 생산성과 지방산 생산성은 기존의 TAP 배지 대비 각각 14%, 45% 증가

하였다. 생리 활성 효과로 인해 관심이 높은 오메가-3 지방산의 생산에는 MTAP-4 배지가 가장 적합하여 바이오매스 생산성과 오메가-3 지방산 생산성이 기존 BBM 배지 대비 각각 18%, 39% 증가하여 목표 중점 생산물질(바이오매스, 총 지방산, 또는 오메가-3 지방산)의 생산성을 향상시킬 수 있는 신규 배지 2종의 조성을 개발하였다.

Acknowledgments

This research was supported by the research program of the Nakdonggang National Institute of Biological Resources funded by the Ministry of Environment (NNIBR202002103) and Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2019R111A1A01042404).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Park H, Lee CG. 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.
2. Kang Z, Kim BH, Oh HM, Kim HS. 2013. Production of biodiesel and nutrient removal of municipal wastewater using a small scale raceway pond. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **41**: 207-214.
3. Kassim MA, Rashid MA, Halim R. 2017. Towards biorefinery production of microalgal biofuels and bioproducts: Production of acetic acid from the fermentation of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis suecica* hydrolysates. *Green Sust. Chem.* **7**: 152-171.
4. Joe MH, Kim DH, Choi DS, Bai S. 2018. Optimization of phototrophic growth and lipid production of a newly isolated microalga, *Desmodesmus* sp. KAERI-NJ5. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **46**: 377-389.
5. Mahdieh M, Shabani S, Amirjani M. 2019. Characterization of the growth, total lipid and fatty acid profiles in microalga, *Nannochloropsis oceanica* under different nitrogen sources. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **46**: 11-19.
6. Park H, Hoh D, Shin DW, Kim ZH, Hong SJ, Lim SM, et al. 2019. Isolation and characterization of five isolates of *Tetraselmis* sp. with rapid growth rates in low temperatures. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **11**: 23-28.
7. Baer S, Heining M, Schwerna P, Buchholz R, Hübner H. 2016. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. *Algal Res.* **14**: 109-115.
8. Shin DW, Bae JH, Cho Y, Ryu YJ, Kim ZH, Lim SM, et al. 2016. Isolation of new microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, and biodiesel production using its biomass. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **8**: 39-44.
9. Hong SJ, Park YS, Han MA, Kim ZH, Cho BK, Lee H, et al. 2017.

- Enhanced production of fatty acids in three strains of microalgae using a combination of nitrogen starvation and chemical inhibitors of carbohydrate synthesis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **22**: 60-67.
10. Recht L, Zarka A, Boussiba S. 2012. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *App. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1495-1503.
 11. Kim DK, Hong SJ, Bae JH, Yim N, Jin E, Lee CG. 2011. Transcriptomic analysis of *Haematococcus lacustris* during astaxanthin accumulation under high irradiance and nutrient starvation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**: 698.
 12. Park S, Lee Y, Jin E. 2013. Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *Algae* **28**: 203-211.
 13. Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH. 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.* **162**: 21-27.
 14. Li X, Přibyl P, Bišová K, Kawano S, Cepák V, Zachleder V, Čížková M, et al. 2013. The microalga *Parachlorella kessleri*—A novel highly efficient lipid producer. *Biotechnol. Bioeng.* **110**: 97-107.
 15. Heo J, Cho DH, Ramanan R, Oh HM, Kim HS. 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**: 193-197.
 16. Lee SH, Ahn CY, Jo BH, Lee SA, Park JY, An KG, et al. 2013. Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N: P ratio in wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 92-98.
 17. Karapinar Kapdan I, Aslan S. 2008. Application of the Stover–Kincaid kinetic model to nitrogen removal by *Chlorella vulgaris* in a continuously operated immobilized photobioreactor system. *J. Chem. Technol. Biot.* **83**: 998-1005.
 18. Mandalam RK, Palsson B. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 605-611.
 19. Zhu S, Huang W, Xu J, Wang Z, Xu J, Yuan Z. 2014. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresour. Technol.* **152**: 292-298.
 20. Lee HS, Kim ZH, Park H, Lee CG. 2016. Specific light uptake rates can enhance astaxanthin productivity in *Haematococcus lacustris*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **39**: 815-823.
 21. Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, Galvan A, Fernandez E. 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* **6**: 899.
 22. Chalima A, Oliver L, Fernández de Castro L, Karnaouri A, Dietrich T, Topakas E. 2017. Utilization of volatile fatty acids from microalgae for the production of high added value compounds. *Fermentation* **3**: 54.
 23. Bourre J. 2005. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful. *J. Nutr. Health. Aging* **9**: 232-242.
 24. Simopoulos AP. 2003. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. pp. 1-22. *Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio: The scientific evidence*. Karger Publishers, City.
 25. Ponnampalam E, Mann N, Sinclair A. 2006. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **15**: 21-29.
 26. Sayanova O, Mimouni V, Ulmann L, Morant-Manceau A, Pasquet V, Schoefs B, et al. 2017. Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* **372**: 20160407.
 27. Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P. 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**: 97-106.
 28. Sasaki M, Takagi A, Ota S, Kawano S, Sasaki D, Asayama M. 2020. Coproduction of lipids and extracellular polysaccharides from the novel green alga *Parachlorella* sp. BX1. 5 depending on cultivation conditions. *Biotechnol. Rept.* **25**: e00392.
 29. Taleb A, Legrand J, Takache H, Taha S, Pruvost J. 2018. Investigation of lipid production by nitrogen-starved *Parachlorella kessleri* under continuous illumination and day/night cycles for biodiesel application. *J. Appl. Phycol.* **30**: 761-772.