

온도에 의해 유도된 2단계 배양전략을 통한 미세조류 *Chlorella vulgaris*와 *Dunaliella salina*의 지질과 탄수화물의 축적량 변화

이연지^{1,2} · 이치헌^{1,2} · 조기철³ · 문혜나¹ · 남궁진¹ · 김기혁¹ · 임병진³ · 김대경² · 여인규^{1*}

¹제주대학교 해양생명과학과, ²한국기초과학지원연구원 제주센터, ³국립환경과학원 금강물환경연구소

Effect of Temperature-induced Two-stage Cultivation on the Lipid and Saccharide Accumulation of Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*

Yeon-Ji Lee^{1,2}, Chi-Heon Lee^{1,2}, Kichul Cho³, Hye-Na Moon¹, Jin Namgung¹, Ki-hyuk Kim¹, Byung-Jin Lim³, Daekyung Kim* and In-Kyu Yeo^{1*}

¹Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Jeju Center, Korea Basic Science Institute (KBSI), Jeju 63309, Korea

³Geum River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Okcheon 29027, Korea

The aim of this study was to evaluate a temperature-induced two-stage cultivation (TTC) strategy for the regulation of lipid and carbohydrate production by two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*, for biofuel production. The microalgae were grown under several temperature conditions (15, 25, 35, and 45°C) and optimal growth was observed at 25°C for both microalgae. To test the TTC, aseptically cultured microalgae were incubated under optimal conditions (25°C) for 20 days, and then divided into four aliquots that were incubated at 15, 25, 35, and 45°C for 5 days. Similar but somewhat decreased growth rates were observed at the non-optimal temperatures (15, 35, and 45°C). In addition, while total lipid accumulation increased in a temperature-dependent manner in both microalgae, total carbohydrate increased with temperature in *C. vulgaris* but decreased in *D. salina*. However, for lipid and carbohydrate production, while the highest lipid productions of *C. vulgaris* and *D. salina* were observed at 25°C and 35°C, respectively, the highest total carbohydrate productions of *C. vulgaris* and *D. salina* were obtained at 15°C and 25°C, respectively. These results suggest that the TTC strategy may be easily and efficiently applied to bioprocessing for biofuel production.

Key words: Carbohydrate, Lipid, Microalgae, Temperature, Two stage

서 론

최근 개발도상국들의 산업화와 화석연료 사용증가에 따른 지구온난화 문제로 인해 해양산성화와 대기오염 등 각종 환경문제가 크게 부각되고 있다(Mata et al., 2010). 최근 이러한 문제를 해결하기 위한 풍력, 조력, 태양열, 바이오연료 등 신재생에너지 분야에 대한 관심이 크게 증가하고 있으며 관련 연구에 대한 범 세계차원의 투자가 확대되고 있는 추세이다(Chisti, 2007; Mata et al., 2010).

신재생에너지원 중 특히 바이오연료는 기존 화석연료와 비스

한 성질을 가지고 있고, 광합성 작용을 하는 육상식물 및 조류(algae)를 사용할 경우 대기 중 CO₂ 제거를 통해 지구온난화를 줄일 수 있다는 기대심리와 맞물려 화석연료를 효과적으로 대체할 수 있는 청정 에너지로 여겨져 왔다(Wang et al., 2000; Miao and Wu, 2006; Packer, 2009). 특히, 미생물인 미세조류를 활용한 바이오연료 생산에 관한 내용이 최근 각광 받고 있으며 미세조류 바이오매스(biomass)를 미래의 에너지 자원으로 확보하기 위한 연구가 지속되고 있다(Wang et al., 2000; Chisti, 2007; Mata et al., 2010).

미세조류는 주로 해양 및 담수 환경에 서식하고 광합성을 통

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2017.0032>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(1) 032-040, February 2017

Received 2 December 2016; Revised 4 January 2017; Accepted 4 January 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3474 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: ikyeo99@jejunu.ac.kr

해 생태 먹이사슬의 1차 생산자 역할을 담당하는 마이크로 사이즈의 엽상체 식물이며, 기존 생물자원에 비해 빠른 성장률과 일일 생산이 가능한 지속가능자원으로 여겨지고 있다(Chisti, 2007; Mata et al., 2010). 또한 기존 육상식물에 비해 많은 양의 지질 및 녹말을 축적하기 때문에 이를 전환시켜 바이오디젤(biodiesel) 및 바이오에탄올(bioethanol) 등의 바이오연료를 생산하기 위한 생물공정 등 많은 기술들이 개발되고 있다(Chisti, 2007; Harun et al., 2010). 미세조류는 최대 80% (w/w)의 지질을 축적할 수 있으며 바이오매스에서 추출된 지질은 에스터교환(transesterification) 반응에 의해 바이오디젤로 전환이 가능하고, 녹말 등 당 성분은 발효(fermentation)과정을 통해 바이오에탄올로 전환시켜 연료로 활용할 수 있다(Chisti, 2007; Harun et al., 2010).

미세조류는 기존에 바이오연료의 재료로 사용되던 육상식물과 비교할 때 다양한 이점을 갖는다. 먼저, 넓은 경작지가 필요한 육상작물에 비해 많은 공간을 차지하지 않으며 토질 등에 의한 영향이 적다는 장점이 있다. 따라서 육상작물을 경작하기 좋지 못한 토질 환경과 공간적인 제약을 받지 않는다. 또한 미세조류는 세대시간(generation time)이 짧고, 성장이 빠르므로 적절한 생물공정을 통한 일일 생산이 가능하며 생체 무게 대비 광합성 효율이 높고 대기 중 이산화탄소를 효율적으로 흡수할 수 있을 뿐만 아니라, 많은 양의 지질을 함유하고 있기 때문에 친환경 바이오디젤 생산의 원료로서 활용하기에 용이하다. 그리고 미세조류는 수계에 존재하는 질소화합물, 중금속 등을 비롯한 각종 독성물질을 효과적으로 흡수할 수 있으므로 생물학적 폐수 처리의 재료로 활용가치가 높다. 따라서 오폐수를 정화함과 동시에 오폐수 내에 존재하는 영양염류를 활용하여 바이오연료 및 기타 생물재료를 생산하는 친환경적이고 효율적인 미래 에너지 생산에 대한 구상이 가능하다. 또한 해양 및 기수성 미세조류는 담수를 필요로 하지 않으며 옥수수, 콩과 같은 육상작물처럼 식품으로서 활용가치가 높지 않기 때문에 물 부족 문제와 식량부족 문제를 일으키지 않는다. 따라서 최근 미세조류는 육상작물의 한계를 대체할 바이오연료의 좋은 재료로 간주되고 있다(Chisti, 2007; Amin, 2009; Mata et al., 2010).

최근 이러한 미세조류를 바이오연료의 재료로 활용하기 위해 지질 또는 탄수화물의 생산성을 높이기 위한 배양법, 유전학적 기법, 지질생산성이 높은 종의 분리 및 수거(harvesting) 기법 등 미세조류의 바이오연료 효율을 높이기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Chen et al., 2011; Baicha et al., 2016; Yang et al., 2016). 특히, 미세조류는 온도, 염분, 광조건, 영양염류의 농도 등 환경적인 조건에 따라 세포 성장 및 내부 축적 물질들의 조성 및 생산성이 달라지기 때문에, 다양한 배양조건 조절을 활용한 미세조류 바이오연료 생산에 관한 연구가 집중적으로 이루어져 왔다(Goold et al., 2016; Kinnunen and Rintala, 2016; von Alvensleben et al., 2016). 그 중 최근에는 2단계 배양기법에 따라 미세조류 바이오매스 축적물질의 생산성을 변화시키

려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다(Su et al., 2011; Zheng et al., 2012; dos Santos et al., 2016). 이를테면, Su et al. (2011)은 *Nannochloropsis oculata* 종을 최적배양조건에서 1단계 배양을 진행하여 2단계로 질소원이 결핍된 상태로 옮겨 배양시킨 배양방법을 통해 최대 약 2.8배의 지질 생산성을 향상시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 한편 Xia et al. (2013)은 최적배양조건에서 1단계 배양을 거친 *Scenedesmus obtusus*종을 NaCl의 농도를 증가시킨 2단계 배양조건에서 다시 배양한 결과 지질생산성과 향상과 더불어 고품질의 바이오디젤을 생산할 수 있다고 보고하였다. 따라서 2단계 배양법을 활용할 경우 비용 및 시간적인 측면에서 효과적으로 미세조류의 바이오연료를 생산할 수 있다(Su et al., 2011; Xia et al., 2013; Zheng et al., 2012; dos Santos et al., 2016).

하지만 현재 2단계 배양법 연구는 현재 영양염류의 조성변화 및 광조건을 활용한 방법들에 국한되어 있으며 온도조건 변화에 의한 2단계 배양법에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이다. 온도의 경우 미세조류 지질 합성 및 성장에 상당한 영향을 미친다고 알려져 있다. 예를 들면 Converti et al. (2009)은 20°C에서 25°C로 배양온도를 증가시킬 경우 미세조류 *Nannochloropsis oculata*의 지질 축적량을 약 2배 증가시킬 수 있고, 25°C에서 30°C로 배양 온도를 더 증가시킬 경우 지질합성이 오히려 2배 이상 감소한다고 보고한 바 있다. 또한 온도조절 방법은 미세조류의 영양염 조성을 변화시키는 방법보다 노동 및 비용적인 측면에서 생물공정에 효과적으로 적용이 가능하며 대형 광생물배양기(photobioreactor) 및 수로형연못배양조(raceway pond)와 같은 대량배양 시스템에도 쉽게 적용할 수 있다. 따라서 배양온도 변화를 통한 2단계 배양법을 활용할 경우 간편하게 미세조류 바이오디젤 생산성을 높일 수 있을 것이라 판단된다.

따라서 이번 연구에서는 바이오연료의 유망종으로 평가 받고 있는 두 종의 녹조류 *Chlorella vulgaris*와 *Dunaliella salina*의 온도에 따른 2단계 배양 조건에서 바이오연료의 인자인 탄수화물 및 지질의 축적량 변화를 확인하여 산업적인 이용가치에 대해 평가해보고 미세조류 바이오연료 생산의 효율성을 높일 수 있는 생물공정에 대한 기초정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

미세조류 배양

실험에 사용한 두 종의 미세조류 *Chlorella vulgaris* (KMMCC-120), *Dunaliella salina* (KM979516)는 부경대학교 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC)과 영남대학교에서 각각 구입하였다. 배양배지는 Erd-Schreiber's 배지(pH 8.0)을 제조하여 실험에 사용하였다(Okaichi et al., 1982). 각각의 배지는 15, 25, 35 및 45°C로 조절된 multi-room incubator (JS RESEARCH INC, KOR)에서 배양하였으며 광주기는 12:12의 light:dark 주기로, 광도는 형

광등을 광원으로 하여 $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 세기로 배양기간 동안 유지하였다. *C. vulgaris* 및 *D. salina* 종의 초기 세포 농도는 각각 $1.72 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 및 $1.58 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ 였으며, 100 mL의 Erlenmeyer flasks (IWAZAKI, JPN)를 사용하여 배양액 총 용량을 50 mL로 맞추어 배양하였다. 또한 2단계 온도 배양 조건에서는 450 mL의 Erlenmeyer flasks (DURAN, GER)를 사용하여 총 배양액 300 mL를 정체기(stational phase)가 될 때까지 20일간 배양 후 100 mL의 Erlenmeyer flasks (IWAZAKI, JPN)에 50 mL의 용량으로 옮겨 각각의 온도에서 5일간 배양하였다.

미세조류 성장 측정

미세조류의 성장은 24시간마다 microplate reader (BioTek, USA)를 활용하여 570 nm 파장으로 흡광도(Absorbance)를 측정하여 측정하였다. 측정된 흡광도는 OLYMPUS BX53 광학현미경(OLYMPUS, JPN) 및 혈구계수기(AO-Spencer, USA)를 사용하여 세포농도를 측정 후 세포농도에 따른 흡광도의 검량선을 만들어 배양액 내의 세포수를 계산하였다.

미세조류의 탄수화물 측정

미세조류 총탄수화물의 함량은 페놀-황산법을 활용하여 측정하였다(Masuko et al., 2005). 준비된 미세조류 배양액 1 mL를 13,000 g에서 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 3차 증류수로 세포를 2회 washing 하고, 다시 3차 증류수 1 mL를 넣어 재부유한 후 100 μL 를 분취하여 300 μL 의 진한 황산과 5% 페놀용액 100 μL 를 혼합해서 90°C에서 5분간 반응시켜주었다. 이 반응물을 상온에서 식힌 후 microplate reader (BioTek, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정해 탄수화물의 농도를 구했고 D-glucose를 표준물질로 검량하였다.

미세조류의 지질 측정

미세조류 지질의 함량은 sulfo-phospho-vanillin 반응법을 이용하여 측정하였다(McMahon et al., 2013). 미세조류 배양액 3 mL를 13,000 g에서 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 증류수를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 이후 세포 펠렛에 증류수 1 mL를 넣어 재부유시킨 용액 100 μL 를 분취한 뒤 5 mL의 진한황산과 90°C에서 10분간 반응시켜주었다. 이 반응물 400 μL 에 phosphor-vanillin 시약을 6 mL를 첨가한 후 암실에서 45분간 반응시켰고, 상온에서 방치 후 microplate reader (BioTek, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

미세조류의 현미경 관찰

온도변화에 따른 미세조류의 형태변화를 관찰하기 위하여 각 미세조류 배양액 10 μL 를 슬라이드 글라스에 놓고 OLYMPUS BX53 형광현미경(OLYMPUS, JPN)을 이용하여 bright field 모드로 미세조류의 형태 변화를 관찰하였다.

통계학적 분석

실험값의 통계는 Excel 2013 (Microsoft, USA) 프로그램을 활용한 one-way ANOVA 및 데이터 간의 Turkey's multiple comparison test를 통해 유의성 테스트를 진행하였고 모든 실험값은 3반복 실험에 의한 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었다.

결과 및 고찰

미세조류의 온도에 따른 성장변화

2단계 온도 배양법에 따른 미세조류 *C. vulgaris*와 *D. salina*의 최적 배양 온도를 구하기 위해 15, 25, 35, 45°C 각 온도에 따른 미세조류의 24시간 간격의 성장변화를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 *C. vulgaris* 및 *D. salina* 두 종 모두 25°C에서 가장 높은 성장을 나타냈고, *C. vulgaris*의 경우 35°C, 15°C, 45°C의 순으로, *D. salina*의 경우 15°C, 35°C, 45°C

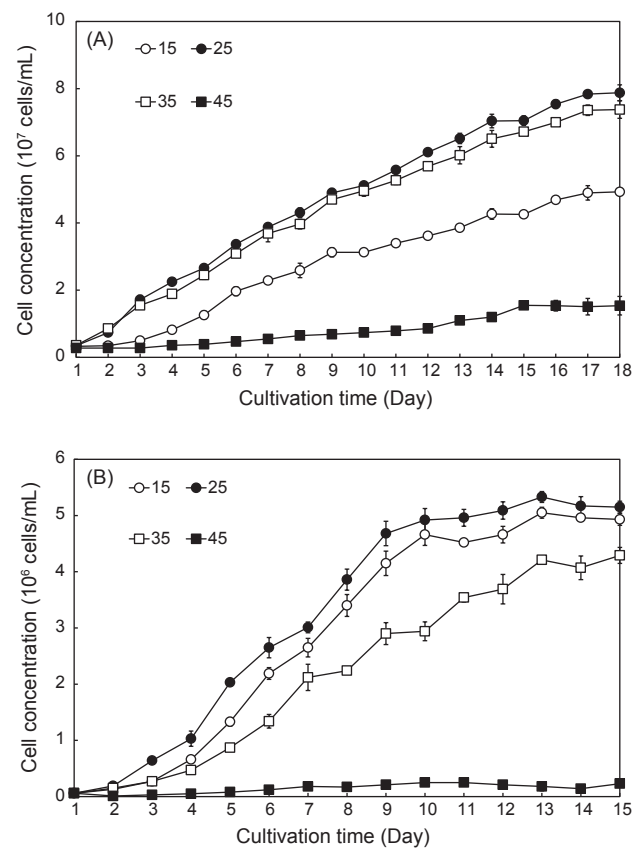


Fig. 1. Effect of different temperatures (15, 25, 35, and 45°C) on the daily growth of oceanic microalgae *Chlorella vulgaris* (A) and *Dunaliella salina* (B). Error bars represent mean±standard deviation (SD) of triplicate experiments.

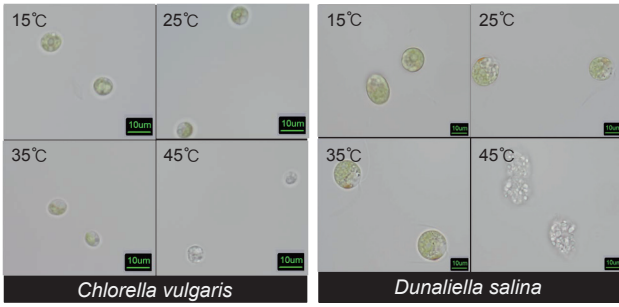


Fig. 2. Microscopic observation of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* under 15, 25, 35, and 45°C of incubation temperatures.

순으로 두 종이 서로 형태가 다른 성장 곡선을 나타냈다. 또한 45°C의 온도에서 두 종의 미세조류 배양액 모두 녹색에서 흰색으로 색 변화가 일어났고 성장이 더 이상 증가하지 않았다. 또한 45°C의 온도에서 두 종의 미세조류 배양액 모두 녹색에서 흰색으로 색 변화가 일어났고 성장이 더 이상 증가하지 않았다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 현미경 사진으로 관찰한 결과 45°C에서 그 형태와 색이 다른 온도 조건의 배양 미세조류들과 비교했을 때 확연히 구분되는 흰색의 찌그러진 모양이 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 38°C에서 *C. vulgaris*가 녹색에서 회갈색으로 변화되어 미세조류의 성장률이 저해된 Converti et al. (2009)의 연구결과와 비슷하며 연구 결과에서 보고된 바와 같이 이번 연구에서도 높은 온도로 인한 스트레스로 인해 세포가 사멸한 것으로 판단된다.

Juneja et al. (2013)에 따르면 온도는 미세조류의 성장과 세포의 크기, 생화학물질 조성 및 영양염 흡수에 영향을 주는 가장 중요한 환경 요소 중 하나이며 미세조류 세포질의 점성도에 영향을 주어 탄소원과 질소원의 흡수를 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다(Hope and Walker, 1975; Raven and Geider, 1988). 또한 온도가 낮을 경우 대기중 이산화탄소의 고정률이 감소하면서 광합성 작용시 전자전달을 감소시켜 미세조류에 광저해(photoinhibition)와 동일한 효과를 일으키는 것으로 알려져 있고 최적 온도보다 높은 조건에서는 RNA unit 당 유리 아미노산의 양이 많아지는 현상 즉, 단백질의 합성 효율이 저해되는 현상이 일어나면서 성장을 저해시킨다는 보고가 있다(Rhee and Gotham, 1981; Kakinuma et al., 2006; Juneja et al., 2013). 따라서 이번 실험에서도 성장의 최적온도인 25°C와 비교했을 때 낮은 온도인 15°C에서 대사활성의 장애로, 25°C보다 높은 온도인 35°C에서는 단백질 합성 효율의 저해로 인해 미세조류 성장이 억제된 것으로 판단된다.

또한 두 종 *C. vulgaris*와 *D. salina*는 온도에 따라 서로 패턴이 다른 성장 곡선을 나타냈으며 최적온도인 25°C 보다 높은 온도에서 *D. salina* 종의 성장이 *C. vulgaris*보다 더 크게 줄어든다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 *D. salina*가 *C.*

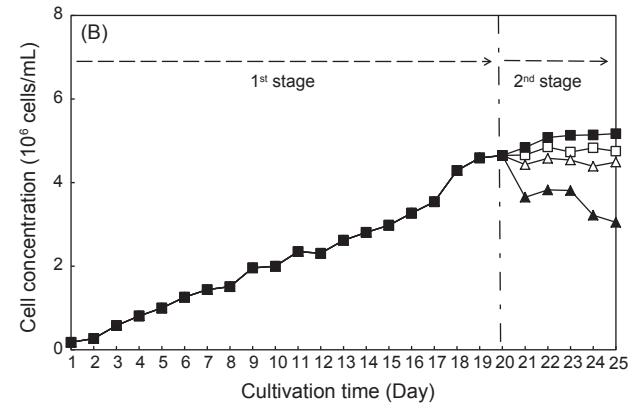
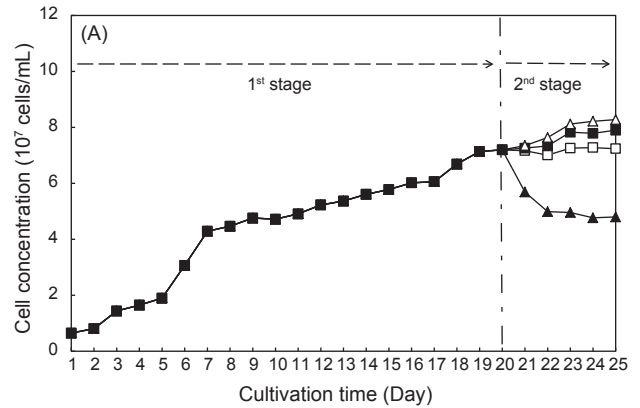


Fig. 3. Daily growth of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* under two-stage culture condition. One-stage cultivation was performed under 25°C for 20 days, and subsequently two-stage cultivation was performed under 15 (□), 25 (■), 35 (△), and 45°C (▲) for 5 days. Error bars represent mean±standard deviation (SD) of triplicate experiments.

*vulgaris*에 비해 세포 부피가 크며 세포벽이 소실되어있기 때문에 온도 변화에 의한 열 에너지를 세포막에 더욱 많이 받기 때문이라고 판단되며 그에 따라 단백질 합성의 저해도 크게 일어나고 보다 큰 성장억제가 일어나는 것으로 판단된다(Cowan et al., 1992).

2단계 배양에 의한 미세조류의 성장 및 바이오매스의 변화

2단계 배양에 의한 미세조류의 성장효과를 확인하기 위해 두 미세조류 *C. vulgaris*와 *D. salina*의 최적 성장 온도인 25°C에서 1단계 배양을 20일간 진행 한 후 변화가 뚜렷하게 확인이 되는 5일 동안 15°C, 25°C, 35°C, 45°C에서 2단계 배양을 진행하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것과 같이 2단계 배양시점부터 서로 다른 온도에 따른 성장 차이를 확인할 수 있었다.

먼저 Fig. 3A에서 보는 것처럼 *C. vulgaris*의 경우 오히려

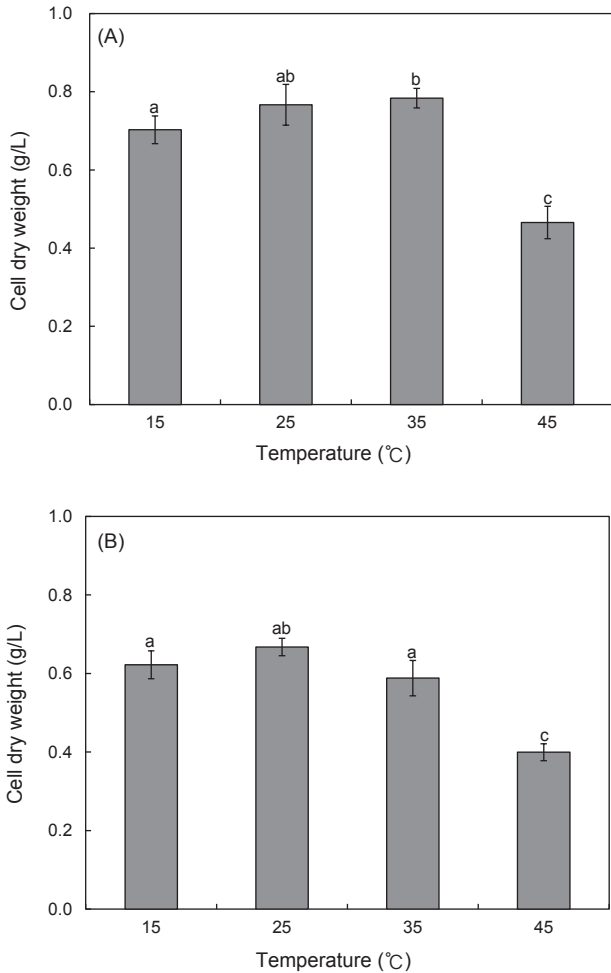


Fig. 4. Changes of cell dry weight of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* under different temperature (15, 25, 35, and 45°C) and temperature-induced two stage culture conditions. Error bars represent mean±standard deviation (SD) of triplicate experiments and different letters exhibited significant difference ($P < 0.05$).

25°C보다 35°C에서 가장 높은 성장곡선을 보였고 25°C, 15°C, 45°C 순으로 높은 성장곡선을 나타냈다. 또한 Fig. 3B에서 보는 것처럼 *D. salina*의 경우 25°C에서 가장 높은 성장을 나타내었고 15°C, 35°C, 45°C 순으로 높은 성장 곡선을 나타냈으며 이러한 차이는 앞서 설명한 온도에 따른 대사활성과 단백질 합성의 변화에서 기인하는 것으로 생각된다. 또한 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 2단계 배양 후 미세조류 세포 건조체의 질량(바이오매스)을 비교한 결과 최적성장 온도인 25°C와 비교했을 때 온도에 따라 다소의 차이는 나타났지만 15°C 및 35°C 구간에서 비슷한 양의 바이오매스를 얻을 수가 있었다. 하지만 45°C 구간에서는 성장저해가 크게 일어났으며 하얀색으로 변화된 적은 양의 바이오매스를 보였다. 이러한 결과들을 통해 2단계 배양법을 활

용할 경우 *C. vulgaris*, *D. salina* 두 종 모두에서 15°C 및 35°C는 최적성장온도와 비슷한 양의 바이오매스를 획득할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었고 45°C는 온도 스트레스로 인한 세포 사멸로 바이오매스의 생산량 저하가 크게 일어나는 것을 알 수 있었다. 따라서 2단계 배양시 45°C의 배양 온도는 비효율적이고 판단하였고 45°C를 제외한 15°C, 25°C, 35°C의 온도 조건에서 다음 실험을 진행하였다.

2단계 배양에 따른 지질 및 탄수화물 축적량의 변화

미세조류의 지질 및 탄수화물은 산업적인 바이오연료 생산의 주 원료로서 매우 잠재성이 큰 것으로 알려져 있다(Chisti, 2007; Chen et al., 2013). 미세조류 탄수화물의 경우 주로 세포벽의 셀룰로오스와 색소체에 함유된 녹말이 주요 구성성분으로 이뤄져 있으며 lignin과 hemicelluloses의 양이 적기 때문에 쉽게 발효원으로 전환시켜 바이오에탄올 생산 공정에 사용할 수 있다(Chen et al., 2013). 또한 미세조류의 지질은 triacylglyceride (TAG)가 주 성분이며, TAG를 알코올과 촉매제하에서 에스테르화(transesterification) 반응을 통해 바이오디젤로 전환시켜 산업적인 이용이 가능하다고 알려져 있다(Chisti et al., 2007). 따라서 이번 연구에서 미세조류의 2단계 배양의 산업적인 적용 가능성을 평가하기 위해 2단계 온도배양 조건에 따른 미세조류의 지질 및 탄수화물 축적량 변화를 확인하였다. 또한 각각의 온도 15, 25, 35°C에서 2단계 배양 없이 같은 기간(25일) 동안 배양한 미세조류 바이오매스를 모아 2단계 배양과 비교했을 때 축적량에 변화가 있는지 비교해 보았다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 *C. vulgaris*의 경우 35°C 온도 조건에서 지질 축적량에 차이를 보였고(Fig. 5A), *D. salina*의 경우 35°C에서 탄수화물 축적량에 차이를 나타냈다(Fig. 6B). 하지만 지질 및 탄수화물의 온도에 따른 축적 양상은 2단계 배양에서도 각 온도조건에서 배양한 미세조류와 동일하게 나타났다. 먼저 지질의 축적량은 *C. vulgaris*와 *D. salina* 두 종 모두에서 동일하게 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향성을 나타냈다. *C. vulgaris*의 경우 가장 지질함량이 높은 15°C의 배양 조건에서 최대 약 26%의 지질 함량을 나타냈으며 35°C 조건에서는 최저인 약 21%의 지질 함량을 나타냈다. 또한 15°C와 25°C의 두 온도 조건 간의 지질함량 차이에 유의성이 없었다. 따라서 지질의 2단계 배양 조건에서 지질의 생산은 15, 25, 35°C에서 각각 약 0.183, 0.196, 0.164 g L⁻¹로 25°C에서 가장 높은 생산성을 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다. *D. salina*의 경우 15°C의 온도에서 약 15%의 최대 지질 함량을 나타냈고 35°C에서 최소치인 약 11%의 함량을 나타냈다. 생산량은 15°C, 25°C, 35°C에서 각각 약 0.094 g L⁻¹, 0.088 g L⁻¹, 0.065 g L⁻¹로 15°C일 때 가장 높은 지질 생산을 나타냈다.

이러한 결과는 Xin et al. (2011)이 *Scenedesmus* sp. 종에서 온도 실험을 통해 지질축적양상을 파악한 결과와 유사하게 나타났다. 하지만 Converti et al. (2009)의 연구에서 보고된 *Nannochlorop-*

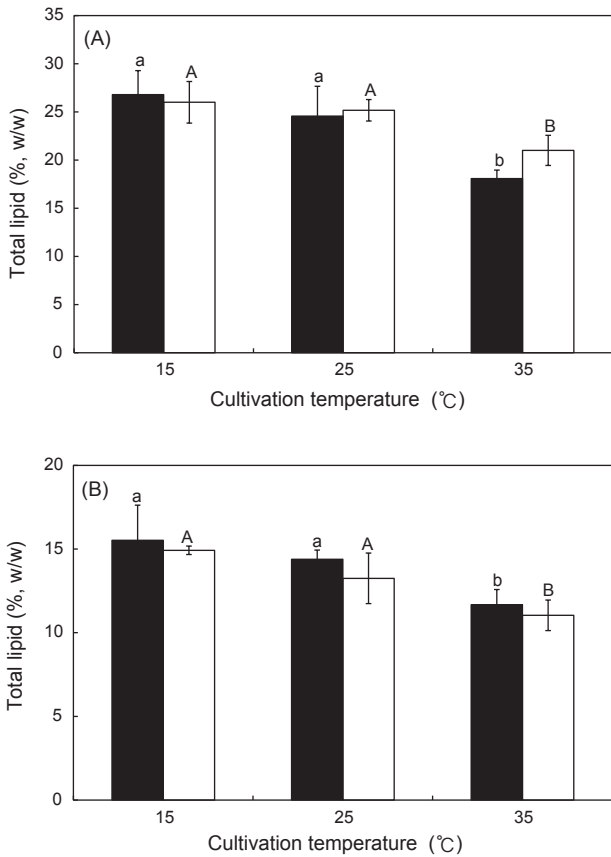


Fig. 5. Effect of different temperatures (15, 25, 35, and 45°C) condition (■) and temperature-induced two-stage culture condition (□) on the lipid accumulation of microalgae *Chlorella vulgaris* (A) and *Dunaliella salina* (B).

sis sp. 미세조류의 결과와는 다르게 나타났다.

또한 성장 최적온도와 비교했을 때 낮은 온도에 노출된 미세조류는 산화스트레스 환경에 놓이게 된다고 보고된 바 있으며, 따라서 낮은 온도인 15°C에서 산화스트레스가 발생하고 그에 따른 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 스트레스가 미세조류 물질대사에 영향을 미치고 이러한 결과물로 지질함량이 증가한 것으로 판단이 된다(Cho et al., 2016; Xin et al., 2011). 그리고 35°C 배양 조건에서 지질 함량이 감소한 이유는 열 스트레스에 의한 자극으로 인해 지질합성에 관여하는 효소가 피해를 입었기 때문인 것으로 보인다. Renaud et al. (2002)에 의한 온도에 따른 성장과 생화학물질 축적에 관한 연구에 의하면 미세조류 *Isocrysis* sp., *Rhodomonas* sp., *Cryptomonas* sp., *Chaetoceros* sp., 그리고 예서 최대 성장률이 각각 27°C, 25°C, 25°C 및 30°C로 나타났으며 이번 연구와 비슷하게 최대 성장률을 나타내는 온도조건보다 높은 온도조건에서 지질함성이 감소하는 경향성을 나타냈고, 이러한 현상을 Renaud et al. (2002)는 식물 효소의 온도에 의한 변성에 기인한 것으

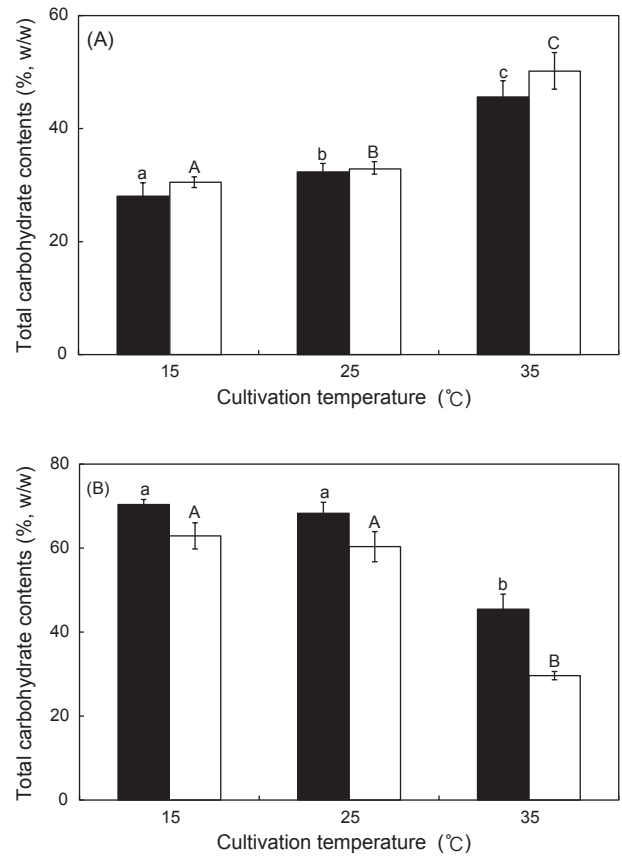


Fig. 6. Effect of different temperatures (15, 25, 35, and 45°C) condition (■) and temperature-induced two-stage culture condition (□) on total carbohydrates accumulation of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*.

로 설명한 바 있다. 2단계 배양에 따른 탄수화물의 경우 두 종 *C. vulgaris*와 *D. salina*의 축적 경향성이 서로 상반되게 나타났다(Fig. 6A, 6B). 먼저 *C. vulgaris*의 경우 온도가 증가함에 따라 상당히 증가된 탄수화물의 축적량을 나타냈으며 최대치인 35°C에서 약 50%의 총 탄수화물 함량을 나타낸 반면, 최소치인 15°C에서는 약 31%의 탄수화물 함량을 보였다. 또한 *C. vulgaris*의 2단계 배양에 의한 바이오매스 대비 총탄수화물의 생산량은 15°C, 25°C, 35°C조건에서 약 0.214 g L⁻¹, 0.254 g L⁻¹, 0.394 g L⁻¹로 35°C에서 가장 높게 나타났다. *D. salina*의 경우 반대로 15°C에서 최대 63%의 탄수화물 함량을 나타냈고 35°C에서 약 30%의 탄수화물 축적량을 나타냈으며, 바이오매스 대비 총 탄수화물의 생산량은 15°C, 25°C, 35°C조건에서 약 0.391 g L⁻¹, 0.403 g L⁻¹, 0.174 g L⁻¹로 25°C에서 가장 높게 나타났다. Ogbonda et al. (2007)에 따르면 남조류인 *Spirulina* sp.에서 온도를 25°C에서 40°C로 증가시켰을 때 탄수화물의 축적이 14%에서 21%로 증가했다는 보고가 있었고, 반면 de Castro Araujo and Garcia (2005)에 의해 규조류 *Chaetoceros* sp.에

서 온도가 낮아질수록 탄수화물의 축적량이 증가된다는 사실이 보고된 바 있다. 또한 Hosono et al. (1994)에 의해 녹조류 *Chlorella vulgaris* SO-2의 온도에 따른 당 축적은 온도가 높아질수록 줄어든다는 연구도 보고된 바 있다. 이번 연구에서 녹조류인 *C. vulgaris*와 *D. salina*는 서로 다른 축적양상을 나타냈는데 그 이유는 서식환경이 다른 곳에서 분리된 종마다 환경에 대한 내성의 차이가 있기 때문인 것으로 판단된다. 특히, 배양 온도가 달라짐에 따라 세포막이 온도 변화로 인한 산화스트레스 작용에 의해 영향을 받게 되고 영양염류 흡수율에 변화가 일어나게 된다고 알려져 있으며, 이러한 산화스트레스 작용을 방어하기 위한 과산화물제거효소(superoxide dismutase), 카탈라아제(catalase) 및 글루타티온과산화효소(glutathione peroxidase)와 같은 항산화 효소(antioxidant enzyme)와 아스코르빈산(ascorbic acid) 등과 같은 비효소적 항산화 물질의 분비가 일어나게 되고, 이러한 항산화 물질들의 분비양상은 종마다 서로 다른 것으로 알려져 있다(Lesser, 2006; Chokshi et al., 2015).

따라서 항산화효소의 분비양상 차이로 인해 산화스트레스의 보호작용이 종에 따라 달라지고, 온도 변화에 의한 산화스트레스에 반응하는 정도가 달라지기 때문에 미세조류 2차 대사물질의 축적량이 다르게 나타난 것으로 사료된다. 또한, 서로 다른 세포벽 및 세포막의 구조를 가진 두 종간의 구조적인 차이도 이러한 중간 생화학물질 축적의 정도를 변화시킨 요인중의 하나라고 생각된다. 그리고 *D. salina*의 경우 온도가 증가함에 따라 지질과 탄수화물이 모두 감소되는 현상을 보였으며, 이러한 현상은 좀더 많은 연구가 필요하겠지만, 온도가 증가함에 따라 단백질과 같은 다른 2차대사물질의 양이 상대적으로 많아지면서 탄수화물과 지질의 양은 감소된 것으로 보인다.

추가적으로 Fig. 1에서 보는 것처럼 이번 연구에서 *C. vulgaris*의 경우 온도 스트레스에 의해 35°C, *D. salina*의 경우 15°C에서 최적성장 온도인 25°C 조건 보다는 감소했지만 두 번째로 높은 성장을 나타냈고 이때 탄수화물의 축적량은 25°C에 비해서 증가하는 경향성을 나타내었다. 이러한 현상은 다양한 스트레스 조건에 의해서 미세조류의 탄수화물 축적량이 증가할 수 있다는 Pancha et al. (2015), Markou et al. (2012) 등 기존의 문헌들과 일치하는 결과이며, 성장이 더욱 낮게 나타난 온도 조건 (*C. vulgaris*의 경우 15°C, *D. salina*의 경우 35°C)에서 오히려 탄수화물이 성장 최적온도인 25°C 조건과 비교할 때 감소된 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 Renaud et al. (2002)의 연구에서 보고된 미세조류 Prymnesiophyte NT19와 비슷한 양상을 나타내었으며 이러한 이유는 스트레스 정도가 일정 수준 이상으로 일어날 경우 오히려 탄수화물 대사활성에 관여하는 효소 및 항산화 물질의 활성이 떨어지기 때문인 것으로 판단된다. Tammam et al. (2011)의 연구에 의하면 농도에 따른 염분에 의해 산화스트레스가 일어나며 그에 따른 기작으로 Malondialdehyde (MDA)가 증가하는 것을 확인하였고, 탄수화물의 농도는 염분에 의한 스트레스가 증가함에 따라 증가하는 추세를 보

이다가 일정 농도 이상(1.25 molar)에서는 오히려 감소하는 현상을 나타내 MDA의 양과 반대되는 경향성을 나타낸다는 사실을 확인한 바 있고, 이 때 항산화 활성을 나타내는 비효소 계열의 물질인 ascorbic acid와 satalase, peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase와 같은 항산화효소의 활성이 또한 산화스트레스가 증가함에 따라 일정 농도 이상에서 크게 변화한다는 사실을 보고한 바 있다. 따라서 온도에 의한 스트레스 작용에서도 비슷한 현상으로 스트레스가 일정 이상 크게 증가할 경우 스트레스에 의한 방어기작을 담당하는 효소 및 비효소 계열의 활성변화로 인해 대사활성이 변화되어 오히려 탄수화물이 감소된 것으로 사료된다.

이번 연구를 통해 두 종의 미세조류 *C. vulgaris*와 *D. salina*의 15, 25, 35, 45°C의 온도 변화에 의해 유도된 2단계 배양법에 따른 성장과 지질 및 탄수화물의 축적량 변화에 대하여 확인할 수 있었다. 미세조류 *C. vulgaris*의 경우 25°C에서 가장 높은 지질 생산량을 나타냈고 35°C에서 가장 높은 탄수화물 생산량을 나타냈으며, *D. salina*의 경우 15°C에서 최대 지질 생산량을, 25°C에서 최대 탄수화물 생산량을 나타냈다. 따라서 온도 조절을 통한 2단계 배양법을 활용할 경우 배양공학적 적용을 통해 간단한 방법으로 효율적인 미세조류 바이오연료 생산이 가능할 것이라 여겨진다. 또한 미세조류를 주 원료로 만들어 낼 수 있는 카로테노이드, 폴리페놀(polyphenol) 등 생리활성 물질 및 기타 생화학물질의 조성변화에도 앞으로 더 많은 연구를 진행하여 산업적으로 적용할 수 있는 기초정보가 뒷받침 된다면 유용물질 생산을 위한 효율적인 배양기술로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 기상청 “기후변화 감시예측 및 국가정책지원강화”(KMIPA2015-2050)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Amin S. 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energ Convers Manage* 50, 1834-1840. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.001>.
- Baicha Z, Salar-García MJ, Ortiz-Martínez VM, Hernández-Fernández FJ, de los Ríos AP, Labjar N, Lotfi E and Elmahi M. 2016. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Process Technol* 154, 104-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.08.017>.
- Carvalho AP, Monteiro CM and Malcata FX. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J Appl Phycol* 21, 543-552. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9415-z>.
- Chen CY, Zhao XQ, Yen HW, Ho SH, Cheng CL, Lee DJ, Bai FW and Chang JS. 2013. Microalgae-based carbohydrates

- for biofuel production. *Biochem Eng J* 78, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>.
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ and Chang JS. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technol* 102, 71-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25, 294-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.
- Cho KC, Lee CH, Ko KJ, Lee YJ, Kim KN, Kim MK, Chung YH, Kim DK, Yeo IK and Oda. T. 2016. Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Res* 17, 61-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.023>.
- Chokshi K, Pancha I, Trivedi K, George B, Maurya R, Ghosh A and Mishra S. 2015. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource Technol* 180, 162-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.102>.
- Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P and Del Borghi M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem Eng Process* 48, 1146-1151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>.
- Cowan AK, Rose PD and Horne LG. 1992. *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *J Exp Bot* 43, 1535-1547. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/43.12.1535>.
- de Castro Araújo S and Garcia VMT. 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture* 246, 405-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.051>.
- dos Santos RR, Kunigami CN, Aranda DAG and Teixeira CMLL. 2016. Assessment of triacylglycerol content in *Chlorella vulgaris* cultivated in a two-stage process. *Biomass Bioenerg* 92, 55-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombio.2016.05.014>.
- Goold HD, Cuiñé S, Légeret B, Liang Y, Brugièrè S, Auroy P, Javot H, Tardif M, Jones BJ, Beisson F, Peltier G and Li-Beisson Y. 2016. Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* pp-00718. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.16.00718>.
- Harun R, Danquah MK and Forde GM. 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J Chem Technol Biot* 85, 199-203. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2287>.
- Hope AB and Walker NA. 1975. The physiology of giant algal cells. Cambridge University Press, London pp. 136-148. <http://dx.doi.org/10.1080/00219266.1975.9654047>.
- Hosono H, Uemura I, Takumi T, Nagamune T, Yasuda T, Kishimoto M, Nagashima H, Shimonura N, Natori M and Endo I. 1994. Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *Journal of fermentation and bioengineering* 78, 235-240. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90296-8](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(94)90296-8).
- Jensen S and Knutsen G. 1993. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *J Appl Phycol* 5, 495-504. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02182508>.
- Juneja A, Ceballos RM and Murthy GS. 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies* 6, 4607-4638. <http://dx.doi.org/10.3390/en6094607>.
- Kakinuma M, Coury DA, Kuno Y, Itoh S, Kozawa Y, Inagaki E, Yoshiura Y and Amano H. 2006. Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). *Mar Biol* 149, 97-106. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-005-0215-y>.
- Kinnunen V and Rintala J. 2016. The effect of low-temperature pretreatment on the solubilization and biomethane potential of microalgae biomass grown in synthetic and wastewater media. *Bioresource Technol* 221, 78-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.017>.
- Ko KJ, Lee CH, Moon HN, Lee YJ, Yang JJ, Cho KC, Kim DK and Yeo IK. 2016. Simultaneous effect of salinity and temperature on the neutral lipid and starch accumulation by oceanic microalgae *Nannochloropsis granulata* and *Chlorella vulgaris*. *J Korean Soc Mar Environ Energy* 19, 236-245. <http://dx.doi.org/10.7846/JKOSMEE.2016.19.3.236>.
- Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.
- Markou G, Angelidaki I and Georgakakis D. 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 631-645. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI and Lee YC. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 339, 69-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.
- Mata TM, Martins AA and Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energ Rev* 14, 217-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- McMahon A, Lu H and Butovich IA. 2013. The spectrophoto-

- metric sulfo-phospho-vanillin assessment of total lipids in human meibomian gland secretions. *Lipids* 48, 513-525. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-013-3755-9>.
- Miao X and Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technol* 97, 841-846. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.008>.
- Oda T, Akaike T, Sato K, Ishimatsu A, Takeshita S, Muramatsu T and Maeda H. 1992. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch Biochem Biophys* 294, 38-43. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90133-H](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(92)90133-H).
- Ogbonda KH, Aminigo RE and Abu GO. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technol* 98, 2207-2211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028>.
- Packer M. 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energ Policy* 37, 3428-3437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2008.12.025>.
- Pancha I, Chokshi K, Maurya R, Trivedi K, Patidar SK, Ghosh A and Mishra S. 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technol* 189, 341-348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>.
- Raven JA and Geider RJ. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol* 110, 441-461. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00282.x>.
- Renaud SM, Think LV, Lambrinidis G and Parry DL. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195-214. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4).
- Rhee G and Gotham IJ. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol Oceanogr* 26, 635-648. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1981.26.4.0635>.
- Sforza E, Grisa B, de Farias Silvae CE, Morosinotto T and Bertuccio A. 2014. Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor. *Chem Eng Trans* 38. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1438036>.
- Su CH, Chien LJ, Gomes J, Lin YS, Yu YK, Liou JS and Syu RJ. 2011. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J Appl Phycol* 23, 903-908. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9609-4>.
- Tammam AA, Fakhry EM and El-Sheekh M. 2011. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *Afr J Biotechnol* 10, 3795-3808. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB102392>.
- Tredici MR, Carlozzi P, Zittelli GC and Materassi R. 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technol* 38, 153-159. [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90147-C](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(91)90147-C).
- von Alvensleben N, Magnusson M and Heimann K. 2016. Salinity tolerance of four freshwater microalgal species and the effects of salinity and nutrient limitation on biochemical profiles. *J Appl Phycol* 28, 861-876. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0666-6>.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y and Ruan R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotech* 162, 1174-1186. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>.
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144, 307-313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Xia L, Rong J, Yang H, He Q, Zhang D and Hu C. 2014. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. *Bioresource Technol* 161, 402-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.063>.
- Xin L, Hong-Ying H and Yu-Ping Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technol* 102, 3098-3102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.
- Yang IS, Salama ES, Kim JO, Govindwar SP, Kurade MB, Lee M, Roh HS and Jeon BH. 2016. Cultivation and harvesting of microalgae in photobioreactor for biodiesel production and simultaneous nutrient removal. *Energ Convers Manage* 117, 54-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.03.017>.
- Zheng Y, Chi Z, Lucker B and Chen S. 2012. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource Technol* 103, 484-488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.122>.