

인 결핍에 따른 하수배양 미세조류의 지방산 특성 분석 연구

Effects of Phosphorus Starvation on Fatty Acid Production by Microalgae Cultivated from Wastewater Environment

우성근* · 박준홍**

Woo, Sung-Geun · Park, Joon-Hong

Abstract

Wastewater-adapted microalgae such as *Chlorella vulgaris* AG10032, *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2 and *Scenedesmus quadricauda* AG10308 are useful biological resources for recovering biofuel and other bio-based materials from wastewater because of their efficient removals of nitrogen and phosphorus from wastewater and their high fatty acid contents in biomass. Although the concentrations of phosphorus typically vary in wastewater environment, very little is known about the effect of phosphorus concentration, especially phosphorus starvation, on microalgal fatty acid synthesis. This is partially due to the lack of methodological establishment for algal fatty acid analysis. In this study, we compared the analysis performances of microalgal fatty acids by two different methods; one is a non-polar GC (gas chromatography) column based method, which is generally used for microbial fatty acids, and the other is a polar WAX-type GC column method, which is typically used for plant fatty acids. And then, we explored the effect of phosphorus concentration levels on fatty acid production in microalgae cultivated from wastewater. As results, the polar WAX-type column method has better ability to separate poly unsaturated fatty acids (PUFA) including C_{18:3} (linolenic acid), and was found to be more applicable in analyzing fatty acids from wastewater-cultivated microalgae than the non-polar column method. The fatty acid characterization by the WAX-type column method revealed little effect of phosphorus starvation on the quantity and composition of fatty acids from wastewater-cultivated microalgae.

Key words : wastewater, resource recovery, microalgae, phosphorus limitation

요 지

하수에서 배양된 미세조류인 *Chlorella vulgaris* AG10032, *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2, *Scenedesmus quadricauda* AG10308은 오폐수에서 질소 및 인 제거가 우수하고 높은 지질을 함유하고 있어서, 오폐수에서 바이오연료나 기타 바이오 기반의 자원 회수에 유용한 생물자원이다. 오폐수 환경에는 다양한 인의 농도가 존재하는데, 인의 농도 특히 인 결핍조건에 따른 조류의 지방산 특성에 대한 정보가 매우 제한적이다. 이는 표준 분석방법이 정립되어 있지 않은데 일부 기인한다. 본 연구에서는 미생물의 지방산을 분석하는데 일반적으로 사용되는 무극성 컬럼법과 식물성 지질을 분석하는데 널리 사용되는 극성 WAX-type 컬럼 GC-FID 방법의 미세조류 지방산 분석 성능을 비교 분석하였고, 하수배양 조류에 적용이 보다 적절한 방법을 이용해서 인 결핍에 의한 조류 지방산 생성특성에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 무극성 컬럼 방법에 비해 극성 WAX-type 컬럼 GC 방법이 C_{18:3} 지방산과 같은 고불포화지방산을 규명하는 분석능력이 우수하였고, 실제 하수배양에서 배양 분리된 미세조류의 지방산 분석에 보다 정확한 결과를 보이었다. 이 WAX-type 컬럼 방법으로 인 결핍 영향을 분석한 결과, 미세조류의 지방산 조성과 생성량은 인의 농도 변화에 크게 영향을 받지 않음을 밝히었다.

핵심용어 : 하수, 자원회수, 미세조류, 인 결핍

1. 서 론

지구 온난화와 화석연료고갈에 따른 문제를 해결하기 위한 방법들 중, 바이오에너지는 가장 유망한 대체에너지로 각광 받고 있다(IEA 2007; IPCC, 2007). 제 1 세대 바이오에너지는 식물성 혹은 동물성 유지로부터 바이오에너지를 생산

하는 기술분야를 일컫는데(Singh와 Singh, 2010), 식량자원을 소비한다는 점에서 비판을 받고 있다(Rosegrant 등, 2006). 이러한 문제에 대처하기 위하여 폐목재, 낙엽, 농축 유기폐기물 등 비식량 폐자원을 가수분해하여 바이오에너지를 생산하는 제 2 세대 바이오에너지 기술이 대두되었다(Somerville, 2006). 최근에는 미세조류를 이용한 바이오에너

*연세대학교 토목환경공학과 대학원 석사과정 (E-mail : wsg135@hanmail.net)

**정회원 · 교신저자 · 연세대학교 토목환경공학과 교수 (E-mail : parkj@yonsei.ac.kr)

지가 제 3 세대 바이오에너지로서 두각을 나타내고 있는데, 이는 조류가 단위 바이오매스당 높은 양의 지질을 함유하고 있을 뿐만 아니라 질소, 인 등의 무기영양염류를 제거함으로써 수질개선과 바이오에너지 자원 회수라는 동시 목적에 조류자원이 응용될 수 있기 때문이다(Martinez 등, 2000; Chisti, 2007; Rittmann, 2008; Park 등, 2011; Singh 등, 2011).

미세조류의 바이오매스로부터 추출된 지질을 이용하여 바이오디젤, 식품보조제 등의 자원으로 사용하기 위해서는 지질을 이루고 있는 지방산의 성분을 정확하게 분석하는 것이 매우 중요하다(Chisti, 2007). 불포화 지방산의 비율이 높은 경우 이중결합의 개수가 많기 때문에 수송연료로 사용되었을 시 엔진에 손상을 입힐 수 있다. 반면에 이중결합의 개수가 많은 경우에는 여러 가지 수지를 만들 수 있는 가능성이 넓어지기 때문에 유기화학분야에서 치환기에 따라서 다양하게 응용될 수 있고 오메가 3 지방산처럼 의약품 또는 건강식품에 이용될 수도 있다(Meier 등, 2007; Hatti-Kaul 등, 2007).

지방산을 분석하기 위한 방법들 중, gas chromatography (GC)를 기반으로 한 분석법이 가장 널리 이용되고 있다. 미생물의 지방산을 분석하기 위한 GC 기반 방법 중 GC-MS를 이용한 분석방법은 지방산 성분을 기지의 데이터베이스로 규명할 뿐만 아니라 표준 물질을 이용하여 정량적 분석도 가능하다(Samori 등, 2010). 하지만 설치하는데 드는 고비용으로 인해 일반적으로 GC-flame ionization detector (FID)을 이용하여 분석하게 되는데, 기지의 fatty acid methyl ester(FAME) 물질을 이용하게 되면 GC-FID system을 통해 지방산의 성분 규명이 가능하고, MS 방법과 마찬가지로 정량분석도 가능하다(Mondala 등, 2009; Johnson 등, 2009). 이 때 컬럼의 극성정도에 따라서 지방산 분석 성능이 달라지게 되는데, 하수에서 배양되는 미세조류의 지방산 분석에 대한 실증적인 연구가 제한적이므로 이에 대한 연구가 필요하다. 박테리아의 지방산을 분석하는데 무극성 컬럼기반의 Microbial Identification Inc system(MIDI)가 일반적으로 사용되고(Buyer, 2006), 식물 지방산 분석에는 SUPELCOWAX-10와 같은 극성 컬럼을 사용하는 분석방법이 일반적인데(Abidi, 2001), 이러한 방법들이 하수배양 미세조류의 지방산 분석에 적합한지에 대한 실증적인 연구 결과가 보고되어 있지 않다.

미세조류의 지질함량 증대를 위해서 UV, 질소부족 등의 환경스트레스 조건을 부여하기도 한다(Wang 등, 1994; Ou 등, 2005; Li 등, 2010). 공학적 차원에서 보면, 환경스트레스에 따른 지질함량도 중요하지만 동시에 지질 내 지방산 성분의 조성에 관련된 정성적 특성은 조류지질의 상용화 판단에 중요하다. 하지만 환경스트레스 조건에 따른 조류 지질 내 지방산 구성에 미치는 영향에 대한 기초연구가 국내외적으로 미흡하다. 이러한 원인 중에 주요사항은 조류 지방산 분석 표준방법의 부재와 방법론에 대한 연구가 부족한 것이다. 환경스트레스 조건 중 질소부족, 광원에 따른 조류 지방산 생성에 미치는 영향에 관한 연구는 일부 있으나(Wang 등, 1994; Serebryakova와 Tsygankov, 2007; Li 등, 2010), 인 결핍이 조류지방산 조성에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 전무하다. 본 연구에서는 조류 지방산 분석을 위해 MIDI를 포함한 GC 분석 방법의 분석특성을 비교분석하고,

인 결핍 환경에서 지방산 생성과 조성에 미치는 영향을 기존에 하수에서 배양되는 것으로 알려진 미세조류 *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2, *Scenedesmus quadricauda* AG10308, *Chlorella vulgaris* AG10032(이장호와 박준홍, 2010)을 이용하여 연구하였다.

2. 실험방법

2.1 조류

실험에 사용된 조류 3종은 하수에서 배양할 조류인 *Ankistrodesmus gracilis* SAG278-2, *Scenedesmus quadricauda* AG10308, *Chlorella vulgaris* AG10032를 한국생명공학연구원(KRIBB)의 생물자원센터로부터 분양 받았다.

2.2 배양

3개의 1 L 크기의 삼각플라스크에 400 mL의 BG11 배지와 하수 두 경우에 대해 3종의 조류를 배양하였다. 세 조류의 초기 주입 농도는 약 20 mg/L 이고, 호기성 혼합반응조에서 25°C의 온도와 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛세기를 유지하며 125 rpm으로 2주동안 배양하였다. 조류가 성장한 후에 조류를 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 후에, 동결건조하여 보관하였다(이장호와 박준홍, 2010).

BG11 배지는 다음과 같은 성분을 포함하고 있다. 1.5 g의 NaNO_3 , 0.04 g의 K_2HPO_4 , 0.07 g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.058 g의 $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.006 g의 citric acid, 0.006 g의 ferric ammonium citrate, 0.001 g의 EDTA(disodium salt), 0.02 g의 NaCO_3 , 1 mL의 trace metal mix A5를 1 L의 멸균된 증류수에 넣는다. Trace metal mix A5는 다음과 같은 성분을 포함하고 있다. 2.86 g의 H_3BO_3 , 1.81 g의 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.222 g의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.039 g의 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and 0.049 g의 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 1 L의 증류수에 넣어 만든다. 멸균 후 pH는 8.4로 조절한다.

인 제한조건에서의 지방산의 조성 및 양의 변화를 살펴보기 위해서 BG11 배지에서 K_2HPO_4 를 제거한 후 K_2HPO_4 의 양을 조절하여 인의 양을 Table 1과 같이 세 가지 조건으로 설정하였고(Ou 등, 2005), 이렇게 설정된 조건에서 BG11에서 제시된 조건하에 2주 동안 기 배양된 3종의 조류를 filtering하여 다시 넣어 준 이후, 8일 동안 배양하였다.

하수는 서남 하수처리장(서울)의 유입수를 1.2 μm GF/C (Whatman filter)를 이용하여 Filtering 함으로써 박테리아를 제거한 이후에 사용하였다. 하수의 초기 총질소, 총인의 농도는 각각 $37.5 \pm 0.5 \text{ mg/L}$ 와 $3.25 \pm 0.05 \text{ mg/L}$ 이었고, pH는 7.35 ± 0.02 이었다.

2.3 Transesterification 반응

지방산을 분석하기 위해 Fig. 1과 같이 FAME전환과 추

Table 1. Culture media used in this study

Media	High-P (BG11)	Medium-P (Modified BG11)	Low-P (Modified BG11)
Phosphorus concentrations	High level of P (175 $\mu\text{mol/L}$)	Medium level of P (1.75 $\mu\text{mol/L}$)	Low level of P (0.02 $\mu\text{mol/L}$)

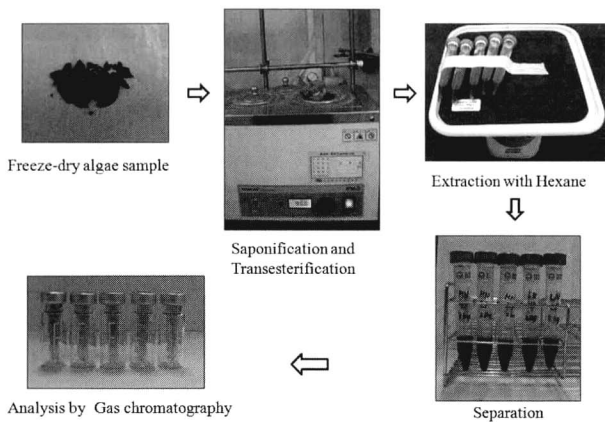


Fig. 1 Direct-transesterification process

출과정을 동시에 진행하는 direct-transesterification 반응을 진행하였다(Yoo 등, 2010; Ehimen 등, 2010). 지방산을 분석하기 위한 첫 번째 단계는 자유지방산(free fatty acid, FFA)을 제거하기 위한 비누화 반응으로서, 동결 건조된 조류 100 mg을 1 mL의 포화 KOH-CH₃OH 용액을 넣고 100°C에서 30분 동안 가열하였다. Transesterification 반응을 위해 차가운 물에서 식힌 후에 5% HCl in MeOH 용액을 2 mL 넣고 80°C에서 10분동안 가열하였다. 차가운 물에 식힌 후에 1.25 mL의 n-hexane과 methyl-tert butyl ether(1:1 비율) 용액을 넣고 부드럽게 섞어서 두 개의 층이 생성된 후에 아래 층은 버리고 위층은 3 mL의 1.2% KOH 용액을 이용하여 잔류 HCl을 제거하였다. 최종적으로 포화 NaCl용액을 이용하여 washing 한 후 GC vial에 담아 분석을 진행하였다.

2.4 지방산 GC 분석

GC-based method 중에서 식물 또는 미생물의 지방산을 분석하기 위하여 쓰이는 방법들 중 Table 2의 2가지 방법에 대한 분석을 시행하였고 각각의 결과에 대해 비교, 분석하였다.

Microbial Identification Inc system(MIDI) 방법은 무극성인 HP ultra 2 컬럼을 이용하여 지방산을 분리하고 MIDI사의 sherlock system을 이용하여 지방산을 검출하였다. HP ultra 2 컬럼의 길이와 내경, 필름두께는 각각 25 m × 200 μm × 0.33 μm인 것을 사용하였다. 초기온도 170°C에서 5분을 유지하였고, 5°C/min의 비율로 14분 동안 승온하였으며 다시 40°C/min의 비율로 1.5분을 승온하였고 최종온도인 320°C에서 1.5분을 유지하였다. 주입부의 온도는 250°C, Detector의 온도는 300°C를 유지하였고, Carrier gas는 H₂를 사용하였다.

WAX-type 컬럼 방법은 극성인 SUPELCOWAX 10 컬럼을 FID detector와 연계해서 FAME를 검출하는 것이다. 표준 FAME를 사용하여 해당 지방산을 정성 및 정량하였다. 컬럼의 길이와 내경, 필름두께는 각각 60m × 320 μm × 0.5 μm인 것을 사용하였다. 초기온도 100°C에서 5분을 유지하였

고, 10°C/min의 비율로 15분 동안 승온하였으며, 최종온도인 250°C에서 40분을 유지하였다. Carrier gas는 He를 사용하였고 주입부의 온도는 250°C, Detector의 온도는 300°C를 유지하였으며, Carrier gas는 He를 사용하였다.

2.5 지방산 정량화

GC-FID에서 지방산 Peak를 정성 및 정량 하기 위하여 14개의 복합 FAME 표준물질(F.A.M.E.Mix C₈-C₂₄, Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 구매하였고 포함된 지방산및 함량은 다음과 같다. C_{8:0}(8%), C_{10:0}(8%), C_{12:0}(8%), C_{14:0}(8%), C_{16:0}(11%), C_{16:1}(5%), C_{18:0}(8%), C_{18:1}(5%), C_{18:2}(5%), C_{18:3}(5%), C_{20:0}(8%), C_{22:0}(8%), C_{22:1}(5%), C_{24:0}(8%). 이 중에서 불포화 지방산은 다음과 같은 성분이 함유되어 있다. C_{16:1}(9-hexadecanoic acid), C_{18:1}(9-octadecanoic acid), C_{18:2}(9,12-octadecadienoic acid), C_{18:3}(9,12,15-octadecatrienoic acid), C_{22:1}(13-docosenoic acid). Stock solution을 만들기 위하여 100 mg의 표준 FAME 혼합물을 2 mL의 n-hexane에 녹인 후에 250 mg/L, 500 mg/L, 1,000 mg/L, 2,500 mg/L, 5,000 mg/L, 7,500 mg/L, 10,000 mg/L의 7가지 농도로 희석하였다.

표준 FAME 물질의 retention time과 비교하여 조류가 함유하고 있는 지방산을 정성하였고, 이 지방산들을 정량하기 위해 준비된 7가지 농도의 표준 FAME 물질을 이용하여 GC 크로마토그램의 각각의 peak에 대한 적분넓이와 주입농도에 대한 calibration curve를 작성하였다. n-hexane의 희석 배수는 1:1 이었고, calibration curve를 통해 조류의 지질을 정량하였다. Roberson(1978)이 GC 방법에 있어서 재현성 검증하기 위하여 제시하였던 반복 검증에 의한 차이와 평균의 비율인 변동계수(coefficient of variation, CV) 값을 사용하여 두 가지 GC 방법의 FAME 종류에 따른 재현성을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 GC 방법에 따른 복합 FAME 물질 분리 능력 비교 분석

무극성 컬럼을 이용한 MIDI 방법과 극성 WAX-type 컬럼을 사용하는 방법을 각각 이용해서 14개의 표준 FAME물질의 혼합시료를 각각 분석하여, 지방산물질의 분리능력을 비교분석하였다. MIDI의 경우(Fig. 2), 탄소개수 18개의 지방산 중 C_{18:3} 지방산이 C_{18:1}, C_{18:2}과 따로 분리되지 않았다. 이로 인해 상대적으로 C_{18:1}의 성분이 높게 나오는 결과를 보였다. 반면 WAX-type 컬럼 방법은 C_{18:3} 지방산 분리능력이 우수하였다(Fig. 3). 하수에서 배양되는 조류지질이 C_{18:3} 지방산을 높게 포함하고 있다는 것을 감안하였을 때 (Zhukova와 Aizdaicher, 1995; Chinnasamy 등, 2010; Mulbry 등, 2008), 하수에서 배양된 조류의 지방산 분석을 위해서는

Table 2. GC methods employed in this study

Methods	Detector	Identification	Column
MIDI (Non-polar column)	FID	TSBA 6.0 (MIDI Library)	Non-polar, HP ultra 2 (25 m, 0.2 mm, 0.2 μm)
WAX-type column (Polar column)	FID	Standard FAMES	Polar, SUPELCOWAX-10 (60 m, 0.32 mm, 0.5 μm)

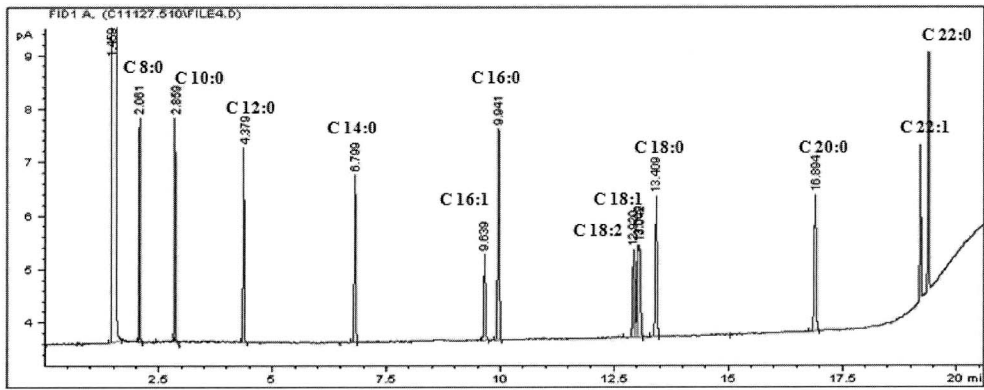


Fig. 2 Separation of 14 standard FAMES by non-polar GC column based MIDI method

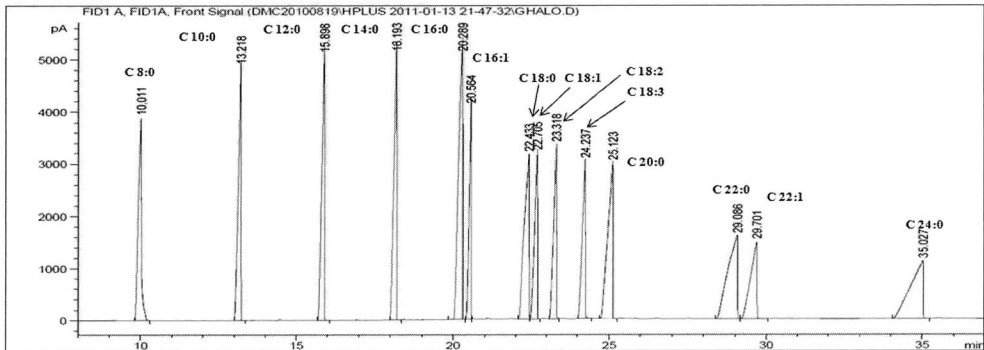


Fig. 3 Separation of 14 standard FAMES by polar WAX-type GC column method

무극성 컬럼을 사용하는 GC 분석 방법보다는 WAX-type과 같은 극성 컬럼을 사용하는 GC 방법이 보다 더 적합함을 본 연구 결과는 시사한다.

3.2 GC 방법에 따른 조류 지방산 분석 비교분석

극성 컬럼 사용하는 GC 방법이 무극성 컬럼 GC 방법에 비해서 지방산 분석에 우수함을 하수 배양된 미세조류들의 지방산 조성 분석에 실제 적용해서 연구하였다. 비교분석 결과, GC 방법에 따라서 상이한 결과를 보임을 알 수 있었고, 이 경향은 이종 미세조류 간에도 동일하였다(Fig. 4). MIDI 방법에서는 $C_{18:3}$ 지방산이 거의 검출되지 않았지만, WAX-type 컬럼방법은 $C_{18:3}$ 지방산 검출이 현격하게 관찰되었다. 이러한 WAX-type 컬럼 방법에 의한 결과는 유사한 미세조류의 지방산 성분에 대한 문헌 결과와 일치하였다(Zhukova와 Aizdaicher, 1995). 따라서 WAX-type 컬럼방법이 MIDI

방법보다 해당 미세조류의 지방산의 성분분석에 보다 더 적합함을 알 수 있었다. 앞서 언급된 바와 같이(Fig. 2 vs. Fig. 3), 이러한 WAX-type 컬럼방법의 우월성은 극성 컬럼인 SUPELCOWAX-10이 불포화 정도가 다른 동일탄소 지방산 분리능이 우수하기 때문인 것으로 판단된다.

$C_{18:3}$ 지방산 분석능력은 미세조류 지질의 상용화 방안 도출에 매우 중요한 정보를 제공할 수 있다. $C_{18:3}$ 지방산과 같이 불포화 정도가 높은 지방산의 함유량이 큰 지질로부터 생산된 바이오디젤을 사용하는 경우, 기존의 연소 기관내에 기계적인 무리를 줄 수 있는 단점이 있다(Chisti, 2007). 이러한 이유로 유럽에서는 바이오디젤의 상용화에 고불포화지방산(poly-saturated fatty acid)의 함량을 제한하고 있다(Chisti, 2007). 반면 고불포화지방산은 식품 및 첨가제로서 혹은 기타 대체 물질로서 고가치(high value) 물질자원으로 사용될 수 있다(Meier 등, 2007; Hatti-Kaul 등, 2007). 따라서 WAX-type의 극성 컬럼을 이용한 GC 방법을 통해서 제시되는 고불포화지방산 성분과 함양에 대한 정보는 하수로 배양되는 미세조류내 지질을 바이오디젤로 활용하는 것이 적당한지 혹은 기타 고가치 물질자원으로 활용하는 것이 상용성이 높은지에 대한 판단에 매우 유용할 것이다.

Table 3과 Table 4는 각각 두 가지 FAME 분석 GC 방법에 있어서 변동계수 값을 통해 각각의 GC 방법의 재현성을 분석한 결과를 나타낸다. MIDI 방법은 변동계수 값이 0.07-5.25%의 값을 보였고, WAX-type 컬럼의 경우 0.00-2.09%의 값을 보임으로써, 두 방법 모두 비교적 높은 재현성을 갖고 있는 것을 보였다. 하지만, 탄소개수 혹은 농도가 증가 또는 감소함에 따른 변동계수의 차이는 나타나지 않았다.

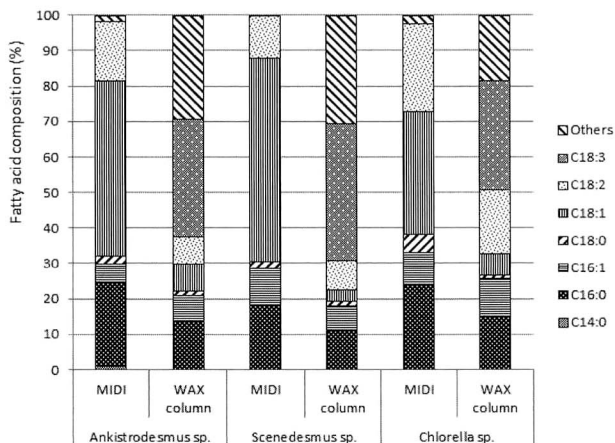


Fig. 4 Fatty acid composition analysis by different GC methods

Table 3. Coefficients of variation of each FAME with various concentrations analyzed by MIDI method

FAME CONC (mg/L)	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 22:0	C 22:1	C 24:0
250	1.70	1.71	1.20	0.76	0.49	0.74	0.67	0.69	0.58	-	0.72	0.67	0.87	0.75
500	0.69	0.67	0.31	0.37	0.39	0.41	0.37	0.33	0.40	-	0.28	0.19	1.21	0.18
1,000	0.78	1.00	0.07	0.10	0.09	0.17	0.15	0.12	0.40	-	0.29	0.45	0.41	0.56
2,500	0.32	0.10	0.17	0.11	0.04	0.08	0.12	0.24	0.15	-	0.21	0.30	0.27	0.54
5,000	1.89	2.00	1.83	1.71	1.63	1.65	1.71	1.79	2.28	-	1.90	2.27	2.15	2.91
7,500	0.55	0.78	0.60	0.58	0.45	0.49	0.38	0.56	0.25	-	0.38	0.43	0.42	0.55
10,000	0.38	0.15	0.79	0.95	0.97	1.00	0.97	2.22	5.25	-	0.91	0.82	0.85	0.64

*FAME concentration represents concentrations of total FAMES

*Linolenic acid (C_{18:3}) was not separated from Oleic or Linoleic Acids (C_{18:1} or C_{18:2}) by this MIDI method.

Table 4. Coefficients of variation of each FAME with various concentrations analyzed by Wax-type method

FAME CONC (mg/L)	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 22:0	C 22:1	C 24:0
250	0.06	0.08	0.13	0.05	0.16	0.20	0.18	0.59	0.06	0.74	1.10	2.08	1.34	2.09
500	1.63	0.47	0.28	0.19	0.03	0.00	0.32	0.18	0.30	0.44	0.74	1.55	1.18	1.94
1,000	0.45	0.52	0.48	0.57	0.60	0.58	0.66	0.59	0.64	0.69	0.82	1.09	1.01	1.11
2,500	0.31	0.25	0.29	0.28	0.30	0.28	0.33	0.35	0.33	0.40	0.46	0.62	0.57	0.88
5,000	0.37	0.33	0.24	0.16	0.18	0.16	0.22	0.16	0.22	0.19	0.24	0.19	0.21	0.07
7,500	1.34	1.34	1.43	1.55	1.67	1.73	1.64	1.68	1.65	1.70	1.65	1.74	1.71	1.90
10,000	0.22	0.26	0.26	0.30	0.44	0.41	0.44	0.41	0.45	0.53	0.34	0.11	0.17	0.13

*FAME concentration represents the concentrations of total FAMES

3.3 인 농도 조건에 따른 미세조류 지방산 특성화

선행된 실험을 통해 WAX-type 컬럼 방법이 고불포화지방산 분리능력 면에서 뛰어난 성능을 보일 뿐만 아니라 표준 FAME 물질과 비교분석을 통해서 정량분석도 가능한 점을 감안하여 GC-FID SUPELCOWAX-10 컬럼 방법을 이용하여, 인의 농도 조건에 따른 미세조류의 지방산 조성의 생성량에 미치는 영향을 분석·비교하였다. 이를 위해서 문헌에서 가장 많이 인용되었던 *Chlorella vulgaris* 종을 이용해서 비교분석을 수행하였다.

조류에 의한 인 제거 경향에 대해 일반적으로 문헌에서는 환경에 인이 과다하게 존재하는 경우, 일반적인 조류는 인을 체내에 축적하는 경우를 보이거나(Rhee, 1982) 또는 조류가 제거할 수 있는 일정농도까지 제거하는 경향을 보인다고 보고하고 있다(Kromkamp 등, 1989; Robinson 등, 1989). 조류의 성장이 완전히 이루어진 경우, 남조류(Microcystis)는 300 μ M의 인 농도를 100 μ M 까지 낮추는 것으로 나타났고(Kromkamp 등, 1989), 녹조류(*Chlorella*)의 경우, 200 μ M의 인 농도를 완전히 제거하는 것으로 나타났다(Robinson 등, 1989). 따라서, 본 논문에서는 남조류와 녹조류의 인 제거 농도 범위 및 기작에 있어서 큰 차이가 없다고 가정하여, Ou 등(2005)의 논문에서 남조류(Microcystis)에 사용하였던 세 가지 농도의 인 조건을 녹조류(*Chlorella*)에 적용하였다.

고농도의 인 환경이 부여된 BG11 배지, 중간 정도의 인 농도의 배지 그리고 인 결핍 배지에서 자란 조류의 지방산 조성을 비교한 결과(Fig. 5), 전체적인 지방산 조성에서는 큰

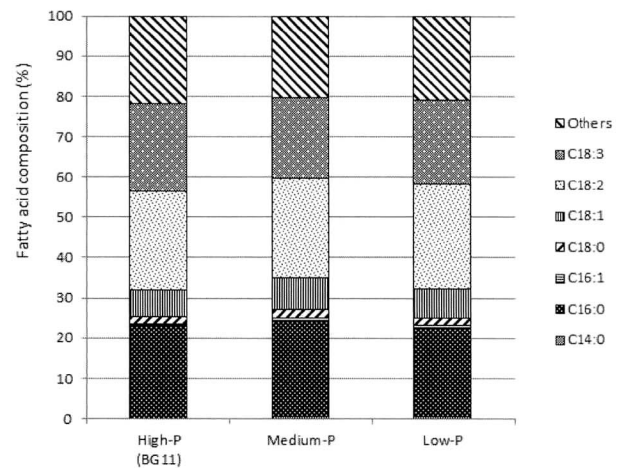


Fig. 5 Fatty acid composition analysis of *Chlorella* sp. cultivated in various phosphorus concentrations

차이를 보이지 않는다. 즉 해당 미세조류의 지방산 조성이 인의 농도 조건에 영향을 받지 않음을 의미한다. 기존의 문헌에서도 인 결핍이 불포화 지방산 조성에 큰 영향을 미치지 않는다는 연구 결과가 있었다(Park 등, 2002). 이러한 기존의 문헌 및 이 연구에서의 지방산 조성에 대한 결과는 하수를 이용해서 배양하는 미세조류에 대한 연구에 중요한 시사점을 제시하고 있다. 일반적으로 인의 농도가 높은 BG11과 같은 배지에서 조류에 대한 생물학적 연구들이 진행되어 왔는데, 만약 인의 농도가 조류 지방산 조성에 영향을 준다면 인의 농도가 상대적으로 낮은 하수에서 배양된 조류에 대한 활용방안 도출을 위해서는 기존의 연구결과들

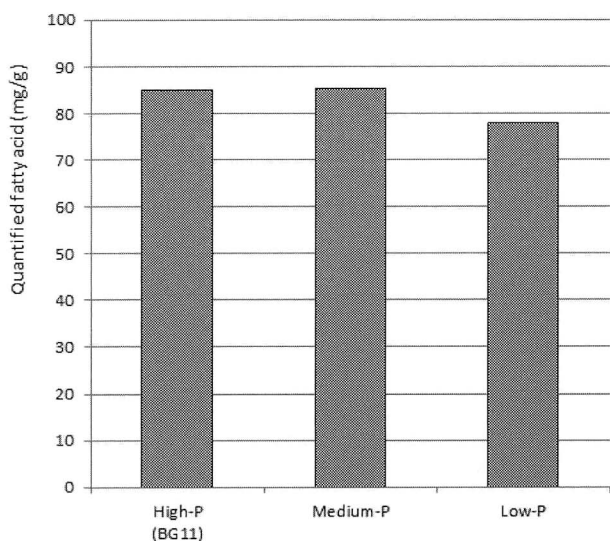


Fig. 6 Quantification of total fatty acid of *Chlorella* sp. cultivated in various phosphorus concentrations

을 활용할 수 없을 것이다. 하지만 본 연구결과에 따르면, 인의 농도가 조류 지방산 조성에 영향을 주지 않으므로, 해당 조류의 하수배양에 사용시 기존 문헌결과들이 활용될 수 있음을 시사한다.

인 농도에 따라서 조류 지방산의 조성은 일정하게 유지되었다. 하지만 생성된 총 지방산 량에 인의 농도가 미치는 영향에 대한 분석이 필요하였다. 이를 위해서 확인된 지방산을 표준 FAME 물질을 이용해서 정량해서 생성된 총 지방산의 양을 산출하였다. 그 결과, 고농도 및 중간농도의 인 환경조건에 비해서 인 결핍 조건에서 조류바이오매스 당 생성된 지방산이 약 10% 정도 감소하였다(Fig. 6).

일반적으로 녹조류(*Chlorella*) 및 남조류(*Microcystis*) 등의 일반적인 미세조류들은 인 결핍 상황에서 유사한 적응 방식을 보기에 되는데(Kromkamp 등, 1989), 이 적응 방식은 질소, 인 등의 결핍 상황에서 조류가 light harvesting capacity를 낮추어 체내에 에너지 과잉 상태를 만드는 것을 의미한다(Kromkamp 등, 1989). 따라서, 일반적인 미세조류의 경우, 질소 및 인 결핍상황에서 체내의 탄수화물, 단백질, 지질 등이 증가하는 경우를 보이게 된다. 기존의 문헌들에 의해 알려진 것처럼, 질소 결핍조건에서는 미세조류들이 지방산 생성이 증가하는 경향을 보이고 있다(Li 등, 2010). 이러한 이유로 인의 결핍도 지방산 생성의 증가를 가져올 것으로 기대하였으나, 그 결과는 그렇지 않았다. 이러한 경향이 다른 미세조류에도 적용이 되는지는 본 연구의 결과로만으로는 결론을 내릴 수 없다. 그럼에도 불구하고 인 농도가 미세조류 지방산 생성에 미치는 영향이 잘 알려진 질소의 그것과는 현격하게 다를 수 있음을 본 연구에서 밝혀졌다.

4. 결 론

본 연구는 하수로부터 유용한 자원을 회수하는 목적으로 미세조류를 활용하는 기술 연구의 일환으로 하수로 배양된 미세조류의 지방산 분석 방법과 주요 무기 영양염류 중 하나인 인의 농도 조건에 따른 미세조류 지방산 생성 특성에 대한 실험연구를 수행하였다. 이를 위해서 미생물의 지질을

분석하는데 가장 널리 이용되고 있는 무극성 컬럼을 사용하는 MIDI법과 식물 기반 바이오디젤 분석에 일반적으로 사용되는 WAX-type 컬럼 GC-FID 방법의 분석성능을 직접 비교 분석하였고, 인의 농도에 따른 미세조류의 지방산 성분 조성 및 생산량에 미치는 영향에 대해서 우수성이 입증된 WAX-type 컬럼을 이용해서 분석하였다. 그 주요 결과는 다음과 같다.

1. 하수배양조류의 주된 지방산 성분인 $C_{18:3}$ 지방산을 포함한 고불포화지방산을 동일탄소수의 지방산에서 분리하는 능력면에서 극성 WAX-type 컬럼 방법이 무극성 컬럼을 사용하는 MIDI 방법보다 우수함을 표준 FAME 물질들과 실제 하수에서 배양된 미세조류들의 지방산 분석을 통해서 입증하였다.
2. *Chlorella* 종의 미세조류를 대상으로 지방산 조성 및 함량에 미치는 인 농도의 영향을 분석한 결과, 인 결핍이나 부족 조건이 지방산 조성이나 바이오매스당 생산량에 크게 영향을 주지 않음을 본 연구결과 알 수 있었다.

본 연구에서는 하수에서 배양된 미세조류의 지방산 분석에 극성 컬럼 기반의 GC 방법이 무극성 컬럼 기반의 방법보다 지방산 규명 해상도에서 우월함을 입증하였고, 이 검증된 방법으로 미세조류의 지방산 성분조성과 생성량이 인의 결핍에 영향을 받지 않음을 밝혀냈다. 본 연구의 결과를 통해서, ‘또 다른 주요 무기영양염류인 질소의 결핍은 조류 지방산 생성을 촉진하는 환경스트레스로 작용하는 반면(Li 등, 2010), 인의 결핍은 지방산 생성에 무관하다’라는 가설 제시가 가능하였다. 이러한 가설의 검증은 더 다양한 하수 배양 조류 자원을 대상으로 인 농도와 지방산 생성 특성 간의 상관성을 실험적으로 규명하는 추후 연구의 필요성을 도출하였다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2009-0081153).

참고문헌

- 이장호, 박준홍(2010) 실제 하수조건에서 고지질 함량 조류자원의 생체생성과 하수처리 특성 분석. 대한환경공학회, Vol. 32 No. 4, pp. 333-340.
- Abidi, S.L. (2001) Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 935, 173-201.
- Buyer, J.S. (2006) Rapid and sensitive FAME analysis of bacteria by cold trap injection gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 67, pp. 187-190.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., and Das, K.C. (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, pp. 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, Vol. 25, pp. 294-306.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., and Carrington, C.G. (2010) Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, Vol. 89, pp. 677-684.
- Hatti-Kaul, R., Tornvall, U., Gustafsson, L., and Borjesson, P. (2007)

- Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective. *Trends in Biotechnology*, Vol. 25, pp. 119-124.
- IEA (2007) World Energy Outlook 2007. *International Energy Agency*, Paris.
- IPCC (2007) *Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Geneva.
- Johnson, M.B. and Wen, Z. (2009) Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. *Energy & Fuels*, Vol. 23, pp. 5179-5183.
- Kromkamp, J., van den Heuvel, A., and Mur, L.R. (1989) Phosphorus uptake and photosynthesis by phosphate-limited cultures of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *British Phycological Journal*, Vol. 24, No. 4, pp. 347-355.
- Li, X., Hu, H.Y., Gan, K., and Sun, Y.X. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *S. quadricauda* AG10308 *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, pp. 5494-5500.
- Martinez, M.E., Sanchez, S., Jimenez, J.M., El Yousfi, F., and Munoz, L. (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.*, Vol. 73, pp. 263-272.
- Meier, M.A.R., Metzger, J.O., and Schubert, U.S. (2007) Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 36, pp. 1788-1802.
- Mondala, A., Liang, K., Toghiani, H., Hernandez, R., and French, T. (2009) Biodiesel production by in situ transesterification of municipal primary and secondary sludges. *Bioresour. Technol.*, Vol. 100, pp. 1203-1210.
- Mulbry, W., Kondrad, S., and Buyer, J. (2008) Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *Journal of Applied Phycology*, Vol. 20, pp. 1079-1085.
- Ou, M.M., Wang, Y., and CAI, W.M. (2005) Physiological and Biochemical Changes in *Microcystis aeruginosa* Qutz. in Phosphorus Limitation. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 47, No. 6, pp. 692-702.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., and Shilton, A.N. (2011) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, Vol. 102, pp. 35-42.
- Park, S. Brett, M.T., Mullar-Navarra, D.C., and Goldman, C.R. (2002) Essential fatty acid content and the phosphorus to carbon ratio in cultured algae as indicators of food quality for *Daphnia*. *Freshwater Biology*, Vol. 47, pp. 1377-1390.
- Rhee, G.-Y. (1982) Effects of environmental factors and their interactions on phytoplankton growth. *Adv. Microb. Ecol.* Vol. 6, pp. 33-74.
- Rittmann, B.E. (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 100, pp. 203-212.
- Robinson, P.K., Reeve, J.O., and Goulding, K.H. (1989) Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 11, pp. 590-596.
- Rosegrant, M.W., Msangi, S., Sulser, T., and Valmonte-Santos, R. (2006) *Biofuels and the Global Food Balance*, International Food Policy Research Institute, Washington DC, USA.
- Samori, C., Torri, C., Samori, G., Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., Pistocchi, R., and Tagliavini, E. (2010) Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, pp. 3274-3279.
- Serebryakova, L.T. and Tsygankov, A.A. (2007) Two-Stage System for Hydrogen Production by Immobilized Cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 23, pp. 1106-1110.
- Singh, A., Nigam, P.S., and Murphy, J.D. (2011) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresour. Technol.*, Vol. 73, pp. 263-272.
- Singh, S.P. and Singh, D. (2010) Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renew Sust Energy Rev.*, Vol. 14, pp. 200-216.
- Somerville, C. (2006) The billion-ton biofuels vision. *Science*, Vol. 312, pp. 1277.
- Wang, K.S. and Chai, T.J. (1994) Reduction in omega-3 fatty acids by UV-B irradiation in microalgae *Journal of Applied Phycology*, Vol. 6, pp. 415-421.
- Yoo, C., Jun, S.-Y., Lee, J.-Y., Ahn, C., and Oh, H.-M. (2010) Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol.*, Vol. 101, pp. S71-S74.
- Zhukova, N.V. and Aizdaicher, N.A. (1995) Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, Vol. 39, pp. 351-356.

(접수일: 2011.11.8/심사일: 2011.12.26/심사완료일: 2012.5.10)