J. Mar. Biosci. Biotechnol. 2016, p. 39 - 44 Vol. 8, No. 1 [Research Paper]

http://dx.doi.org/10.15433/ksmb.2016.8.1.039 ISSN 2383-5400 (Online)

신규 미세조류 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP의 분리 및 이를 이용한 바이오디젤 제조

Isolation of New Microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, and Biodiesel Production using Its Biomass

신동우†, 배재한†, 조용희, 류영진, 김지훈, 임상민, 이철균*

Dong-Woo Shin†, Jae-Han Bae†, Yonghee Cho, Young-Jin Ryu, Z-Hun Kim, Sang-Min Lim, Choul-Gyun Lee*

인하대학교 생물공학과, 인천광역시 남구 인하로 100, 22212, 대한민국

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon-si 22212, Republic of Korea

† Both authors contributed equally to this work

(Received 27 May 2016, Revised 29 June 2016, Accepted 30 June 2016)

Abstract The microalgae have been studied for a source of biodiesel production. It is important to select the microalgae, which grows rapidly in local environmental conditions such as temperature range and ingredient of local seawater. The aim of this study was isolating microalga, which has rapid growth rate and high FAME contents in wide temperature ranges, for microalgal offshore cultivation in Korea, one of the country with four distinct seasons. Firstly, we had isolated a green microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, which has faster growth rate in low temperature (5 and 10°C) than *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* LB999 from Young Heung Island, Incheon, Korea. This microalga was cultivated in outdoor circulated tank photobioreactor (CT-PBR). As a result, this microalga could grow in wide temperature ranges (6 to 29°C), outdoors. After that, the biomass was recovered, and 13.2 g biodiesel could be acquired from 110 g dry biomass. These results indicate that the isolated microalga, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP is proper to biodiesel production using outdoor cultivation in Korea for all seasons.

Keywords : microalgae, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP, biodiesel

서 론

화석에너지의 사용으로 인한 이산화탄소의 발생은 지구온난화의 원인이 되고 있으며, 화석에너지의 고갈 시대를 대비한 지속가능한 친환경에너지로 바이오 에너지의 개발이 필요하다. 바이오 에너지 중에 바이오디젤은 내연기관인 디젤기관의 원료로서 널리 사용되고 있으며, 친환경연료로서 각광 받고 있는 연료이다. 그러나 현재 바이오디젤 제조 원료로서 대부분 식물성 지질을 이용하며, 그 지질은 대부분 식량자원이기 때문에 바이오디젤의 대량생산이 식량의 고갈문제를 새로이 유발시킬 위험성이 있다 [5]. 따라서 에너지문제도 해결하고 식량문제도 발생시키지 않을 새로운 지질자원의 개발이 필요하다. 지질 생산자원 중에 미세조류는

* Corresponding author
Phone: +82-32-872-7518 Fax: +82-32-873-7518
E-mail: leecg@inha.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

태양빛과 이산화탄소 및 물을 사용하여 광합성을 하여 유기물, 특히 지질을 생산하는 능력이 우수하기 때문에 미래 바이오디젤의 생산원으로 기대되고 있어 많은 연구가 진행되고 있다 [1]. 미세조류로부터 경제적이고 품질이 우수한 바이오디젤을 생산하기 위해서는 우수 균주의 확보가 가장 중요하며 배양된 미세조류로부터 바이오디젤을 제조하는 기술 또한 필요하다. 미세조류는 균주에 따라 생산하는 지질의 특성이 다르기 때문에 미세조류 지질을 에너지 및 건강식품자원으로 활용하기 위해서는 다양한 생산균종을 활용하여 생산하는 것이 필요하다 [6]. 특히, 경제적으로 바이오디젤을 생산하기 위해서는 옥외에서 배양하는 것이 운전비용과 설비비가 적게 들어 유리하지만, 미세조류는 일반적으로 약 23℃의 온도에서 가장 잘 생육하고 추운 기후에서는 생육이 어려운 성질이 있다 [3]. 따라서 추운 계절에도 옥외에서 배양하여 지질을 효과적으로 생산하기 위해서는 낮은 온도에서 생육활성이 우수한 미세조류가 필요하다. 북극이나 남극에도 미세조류가 존재하며 낮은 온도에서 생육하지만 전반적으로 극지 미세조류는 차가운 온도에서 생육할 뿐 성장속도가 늦고 일반 배양조건에서 생육이 잘 안되어서 극지균주 자체를 옥외배양의 거친 환경에서 지질생산균주로 사용하기에는 어려움이 있다 [4]. 특히 대한민국과 같이 사계절이 뚜렷한 지역에서의 봄, 가을 및 겨울과 같이 미세조류를 배양하기에 불리한 기온에서 생육이 잘되는 미세조류 종의 개발이 필요하다. 본 실험의 목적은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 환경조건 하에서 안정적으로 바이오디젤을 대량생산할 수 있는 신규 미세조류 균주를 선별하는 것이다.

재료 및 방법

균주의 분리

대한민국 인천광역시 강화군에 위치하는 강화도 인근 해변에서 겨울철에 해수를 채취한 후 미세조류를 분리하였다. 채취한 해수 시료를 0.45 μm의 여과지를 사용해 여과하여 세포를 농축시킨 후, 이를 멸균된 MBL (인공해수)에 f/2 배지를 용해하여 제조한 배지에 접종하였다. 그 조성은 Table 1과 같으며, 사용한 f/2 배지는 바닷물의 동물성 플랑크톤, 규조류 등의 다양한 생물체로부터의 오염을 방지하기 위해 비타민과 규소 성분을 포함하지 않았고, 1,000 배 농축액 1 L 제조를 위한 함량을 표시하였다. 0.45 μm의 여과지를 사용해 여과하여 농축된 세포를, MBL에 f/2 배지를 용해하여 제조한 한천 평판배지 (한천 1.5%)에 도말하여, 10°C에서 50 μmol/m^2/sec의 광도로 형광등을 계속 조사하면서 3 주간 배양하여 미세조류의 군락을 형성시켰다. 첫 번째 배양에서는 미세조류 뿐만이 아니라 다른 미생물들도 함께 군락을 형성하였다. 그 중 빠른 성장성을 보이는 군락들을 백금이를 사용하여 고체 배지에 선형 도말하여 미세조류만을 분리하는 과정을 3회 반복하여, 순수한 미세조류 군락들을 얻었다.

Table 1. Composition of MBL and f/2 medium (1 L basis)

Artificial seawater (MBL)	
NaCl	24.7 g
KCl	0.66 g
$MgCl_26H_2O$	8.48 g
$CaCl_22H_2O$	1.9 g
$MgSO_4$	3.07 g
$NaHCO_3$	0.18 g
f/2 medium	
$NaNO_3$	0.075 g
$NaH_2PO_4H_2O$	0.005 g
Trace metal solution	1 ml
Trace metal solution	
$FeCl_36H_2O$	3.15 g
$Na_2EDTA_2H_2O$	4.36 g
$CuSO_45H_2O$	0.0098 g
$Na_2MoO_42H_2O$	0.0063 g
$ZnSO_47H_2O$	0.022 g
$CoCl_26H_2O$	0.01 g
$MnCl_24H_2O$	0.018 g

균주의 동정

선별된 균주에 대한 형태학적 관찰과 18S rDNA의 염기서열 결정 및 분석 실험 등을 수행하였다. DNA 분리키트 (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen)를 사용하여 배양 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였으며, 이를 이용하여 18S rDNA의 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하였다. 진핵세포의 18S rDNA 염기서열을 확인하기 위해 프라이머를 제작하였다 (Table 2). 이 프라이머를 사용하여 해당 유전자의 단편을 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭시켰다. PCR은 pfu DNA 중합효소 (PrimeStar HS DNA Polymerase, TAKARA)를 사용하였고, 주형으로는 분리된 미세조류에서 추출한 게놈 DNA 40

ng 를 사용하였다. PCR 조건으로는 초기변성을 94℃에서 3분간 실시한 후, 98℃에서 10초, 50℃에서 5초, 72℃에서 30초의 반응을 30 회 반복하였고, 마지막 DNA 신장은 5 분간 실시하였다.

Table 2. Primer used for 18S rDNA PCR

서열번호 2	정방향 프라이머	5-GTCAGAGGTGAAATTC TTGGATTTA-3
서열번호 3	역방향 프라이머	5-AGGGCAGGGACGTAAT CAACG-3

생체 세포 중량 분석

바이오매스 분석을 위해 생체 세포 중량을 측정하였다. 미세조류 배양액 샘플을 electrolyte solution, Isoton®II에 희석하여 Coulter Counter (Multisizer 3, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A)를 통해 세포 크기와 세포 농도를 확인하였다.

분리된 균주의 저온에서의 생장성

분리 및 동정한 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP의 저온에서의 생장성을 확인하였다. 이때, *Dunaliella tertiolecta* LB 999와 *Tetraselmis suecica*를 대조군으로 사용하였다. 스폰지로 마개를 한 250 mL 삼각플라스크를 사용하였으며, f/2 배지를 MBL에 용해하여 준비한 배지 100 mL를 사용하여 초기 젖은 세포를 0.1 g/L 농도로 접종하고, 10℃에서 50 μmol/m^2/sec의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 120 rpm으로 진탕하며 배양하였다. 이어, 온도 조건을 5℃로 변경하고, 그 외의 조건은 모두 동일하게 하여 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP의 저온에서의 생장성을 확인하였다. 이 때, 대조군으로는 *Dunaliella tertiolecta* LB 999를 이용하였다.

분리된 균주의 옥외배양

분리 및 동정된 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP를 순환수조광생물반응기를 이용하여 옥외에서 배양함으로써, 옥외 배양적응성을 관찰하였다. 순환수조광생물반응기는 지름 1.5 m에 높이 1 m의 원통형으로 원통은 투명한 재질이며, 원통하단은 완만한 경사를 가지고 중앙으로 집중되는 깔대기 형상을 갖는다 (Figure 1). 또한, 하단중앙에 순환배양액 유출구가 있으며, 상기 순환배양액 유출구를 통하여 나간 배양액이 다시 배양액 중으로 순환배양액 유입구를 통해 토출되며 순환하는 장치를 포함한다. 또한, 순환배양액 유출구에 혼합기체를 직접 주입할 수 있도록 기체주입관이 구비되어 있다. 이때, *Dunaliella tertiolecta* LB 999를 대조군으로 사용하였다.

공기와 이산화탄소 혼합기체(2% 이산화탄소)를 순환배양액 유출구와 병렬로 연결된 기체주입관을 통해 주입하며 동시에 배양액도 순환배양액 유출구를 통해 연속적으로 배출시킨 후 순환배양액 유입구를 통해 수조 내로 분사하며 순환하는 방법으로 배양하였다. 이때, 배지는 대한민국 인천 앞바다에서 채취한 바닷물을 모래여과로 불순물을 제거한 자연해수에 f/2 배지를 혼합한 것을 사용하였으며, 배양은 대한민국 인천시 용현동 인하대학교 내의 옥외에서 2012년 4월 12일부터 30일간 배양하였다.

Figure 1. Circulated tank photobioreactor (CTPBR)

분리된 균주를 이용한 바이오디젤의 제조

순환수조광생물반응기에서 30일간 배양한 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP를 회수하기 위하여 순환수조광생물반응기의 순환을 멈추고 3시간 정치하였다. 투명한 상등액만 사이폰으로 제거하고, 남은 세포 침전액을 무명천을 여과포로 사용하여 하룻밤 자연중력여과를 하였다. 그 후, 다시 물로 세척한 다음 하룻밤 자연중력여과를 하여서 세포회수를 실시하였다. 세포를 판

형용기에 담아 영하 40°C에 동결한 다음 동결건조하여 동결건조 균체를 수득하였다. 동결건조 균체에 300 mL 메탄올과 5 mL 진한 황산(95%)을 넣고 가열하여 6시간동안 환류 교반을 한 다음 냉각하였다. 그 후, 여과한 여액을 250 mL *n*-헥산으로 3회 추출한 후, *n*-헥산층을 농축하여 조바이오디젤을 얻었다. 조바이오디젤을 고진공하에서 분별 증류하여 바이오디젤을 수득하였다.

바이오디젤의 분석

수득한 바이오디젤을 가스크로마토그래피(Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용해 FAME함량과 조성을 분석하였다. Capillary Column (HP-INNOWax, Agilent, Califonia, U.S.A., 길이: 30 m, 직경 0.25 mm, 두께 0.25 μm)을 이용하였고, 유량 3 mL/min의 헬륨가스를 이동상으로 이용하였다. 오븐의 분석조건은 초기 오븐 온도 140°C에서 1분간 정치하여 240°C까지 5°C/min로 승온하여 최종온도에서 10분간 정치하였다. FAME standards mixture (F.A.M.E. MixC4-C24, SUPELCO, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.)와 미세조류 유래 FAME의 정체시간을 비교하여 FAME의 정량분석을 실시하였고, 각 정체시간 동안의 면적을 내부 표준물질의 면적과 비교하여 정성분석을 실시하였다.

결 과

균주의 분리 및 동정

선형분리하여 얻은 순수한 미세조류 군락들을 1 mL의 f/2 배지를 MBL에 용해하여 준비한 배지에 접종하고 봄철 평균 수온인 10°C에서 50 μmol/m^2/sec의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 24 Well Plate에서 2주간 배양하였다. 배양한 균주 중에 성장성이 우수한 균주를 선택하고, 이를 100 mL 부피까지 규모를 키워서 10°C에서 50 μmol/m^2/sec의 광도를 연속적으로 조사하면서, 100 rpm으로 교반시켜 세포를 배양하였다. 얻은 세포를 이용하여 18S rDNA 염기서열을 분석한 결과, Figure 1과 같이 685 bp의 분리한 균주의 18S rDNA 단편의 염기서열(서열번호 1)을 확인할 수 있었다. 이 염기서열을 대상으로 하여 NCBI의 BLAST를 사용하여 상동성을 검사한 결과 *Tetraselmis striata*와 *Tetraselmis carteriiformis*를 포함한 *Tetraselmis*의 여러 종들과 rDNA 서열이 100% 일치한 결과를 통하여 *Tetraselmis* 속에 속하는 균주로 동정되었다.

(A)

```
1   TGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGTCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAA   60
61  GTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTA  120
121 GGGATTGGCAGACGTTTTTTTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTT  180
181 GGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACC  240
241 ACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGA  300
301 CATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGC  360
361 CGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCC  420
421 TGCTAAATAGTTACTCCTACTTTGGTAGGAGGTGAACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTT  480
481 TAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGC  540
541 ACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGACCGAGAGGTCCGGGTAATCT  600
601 TTGAAACTGCATCGTGATGGGGCTAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGC  660
661 CTAGTAAGCGTGATTCATCAGATCG                                     685
```

(B)

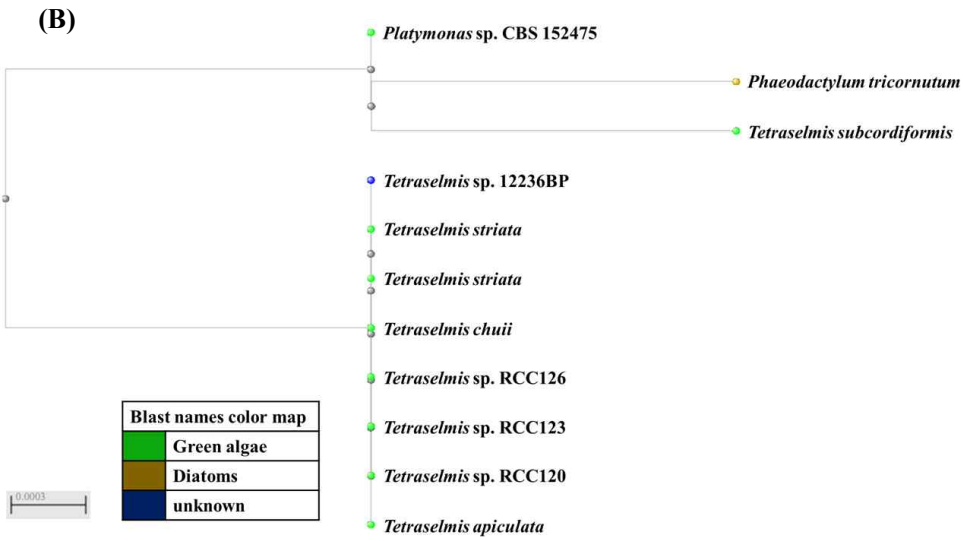

Figure 2. (A) Sequence of 18s rDNA of isolated strain, (B) Phylogenetic analysis of the 18s rDNA of *Tetraselmis* sp. 12236BP

분리된 균주의 저온에서의 생장성

온도 10°C에서 배양 4일 후, Coulter Counter(모델 multi-sizer, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.)를 사용하여 세포 농도를 측정한 결과, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP는 0.68 g/L로 생육되었으나, *Tetraselmis suecica*와 *Dunaliella tertiolecta* LB 999는 각각 0.15 g/L와 0.24 g/L로 생육이 저조하였다 (Figure 3). 온도 조건을 5°C로 변경한 결과, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP는 5°C 온도에서도 생육이 우수하였으며, 대조군에 비하여 약 6배가량의 우수한 생육정도를 나타냈다 (Figure 4).

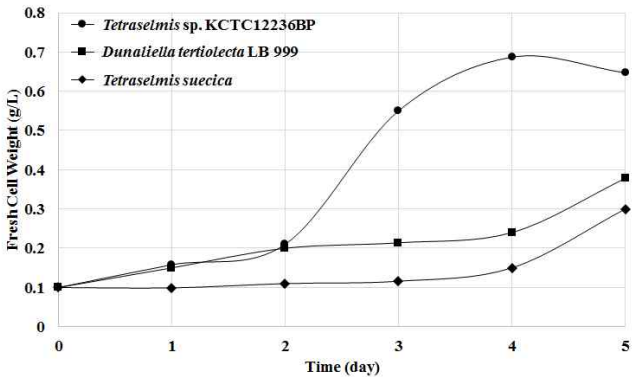

Figure 3. Growth of isolated strain *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP (●), *Tetraselmis suecica* (◆), and *Dunaliella tertiolecta* LB 999 (■) at 10°C

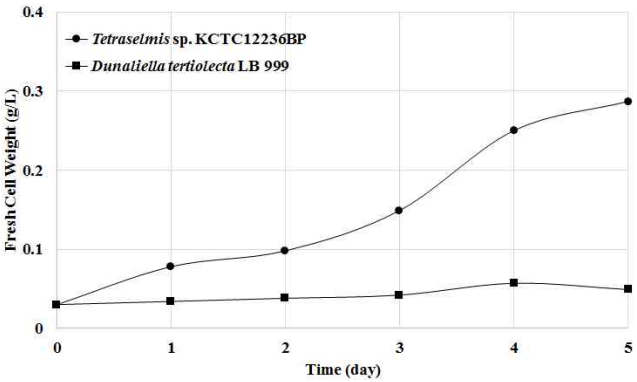

Figure 4. Growth of isolated strain *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP(●) and *Dunaliella tertiolecta* LB 999 (■) at 5°C

분리된 균주의 옥외 배양적응성

배양기간 중 배양액의 수온은 배양 첫날이 가장 낮았으며 점진적으로 올라가서 배양 1일차, 10일차, 20일차, 30일차 아침 수온이 각각 6°C, 16°C, 18°C, 21°C이었으며, 한낮의 수온은 13°C, 20°C, 21°C, 29°C 이었다. 배양 생육결과 *Dunaliella tertiolecta* LB 999는 거의 생육하지 못하고 사멸하였다. 반면, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP는 매우 잘 성장하여 차가운 기온과 자연해수 조건 및 순환수조광생물반응기의 전단응력 조건 등의 옥외 배양 조건에서 생육활성을 유지하는 생육성이 우수한 균종으로 판명되었다.

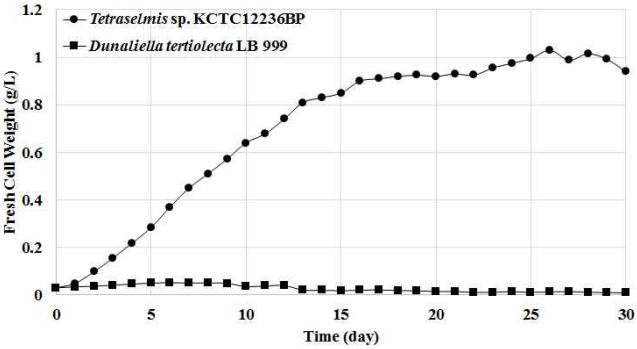

Figure 5. Growth of isolated strain *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP (●) and *Dunaliella tertiolecta* LB 999 (■) in outdoor circulated tank photobioreactor

분리된 균주를 이용한 바이오디젤의 제조

Tetraselmis sp. KCTC12236BP를 순환수조광생물반응기에서 30일간 배양한 후, 반응기의 순환을 멈추고 3시간 정치하였다. 세포 침전액(약 100 L)을 다시 무명천을 사용하여 하룻밤 자연중력여과 하였고, 다시 물로 세척한 다음 하룻밤 자연중력여과를 하여서 젖은 세포를 932 g을 수득하였다. 세포를 동결건조하여 307 g의 동결건조 균체를 수득하였다. 동결건조 균체 110 g을 이용하여 조바이오디젤 19.1 g을 얻었다. 조바이오디젤을 고진공하에서 분별 증류하여 바이오디젤 13.2 g을 수득하였다. *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP로부터 추출한 바이오디젤 지방산의 조성은 C16:0 21.9%, C18:1 15.9%, C18:2 20.4%, C18:3 8.6% 로 4가지 지방산성분이 주요 조성을 이루는 바이오디젤로 확인되었다.

고 찰

현재, 북극해양에서 분리한 클라미도모나스 세포주 등의 저온에서 자라며, 지질함량이 높은 특징을 지닌 종들이 있다. 하지만, 미세조류 유래 바이오디젤 생산을 위해서는 옥외 열린계에서도 우점종으로 생육이 가능하고, 밤낮의 온도 차이가 큰 환경에서

생존력이 우수한 균주가 필요하다. 특히 밤 시기의 저온에서도 생장속도가 빠른 균주가 필요하다. Figure 4에서 볼 수 있듯이, *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP는 5ºC 온도에서, 대조군에 비하여 약 6배가량의 우수한 생육정도를 나타냈다. 반면에, 김철원 등 [2]은 대량배양에 적합한 *Tetraselmis* 종을 선택하기 위해 5종의 *Tetraselmis*를 시험하였지만 저온인 6ºC에서는 거의 성장이 되지 않고 바닥에 가라앉아 세포가 바닥에 가라앉아 뭉쳐져 있다고 보고하고 있다.

따라서 이 실험에서 분리한 균주는 차가운 온도에서도 생육이 잘되며 배양장치가 발생하는 기계적인 스트레스에 적응성이 우수하여 차가운 계절에 옥외에서 주위환경에 영향을 적게 받으며 안정적으로 바이오디젤을 생산할 수 있는 미세조류 종으로 이용될 수 있다.

결 론

이 실험을 통해 저온에서 빠른 속도로 생장하며 옥외배양장치에 적응성이 우수한 균주를 개발하기 위하여 겨울철 대한민국 강화도 바닷가에서 생육하는 야생 미세조류를 분리하였다. 그 중 차가운 바닷가에서 생육이 우수한 미세조류를 분리하였으며, 지질 생산성이 우수한 균주를 선별하고 동정을 한 결과 *Tetraselmis* 속으로 밝혀져 *Tetraselmis* sp. KCTC12236BP 균주로 명명하였다. 봄철에 옥외배양장의 순환수조 광생물 반응기를 사용하여 대량배양 시험한 결과 저온 생장성이 종래 동속 균주 *Tetraselmis suecica*보다 우수하고, 저온부터 29ºC의 고온에서도 잘 생장하는 등 생장온도 스펙트럼이 넓어 옥외배양 조건 및 시설에 적응성이 우수하였다. 또한, 바이오매스 회수 후 직접적으로 바이오디젤을 생산하였으며, 그 결과 건조 균체 110 g으로부터 13.2 g의 바이오디젤이 생산 가능했다. 이 균주는 저온 생장성이 좋고 온도 스펙트럼이 넓어서 한국과 같은 기후조건에서 옥외배양이 가능하여, 우리나라의 바이오디젤 대량생산에 대한 연구에 크게 기여할 것이다.

감사의 글

본 논문은 정부 (해양수산부)의 '해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술개발' 연구의 지원을 받아 수행하였습니다.

References

1. Ahmad A.L., N. H. Mat Yasin, C. J. C. Derek, and J. K. Lim. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev*. **15**, 584-593.
2. Kim C. W. and S. B. Hur. 1998. Selection of Optimum Species of *Tetraselmis* for Mass Culture. *J. Aquaculture*. **11**, 231-240.
3. Monique R., J-P Steyer, and O. Bernard. 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Bio-technol*. **12**, 153-164.
4. Pedro C-A, C. O. Pamela, and M. D. Juan. 2012. Growth response of antarctic snow microalgae cultures belonging to the *chlamydomonadaceae* family to effects of temperature, irradiance and supporting media. *Anal. Inst. Patagonia*. **40**, 153-156.
5. Richard S. 2010. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *BioScience*. **60**, 722-727.
6. Teresa M., A. Martins, S. C. Nidia. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev*. **14**, 217-232.