



# 국내 담수 미세조류 *Nautococcus* sp. KNUA212의 분리 및 바이오 에너지 분석

최하늘<sup>1</sup>, 도정미<sup>1,2</sup>, 윤호성<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>2</sup>경북대학교 첨단복합 생명과학 교육연구단(생명과학부 4단계 BK교육연구단),  
<sup>3</sup>경북대학교 신바이오소재연구소

## Isolation and Characterization of Freshwater Microalga *Nautococcus* sp. KNUA212 and Bioenergy Analysis

Ha Neul Choi<sup>1</sup>, Jeong-Mi Do<sup>1,2</sup> and Ho-Sung Yoon<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>BK21 FOUR KNU Creative BioResearch Group, School of Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>3</sup>Advanced Bio-Resource Research Center, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

\*Corresponding author: hsy@knu.ac.kr Tel: +82-53-950-7398

Received 19 November 2023 | Revised 12 December 2023 | Accepted 12 December 2023

### 초록

과도한 화석연료 사용으로 증가한 대기중 이산화탄소는 기후 변화와 불안정한 연료 비용, 생물 다양성의 감소문제를 야기했다. 이러한 문제의 대안책으로써 광합성을 통해 대기 중의 이산화탄소를 흡수하고 바이오 연료로 이용가능한 지질을 축적하는 미세조류가 각광받고 있다. 또한 미세조류의 바이오매스에 축적된 고부가가치 산물들(색소, 다당류, 아미노산 등)은 산업적으로 다양하게 활용할 수 있어 관련 연구들이 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구는 울릉도 담수에서 채집해 순수분리한 토착 미세조류를 형태학적 및 분자생물학적으로 동정하여 *Nautococcus* 속으로 분류했다. *Nautococcus* sp. KNUA212를 BG-11 액체 배지에서 1~3%의 CO<sub>2</sub> 공급을 유지하며 8일간 배양한 결과 배양 1.34 g L<sup>-1</sup>의 건조중량을 가지는 바이오매스를 수확할 수 있었다. 동결건조한 바이오매스의 생화학적 특성을 분석한 결과 26.77%의 단백질 함량을 가진 것으로 나타났다. 근사분석을 통해 89.35%의 높은 휘발성 물질량을 확인할 수 있었고 이는 1,2세대 바이오 연료인 작물과 목질계에서 측정되는 값보다 높은 것으로 나타났다. 또한 원소분석한 결과 22.0 MJ kg<sup>-1</sup>의 높은 열량값이 측정되었으며 이전 바이오 및 화석 연료가 가지는 열량값보다 높거나 유사했다. 특히 *Nautococcus* sp. KNUA212가 가지는 열량값은 이전세대 바이오 연료인 작물과 목재에서 측정되는 값보다 높게 나타나 *Nautococcus* sp. KNUA212의 바이오 연료와 같은 바이오 에너지 공급원으로써의 이용 가능성도 확인할 수 있었다.

주요어: 고부가가치 산물, 미세조류, 바이오 에너지 공급원, 바이오 연료, 바이오매스, 지질



## Abstract

Increased carbon dioxide in atmosphere by increased use of fossil fuel leads to the climate change, unstable price of fuels and the decline of biodiversity. The microalgae can eliminate the carbon dioxide through photosynthesis and accumulate the lipid that can be used for biofuels as the alternative to these problems. In addition, the highly valued products (pigments, polysaccharides and amino acids etc.) are available for diverse industrial use and for those reasons, many related studies have performed actively. Our team collected sample from Ulleungdo fresh water to perform morphologic and molecular biological species identification and classified the microalgae as *Nautococcus* sp. KNUA212. As a result of cultivating *Nautococcus* sp. KNUA212 in BG-11 liquid medium for 8 days while maintaining 1~3% CO<sub>2</sub> supply, we could harvest the biomass on the 8th day of which a dry weight was 1.34 g L<sup>-1</sup>. Biochemical analysis of the freeze-dried biomass showed that *Nautococcus* sp. KNUA212 had a high protein content of 26.77%. Approximate analysis of the biomass showed that the high volatile matter of 89.35%, which was much higher than the value measured in crops and wood, first and second-generation biofuels. Additionally, elemental analysis of the biomass showed that the high calorific value of 22.0 MJ kg<sup>-1</sup>, which was higher or similar to that of previous bio and fossil fuel. Especially, the calorific value of *Nautococcus* sp. KNUA212 was much higher than the values measured in crops and wood, first and second-generation biofuels and we could identify that *Nautococcus* sp. KNUA212 also can be utilized as the bio energy source such as biofuel.

**Key Words:** bio energy source, biofuel, biomass, highly valued products, lipid, microalgae

## 1. 서론

인류는 지난 수십년 동안 산업화를 통한 괄목할 만한 발전을 이루었지만, 이 과정에서 화석연료 등 재생할 수 없는 에너지가 끊임없이 사용되었다(Khan et al. 2023). 이로 인해 발생하는 이산화탄소를 포함한 온실가스 배출의 증가는 기후 변화 및 연료비용 불안정 등으로 이어질 뿐만 아니라 돌이킬 수 없는 생물다양성 감소문제에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다(Priyadharsini et al. 2022). 이러한 전 지구적인 문제를 함께 해결하기 위하여 최초의 초국가 기후협약인 유엔기후변화협약(UNFCCC)이 등장하였으며 2015년에 파리에서 개최된 제21차 당사국총회(Conference of parties 21; COP21)에서 195개 협약 당사국이 참여해 모든 국가에 온실가스 감축 의무 부여 등 압박이 증대하였다. 또한 올해 열린 기후변화에 관한 정부 간 협의체(IPCC; Intergovernmental Panel on Climate Change) 제 58차 총회에서는 IPCC 제6차 평가보고서(AR6: The Sixth Assessment Report)를 만장일치로 승인시켰으며 여기에는 현황 및 추세, 장기 기후변화 그리고 단기 기후 행동의 시급성을 강조하였는데 여기에는 특히 기후탄력적 개발(climate resilient development)의 중요성을 담고 있다. 각국에서는 기후대응 및 에너지전환을 위해 다양한 전략을 취하고 있는데 EU의 경우 탄소국경조정제도를 통해 철강 등 6개 품목에 대해 탄소배출에 대한 규제를 실시할 예정이며 미국은 기후변화 대응 분야에만 3,690억 달러를 지출하여 인플레이션감축법을 수립하였다. 우리나라 또한 2050 탄소중립을 선언하고 탄소중립기본법을 제정하며 2021년 국제사회에 약속한 NDC 상향안의 감축목표를 준수하는 등 관련 역량을 동원하고 있다. 이 외에도 선진국을 포함한 많은 나라들은 지속가능한 에너지원과 탄소중립을 위한 탄소 포집·활용·저장 기술(CCUS) 개발에 지원을 아끼지 않고 많은 역량을 동원하고 있다.

미세조류는 광합성을 통해 이산화탄소를 다양한 유기물로 전환하는 생물로써 최근 탄소중립을 실현할 수 있는 바이오 기반 신재생에너지원으로 주목받고 있다(Khan et al. 2023). 이는 미세조류가 지닌 다양한 특성으로부터 기인하는데, 먼저 미세조류는 1차 생산자로서 수생태계의 정상적인 기능에 주요한 역할을 수행하고 있으며 빠른 성장률과 높은 광합성 효율을 바탕으로 고효율의 바이오매스를 생산할 수 있다(Leong et al. 2021). 또한 미세조류 유래 바이오 에너지를 활용한 탄소 포집 및 저장 기술은(BECCS) 이산화탄소의 배출과 흡수 사이의 균형을 맞추며 배가스의 재활용이 가능하다는 점에서 지속가능한 에너지원으로 각광받고 있다(Choi et al. 2019). 배양 후 수확한 미세조류 바이오매스에는 축적된 지질이 존재해 이를 바이오 디젤

과 같은 바이오 연료로 활용할 수 있으며 다양한 부가가치 산물들(색소, 다당류, 아미노산 등)은 항산화제, 식이보충제, 색소, 다중 불포화 지방산 등으로 활발하게 응용이 가능하다(Barkia et al. 2019; Ummalyma et al. 2023).

이러한 미세조류는 현재까지 전세계 약 170,000 여종이 존재하는 것으로 밝혀졌으며 약 3만여 종이 동정된 것으로 알려져 있다(Gómez et al. 2023). 이 중 유익한 고부가가치 물질을 생산하며 고농도의 바이오매스 획득이 가능할 것으로 기대되는 종의 수는 전체의 아주 일부에 불과하다. 더욱이 미세조류가 가진 균주 별 특징들과 구성성분의 비율은 배양환경이나 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스의 강도에 따라 변화될 수 있다(Mehariya et al. 2021). 높아진 성장속도에 비례하여 영양염 제거율 증가가 수반되거나, 스트레스에 반응하여 지질을 더 많이 축적할 수 있으며, 온도 및 pH 등과 같은 다양한 환경인자의 급격한 조절을 이용하여 단일 균주 배양을 달성할 수도 있다(Lin et al. 2023). 따라서 이러한 미세조류의 다양한 특성들을 제대로 활용하기 위해서는 종별 특성을 살펴보는 기초연구가 필수적이다.

본 연구는 우리나라 담수 미세조류 균주를 순수분리하고 분자적 동정을 진행하였으며 이산화탄소 공급 조건 하에서 최적의 성장률과 바이오매스 생산성을 획득하고자 하였다. 배양기간 동안 여러 방법으로 성장 특성을 알아보았으며 종의 생리적 특성을 알아보기 위하여 비생물학적 스트레스 환경 하에서의 성장률도 함께 조사하였다. 수확하여 얻은 바이오매스의 바이오 에너지를 위해서 활용 잠재력을 알아보기 위하여 생화학적 특성을 분석하고 근사분석 및 원소분석을 통해 열량값을 산출하여 특징을 조사하였다. 이러한 우리나라의 기후와 환경에 적응하고 진화해온 미세조류에 대한 연구를 바탕으로 국내에서 고농도의 바이오매스를 생산하는데 적합한 종을 선별하는 과정에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 미세조류 균주 순수분리

울릉도 나리분지 담수 샘플을 채집하여 BG-11 100 mL 배지에 5 mL가량 접종하였다. 배양액이 담긴 플라스크를 160 rpm으로 설정된 Orbital shaker (Vision Scientific, Korea)에 넣어 25°C, 146  $\mu\text{mole m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 광량, 16:8h 명암주기 조건에서 8일간 배양했다. 미세조류의 성장이 배양액 색의 변화 등으로 육안으로 관찰되면 1.7 mL 튜브에 배양액 1.5 mL를 넣고 15분 동안 3000×g로 원심분리(1730R, LRBOGENE, Korea)를 실시하였다. 상등액을 제거하고 얻은 미세조류 cell pellet을 Imipenem 항생제 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ 가 들어간 BG-11 고체 배지에 희석 도말한 후 도말된 고체 배지를 앞서 언급한 것과 같은 조건에서 axenic culture를 얻을 때까지 계대 배양을 실시하였다.

### 2.2 형태학적 및 분자생물학적 동정

형태학적 관찰을 위해 25°C, 146  $\mu\text{mole m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  광량, 16:8 h 광주기, 160 rpm으로 설정된 Orbital shaker에서 배양된 미세조류를 Zeiss axiolab 5 (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 관찰했다. 광학현미경에 Zeiss Axiocam 208 color를 부착하고 1000×배율로 미세조류를 촬영하며 미세조류의 특징을 관찰했다.

분자생물학적 종 동정을 위해 각각 Internal transcribed spacer (ITS), 18s rRNA, *tufA* 유전자 서열에 대한 증폭을 진행했다. PCR Premix (Bioneer, Korea)를 이용해 total volume 20  $\mu\text{L}$ 으로 Takara thermocycler (Takara, Japan)에서 template DNA를 증폭했다. ITS의 경우 ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'), ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') primer로 PCR을 진행했다. Pre denaturation은 94°C에서 3분, denaturation은 92°C에서 30초, annealing은 50°C에서 30초, elongation은 72°C에서 1분 동안 실행했다. 총 30 cycle 동안 PCR을 진행했다. 마지막 cycle이 끝난 후 72°C에서 10분 동안 extension하였다.

18s rDNA의 경우 NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'), NS8 (5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3') primer 로 PCR을 진행했다. Pre denaturation은 94°C에서 2분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 45°C에서 45초, elongation은 72°C에서 90초 동안 실행했다. 총 30 cycle동안 PCR을 진행했다. 마지막 cycle이 끝나면 72°C에서 5분 동안 extension하였다.

*tufA*의 경우 *tufA-F* (5'-GGN GCN GCN CAA ATG GAY GG - 3'), *tufA-R* (5'- CCT TCN CGA ATM GCR AAW CGC - 3') primer (Vieira et al. 2016; White et al. 1990)로 PCR을 진행했다. Pre denaturation은 94°C에서 4분, denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 45°C에서 30초, elongation은 72°C에서 1분 동안 실행했다. PCR은 총 38 cycle을 진행했다. 마지막 cycle이 끝나면 72°C에서 7분 동안 extension하였다.

pGEM easy vector system (Promega, USA)으로 1시간 동안 상온에서 ligation 시켰으며 그 후 *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell 50  $\mu$ L에 heat shock으로 transformation을 실시하고 Dokdo plasmid mini-prep kit (Elpis-Biotech, Korea)로 *E. coli* 내 PCR product가 insertion된 vector를 분리하였다. Macrogen사에 염기서열분석을 의뢰하였으며 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Blast 결과에서 미세조류의 18s rRNA, ITS, *tufA*에 대한 염기서열과 유연관계가 가까운 종의 염기서열을 파악하였다. MEGA version 11의 ClustalW에서 염기서열을 정렬해 Kimura 2-parameter +Gamma distributed (K2+G)을 이용한 Maximum likelihood 계통 추론법으로 계통도를 작성하였다.

## 2.3 생장 특성 분석

### 2.3.1 성장률 및 건조중량 측정

미세조류를 배양하기 위하여 1 L 플라스크에 BG-11 500 mL을 준비하여 seed culture를 10% 접종한 후 0.2 vvm (1~3%)으로 이산화탄소를 공급하며 8일간 배양하였다. 배양기간 동안 온도(25°C), 광량(146  $\mu$ mole m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>), 광주기(16:8 h)를 유지하였으며, 120 rpm의 회전 속도로 진탕 배양하였다.

배양기간 동안 매일 optical density (OD), cell number, pH를 측정하였다. OD는 분광 광도계(UV-1900i, Shimadzu, Japan)를 이용하여 680 nm의 파장에서 측정하였고, cell counting은 Neubauer improved C-chip (DHC-N01, NanoEntek, Korea)을 이용하여 계수하였다. pH는 pH meter기(SevenDirect SD20, Mettler Toledo, Korea)를 이용해 측정하였으며 각각의 결과값을 이용하여 성장기간 동안의 변화를 곡선으로 그렸다.

건조중량은 American Public Health Association (APHA)에 명시된 2540D protocol에 따라 측정했다. 배양 7일차의 *Nautococcus* sp. KNUA212 배양액 5 mL을 진공여과장치(Merck Millipore, XX1514700)를 이용하여 GF/C filter (47 mm, Whatman, Germany)에 여과시켰다. 그 후 filter를 105°C 오븐(WOF-W155, WiseVen, Germany)에서 24시간 동안 건조시키고 완전히 건조된 해당 filter의 여과 전, 후 중량을 측정하여 바이오매스의 건조중량을 구하였다.

### 2.3.2 엽록소 및 총 카로티노이드 함량 측정

배양 7일차 배양액 2 mL을 모은 후 미세조류 cell pellet을 차가운 Methanol (Merck, USA) 1 mL에 현탁했다. 이후 sonicator (Model 550, Fisher Scientific, USA)를 이용해 40 Hz에서 30분 동안 cell을 파쇄하였으며 어두운 곳에서 24 시간 동안 4°C에 보관하였다. 24시간 후 5분 동안 4000 $\times$ g로 원심분리하였으며 상등액의 OD를 분광 광도계를 통해 각각 473 nm, 653 nm, 666 nm의 파장에서 측정하였다. 배양 7일차 엽록소 *a*, *b*와 총 카로티노이드에 대한 함량을 분석하기 위해 Wellburn의 식을 사용했다(Wellburn 1994).



$$\text{Chl } a = 15.65 \cdot A_{666} - 7.34 \cdot A_{653}$$

$$\text{Chl } b = 27.05 \cdot A_{653} - 11.21 \cdot A_{666}$$

$$\text{Total carotenoid} = (1000 \cdot A_{473} - 2.86 \cdot \text{Chl } a - 129.2 \cdot \text{Chl } b) / 221$$

## 2.4 최적 성장 조건 실험

서로 다른 pH와 염분 농도 하에서 미세조류가 지니는 성장특성을 파악하고 최적 성장 조건을 알아보기 위하여 다양한 조건 별로 배지를 준비하여 미세조류의 성장율을 측정하였다. 각 배지들은 pH 3, 5, 7, 9, 11와 5, 25, 50, 100, 200 mM NaCl의 조건으로 제작되었으며 같은 성장환경에서 8일간 배양하고 OD와 pH를 측정하였으며 성장곡선을 그렸다.

## 2.5 바이오매스의 생화학적 분석

8일간 배양한 미세조류 배양액을 5분 동안 4000×g로 원심 분리(5810R, Eppendorf, Germany)하고 증류수로 세척하여 수확하였다. 획득한 바이오매스는 동결건조기(PVTFD20R, Ilshin, Korea)를 이용하여 동결건조 시키고 바이오매스의 생화학적 특성을 알아보는 실험들에 이용하였다.

바이오매스의 탄수화물 함량은 Debois method를 활용한 phenol-sulfuric acid 비색법을 이용해 측정했다(Nielsen 2010). 바이오매스 50 mg을 glass vial에 담고 2 N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 mL를 첨가한 뒤 3시간 동안 100°C에서 끓인 후 상온에서 식혔다. 샘플에 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 중화시킨 후 2 μm PVDF syringe filter (PV1322, Chromdisc, Korea)로 여과하였다. 각 샘플에 80% (w/v) phenol (Sigma, USA) 50 μL를 넣고 sulfuric acid (Sigma, USA) 5 mL를 넣은 후 30분 동안 상온에서 반응시켰으며 분광광도계를 이용하여 490 nm 파장에서 OD를 측정하였다. 측정값은 glucose standard에 대입하여 분석하였다.

바이오매스의 20 mg에 RIPA lysis buffer (GenDEPOT, USA) 1 mL을 넣고 sonicator에서 30분 동안 cell을 파쇄했다. 파쇄한 샘플을 30분 동안 100°C에서 끓인 후 4°C, 11000×g로 15분 동안 원심분리하여 상등액 800 μL를 획득하였다. 차가운 TCA를 샘플의 4배 부피로 첨가하고 -20°C에 밤새 반응시켰다. 그리고 4°C, 15000×g로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 얻은 pellet에 차가운 acetone 1mL을 넣고 4°C, 18400×g로 3분 동안 원심분리하였다. 여러 번 세척과정을 거친 후 4°C, 18400×g로 3분 동안 원심분리한 뒤 상등액을 제거해주고 남은 pellet에 Tris HCl 60 mmol L<sup>-1</sup>에 Urea 8 mol L<sup>-1</sup>이 들어간 용액 2 mL을 넣어 녹였다. 추출한 바이오매스의 단백질 샘플은 BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하였으며 562 nm에서 OD를 측정한 후 Bovine Serum Albumin (BSA) standard (ThermoFisher Scientific, USA)와 비교해 계산하였다.

바이오매스의 지질함량은 Sulfo-Phospho-Vanillin (SPV)법을 이용해 측정했다. 0.6% (w/v) vanillin (Sigma, USA) 100 mL에 phosphoric acid (Duksan, Korea) 400 mL를 첨가하여 총량 500 mL의 Phosphor-vanillin (PV) solution을 준비했다. 10 mg mL<sup>-1</sup>의 미세조류 샘플에 98% sulfuric acid (Sigma, USA) 2 mL를 넣고 10분 동안 100°C에서 끓인 후 5분 동안 얼음에 두어 식혔다. 각 샘플에 PV solution 5 mL를 넣고 37°C incubator에서 200 rpm으로 15분 동안 반응시켰다. 530 nm에서 샘플들의 OD를 측정하였으며 canola oil standard와 비교해 계산하였다.

## 2.6 근사분석 및 원소분석

미세조류를 바이오매스 5 mg을 platinum pan에 담고 30 mg의 α-alumina (α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)를 스탠다드로 이용하였다. 샘플은 열분 석기(DTG-60A, Shimadzu)에서 Thermogravimetric analysis (TGA)로 분석하였다. 질소가스를 분당 25 mL 주입하며 분당

10°C씩 승온시켜 50~900°C사이의 측정값을 구하였으며 이를 통해 수분함량, 휘발성물질함량, 회분의 양을 분석하였다. 소량의 바이오매스에서 원소분석기(Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Italy)를 통해 탄소, 수소, 질소, 산소, 황 성분을 분석하였다. 계산된 원소들의 값을 이용하여 Given et al.의 식에 대입하여 열량값을 구하였다(Given et al. 1986).

$$\text{calorific value} = 0.3278C + 1.419H + 0.09257S - 0.1379O + 0.637 \text{ (MJ} \cdot \text{kg}^{-1}\text{)}$$

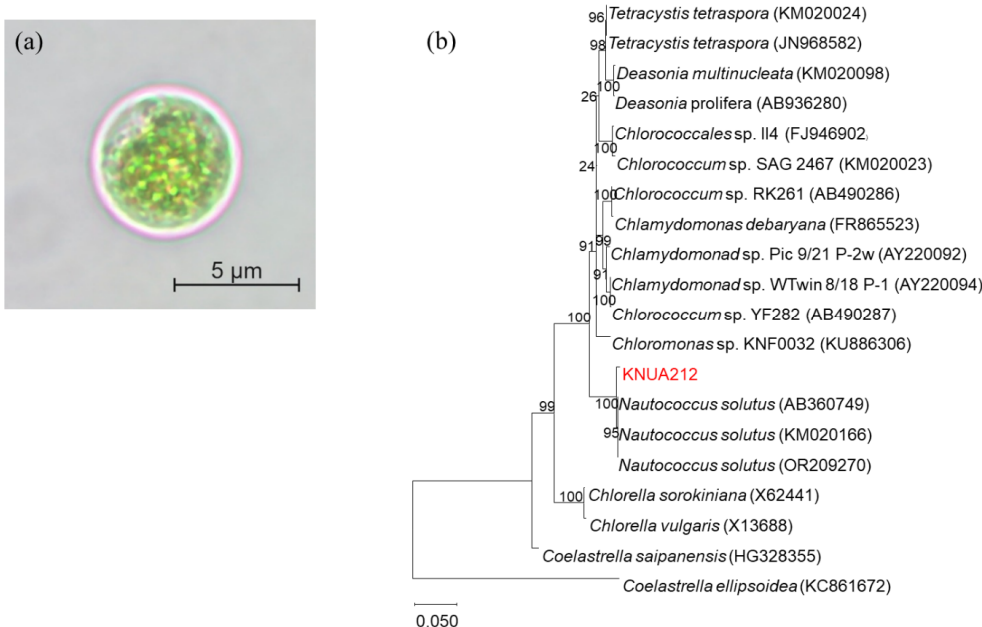
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 미세조류 균주의 분리 및 동정

광학현미경으로 관찰한 KNUA212는 대부분이 단일 세포였다. 세포는 직경이 약 5 μm이상의 원형 형태이고 편모는 관찰되지 않았다. 배양 5일차부터 일부 세포가 모여 자라는 모습이 관찰되었으나 대부분이 단일 세포 형태로 떨어져 있었다(Fig. 1a).

분자적 종 동정을 위한 18s rRNA, ITS, *tufA*에 대한 유전자 서열 분석 결과 18s rRNA의 경우 *Nautococcus solutus* (AB360749), ITS의 경우 *Chlorominima collina* (MW553075), *tufA*의 경우 *Chlorococcum* sp. KSF0227 (OP448669)와 가장 근연관계에 있는 것으로 나타났다(Table 1). 그 중에서 18s rRNA에 대한 결과를 바탕으로 근연종들과 KNUA212의 계통도를 그려보았을 때 KNUA212는 *Nautococcus solutus* 균주들과 계통학적으로 매우 가깝게 나타났다(Fig. 1b). 따라서 KNUA212는 *Nautococcus*에 속하는 종으로 추정할 수 있다.

KNUA212와 가장 가깝게 나타난 *Nautococcus* 속은 타원형이나 구형을 나타내는 영양세포이며 2주동안 배양했을 때 직경 10~12 μm이고 세포벽은 0.5~2.5 μm이다. 엽록체가 거대하고 축상에 피레노이드가 있으며 세포는 불연속적인 녹말립에 둘러싸여 있다. 세포는 무핵이며 부동포자 및 동포자에 의해 번식하고 안점이 있으며 유성색식은 관찰되지 않는 것으로 알려져 있다(Archibald 1972).



**Fig. 1.** (a) The light microscope image of *Nautococcus* sp. KNUA212 at x1,000 magnification. (b) The phylogenetic relationship of *Nautococcus* sp. KNUA212 and its closely related species inferred from 18S rRNA sequence data. The number at nodes indicates the percentage values given by 500 bootstrap analysis samples. The scale bar represents difference in nucleotide sequences.

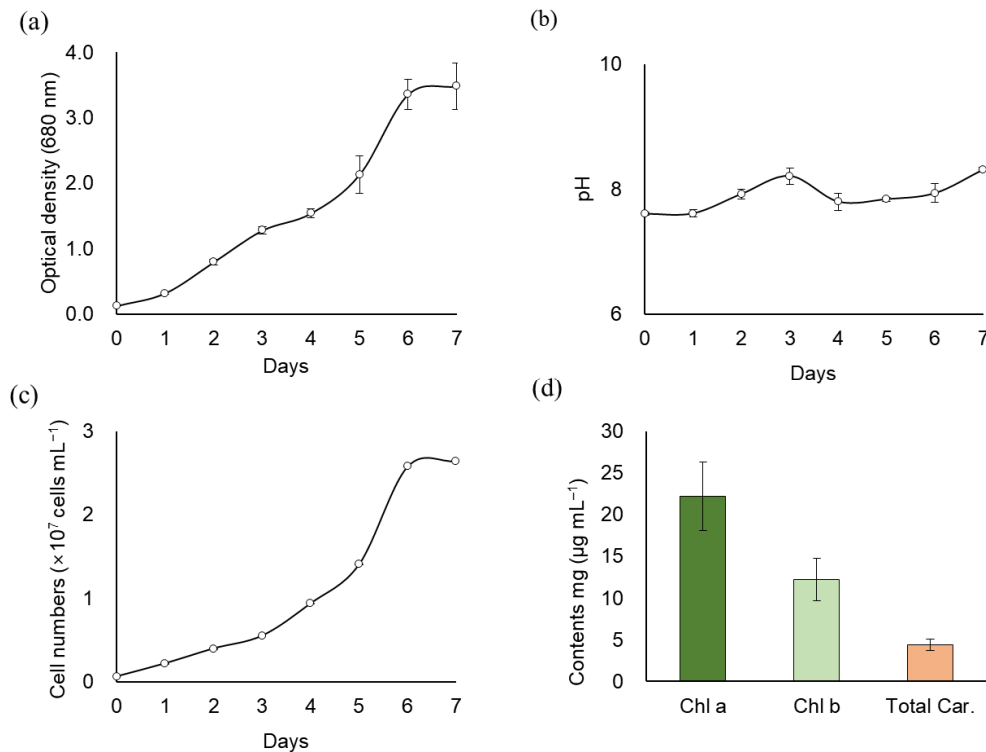
**Table 1.** Results from BLAST searches using the ITS, 18S rRNA, and *tufA* sequences of *Nautococcus* sp. KNUA212.

Marker gene	Length (bp)	Closest match (accession no.)	Query cover	Identification
ITS	696	<i>Chlorominima collina</i> (MW553075)	82%	81.88%
18S rRNA	1767	<i>Nautococcus solutus</i> (AB360749)	98%	99.37%
<i>tufA</i>	929	<i>Chlorococcum</i> sp. KSF0227 (OP448669)	100%	91.50%

### 3.2 성장특성

*Nautococcus* sp. KNUA212 균주는 OD와 세포수 결과를 보았을 때 배양 5일차까지 비교적 일정한 속도로 성장하다가 배양 5일차부터 성장 속도가 급격하게 증가하는 대수기를 거치고 배양 6일차부터는 성장속도가 줄어드는 정체기를 거치는 것으로 나타났다(Fig. 2(a), (c)). 배양 0~3일차까지 0.2 vvm의 (1~2%) 이산화탄소를 공급한 결과 pH는 대략 8 정도로 일정하게 유지되었다. 배양 4일차부터 3% 이산화탄소를 공급한 결과 pH는 7.80으로 감소했다가 배양 7일차까지 다시 증가해 계속 성장함을 파악할 수 있었다(Fig. 2(b)).

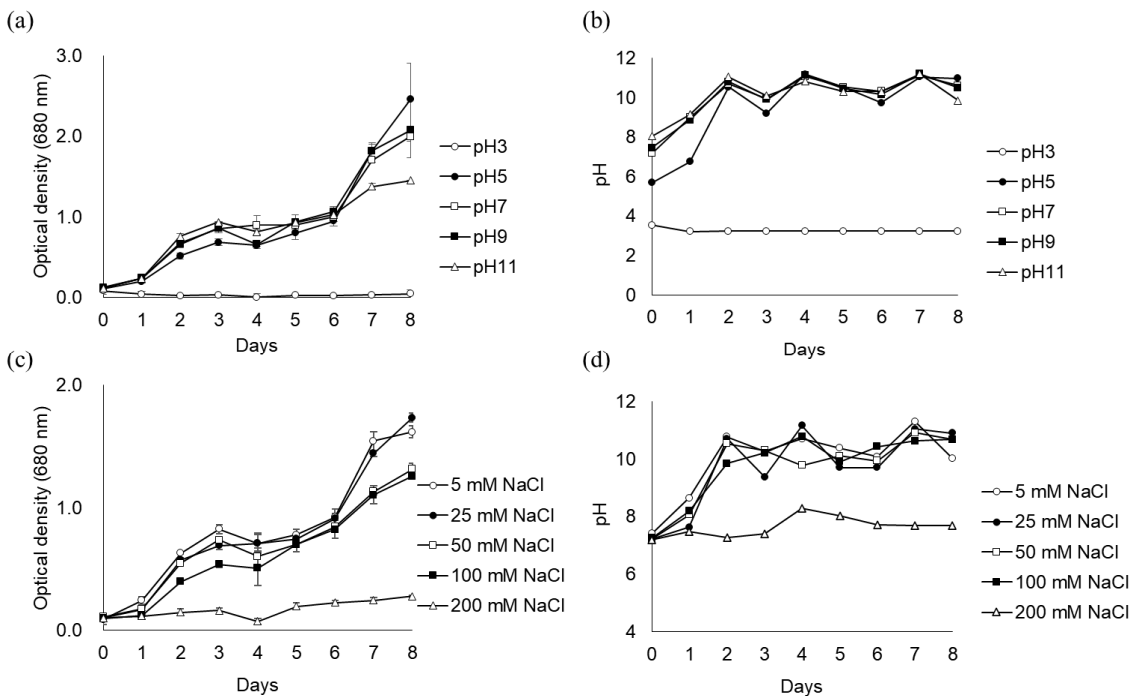
배양 7일차에 정체기에 진입한 배양액을 수확하였다. 배양 8일차 측정된 OD는 3.48였고 cell로부터 얻은 바이오매스의 건조중량은  $1.34 \text{ g L}^{-1}$ 으로 측정되었다. 바이오매스에서 추출한 엽록소 *a*는  $22.22 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , 엽록소 *b*는  $12.23 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , total carotenoid는  $4.43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ 으로 측정되었다(Fig. 2(d)).

**Fig. 2.** Growth characteristic of *Nautococcus* sp. KNUA212. (a) The optical density, (b) pH, (c) Cell numbers, and (d) the Chlorophyll *a*, *b* and total carotenoid contents.

### 3.3 최적 성장 조건 실험

미세조류는 pH, 염도와 같은 스트레스 환경에 따라 다른 성장을 나타낼 수 있으므로 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주가 생물학적인 스트레스 환경 하에서 어떻게 성장하는지 생리특성을 파악하고 최적의 성장 조건을 알아보기 위해 각각 서로 다른 pH와 염도를 가지는 BG-11에서 8일간 배양하였다. pH에 따른 성장을 파악하기 위해 각각 pH3, 5, 7, 9, 11의 BG-11에서 8일간 배양하였으며 8일간 매일 측정된 OD<sub>680</sub>로 성장 곡선을 그려 성장특성을 파악했다. pH3에서 접종일 이후로부터 세포는 사멸하였으며 나머지 pH5~11에서 미세조류는 서로 다른 성장조건임에도 불구하고 유사한 성장 추세를 보였다. 결과적으로 초기 pH5부터 pH11이라는 상당히 높은 pH 환경에서도 충분히 적응하며 성장할 수 있는 것으로 나타났다(Fig. 3(a), (b)).

NaCl 농도에 따른 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주의 성장을 파악하기 위해 각각 NaCl을 5, 25, 50, 100, 200 mM로 처리한 BG-11에서 8일간 배양했다. 8일간 매일 측정된 OD<sub>680</sub>로 성장곡선을 그려 성장특성을 파악했다. NaCl을 200 mM 처리한 배지에서 접종일부터 더 이상 성장하지 않았고 NaCl을 5, 25, 50, 100 mM 처리한 배지에서 균주는 서로 다른 농도에도 불구하고 유사한 성장 추세를 보였다. NaCl을 5, 25 mM 처리한 배지에서 NaCl을 100, 200 mM 처리한 배지보다 성장률이 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 3(c), (d)). 결과적으로 NaCl 200 mM보다 낮은 NaCl 농도에서는 미세조류가 큰 차이를 보이지 않고 잘 자라는 것으로 보인다. *Scenedesmus obliquus* XJ002의 염분 스트레스의 영향을 조사하기 위해 각각 0, 10, 100, 150, 200 mM의 NaCl을 처리한 이전 연구 결과에서 *Scenedesmus obliquus* XJ002는 NaCl 농도가 증가함에 따라 바이오매스와 엽록소 a, b 및 카로티노이드 함량이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 연구 결과는 NaCl 스트레스가 산소 발생 복합체와 광계 II 반응 센터를 손상시켜 반응 센터의 공여체 및 수용체 측에서 전자 전달을 억제하여 빛 에너지의 흡수, 전달 및 적용에 영향을 미쳤기 때문이라고 주장하였다(Ji et al. 2018). 이러한 연구를 바탕으로 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주의 NaCl 200 mM에서의 저성장 결과는 염분 스트레스로 인해 광합성 능력이 감소한 것이 영향을 끼쳤을 것으로 생각된다.



**Fig. 3.** Growth curves for *Nautococcus* sp. KNUA212 strains under various initial (a) pH, and (c) NaCl concentrations. A change of pH during cultivation of *Nautococcus* sp. KNUA212 strains under different initial (b) pH, and (d) NaCl concentrations.



### 3.4 바이오 매스 생화학적 분석

건조된 바이오매스에서 탄수화물 함량은  $24.41 \pm 0.89\%$ 로 측정되었다(Table 2). 단백질의 함량은  $26.77 \pm 1.29\%$ 로 측정되었으며 동물이나 육상 작물로부터 얻는 단백질의 단점을 보완하는 잠재적인 단백질 공급원이 될 수 있을 것으로 보인다. 건조된 바이오매스의 지질 함량은  $13.57 \pm 0.61\%$ 로 확인되었다. 미세조류는 세포막, 저장 산물, 대사 산물 및 에너지원으로 지질과 지방산을 함유하고 있다. 미세조류는 바이오 디젤의 원료로서 활용가능성이 높으며 중량을 기준으로 보통 2~40%의 지질을 함유하는 것으로 알려져있다(Demirbas and Fatih Demirbas 2011). 그 중에서 잠재적인 공급 원료로 인식되고 있는 *Chlorella pyrenoidosa*의 경우 38%, *Nannochloropsis* sp.의 경우 30%의 가량의 지질을 가지는 것으로 알려져있다(Goh et al. 2019).

**Table 2.** Biochemical composition of microalgal biomass

	Component (%wt)
Total carbohydrate	$24.41 \pm 0.89$
Total protein	$26.77 \pm 1.29$
Total lipid	$13.57 \pm 0.61$

### 3.5 바이오매스 근사분석 및 원소분석

TGA를 바탕으로 한 바이오매스의 근사분석 결과 수분함량이  $5.42 \pm 0.62\%$ , 휘발성 물질은  $89.35 \pm 1.29\%$ , 회분의 함량은  $5.57 \pm 1.81\%$ 으로 측정되었다(Table 3). 수분함량은 바이오매스의  $105^\circ\text{C}$  이전의 질량 손실에 의해 결정된다. 휘발성물질은  $105^\circ\text{C}$ 에서  $900^\circ\text{C}$  사이에 열분해에 의한 질량 손실을 나타내고 이 값은 가열로 인해 가스로 방출되는 고체 연료의 일부를 나타낸다. 회분은 남아있는 물질들의 질량이다. 일반적으로, 휘발성물질의 양이 높을수록 해당 물질은 빨리 가열되고 기체 상태로 변화할 가능성이 크기 때문에 좋은 연소가 될 수 있다(Vieira et al. 2020). 이를 다른 바이오 원료와 비교해보았을 때 미세조류의 바이오매스는 일반적으로 80%의 휘발성 물질량을 가지는데 작물의 경우 63~70%, 목재의 경우 72~78%의 값을 지니는 것으로 알려졌다(Battah et al. 2013). *Nautococcus* sp. KNUA212 균주에서 측정된 휘발성 물질함량은 89.35%로 작물이나 목재에서 측정되는 값보다 높게 나타난다. 따라서 미세조류는 이전세대 바이오 원료인 작물과 목질계보다 더 많은 양을 에너지원으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

원소분석을 통해 계산한 바이오매스의 열량값은  $22.0 \text{ MJ kg}^{-1}$ 으로 측정되었다(Table 3). 높은 열량값을 가지는 연료는 같은 무게의 다른 연료보다 더 많은 열을 발생시키므로 에너지 효율이 높다. 농·임업 잔재에서 얻은 바이오 매스의 경우  $14.3 \sim 25.4 \text{ MJ kg}^{-1}$ , 작물에서 얻은 바이오 매스의 경우  $13.5 \sim 17.6 \text{ MJ kg}^{-1}$ 의 열량값을 가지는데 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주의 경우 이들과 비슷하거나 높은 열량값을 지니는 것으로 나타났다(Gravalos et al. 2016; Jóvér et al. 2018).

또한 Methanol의 경우  $23 \text{ MJ kg}^{-1}$ , peat의 경우  $16 \text{ MJ kg}^{-1}$ 의 열량값을 가지는데 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주의 열량값이 이러한 연료들과 크게 차이 차지 않는다는 것을 알 수 있다. 따라서 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주는 1,2세대의 바이오 연료뿐 만 아니라 일부 화석연료만큼이나 열에너지를 방출하는 에너지원의 대체제로써 활용될 수 있는 가능성을 지닌 것으로 보인다(Martinka et al. 2019; Tabakaev et al. 2017).

**Table 3.** Proximate and elemental analysis of *Nautococcus* sp. KNUA212 biomass.

	Component (%wt)	Elemental composition	Component (%)
Moisture content	5.42±0.62	C	48.18±0.01
Volatile matter	89.35±1.29	H	7.09±0.03
Ash	5.57±1.81	O	33.18±0.32
		N	7.40±0.05
		S	0.33±0.03
		CV <sup>a</sup>	22.0 MJ kg <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> CV, Calorific value

#### 4. 결론

본 연구는 울릉도 나리분지에서 채집하고 분리한 미세조류의 바이오 에너지원으로서 활용 잠재력을 확인하고자 했다. 연구 목적 달성을 위해 순수분리한 미세조류의 계통을 알아본 결과 분자생물학적으로 *Nautococcus* 속에 속하는 것으로 판단하였다. *Nautococcus* sp. KNUA212 균주는 BG-11배지에서 이산화탄소 공급조건 하에 단기간에 높은 성장률과 건중량을 나타냈으며, 동결건조된 바이오매스는 중량을 기준으로 26.77%의 단백질을 함유하고 있었는데 이는 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주가 가진 높은 단백질 함유량을 바탕으로 대체 단백질 공급원으로써의 이용 가능성을 알아본 결과라고 할 수 있다. 또한 근사분석과 원소분석을 통해 89.35%의 휘발성물질과, 22.0 MJ kg<sup>-1</sup>의 열량값을 확인하였다. 이는 이전세대 바이오 에너지원인 작물과 목질계보다 높은 값으로 *Nautococcus* sp. KNUA212 균주가 지닌 우수한 성질을 활용한다면 차세대 에너지원료로써 이용가능성이 높다고 사료된다.

#### 사사

이 논문은 2022년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2021R111A2055517), 본 논문은 해양수산부 국가연구개발사업(해양치유자원의 효능/표준화 기술개발 및 해양치유자원의 생애주기 안전관리방안, 20220027)의 지원을 받아 수행한 연구결과입니다.

#### 참고문헌

- Archibald PA. 1972. The genus *Nautococcus* Korschikov (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia* 11(1), 207-212.
- Battah M, El-Ayoty Y, El-Fatah Abomohra A, El-Ghany SA and Esmael A. 2013. Optimization of growth and lipid production of the chlorophyte microalga *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *World Applied Sciences Journal* 28(11), 1536-1543. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.28.11.1918>.
- Barkia I, Saari N and Manning SR. 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs* 17(5), 304. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md17050304>.
- Choi YY, Patel AK, Hong ME, Chang WS and Sim SJ. 2019. Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): An emerging sustainable bioprocess for reduced CO<sub>2</sub> emission and biofuel production. *Bioresource Technology Reports* 7, 100270. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100270>.
- Demirbas A, and Fatih Demirbas M. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management* 52(1), 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>.

- Given PH, Marzec A, Barton WA, Lynch LJ and Gerstein BC. 1986. The concept of a mobile or molecular phase within the macromolecular network of coals: A debate. *Fuel* 65(2), 155-163. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(86\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0016-2361(86)90001-3).
- Goh BHH, Ong HC, Cheah MY, Chen WH, Yu KL and Mahlia TMI. 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107, 59-74. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.012>.
- Gómez PI, Mayorga J, Flaig D, Castro-Varela P, Jaupi A, Ulloa PA, Soto-Bartierra J, Henríquez V and Rojas V. 2023. Looking beyond *Arthrospira*: Comparison of antioxidant and anti-inflammatory properties of ten cyanobacteria strains. *Algal Research* 74, 103182. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103182>.
- Gravalos I, Xyradakis P, Kateris D, Gialamas T, Bartzialis D and Giannoulis K. 2016. An experimental determination of gross calorific value of different agroforestry species and bio-based industry residues. *Natural Resources* 07(1), 57-68. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.71006>.
- Ji X, Cheng J, Gong D, Zhao X, Qi Y, Su Y and Ma W. 2018. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga-*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Science of the Total Environment* 633, 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.240>.
- Jóvér J, Antal K, Zsembeli J, Blaskó L and Tamás J. 2018. Assessment of gross calorific value of crop and bio-energy residues. *Research in Agricultural Engineering* 64(3), 121-127. <https://doi.org/10.17221/13/2017-RAE>.
- Khan S, Das P, Abdul Quadir M, Thaher MI, Mahata C, Sayadi S and Al-Jabri H. 2023a. Microalgal feedstock for biofuel production: recent advances, challenges, and future perspective. *Fermentation* 9(3), 281. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030281>.
- Leong WH, Lim JW, Lam MK, Lam SM, Sin JC and Samson A. 2021. Novel sequential flow baffled microalgal-bacterial photobioreactor for enhancing nitrogen assimilation into microalgal biomass whilst bioremediating nutrient-rich wastewater simultaneously. *Journal of Hazardous Materials* 409, 124455. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124455>.
- Lin W, Zhang Z, Chen Y, Zhang Q, Ke M, Lu T and Qian H. 2023. The mechanism of different cyanobacterial responses to glyphosate. *Journal of Environmental Sciences (China)* 125, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.11.039>.
- Martinka J, Rantuch P and Wachter I. 2019. Impact of water content on energy potential and combustion characteristics of methanol and ethanol fuels. *Energies* 12(18), 3491. <https://doi.org/10.3390/en12183491>.
- Mehariya S, Goswami RK, Karthikeyan OP and Verma P. 2021. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere* 280, 130553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130553>.
- Nielsen SS. 2010. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In: *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Texts Series. Nielsen SS, ed. Springer, Boston, MA, 47-53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6).
- Priyadharsini P, Nirmala N, Dawn SS, Baskaran A, SundarRajan P, Gopinath KP and Arun J. 2022. Genetic improvement of microalgae for enhanced carbon dioxide sequestration and enriched biomass productivity: Review on CO<sub>2</sub> bio-fixation pathways modifications. *Algal Research* 66, 102810. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102810>.
- Tabakaev R, Shanenkov I, Kazakov A and Zavorin A. 2017. Thermal processing of biomass into high-calorific solid composite fuel. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 124, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.02.016>.
- Ummalyma SB, Sirohi R, Udayan A, Yadav P, Raj A, Sim SJ and Pandey A. 2023. Sustainable microalgal biomass production in food industry wastewater for low-cost biorefinery products: a review. *Phytochemistry Reviews* 22(4), 969-991. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09814-3>.
- Vieira HH, Bagatini IL, Guinart CM and Vieira AAH. 2016. *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae* 31(2), 155-165. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.4.14>.
- Vieira KR, Pinheiro PN and Zepka LQ. 2020. Volatile organic compounds from microalgae. In: *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds*. Academic Press Inc., 659-686. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00024-5>.

- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols* (Issue 1). Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.