

미세조류속 기름의 신속정량방법

황금옥, 윤철진, 림래근

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《경제발전에서 전략적의의를 가지는 원료와 연료를 국내자원으로 보장하는 생산기술 공정을 확립하며 첨단설비를 비롯하여 절실히 요구되는 기술수단들을 우리의 실정에 맞게 자체로 생산보장하여야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 46페이지)

일반적으로 기름정량방법에는 블라이-다이어법, 속스레법을 비롯한 질량정량법, HPLC(고속액체크로마토그래프법), GC(기체크로마토그래프법)와 닐적(Nile Red)을 비롯한 색소를 리용한 기름검출법 등이 있다.[1] 그러나 이러한 방법들[2-5, 7, 9]은 많은 량의 시료와 특수한 분석설비를 요구하고 로력과 시간, 시약이 많이 드는 부족점을 가지고있다.

조류세포의 기름함량을 신속간편하게 실시간적으로 정량할수 있는 방법을 확립하는것은 기름함량이 높은 조류종을 선별하고 조류세포의 기름함량을 높이기 위한 최적배양조건을 확립하는데서 선차적으로 나서는 중요한 문제이다.

재료와 방법

재료로는 미세조류에 의한 생물연료생산에 광범히 리용되고있는 *Chlorella vulgaris*와 *Botryococcus braunii*를 리용하였다.

두가지 종류의 미세조류를 BG-11배지(pH 7)[2, 7]가 250mL 들어있는 500mL 삼각플라스크에 일정한 량씩 접종하고 온도 25~27°C, 빛세기 7 000~10 000lx, 50r/min에서 7일 동안 배양하였다.

조류배양액을 원심분리(3 000r/min)한 다음 침전물을 증류수로 세번 세척하고 -20°C에 보관하였다가 기름분석에 리용하였다.

기름정량방법 동이나 코발트이온이 기름산(FA)과 반응하여 생긴 복합물은 디에틸디티오카르바민산나트륨의 존재밑에서 누런색을 띤다.[8] 기름산을 추출하여 발색시키는데 다음과 같은 시약들이 리용된다.[8] 즉 비누화시약(1mol/L NaOH에 25%되게 메타놀을 푼것), 중성화시약(100mmol/L 트리스염산완충액(pH 8.0)), 동시약(9체적의 1mol/L 트리에타놀아민, 1체적의 1mol/L 초산, 10체적의 6.45% Cu(NO₃)·3H₂O를 혼합한것), 발색시약(*n*-부타놀에 1%되게 디에틸디티오카르바민산나트륨을 푼 용액).

검량선은 미세조류에서 추출한 기름을 각이한 농도로 희석하고 기름정량공정(발색공정)을 그대로 거친 후 440nm에서 흡광도값을 측정하여 작성하였다.

흡광도값은 분광광도계 《DV730》에서 측정하였다.

모든 분석실험은 5반복으로 진행하고 결과값을 통계처리하였다.

결과 및 논의

기름정량방법의 원리는 기름을 물작용분해시킬 때 생성되는 기름산의 양이 기름량에 비례한다는데 있다.

먼저 -20°C 에 보관하였던 시료 0.1g을 방온도까지 녹이고 2mL의 비누화시약을 넣고 100°C 수욕에서 30min간 가열하면서 물작용분해한다. 이 과정에 기름이 물작용분해되어 기름산이 생성된다. 다음 2mL의 중성화시약과 동시약을 첨가하고 2.5mL의 클로로포름을 넣어 다시 2min간 휘저어준다. 물작용분해된 기름산이 동과 결합하여 클로로포름에 풀린다. 시료를 $3\,000\times g$ 에서 5min간 원심분리한 다음 유기상만을 조심히 분리관에 옮긴다. 2개의 새 시험관에 유기상을 각각 1mL씩 취하고 한 시험관(대조)에는 1mL의 *n*-부타놀을, 다른 시험관에는 1mL의 발색시약을 넣어 발색(누런색)시킨 다음 440nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

시료를 나누어 흡광도를 측정하는것은 조류속에 있는 엽록소가 클로로포름상에 함께 추출되어 440nm에서 명백한 흡수를 나타내기때문이다. 따라서 엽록소에 의해 생기는 흡광도 변화를 제거하는 단계가 없으면 기름함량이 과잉평가된다.

*C. vulgaris*에서 추출한 기름을 각이한 농도로 희석하여 비누화반응, 동착체형성, 발색반응을 거친 후 흡광도값을 측정하여 작성한 검량선은 그림과 같다.

새로운 기름정량방법으로 결정한 기름함량값과 속스레법으로 구한 기름함량값을 대비하여 새 방법의 정확도를 평가하였다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 속스레법으로 *C. vulgaris*의 기름함량을 결정하면 18.7%이며 이 시료를 새로운 흡광도측정법으로 계산하면 20.3%로서 오차가 5%미만으로 믿을수 있다. 또한 *B. braunni*에서도 기름함량이 29.4%로서 오차가 더 작다. 이로부터 새로운 기름함량분석법을 여러 가지 미세조류의 기름함량평가에 리용할수 있다고 본다.

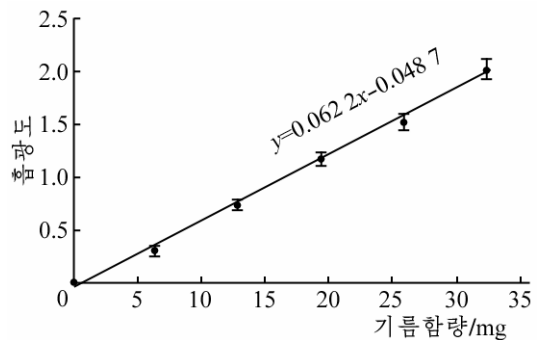


그림. 미세조류 기름함량과 흡광도사이의 관계

표 1. 속스레법과 흡광도측정에 의하여 결정된 미세조류 기름함량의 비교

미세조류종	속스레법에 의한 기름함량/%	A_{440}	흡광도값으로 계산된 기름함량/%
<i>C. vulgaris</i>	18.7 ± 1.3	0.32	20.3 ± 0.8
<i>B. braunni</i>	28.5 ± 2.1	0.49	29.4 ± 1.7

* $p < 0.05$, $n = 5$

다음으로 각이한 배양조건에서 배양한 *C. vulgaris*의 기름함량을 두가지 방법으로 측정하여 결과를 비교하였다.(표 2)

표 2에서 보는바와 같이 배양조건에 따라 *C. vulgaris*의 기름함량은 변화되었는데 이것은 선행연구결과[2, 3, 6]와도 일치된다. 그러나 두가지 방법으로 결정한 기름함량값에서는 유의한 차이가 없었다.

표 2. 각이한 배양조건에서 배양한
*C. vulgaris*의 기름함량측정결과 비교

배양조건	속스레법에 의한 기름함량/%	흡광도값으로부터 계산된 기름함량/%
조건 1	6.7	7.1
조건 2	10.5	11.6
조건 3	18.7	20.3

의 값비싼 유기용매, 상대적으로 오랜 시간(3h이상)이 요구되며 질량정량과정에 분석오차가 심하게 나타나 재현성이 낮다. 그러나 새로운 흡광도측정법에서는 한번 실험하는데 10mL의 배양액과 10mL정도의 유기용매, 1h미만의 분석시간이면 충분하며 재현성도 높다.(표 3)

생물연료를 생산하자면 조류배양 물에서의 기름정량문제가 수시로 제기된다.

흡광도측정법에 의한 기름정량방법은 계산된 기름함량값이 절대적이라고 보기는 어렵지만 그 경향성을 뚜렷이 보여주기때문에 적은 량의 배양액을 가지고도 기름함량을 실시간적으로 평가할수 있는 아주 간편하고 적합한 방법이라고 볼수 있다.

또한 각이한 기름의 검량선을 작성하면 해당한 기름원료의 기름함량을 신속간편하게 정량하는데 광범히 리용할수 있다고 생각한다.

표 3. 속스레법과 새로운 흡광도측정법에 의한
기름정량방법의 기술경제적효과성 비교

지표	측정에 필요한 배양액량	유기용매 소비량/mL	분석 시간/h	재현성
속스레법	2L	50	3	낮다
흡광도측정법	10mL	10	1	높다

맺 는 말

1) 조류세포속의 기름함량을 신속하게 분석평가할수 있는 새로운 기름정량방법인 FA-금속(동이나 코발트)복합체에 의한 흡광도측정방법을 확립하였다.

2) 새로운 흡광도측정에 의한 기름정량방법은 가장 일반적인 속스레법에 비하여 시료량은 1/200, 유기용매는 1/5, 분석시간은 1/3로 줄일수 있으며 재현성도 높다.

참 고 문 헌

- [1] B. Wawrik et al.; Journal of Microbiological Methods, 80, 262, 2010.
- [2] B. Viswanth; Process Biotechnology and Molecular Biology, 3, 49, 2010.
- [3] Y. Chisti; Trends in Biotechnology, 26, 126, 2008.
- [4] H. Everett; WO 1009066A1, 2007.
- [5] M. J. Griffiths; Journal of Applied Phycology, 21, 493, 2009.
- [6] P. M. Schenk et al.; Bioenergy Resource, 1, 20, 2008.
- [7] R. H. Wijffels; Trends in Biotechnology, 1, 27, 2007.
- [8] Yimin Chen et al.; Analytica Chimica Acta, 724, 67, 2012.
- [9] 夏金芸; 中国生物工程杂志, 29, 2, 118, 2004.

주체105(2016)년 6월 5일 원고접수

Rapid Quantification Method of Lipid Contents from Microalgae

Hwang Kum Ok, Yun Chol Jin and Rim Thae Gun

We describe the rapid, spectrophotometric method for the quantification of microalgal lipid contents from small amounts of culture. Algal lipids are saponified into fatty acids and then mixed with a copper reagent. Chloroform-extractable copper soaps of long-chain fatty acids are then spectrophotometrically measured by the addition of diethyldithiocarbamate to develop a yellow colored product.

Key words: microalgae, lipid determination, biofuel