

*Dunaliella salina*의 광 제한 현탁 연속배양에 의한 β -carotene의 생산

박영식 · 유호금 · 오상집¹ · 이현용*
강원대학교 식품공학과, ¹강원대학교 사료생산공학과

Kinetics of Producing β -carotene from *Dunaliella salina* by Light Limited Turbidostat Cultivation

Park, Young-Shik, Ho-Keum You, Shang-Jip Ohh¹ and Hyeon-Yong Lee*

Department of Food Engineering and
¹Department of Feed Science and Technology,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract— It was proved that the cell growth followed a photo-inhibition model in light-limited turbidostat cultivation, having 1.06 (1/h) of maximum specific growth rate and 0.00094 (kcal/cm²/h) and 0.063 (kcal/cm²/h) as half saturation and light inhibition constants, respectively. β -carotene production showed a growth related process. And the activation energy of *Dunaliella salina* was roughly estimated as 12.36 (kcal/mole) in employing Arrhenius relationship. It should also point out that relatively much production of β -carotene was observed at high light intensity with yielding 1.04 (mg-carotene/g-dry cell/day) of specific product production rate while the cell growth was decreased. The optimal conditions of producing β -carotene in turbidostat cultivation were as follows: 7.5×10^{-3} (kcal/cm²/h) of light intensity, 2 (mM) and 50 (mM) of nitrate and sodium bicarbonate concentrations and 100 (ml/h) of CO₂ flow rate.

β -carotene은 식품, 의약품 및 화장품 등의 착색제 및 첨가제로서 오래전부터 사용되고 있으며(1, 2), 현재는 강력한 항암 효과가 있으며(3, 4) 대사 과정에서 retinol의 주 공급원으로 보고돼(5) 건강식품으로서 그 중요성이 크게 인식되고 있다. 하지만 현재까지 사용되는 β -carotene의 대부분은 합성 제품으로서 이는 구조상 trans form 만을 형성하고 있으며(6) 천연 상태로 존재하는 β -carotene에는 약 50% 이상이 9 cis- β -carotene 을 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다(7). 실제 *in vivo* 실험에서도 cis form이 trans form보다 bioavailability가 높은 것으로 보고돼(8) 고가의 천연 제품이 합성제품보다 우수할 것이라는 가설이 있을 뿐만 아니라 식생활 pattern이 합성제품보다는 천연 제품을 선호하는 추세에 부응해 천연 β -carotene의 수요가 급증하고 있는 실정이다. 하지만 이제까지 천연 β -carotene의 대부분은 홍당무에서 추출해 사

용하고 있으나 함유량이 낮을 뿐만 아니라, 종(species)에 따른 수율 편차가 심하며 원재료 공급의 불안정 등으로 많은 문제점을 갖고 있다. 이같은 문제점들의 해결 방안의 하나로 β -carotene 함유량이 높은 광합성 조류(algae)인 *Dunaliella bardawil*을 이용해 육내, 외 배양을 통해 대량 생산하고자 하는 연구가 추진되고 있으나(9) 태양 에너지의 이용, 효율적인 연속배양 및 공정 scale-up 등의 어려움으로 인해 아직은 산업화가 되지않고 있다. 따라서 본 연구는 미세 조류(micro-alga)로부터 β -carotene의 생산성을 높일 수 있는 biological induction 방법 및 배양 공정을 개발해 기존의 보고된 β -carotene 생산 조류들과 β -carotene의 생산성 및 공정 scale-up의 용이성 등을 비교, 분석했다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지 조성

해조류인 *Dunaliella salina*(LB 1208 Wards, USA)

Key words: *Dunaliella salina*, turbidostat cultivation, β -carotene

*Corresponding author

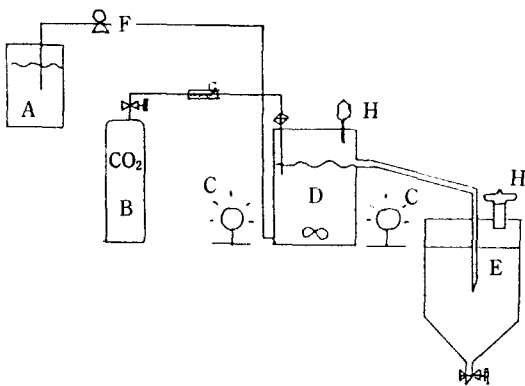


Fig. 1. Schematic diagram of turbidostat cultivation for the growth of *D. salina*.

- A: Medium reservoir
- B: CO₂ gas tank
- C: Light source
- D: Photo bioreactor
- E: Product reservoir
- F: Peristaltic pump
- G: Gas flow meter
- H: Vent gas outlet

를 인공 해수배지(10.0 g NaHCO₃, 1.0 g CaCl₂, 3.0 g MgSO₄, 3.0 g K₂HPO₄, 7.0 g KH₂PO₄, 1 ml vitamin B₁₂, 0.5 mg FeCl₃, 0.045 mg MnCl₂, 0.001 mg (NH₄)₆ Mo₇O₂₄·4H₂O, 6.0 μM EDTA, 50 g NaCl ; final pH 8.0)가 담긴 250 ml 삼각 flask에 접종해 25°C 항온 진탕 배양기에서 30 rpm으로 교반하며 형광등을 사용해 7.0 × 10⁻³(kcal/cm²/h)의 광원을 조사해 배양했다.

연속 현탁배양(turbidostat cultivation) 장치

이같이 전 배양된 균체를 Fig.1과 같은 광 배양 장치에 접종해 연속배양 실험을 수행했다. Fig.1에서 배양조는 빛이 투과하는 pyrex 재질로서 작업 용량이 20 liter(20×25×40 cm)인 직사각형 모양으로 양면에 위치한 광원이 균일하게 조사되도록 했다. 연속 배양을 위해 배양조로 유입되는 배지는 peristaltic pump를 사용해 밑에서 유입되며 유출되는 배지는 배양조 상단의 구멍을 통해 나오도록 했다. 배지의 온도는 배양조 바닥의 온도 조절 장치에 의해 25°C로 일정하게 유지했으며 magnetic stirrer를 사용해 아래로부터 유입되는 배지의 상승 효과와 함께 효과적인 교반이 이루어지도록 했다. 실제 배양조에 유입된 광원은 일정 균체농도하에서 배양조 양면의 광도를 quantum sensor(LICOR, USA)를 사용해 측정해 그 차이를 계산했다. 또한 배양조와 광원의 거리를 조절함으로써 배양조로 조사되는 광도의 변화를 꾀했다.

조사 광원을 생육제한 성분으로 하는 현탁 연속배양(turbidostat cultivation)을 위해, 일정 광도에서 배양

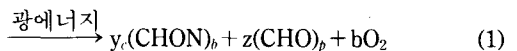
조 내의 광도 구배가 상대적으로 균일한 균체농도(Lambert Beer's law에 의해 20 cm의 배양조 폭을 지나는 경우 균체의 흡광계수는 1.8 l/g/cm임)를 유지하도록 했다. 배양조건(빛의 광도)을 바꾼 후 약 10일 이상 균체농도의 변화가 미미한 경우를 안정 상태에 도달한 것으로 간주해 배지의 희석율을 결정했다. 또한 배양 중 배지 내 pH는 이산화탄소 gas를 유입해 조절했다. 균체농도는 매일 약 5 ml의 sample을 채취해 0.45 μm 여과지를 통과해 105°C에서 약 4시간 건조 후 무게를 측정해 건조균체 무게를 산출했다. 또한 배지내 주 탄소원인 NaHCO₂의 농도는 standard AOAC의 발색방법을 사용해 측정했다(10).

β-carotene의 분리, 정제 및 동정

Fig.1에서 연속적으로 나오는 균체는 무게에 의해 깔대기 모양의 reservoir 바닥에 모여져 밑부분으로 유출시키는 1차 침강법으로 분리했다. 균체내 존재하는 β-carotene의 양은 일단 모아진 균체를 1000 rpm의 원심분리를 통해 균체만 분리한 후 4°C에서 20배 부피의 30 mM NaCl 용액에 5시간 동안 교반, 현탁시켜 삼투압에 의해 세포를 파쇄시켰다. 이 용액을 12,000 g의 원심력에 의해 10분 후 분리된 β-carotene granule인 침강 부분(pellet)을 모아 약 10배 부피의 증류수에 희석해 12,000 g에서 5분간 다시 원심분리해 상등액만을 취했다. 이 상등액을 10 mM Tris buffer에 50% sucrose를 포함한 용액(pH 8.0)과 섞어 원심 분리관에 넣은 후 0.5 ml의 Tris-HCl buffer(pH 8.0) 상층액을 얻어 45,000 g에서 2시간 동안 원심분리해 상층부(top layer)만을 모아 동결 건조 후 무게를 측정했다. 분리된 β-carotene의 확인을 위해 C₁₈ ODS reverse phase matrix(Shimadzu, Japan)로 packing된 HPLC(Waters, USA)를 사용해 standard인 ProvaterneR(Maize-oil extracts of Dunaliella, Microbio Res., USA)와 비교해 분석했다(11, 12).

균체 및 β-carotene의 생체 에너지 수율(Bioenergetic yield)

연속 배양에 의해 광합성 과정을 통해 생산되는 균체 및 β-carotene은 다음과 같은 화학식으로 표시될 수 있을 것이다.



즉, 무기 탄소원과 광에너지를 이용해(CHON)의 균체(biomass)와 (CHO)의 β -carotene(product)를 형성하며 부산물로 산소를 발생하는 과정이 될 것이다. 여기서 y_c 는 탄소원으로부터 균체로의 전환 수율이며 z 는 β -carotene.으로의 전환비이다. 이와는 달리 에너지 전환 수율은 광에너지로부터 균체 및 물질생산으로 전환을 의미하는 것으로 다음과 같이 표기될 것이다.

$$\eta = \frac{DXV\sigma_b\gamma_b Q_0}{12I_a A} \quad (2)$$

$$\zeta_p = \frac{DXV\sigma_b\gamma_b Q_p}{12I_a A} \quad (3)$$

여기서 η 와 ζ_p 는 각각 균체 및 β -carotene.으로의 전환 수율이며 D 는 배지의 희석율(1/h), V 는 배양조 부피(L), I_a 는 배양조에 조사돼 균체에 의해 실제 흡수된 광도(kcal/cm²/h), A 는 광원이 조사되는 면적(cm²)이고 X (g-dry cell/l)와 P (mg β -carotene/l)는 균체 및 생산된 carotene.의 농도다. σ 와 γ 는 균체 및 β -carotene.의 weight carbon fraction과 reductance degree이고 Q 는 에너지 함량(kcal/eq. avial. electrons)다 (13).

결과 및 고찰

Fig. 2는 본 실험에서 배양된 *Dunaliella salina*를 전자 현미경으로 찍은 사진으로 Fig. 2(a)는 약 10,000배 확대한 사진으로서 균체가 타원형 입을 알 수 있으며 β -carotene.이 있는 부분을 30,000배로 확대해 찍은 사진이 Fig. 2(b)이다, Fig. 2(b)에서 β -carotene. granule이 세포벽에 밀집돼 있음을 알 수 있다. 이는 유사 균주인 *D. bardawill*에서와 비슷한 pattern을 보였다(14). 이같이 세포벽에 축적된 양이 많을수록 삼투압에 의한 파괴시 쉽게 세포벽으로부터 분리돼 β -carotene.의 생산 수율이 증가됨을 예측할 수 있었다.

Fig. 3은 0.61 day⁻¹의 희석율에서 0.0075(kcal/cm²/h)의 광도로 현탁 배양한 동력학적 결과로 배양후 약 20일 후부터 균체농도가 일정하게 유지되는 안정 상태에 도달했다. 이때 균체내 존재하는 β -carotene.의 양도 일정하게 유지돼 β -carotene.의 생산은 균체 생육과 밀접하게 관계되어 있음을 입증하고 있다. 건조 균체당 β -carotene.의 양은 배양 초기에는 약 4~7%로 편차가 심하고 낮은 반면 안정 상태에 도달했을 때는

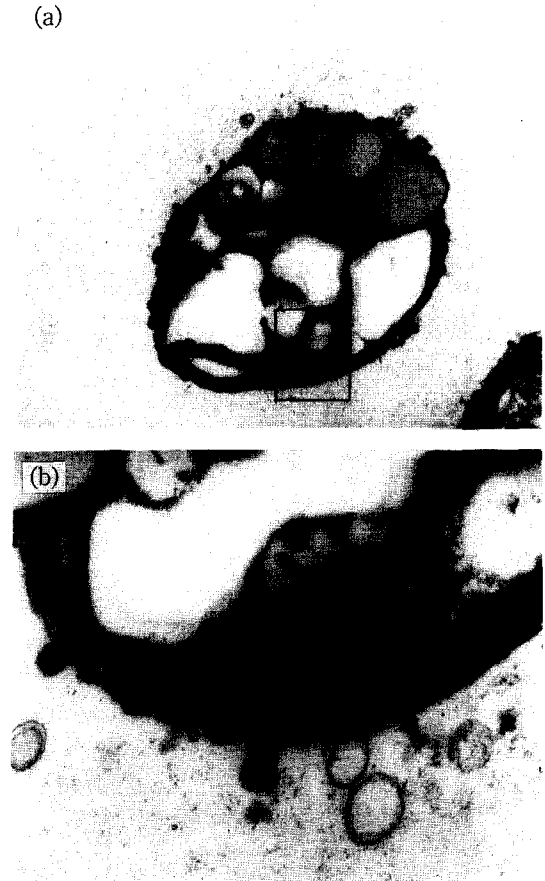


Fig. 2. (a) The electron micrograph of *D. salina*. The square block is the position of α -carotene granules ($\times 10,500$ enlargement).

(b) The focus of β -carotene granules in the box in Fig. 3 ($\times 30,000$ enlargement). Large granules under the laminelle are β -carotene.

약 10%로 일정하게 유지됐다. 또한 광합성 조류의 배양에 따른 pH의 증가를 막기 위해 100 ml/h의 속도로 이산화탄소를 유입해 배양조 내 pH가 약 8.9로 일정하게 유지됐다. Fig. 4는 배양 온도에 따른 균체 생육과의 관계를 Arrhenius식으로 나타낸 것으로 높은 온도에서 보다 낮은 온도에서 균체 생육이 급격히 감소하는 현상을 보였으며 생육 최적 온도는 25°C 임이 확인됐다. 이는 배양 장치의 scale-up시 빛에 의해 발생하는 열의 냉각보다는 저온을 막을 수 있는 배양장치의 고안이 보다 중요한 요소임을 입증하고 있다. 또한 *D. salina*의 activation energy는 Fig. 4의 자료중 직선화가 가능한 실험결과(낮은 온도 범위)를

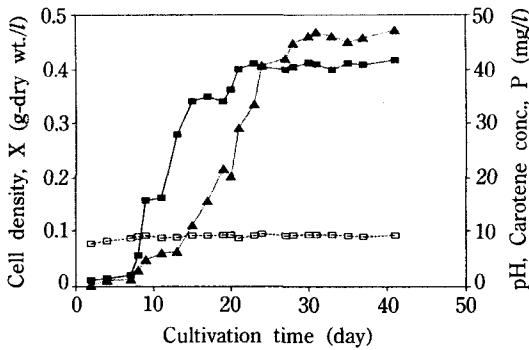


Fig. 3. Kinetics of cell growth and β -carotene production according to cultivation time in turbidostat cultivation at 0.61 (1/day) of dilution rate, 0.00075 (kcal/cm²/h) of light intensity and 100 (ml/h) of CO₂ flow rate.
 -■- Cell density -▲- Product conc. -□- pH

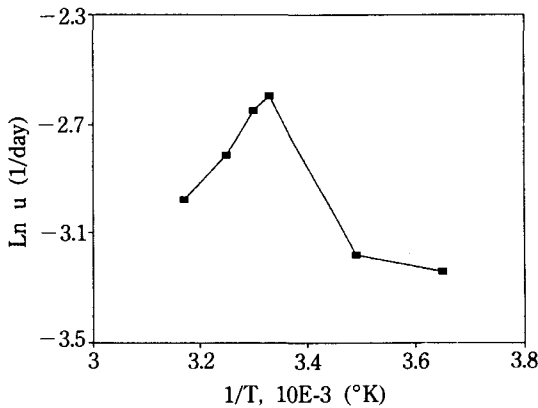


Fig. 4. The Arrhenius plot of cell growth vs. culture temperature in turbidostat cultivation maintaining 0.48 (g-dry wt./l) of cell density.

직선 회귀분석한 결과로 얻어진 기울기의 역수로부터 12.36(kcal/mole)로 계산됐다.

Fig. 5는 배지의 pH 를 일정하게 유지하기 위해 공급되는 이산화탄소가 무기 탄소원으로 작용해 균체 생육 및 β -carotene의 생성에 미치는 영향을 검토한 결과다. 0.61 day⁻¹의 희석율에서 0.0075(kcal/cm²/h)의 일정 광도에서 각 이산화탄소의 유입속도에서 안정상태에 도달했을 때의 균체 양 및 β -carotene 생산성을 비교한 것으로, 이산화탄소의 유입 속도가 증가할수록 균체양이 증가해 일정하게 유지된 반면 β -carotene은 초기에는 증가했으나 점차적으로 감소하다 일정하게 되는 현상을 보였다. 이는 pH 조절을 위해 유입되는 이산화탄소가 β -carotene의 생산보다는 균체 생육에 더 영향을 미치는 것으로 판명됐다.

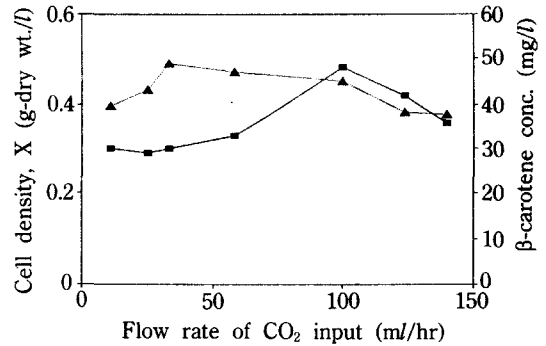


Fig. 5. The relationship between cell growth and β -carotene production according to different CO₂ flow rates at 0.61 (1/day) of dilution rate and 7.5 × 10⁻³ (kcal/cm²/h) of light intensity maintaining 0.5 (g/l) of dry cell density.
 -■- Cell density -▲- Product conc.

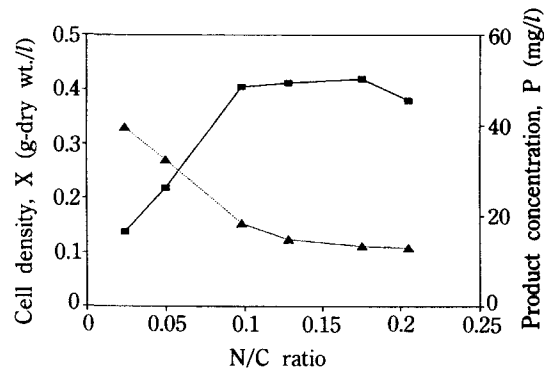


Fig. 6. The cell growth and β -carotene production at several N/C ratios in turbidostat cultivation of *D. salina*.
 -■- Cell density -▲- β -carotene conc.

또한 최적 이산화탄소의 유입 속도는 약 100(ml/h)였으며 이때의 균체농도 및 β -carotene의 농도는 각각 0.44(g-dry wt./l)와 45(mg/l)로 측정됐다. Fig. 6은 현탁 배양시 탄소원인 sodium bicarbonate와 질소원인 nitrate와의 비에 따른 균체 생육 및 β -carotene의 생산을 비교한 것이다. 질소원의 농도가 높아질수록 균체 생육은 증가하는 반면 β -carotene의 생산은 감소해 질소원이 중요한 역할을 하며, N/C ratio가 0.04인 2 mM의 nitrate와 50 mM의 sodium bicarbonate의 농도에서 β -carotene의 최대 생산이 가능한 조건임을 확인했다.

Fig. 7은 0.5(g-dry wt./l)의 균체농도를 유지하며 현탁 연속 배양시 빛의 광도에 따른 비 생육 속도와의 관계를 나타낸 것이다. 일정 광도 이상에서는 균체

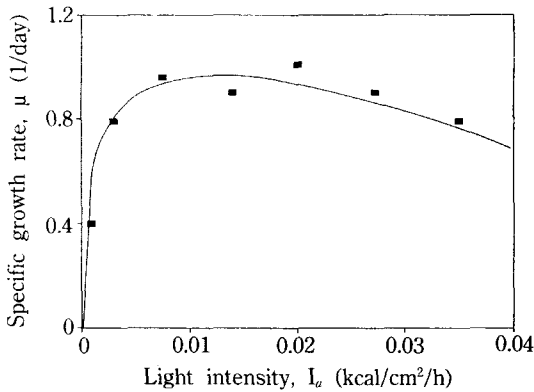


Fig. 7. The effect of light intensity on the growth of *D. salina* in turbidostat cultivation maintaining 0.5 (g/l) of cell concentration.

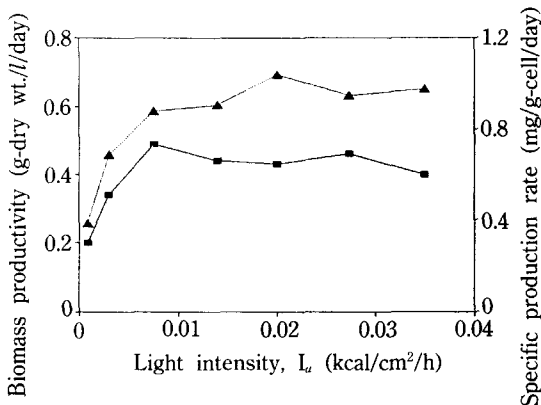


Fig. 8. The biomass productivity and specific β -carotene production rate according to different light intensities in turbidostat cultivation.

—■— Biomass prod. —▲— β -carotene prod.

생육의 증가를 기대할 수 없으며 높은 빛의 광도에서는 생육 저해 현상을 나타내고 있다. 이같은 사실을 바탕으로 실험 자료를 식 (4)와 같은 광원을 기질로 하는 substrate inhibition model에 적용해 비선형 회귀 분석한 결과가

$$\mu = \frac{\mu_{max} I}{K_I + I + I^2/K_I} \quad (4)$$

Fig. 7의 직선이다. 식 (4)에서 μ_{max} 는 최대 비 생육속도 (maximum specific growth rate)이며 I는 배양조에 조사된 광도(kcal/cm²/h)이고 K_I 와 K_I 는 각각 반 포화상수(half saturation constant)와 광 저해상수(photo-inhibition constant)(kcal/cm²/h)다. Fig. 7의 직선 식으로부터 최대 비생육속도, 포화상수 및 광

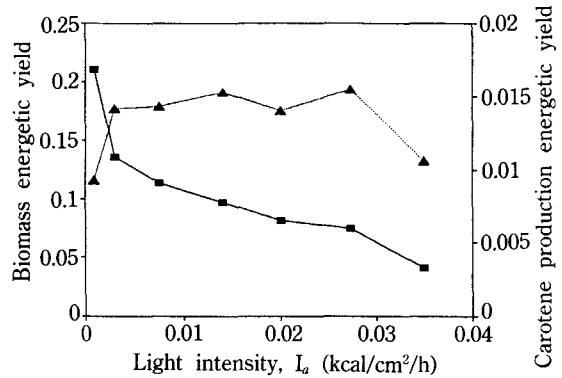


Fig. 9. The correlation between biomass energetic yield and product bioenergetic yield according to light intensity in light-limited turbidostat cultivation of *D. salina*. —■— Bioenergetic yield —▲— Carot. energ. yield

저해상수는 각각 1.06 day⁻¹, 0.00094(kcal/cm²/h), 0.063(kcal/cm²/h)로 계산됐다. Fig. 8은 광도가 생육 제한요소로 작용하는 경우 빛의 광도에 따른 균체의 생산성 및 β -carotene의 비생산속도를 비교한 결과로 균체의 생산성과 비물질 생산속도 둘다 0.01(kcal/cm²/h) 정도의 빛의 강도에서 최대치를 나타내고 있으나, 이보다 높은 강도에서는 균체 양이 감소하는 반면 β -carotene의 생산은 균체 생육과는 달리 높은 빛의 강도도 같은 생산성을 유지함이 확인됐다. 이는 높은 광도에 따른 chlorophyll의 보호작용에 기인된 추측 된다.

이와 함께 Fig. 9는 식 (2)와 (3)을 이용해 균체 및 β -carotene의 bioenergetic 수율을 계산한 것이다. 이는 앞 그림들에서 비교된 무기 탄소원의 소비에 대한 균체 및 물질 생산을 비교한 것과는 달리 system에 유입된 광 에너지에 대한 균체 및 물질생산에 따른 생체 열역학 수율을 계산한 것으로 광원의 증가에 따른 에너지의 전환을 알 수 있다. 광도가 증가함에 따라 균체 에너지 전환 수율은 감소하는 반면 β -carotene 생산을 위한 에너지 전환 수율은 상대적으로 일정함을 알 수 있다. 이는 Fig. 8에서도 확인된 바와같이 높은 광도에서 보다 많은 β -carotene이 생산되지만 미처 사용되지 않는 빛의 양이 많아 효율적 이용이 되고있고 있음을 알 수 있다.

요 약

β -carotene의 생산을 위해서는 배양조에 조사되는 광원이 중요한 생육조절 변수임이 확인됐으며, 높은

빛의 강도에서는 균체 생육이 저해되는 photo-inhibition model을 따르는 반면 β -carotene의 생산은 크게 영향을 받지않고 다소 증가하는 현상을 보였다. 또한 조사되는 광원에 기인된 배지내 온도 변화에 따른 균체 생육은 Arrhenius 관계식을 따랐다. 특히 pH 조절을 위해 유입되는 이산화탄소는 무기 탄소원의 일부가 균체 생육에는 사용돼나 β -carotene의 합성에는 영향을 주지 못하는 것이 입증됐다. 이같은 결과들을 바탕으로 현탁 연속 배양시 β -carotene의 생산을 위한 빛의 강도, 이산화 탄소의 유입속도, 질소 및 탄소원의 농도 등과 같은 생육 변수들의 최적 조건이 확립됐다. 이와 함께 빛의 강도가 증가함에 따라 균체 에너지 전환 효율은 감소하는 반면 β -carotene으로의 에너지 전환 효율은 상대적으로 일정한 수치를 나타냄으로서, β -carotene의 최대 생산을 위해서는 공정 및 생육 변수들의 최적화를 위한 보다 복합적인 연구가 추진돼야 할 것이다.

사 사

본 연구의 일부는 (주)미원 부설 한국음식문화연구원의 연구지원(1992년) 사업에 의해 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1989. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. In R.C. Cresswell, T. A. Rees and N. Shah (eds.), Pp. 90-114, Longman Scientific Press.
2. Masyuk, N.P. 1961. Carotene producing alga in the sea water reservoir of the Krynsh Oblash. *Ukr. Bot. Zh.*, **18**: 100-107.
3. Mathews, M.M. 1982. Antitumor activity of beta-carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology*.

- 39: 33-37.
4. Wald, N.J., S.G. Thompson and J.W. Densem. 1988. Serum beta-carotene and subsequent risk of cancer: Results from the BUBP study. *Br. J. Cancer*. **57**: 428-433.
5. Bauernfeind, J.C., C.R. Adams and W. Marusich. 1981. Carotenoids as *Colorants and Retinol Precursors*. In Bauernfeind, J.C. (ed.), Pp. 564-743. Academic Press.
6. Zechmeister, L. (ed.). 1962. *Cis-Trans-Isomeric Carotenoids, Vitamin A*. Springer-Verlag.
7. MacCrehan, W.A. and E. Schonberger. 1987. Determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by liquid chromatography and electrochemical detection. *Clin. Chem.* **33**: 1585-1592.
8. S. Mokady and U. Cogan. 1988. Nutritional evaluation of a protein concentrate and of carotenoids derived from *Dunaliella bardawil*. *J. Sci. Food Agric.* **42**: 249-254.
9. Oswald, W.J. 1988. *Large Scale Algal Culture System (Engineering Aspects)*. In L. Borrowitzka and M. Borwitzka (eds.), Pp. 357-394. Cambridge University Press.
10. Horwity, W. 1980. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, pp. 558-690. AOAC publication.
11. Aron, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
12. Jensen, A. 1978. *Chlorophyll and Carotenoids*. In J.A. Hellebus and J.S. Craigie (eds.), Pp. 59-70. Cambridge University Press.
13. Lee, H.Y., L.E. Erickson and S.S. Yang. 1984. Estimation of true growth yield and maintenance parameters for methanol utilizing organism. *J. Fermt. Technol.* **62**: 341-350.
14. Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1980. *The Production and Use of Microalgal Biomass*. In G.Shelef and C.J.Soder (eds.), Pp. 603-610. Elsevier Press.

(Received May 3, 1993)