

미세조류 *Dunaliella bardawil*의 고농도 세포배양

†정 옥 진·왕 만 식·최 승 인·정 병 철¹·김 주 곤¹

명지대학교 청정기술원/환경·생물공학과, 생명과학과¹

(접수 : 1998. 10. 14., 게재승인 : 1999. 3. 13.)

High Cell Density Cultures of Micro-algal *Dunaliella bardawil*

Wook-Jin Chung[†], Mansik Wang, Seungin Choi, Jookon Kim¹, and Byungchul Jeong¹

Research Institute for Clean Technology/Dept. of Environmental Engineering and Biotechnology

¹Dept. of Life Science, Myong-Ji University

(Received : 1998. 10. 14., Accepted : 1999. 3. 13.)

High cell density cultivation of microalga *Dunaliella bardawil* using nitrogen fed-batch cultures was studied in batch flask. Optimum environmental conditions include concentrated nutrients except NaCl and carbon sources, carbon sources, pH, light, agitation, nitrate and phosphate ions. Cell growth, consumption rates of nitrate and phosphate ions were monitored. Optimal conditions for higher cell density were found to be (in the range tested): 5 times concentrated media (1 times-10 times concentrated media); pH 8.0 (7.0-9.0); white light (blue and red light); agitation; 15mM of nitrate (0.94-15mM); 250mM NaHCO₃ and CO₂ gas. However, the addition of phosphate ions did not enhance the algal maximum cell density and specific growth rate. Nitrate was found to be effective for the cell growth. The maximum cell density of fed-batch culture using nitrate ions resulted in 8.955 x 10⁶ cells/ml after 198hr incubation.

Key Word : algae, *Dunaliella bardawil*, high cell density, fed-batch culture, β -carotene

서 론

광합성 미세조류는 식품 및 동물사료, 고도불포화지방산, 화학 및 제약산업에 필요한 유용물질들을 생산할 수 있는 중요한 생물자원이다(1). 조류에서 생산되는 중요한 이차대사 물질들은 의약품, 향약제, 가축사료, 식품첨가제, 색소, 향생제 등 다양한 용도로 사용되고 있다(2). β -carotene은 식품의 보조색소, 산화방지제 및 화장품용 노화방지제로써 최근 많이 사용되고 있으며, 미국 FDA에 의한 β -carotene의 항산화 효과가 인정된 후(3) 항암제, 피부병 치료제 등의 의약품 수요가 국내외적으로 급격히 증가하고 있다. 한편, 합성 β -carotene에 비해 천연 β -carotene은 10배정도 뛰어난 항산화 효능, 3~4배 이상의 고가격을 형성하고 있다. 그러나 아직까지 β -carotene은 국내에서는 전혀 생산되지 않고 있으며, 전량 외국으로부터 수입하고 있는 실정이다. 또한 몇몇 외국회사들에 의한 독과점 형태로 판매되어 매년 수입 가격이 크게 오르는 실정이므로(3), 국내의 생산 기술개발이 시급하게 요구되고 있다. β -Carotene 생산에 대한

연구는 1980년대 이전까지 fungi와 photosynthetic bacteria가 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 옥외배양이 가능하며 생산수율이 높아 생산단가가 낮은 미세조류를 이용한 연구가 활발히 진행중에 있으며, 미세조류중 *D. bardawil*은 지난 몇 년동안 천연 β -carotene 생산을 위한 상업적인 균주로 사용되어 왔으며, 다량의 β -carotene을 축적할 수 있는 것으로 보고되었다(4-6) 이 균주는 rigid cell wall이 결여된 미세조류로서 절대 광독립 영양체이며(7), 높은 염농도(1M~5.5M NaCl)에서도 생장이 가능한 halotolerant로서 염농도의 변화와 빛세기 등의 조절로 β -carotene을 과대 축적할 수 있으므로(7), 이 균주에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(8-11). *D. bardawil* 균주를 이용하여 β -carotene 생산성을 증진시키기 위해서는 첫째, 고농도 세포배양기술 확립, 둘째, 세포당 β -carotene 축적조건 확립을 통한 생산성 향상을 달성해야 한다. 그러나 두 가지 목표, 즉 고농도 세포배양과 β -carotene 생산 유도 조건은 서로 상이한 배양조건을 요구하여 생산공정기술을 한 단계로 처리하기 어려운 문제점이 있다. 특히, 미세조류의 고농도 세포배양을 위해서 고려할 점은 일반적인 조류 배양시 단점은 생육속도가 매우 느려 *spirulina* sp.의 경우 세포배양시간이 평균적으로 4~7일이기 때문에 목적물질의 경제적인 생산에 가장 큰 장애요인이 되고 있다(12). 또한, 해양 조류의 생장은 light, pH, 온도, 영양분, 교반속도, 및 염농도에 의해 조절되며(13), 이러한 적정배양조건들이 확립된 후 고농도 세포배양이 달성되었다(14). 해양 미세조류 *Isochrysis galbana* Parke의 경우 높은 세포생장속도와 고농도

† Corresponding Author : Research Institute for Clean Technology, Dept. of Environmental Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Myong-Ji University, San 38-2, Yongin-Si, Kyonggi-do, 449-728
Tel : 0335-330-6389, Fax : 0335-337-2902
e-mail : wookjin@wh.myongji.ac.kr

의 균체를 얻기 위해서 pH, 온도, 광도 등의 환경요인과 질소원, 비타민 등의 배지성분이 균체의 성장에 매우 큰 영향을 나타내었다(14) 대부분 외국에서는 미세조류로부터 β -carotene 생산에 관한 연구에서는 고농도 세포배양보다는 배양세포로부터 빛세기를 조절하여 β -carotene을 세포내 과대축적한 연구가 주로 보고되었다(1,8). 그러나 *D. bardawil*의 경우 일반적인 산업 미생물과 달리 희분배양시 1g dry weight/L 이하의 낮은 세포농도의 수율을 획득한 연구결과가 대부분이며(15), β -carotene의 생산수를 증진을 위해서는 β -carotene 축진기술뿐만 아니라 고농도 세포배양기술이 확립되어야 한다.

본 연구에서는 shake flask 실험에서 고농도 세포배양에 필요한 배양조건들(광원과 온도, pH, 배지조성물질의 농도)을 변화시키며 세포생장에 필요한 적정조건을 결정하였다. 또한, 탄소원을 NaHCO_3 와 CO_2 gas로, 질소 및 인 농도에 따른 세포성장률도 측정하였다. 세포생장에 영향을 미치는 인자들을 조사하여 이에 따른 유기배양시 미세조류 성장을 촉진시킬 수 있도록 고농도 세포배양전략을 수립하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에서는 녹조류인 *Dunaliella bardawil*(ATCC 30861)을 미국 American Type Culture Collection으로부터 구입하여 β -carotene 생산 균주로서 사용하였다. *D. bardawil*은 Ben Amotz등(9)이 사용한 배지성분을 변형시켜 사용하였으며, 배양 온도는 25°C, 광도세기는 Quantum sensor(Licor 6000)로 측정하였으며, $215 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ (형광등 6개)의 조건하에 실험하였다. Flask 실험시 50mL 배지 용액이 담긴 200mL tissue culture flask, 100mL 용액이 담긴 250mL Erlenmeyer flask를 사용하였다. 배지조성은 1M NaCl, 50mM Tris-HCl, 500mM NaHCO_3 , 4mM KH_2PO_4 , 15mM KNO_3 , 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $3.5 \mu\text{M}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $25 \mu\text{M}$ EDTA, $10 \mu\text{M}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $5 \mu\text{M}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $5 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , $5 \mu\text{M}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $5 \mu\text{M}$ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 이었다. 1L 배양배지를 조성하기 위하여 NaCl 58.45 g/L, NaHCO_3 , 42g/L를 증류수에 녹인 후 121°C, 15분 동안 멸균하였다. Control의 배지농도를 1X배지(Table 1 참조)로 명명하였고, NaCl과 NaHCO_3 을 제외한 미량원소들의 농도를 3배, 5배, 10배 농축한 배지를 각각 3X, 5X, 10X 배지로 명명하였다. 증류수에 1M NaCl과 500mM NaHCO_3 를 용해시켜 멸균해 놓은 배양액에 첨가하며 첨가된 부피는 미량원소를 제외한 나머지 부피이며, stock 용액 조성은 Table 1과 같다 고농도 세포배양 실험시 위상차 현미경(Olympus Co.)과 hemocytometer를 사용하여 seed 용액(계대배양을 통해 배양한 세포용액)의 세포수를 측정 후, 원심분리용 falcon tube에 옮겨 담아 3,500rpm, 20°C로 원심 분리하여, 배양액이 담긴 플라스크에 현탁시켰다. 균주의 활성을 지속적으로 유지하기 위하여 7일 마다 160mL의 배양액만 있는 500mL culture bottle에 기존 현탁배양 세포액 40mL(20% v/v)를 넣어 계대배양하였으며, 각 배양의 최종 volume은 200mL로 일정하게 하였다. 계대배양중 pH를 8.0~8.5로 유지하기 위해 완충용액으로 Tris-HCl을 사용하였다.

Table 1 Medium composition for flask culture of *D. bardawil*.

Nutrient		1X(g/L)	3X(g/L)	5X(g/L)	10X(g/L)
NaCl		58.45	58.45	58.45	58.45
NaHCO_3		42.00	42.00	42.00	42.00
	Stock(g/L)	1X(ml/L)	3X(ml/L)	5X(ml/L)	10X(ml/L)
Tris-HCl	242.2	25	25	25	25
KH_2PO_4	136.00	0.80	2.40	4.00	8.00
KNO_3	101.60	2.00	6.00	10.00	20.00
CaCl_2	147.00	0.20	0.60	1.00	2.00
MnCl_2	2.77	0.05	0.15	0.25	0.50
EDTA	37.20	0.05	0.15	0.25	0.50
FeCl_3	27.03	0.02	0.06	0.10	0.20
MgSO_4	246.48	5.00	15.00	25.00	50.00
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	5.82	0.20	0.60	1.00	2.00
ZnCl_2	13.62	0.01	0.03	0.05	0.10
CoCl_2	23.79	0.01	0.03	0.05	0.10
CuCl_2	17.04	0.01	0.03	0.05	0.10

세포농도의 측정

*D. bardawil*의 세포무게를 측정하기 위하여 Eppendorf tube에 균주 배양액 1mL를 넣고 3,500rpm에서, 1분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 조류 세포를 회수하였다 0.1M NaCl 용액을 사용하여 세척한 후, 원심 분리하여 세포균주만 분리하였다. 세포균주를 drying oven에서 80°C로 24시간 건조한 후의 항량무게를 측정하였다. 세포수는 위상차 현미경을 이용하여 hemocytometer에 sample 희석액을 주입한 후 측정하였다. Eppendorf tube에 균주 배양 sample 100 μL 를 취하여 1M NaCl 용액을 사용하여 10배내지 100배로 희석하여 사용하였다. Hemocytometer에 주입하는 희석 sample의 양은 20 μL 로 하였으며 측정된 세포수로부터 mL당 실제 세포 수는 측정세포수에 희석비율과 $10^3/4$ 배를 곱하였다.

질소·인의 분석법

흡광도는 UV/Vis Spectrophotometer(Pharmacia, LKB Ultraspac III)를 사용하여 측정하였고, 모든 sample은 흡광도 값이 1.0을 초과하지 않도록 3차 증류수를 사용하여 100배내지 200배 희석해서 측정하였다. Nitrate(NO_3^-)의 농도를 위해서는 혼합산성 stock 용액으로 5N 황산 17mL, 술폰민산(sulfamic acid) 30g을 500mL 증류수에 혼합하여 준비하였다. KNO_3 표준용액을 0.1ppm에서 1ppm 범위까지 준비하고, 두 개의 Eppendorf tube에 KNO_3 표준용액(1ppm)과 원심 분리한 균주 배양 시료 상등액을 각각 1mL 넣은 후 각각의 tube에 3.5% NaOH 용액 100 μL 를 각각 첨가하였다. 원심 분리 후 남아있는 불순물을 제거하기 위하여 활성탄 0.002g을 첨가한 후 3분 동안 vortexing하고, 5분 동안 방치 후, 6,000rpm으로 원심 분리한 뒤 상등액 700~800 μL 를 취하여 새로운 Eppendorf tube에 넣었다. 혼합산성용액 100 μL 를 각각 처리된 sample tube에 첨가한 후 vortexing한 뒤, 215nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도별 NO_3^- 표준용액에 대한 흡광도를 측정하여 배지 용액내 존

제하는 NO₃⁻이온 양을 측정하였다. Phosphate(PO₄²⁻)의 정량을 위해서는 25mL 5N H₂SO₄, 25mL 0.01M potassium antimonyl tartrate, 75mL 0.03M ammonium molybdate, 1.5mL 0.1M ascorbic acid를 혼합하여 반응시약을 제조하여 4 시간안에 사용하였다. KH₂PO₄ 표준용액을 0.1ppm에서 1ppm 범위까지 준비하고, Eppendorf tube에 표준용액과 원심 분리한 균주 배양 sample 상층액을 각각 1mL씩 첨가하였다. 위에서 제조한 반응시약 110 μL를 첨가하고 10분동안 방치한 후 880nm에서 흡광도를 측정하여 배지 용액내 존재하는 PO₄²⁻ 이온 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

Cell Growth Kinetics

본 실험은 녹조류인 *D. bardawil*(ATCC 30861)을 이용하여 250mL 삼각 플라스크에 5X 배지(Table 1 참조) 100mL를 사용하였으며, 온도 25℃, 광도 215 μE/m²·s 조건하에 실험하였다. Control 실험에 사용되는 질소원으로서 15mM KNO₃, 인은 4mM KH₂PO₄를 사용하였다. Figure 1은 배양시간에 따른 세포 농도 변화, 질소 및 인 농도의 소비속도 변화를 보여준다. 전형적인 조류세포 성장곡선을 보여주고 있으며, 배양 후 132시간에 최대 세포농도에 도달하면서 질소 성분은 60%이상 소모되었으며, 인 성분은 거의 소모되는 변화를 보였다. 비생장속도는 0.026hr⁻¹, 배양 후 132시간에 최대세포농도는 2.4×10⁶ cells/mL(6.34g DCW/L)를 나타내었다.

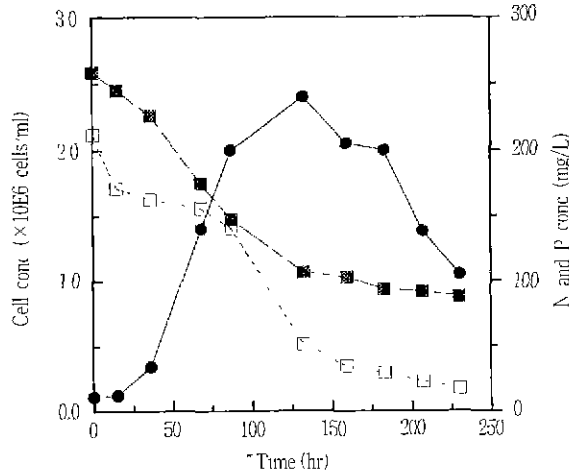


Figure 1. Time course of cell growth, nitrate and phosphate consumption in batch flask (15mM KNO₃ and 4mM KH₂PO₄) μ=0.026hr⁻¹ Max. cell density : 2.4×10⁶ cells/mL(6.34 g DCW/L).

● : Cell conc. ■ : NO₃⁻, □ : PO₄²⁻

미량원소, 교반 및 pH의 영향

배지성분중 NaCl과 NaHCO₃를 제외한 미량원소 농도에 따른 세포 성장변화를 조사하기 위하여 배지를 농축하여 1X(control), 3X, 5X, 10X 배지로 명명하였고 조성은 Table 1을 참조하여 조성하였다. 250mL 삼각 플라스크에 100mL 배양액, 초기 접종 세포농도는 2.5×10⁴ cells/mL, 온도는 25~28℃, 백색 형광등 6개(광도를 215 μE/m²·s)를 이용하여 계대배양하였고, Tris-

HCl buffer를 사용하여 pH를 8.0~8.5로 조정하여 실험을 수행하였다. 세포농도를 측정하기 위해서 위상차 현미경과 hemocytometer를 사용하여 세포 수를 측정하였다.

미량원소 농축배지 사용에 따른 세포농도의 변화는 Figure 2와 같으며, 미량원소농도가 control(1X), control농도의 3배(3X), 5배(5X), 10배(10X)로 증가함에 따라 세포의 비생장속도는 0.010hr⁻¹, 0.011hr⁻¹, 0.013hr⁻¹, 0.010hr⁻¹로서, 미량원소의 농도 변화에 따른 세포 비생장속도 차이는 발견되지 않았다. 그러나 1X, 3X, 5X 배지에서의 최대세포농도는 미량원소 농도가 증가함에 따라 최종균체농도가 증가하는 경향을 보였으며, 배양 후 282시간에 5X 배지에서 5.8×10⁶ cells/mL로써, 1X 배지(3.1×10⁶ cells/mL), 3X 배지(4.9×10⁶ cells/mL)보다 각각 46%, 18% 증가된 세포농도를 보였다(Figure 2) 5X 배지의 경우 1X, 3X 배지와 비교하면 충분한 영양분이 공급되어 세포의 지수생장기가 오래 유지될 수 있었기 때문이라 추측된다 그러나 10X 배지 사용시 최대 균체농도가 가장 낮은 2.9×10⁶ cells/mL를 보였으며, 추후 본 실험에서는 최대 균체농도를 보인 5X 배지를 control로 실험하였다

교반속도가 세포 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 shaker에서 flask를 교반한 경우와 교반하지 않은 경우(control)을 비교하여 실험하였다 교반시 비생장속도는 0.010hr⁻¹(1X), 0.013hr⁻¹(5X), 교반하지 않은 경우 0.009hr⁻¹(1X), 5X 0.010hr⁻¹(5X)을 나타내어 비슷한 세포생장속도를 보였다. 그러나 최대균체량을 비교하면 교반하지 않은 경우 1X, 5X 배지에서 각각 2.6×10⁶, 3.1×10⁶ cells/mL로서 교반시 5X 배지의 5.8×10⁶ cells/mL보다 55%, 46% 감소된 세포농도를 보였다 이러한 현상은 교반을 통하여 충분한 빛이 세포 내에 공급되었고 배지내 영양분이 충분히 혼합되었기 때문이라고 고려된다(Figure 3).

조류 세포배양시 적정 pH 조건을 발견하기 위하여 pH를 7.0, 8.0 및 9.0로 변화시켜 실험하였다. 완충용액으로서 Tris-HCl을 사용하지 않았으며, 24시간마다 1N HCl과 NaOH를 사용하여 pH를 각각 보정하였다. 온도와 광도는 이전 실험과 동일한 조

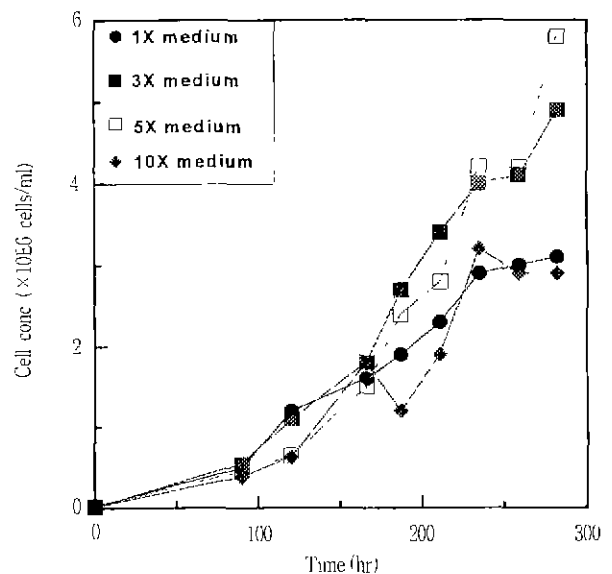


Figure 2. Effect of nutrient feeding concentration on cell growth.

건하에 실험하였으며, shaker를 이용한 교반은 하지 않았다. pH 7.0보다 낮은 pH를 사용하지 않은 이유는 중성이하의 pH에서는 탄소원으로 사용되는 NaHCO_3 가 조류생장시 사용 가능한 HCO_3^- 이온으로 전환되는 반응을 저해하므로 영양분의 적절한 공급이 이루어지지 못하여 세포의 생장을 억제하게 되기 때문이다.

실험결과(Figure 4) pH 8.0 조건하에서는 배양 후 168hr에 가장 높은 세포농도(2.6×10^6 cells/mL)를 보였으며, pH가 7.0, 8.0, 9.0로 변화함에 따라 비생장속도는 각각 0.019hr^{-1} , 0.018hr^{-1} , 0.014hr^{-1} 를 나타내었다. pH 변화에 따라 비생장속도는 거의 비슷하지만, 최대 균체량을 비교하면 8.0인 경우 2.6×10^6 cells/mL로써 pH를 7.0으로 조절한 경우보다 62% 증가된 세포수율을 나타내어 pH 8.0로 조절한 경우 세포생장에 최적 pH임을 확인하였다(Figure 4). 본 연구결과는 해양 미세조류인 *I. galbana* Parke를 이용하여 pH 6~9의 범위에서 실험한 결과

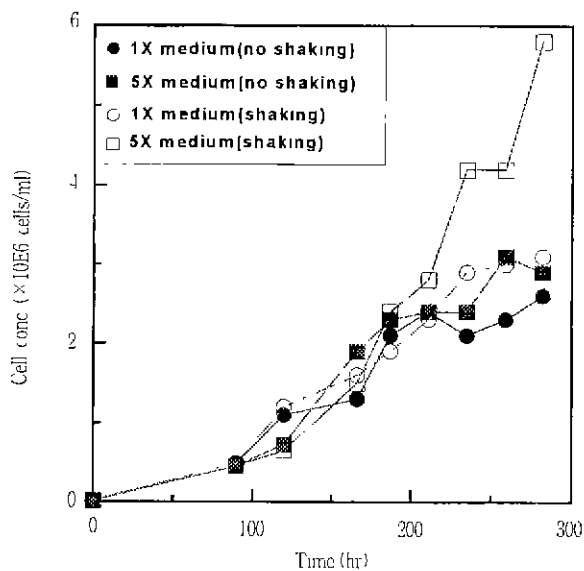


Figure 3 Effect of agitation on cell growth.

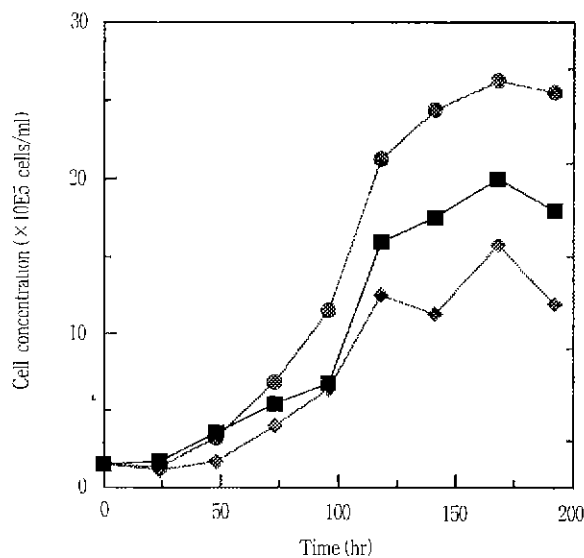


Figure 4. Effect of pH on the cell growth of *D. bardawil* during batch culture in flask (no shaking) Light intensity ; $215 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$.

pH 8.0에서 비생장속도와 최대세포농도가 가장 높은 것으로 보고한 연구결과와 비슷한 현상을 보였다(14).

탄소원 영향

미세조류 *D. bardawil*사용시 탄소원 종류 즉 CO_2 가스 및 NaHCO_3 에 따른 세포 성장속도 변화를 조사하기 위한 실험을 하였다. 탄소원으로 500mM의 NaHCO_3 만 공급한 경우(control), 250mM NaHCO_3 과 대체탄소원으로 CO_2 (1mL/min 공급속도)를 연속적으로 공급한 경우, 그리고 250mM의 NaHCO_3 와 매일 일정량의 CO_2 (104mL/day)를 공급해준 경우 세포생장에 미치는 영향을 조사하였으며, 온도, pH 8.0, 광도 등의 조건은 이전실험과 동일한 조건으로 하였다

연속적으로 CO_2 를 공급해준 경우의 세포는 배양 후 118hr 이후에 모두 사멸하였지만 CO_2 를 주입하지 않은 control과 250mM NaHCO_3 와 104mL/day CO_2 를 주입한 경우는 정상적인 세포 성장패턴을 보였다(Figure 5). 세포생장이 멈춘 이유로서 과도한 CO_2 가스의 공급으로 인하여 pH가 낮아지게 되어 세포의 생장에 필요한 탄소원인 HCO_3^- 이온이 발생하는 것을 억제하게 되어 영양분의 부족으로 인하여 사멸하게 되었다고 추측된다. 또한 미세조류에 있어서 CO_2 가스와 HCO_3^- 축적에 대한 연구보고에 따르면 조류가 이용 가능한 HCO_3^- 로 전환되기 위해서는 무기탄소원의 농도가 40mM이상이 되어야 하며, CO_2 가스의 농도가 매우 낮을 때 미세조류의 생장에 좋은 영향을 준다는 보고가 있다(17). 본 실험에서는 40mM이상의 NaHCO_3 와 CO_2 가 소량씩 공급될 경우 가장 높은 균체농도(1.56×10^7 cells/mL)와 비생장속도(0.007hr^{-1})를 보였다.

광원종류의 영향

광합성 미세조류인 *D. bardawil*은 생장에 필요한 에너지를 생산하기 위하여 반드시 광원이 필요하다. 본 실험에서는 세포 광합성에 사용되는 광원으로서 white, blue, red fluorescent light를 사용하여 세포 성장속도에 미치는 영향을 조사하였다 실험에 사용한 광원은 형광등 12개를 사용하여 $450 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 의 광도조건, 온도는 25~28℃, pH는 Tris-HCl buffer를 사용하여 8.0~8.5의 범위를 유지하도록 하였다.

Red light에서 배양한 경우 배양기간 동안 세포의 생장이 멈추었으며 white와 blue light에서 배양한 세포의 비생장속도는 각각 0.019hr^{-1} , 0.013hr^{-1} 로서 white light의 조건에서 배양시 가장 효과적임을 확인하였다(Figure 6). 미세조류 *D. bardawil*은 과도한 빛을 조사하여 stress가 주어지면 세포내 lipid globule층에 β -carotene을 축적하며 축적된 β -carotene의 photo-filtering action에 의하여 세포가 보호된다. 그러나 red-light에서 배양한 세포의 경우 세포내 생성된 β -carotene은 red light 조사시 filtering action이 나타나지 않으므로 모든 stress는 세포가 직접 받게되어 세포의 생장은 멈추었으나 blue light 조사시 β -carotene의 filtering action이 완벽하게 이루어지는 것으로 보고되고 있음을 고려할 때(9), 세포의 생장에 큰 영향을 받지 않았다고 고려된다. 그러나 blue light조사시 white light에 비하여 비생장속도가 낮은 이유는 blue-light는 자외선에 가까운 단파장이므로 세포에 더욱 많은 stress를 주게 되어 성장보다는 stress로부터 보호할 수 있는 β -carotene의 대량생산을 위한 mechanism이 촉진되어 세포를 보호하는 기작이 먼

저 작용하기 때문에 세포생장이 저해된다고 추측된다(9). 그러므로 세포생장 촉진을 위해서는 white light가 가장 적합하며, 이 조건하에 최대균체농도는 36×10^6 cells/mL 이었다.

Nitrate 및 Phosphate 초기농도의 영향

미세조류 배양시 중요한 제한인자로서 빛, 탄소, 질소, 및 인과 같은 인자 등이 먼저 고려될 수 있으며, 본 실험에서는 먼저 질소 및 인 첨가에 따른 세포생장변화를 flask실험에서 조사하였다. Figure 7에서 nitrate의 농도가 15mM일 경우 배양 후

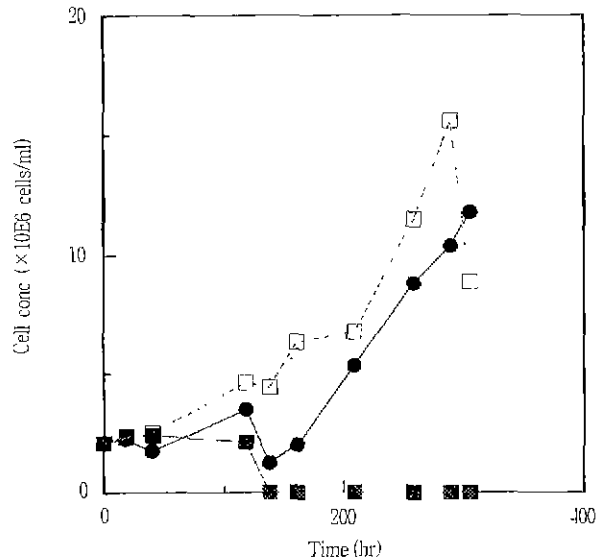


Figure 5. Effect of CO₂ gas and bicarbonate compound on cell growth.

- Control (500mM NaHCO₃, no feeding of CO₂)
- 250mM NaHCO₃, continuous feeding of CO₂(1ml/min)
- 250mM NaHCO₃, 104mL/day feeding of CO₂

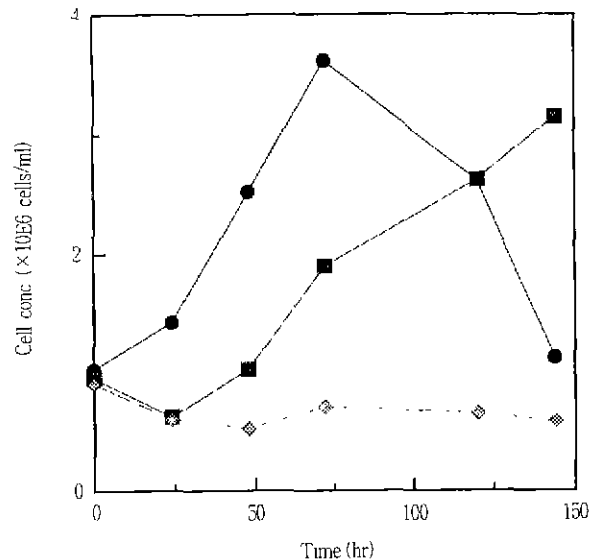


Figure 6. Effect of light sources on cell growth $450 \mu E/m^2 \cdot s$.

- : White light
- : Blue light
- ◆ : Red light

200시간에 최대세포농도가 11.25×10^6 cell/mL의 높은 값을 보이며, 전형적인 세포생장 곡선을 나타내고 있다. 질소원 nitrate 초기농도를 7.5mM, 3mM, 0.94mM로 감소시키면서 인 농도는 4mM로 고정시킨 실험 결과에 따르면 초기 nitrate농도가 감소함에 따라 최대세포농도 및 비생장속도가 급격히 감소됨을 보여 주었다. 배양시간에 따른 질소원의 소모속도를 확인한 결과(미제출 자료), 질소원의 80% 이상이 배양 후 5-6일 내에

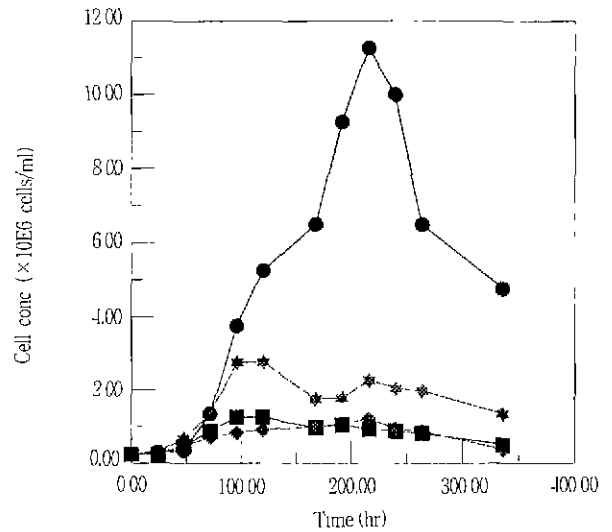


Figure 7. Effect of nitrate concentration on the cell density in batch flask Initial cell conc. : 2×10^5 cells/mL.

- Control (N:15mM, P:4mM)
- N:7.5mM, P:4mM
- ◆ N:3mM, P:4mM
- ★ N:0.94mM, P:4mM

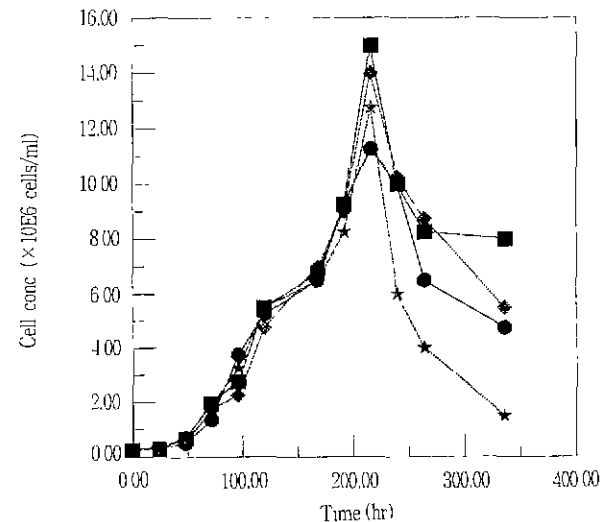


Figure 8. Effect of phosphate concentration on the cell density in batch flask Initial cell conc. : 2×10^5 cells/mL.

- Control (N:15mM, P:4mM)
- N:15mM, P:1mM
- ◆ N:15mM, P:0.5mM
- ★ N:15mM, P:0.25mM

거의 소모가 되었으며 그 이후 일정한 질소농도를 유지하고 있었다. 한편, 초기 phosphate 농도를 4mM, 1mM, 0.5mM, 0.25mM로 감소시킨 경우의 세포농도 변화는 Figure 8에 나타나 있다. 4mM 보다 1mM phosphate 투입시 오히려 최대세포농도는 증가하였으며 비생장속도는 거의 일정하였다. 또한, 4mM phosphate 투입시 가장 낮은 최대세포농도를 나타내었으며 초기 인농도 변화에 따른 세포성장속도 변화가 거의 없고 최대세포농도도 약간 증가한 형태로 미루어 인의 초기농도 영향에 의한 세포성장변화는 거의 없으며 인은 아주 미량만 미세조류 세포생장에 필요함을 추측할 수 있었고 반면에 질소원에 의한 세포생장은 크게 영향을 미치는 현상을 발견하였다.

Nitrate 및 Phosphate를 이용한 유기식 배양

질소원이 세포생장을 촉진시키는 현상을 이용하여 질소 및 인을 이용한 유기식 배양공정을 통하여 고농도 세포배양전략을 수립하고자 실험을 하였다. 지금까지의 실험에서는 질소는 15mM nitrate와 4mM phosphate 농도로 하여 배양하였지만 Figure 9 실험에서는 질소농도에 의한 영향을 조사하기 위하여 초기에 #1 과 #2 batch flask에 질소농도의 1/15수준인 1mM nitrate를 5X 배지에 첨가하였으며 #2 batch flask에는 배양 후 132시간에 15mM nitrate만 공급한 경우의 세포농도 증가 및 질소 소모속도를 조사하였다. 배양조건은 250mL flask에 100mL 5X 배지를 첨가하였으며, 25°C, 215 μE/m²·s, pH는 8.0~8.5가 되도록 Tris-HCl 완충용액을 사용하였다. Nitrate가 추가로 주입이 안된 control실험과 15mM nitrate가 132hr후 주입된 실험결과(Figure 9)를 비교하면 nitrate(NO³⁻)는 주입 후 농도가 즉각 증가하였고, 세포농도 역시 230hr에 4.2×10⁶ cells/mL로 급격히 증가하였다.

Figure 10 실험에서 phosphate 농도 변화에 따른 세포성장 변화를 조사하기 위하여 초기에 #1 set 실험에 control실험의

인농도(4mM)의 1/12 수준인 0.33mM phosphate를 5X 배지에 첨가하였으며, #2 실험에서는 초기농도는 0.33mM phosphate가 첨가된 5X 배지에서 배양 후 132hr에 4mM phosphate만 1회 더 공급한 경우 세포농도 및 인 소모속도를 조사하였다. 배양조건은 초기 질소농도 영향을 조사하기 위한 조건(Figure 9)과 동일하게 실험하였다. 실험결과(Figure 10) 인을 배양중 첨가하였지만 세포농도 변화는 전혀 없었으며 인 첨가후 인의 농도만 증가하는 결과를 보였다. Figure 9과 Figure 10을 비교하면 질소 및 인의 첨가

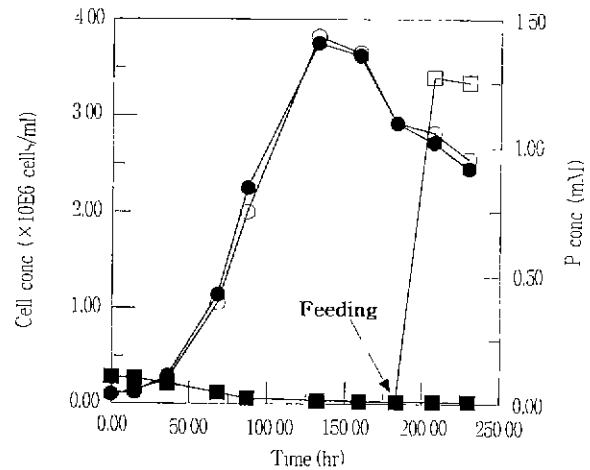


Figure 10. Time course of cell growth and phosphate consumption in both batch(#1) and fed-batch(#2) culture.

- #1 : Control(0.33mM phosphate at inoculum and no feeding)
- #1 cell conc. ■ #1 PO₄²⁻ conc.
- #2 : Fed-batch(0.33mM phosphate at inoculum and 4mM phosphate feeding after 132hr)
- #2 cell conc. □ #2 PO₄²⁻ conc.

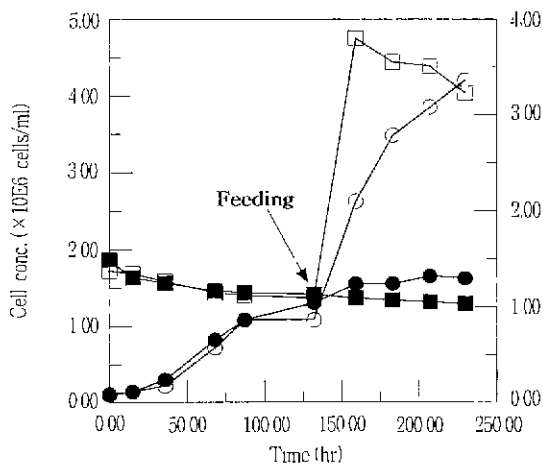


Figure 9. Time course of cell growth and nitrogen consumption in both batch(#1) and fed-batch(#2) cultures.

- #1 : Control(1mM nitrate at inoculum and no feeding of nitrate)
- #1 cell conc. ■ #1 NO₃⁻ conc.
- #2 : Fed-batch(1mM nitrate at inoculum and 15mM nitrate feeding after 132hr)
- #2 cell conc. □ #2 NO₃⁻ conc.

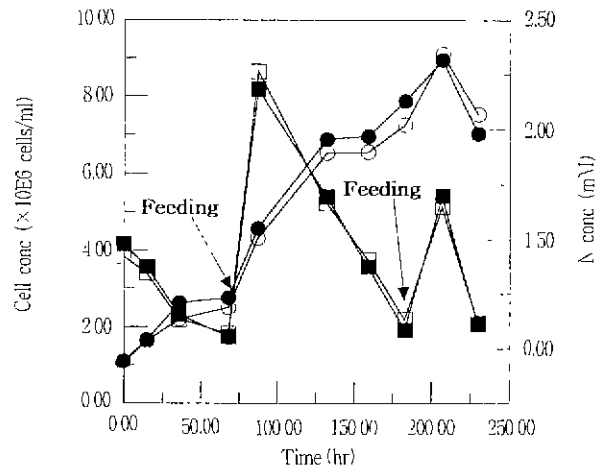


Figure 11. Time course change of cell growth, nitrate consumption in fed-batch flask (initial nitrate conc. 7mM)

- #1 : Nitrate fed-batch(7mM nitrate).
- #1 cell conc. ■ #1 NO₃⁻ conc.
- #2 : Full concentrated medium fed-batch except NaHCO₃ (32.35ml feeding) Feeding time(75hr and 174hr).
- #2 cell conc. □ #2 NO₃⁻ conc.

시 인의 경우 세포생장 증가에 큰 효과가 보이지 않지만 질소 첨가 시 세포농도의 증가에 매우 효과적임을 보였다 이 결과 유가배양을 이용한 고농도 세포배양을 효과적으로 수행하기 위한 전략으로써 질소원 첨가가 매우 효과적임을 나타내었다.

Figure 11 실험에서는 질소원(7mM nitrate)을 두 번 첨가한 유가식 배양 실험에서 생산할 수 있는 최대세포농도를 조사하였다. #1 set 실험에서 질소원만 7mM nitrate 두 번 투입한 경우와 #2 set 실험에서 탄소원인 NaHCO_3 만 제외한 배양배지를 두 번 투입한 경우를 비교하여 세포생장 촉진에 효과가 있는 지를 조사하였다. 75hr와 174hr에 2회씩 질소원(7mM nitrate)만 투입한 경우와 5X 배지 전체를 투입한 경우의 비생장속도는 각각 0.028hr^{-1} , 0.029hr^{-1} 였고 최대 세포수는 8.995×10^6 cells/mL, 9.105×10^6 cells/mL를 나타내어 세포생장변화는 거의 비슷하였다. 이러한 결과로써 유가배양시 미세조류 생장에 중요한 영양분으로써 질소원의 주입은 매우 효과적임을 알 수 있었고, 질소 제한농도 이하로 될 경우 질소원만의 투입으로써 고농도 미세조류 세포를 얻을 수 있다고 고려되며 본 실험결과 2회의 nitrate 투입만으로써 배양 198hr에 8.955×10^6 cells/mL를 보여서 추후 고농도 세포배양 전략을 수립하는데 중요한 기초자료로서 사용될 수 있다고 기대된다.

요 약

본 연구에서는 β -carotene 생산균주인 미세조류 *Dunaliella bardawil*을 사용하여 batch flask에서 미세조류의 고농도세포에 관한 최적배양조건(미량원소, pH, agitation speed, nitrate, phosphate, carbon source)을 확립하고자 하였다. 미량원소는 5X 배지에서 교반하였을 때 비생장속도는 0.013hr^{-1} 와 세포농도는 4.9×10^6 cells/mL로서 1X, 3X, 10X 배지에서 배양한 것보다 약 46%, 18%, 69% 높은 세포수율을 얻었으며, 세포배양시 교반한 경우, pH는 8.0에서 최대 세포농도를 얻었다. 초기 nitrate (KNO_3)와 phosphate(KH_2PO_4)의 영향을 조사한 결과 미세조류 생장에 중요한 영양분으로써 질소원의 주입은 매우 효과적임을 확인하였다. 또한 탄소원으로서 250mM의 NaHCO_3 와 CO_2 가스를 동시에 사용한 배양조건이 500mM NaHCO_3 만을 탄소원으로 사용한 실험에 비하여 32% 증가된 세포농도를 나타내었다. light는 white light의 경우 blue light보다 세포생장에 적합하였다. 질소원을 이용한 유가배양시 2회의 nitrate 투입만으로써 배양 198hr에 8.955×10^6 cells/mL의 고농도의 세포를 얻었다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부의 생물화공 연구과제 연구비에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ben-Amotz A (1987), Effect of Irradiance and Nutrient Deficiency on the Chemical Composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron(Volvocales, Chlorophyta). *J Plant Physiol.*, 131, 479-487.
- John R. B., David M. T., and Joseph C. W.(1987), Microalgae Biotechnology, *Tibtech*, 5, 47-53.
- 김영석(1995), 베타카로틴 수요 급증 : 항암제 등 의약품 확대, *Chemical J.*, 8, 35.
- Lers A., Ham L., and Ada Z.(1991), Co-regulation of a Gene Homologous to early Light-induced Genes in Higher Plants and β -carotene Biosynthesis in the Alga *Dunaliella bardawil*, *J. Biol. Chem.*, 266(21), 13698-13705
- Sadaka A., Avron M., and Ben Amotz A.(1990), Effect of Inhibitors on the Formation of Stereoisomers in the Biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil*, *Plant Cell Physiol.*, 31(5), 689-696.
- Ben-Amotz A.(1995), New mode of *Dunaliella* Biotechnology : Two-phase Growth for β -carotene Production, *J. Appl. Phycol.*, 7, 65-68.
- Katz A., Carlos J. and Pick U.(1995), Isolation and characterization of a Protein Associated with Carotene Globules in the Alga *Dunaliella bardawil*, *Plant Physiol.*, 108, 1657-1664.
- Lers A., Yael B., and Ada Z.(1990), Photoinduction of Massive β -carotene Accumulation by the Alga *Dunaliella bardawil*, *Plant Physiol.*, 93, 389-395
- Ben-Amotz A, Katz A, and Avron M (1989), Mode of Action of the Massively Accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation, *Plant Physiol.*, 91, 1040-1043
- Chandler L. A. and Schwartz S. J.(1987), HPLC Separation of Cis-Trans Carotene Isomers in Fresh and Processed Fruits and Vegetables, *J. Food Sci.*, 22, 669-672
- Constance A. O., Steven J. S. and George L. C.(1991), Comparison of Liquid Chromatographic Methods for Determination of Cis-Trans Isomers of β -carotene, *J Assoc. off. anal. chem.*, 74(1), 36-42.
- Santillan C.(1982), Mass Production of *Spirulina*, *Experientia*, 38, 40-42.
- Kirst G. O.(1989), Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae, *Annu Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 21-53.
- 오유관, 박성훈(1996), 해양 미세조류 *Isochrysis galbana* Parke 성장에 대한 환경 및 영양조건의 영향, *한국생물공학회지*, 11(3), 303-310.
- Javannardian M and Bernhard O Palsson.(1991), High-Density Photoautotrophic Algal Cultures Design, Construction, and Operation of a Novel Photobioreactor System, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1182-1189
- Jimenez C. and Uri P.(1993), Differential Reactivity of β -carotene Isomers from *Dunaliella bardawil* toward Oxygen Radicals, *Plant Physiol.*, 101, 385-390.
- Moroney V. M., David H. H., and Tolbert N. E.(1986), CO_2 and HCO_3^- Accumulation by Microalgae, pp. 715-724, Alan R. Liss, Inc.