

EDTA 대체용 천연 킬레이팅제를 함유한 발효 축산폐수의 배지조성률에 따른 *Chlorella ovalis*와 *Dunaliella parva*의 생산성 강화

전선미¹ · 전경희¹ · 김미경^{2*}

(¹영남대학교 생물학과, ²환경문제연구소 해양과학연구센터)

Enhanced Production of *Chlorella ovalis* and *Dunaliella parva* by the Rates of Medium Composition Obtained from the Fermented Animal Wastewater Including a Natural Substitute Chelator for EDTA

Seon-Mi Jeon¹, Kyung-Hee Jeune¹ and Mi-Kyung Kim^{2*}

¹Department of Biology and

²Marine Science Research Center, Environmental Research Institute, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

The productivities of *Chlorella ovalis* and *Dunaliella parva* were influenced by the rates of medium compositions obtained from the fermented animal wastewater (BM: bacteria mineral water) including a natural substitute chelator for EDTA (etylenediaminetetraacetic acid). The most favorable medium was -E+50 adding 50% BM in f/2 medium instead of EDTA, a chemical chelator, which increased more 19-fold of cell density in *C. ovalis* and 7-fold in *D. parva* than cells cultured on f/2 medium as well as the enhancements of chlorophyll *a* (f/2-E: 0.26 g L⁻¹, -E+50: 1.5 g L⁻¹ in *C. ovalis*; f/2-E: 2.7 g L⁻¹, -E+50: 15 g L⁻¹ in *D. parva*) and the increase of maximal PSII quantum yields. These results were verified that the BM could play an important part as a natural chelator substituted for EDTA. In the fields of biotechnology, food organisms in fishery and eco-industries of CO₂ sequestration in air and nutrient removal in water, the natural chelator of BM could be applied to enhance the biomass of the other microalgae.

Key Words: biomass, BM, *Chlorella ovalis*, *Dunaliella parva*, EDTA, natural chelator

서 론

지구상에 분포하고 있는 녹조류는 약 1만 종이 알려져 있고, 그 중 대부분이 담수산이고, 해수산은 약 10% 정도 존재한다(김과 김 1999; 이 등 2004). 미세조류는 수질 관정을 위한 지표생물로서 연구되고, 비타민, β -carotene, EPA와 같은 고도 불포화 지방산, 단백질, oil, 메탄가스 등 고부가가치 소재의 공급원으로, 건강식품, 향장, 사료, 비료, 연료 등 생명공학적인 연구개발 소재로 각광받고 있다(김 등 2001). 특히 최근에는 생물적 환경정화(bioremediation)를 위해 미세조류를 응용하여 환경산업에 접목하여 환경친화적인 수질 오염원을 제거 및 대기 중에 CO₂를 제거하는데 이용된다(안

등 1996; 박 등 1998; Sung *et al.* 1998; Lee and Lee 2001).

녹조류에 속하는 해산 *Chlorella*는 세포막이 cellulose와 hemicellulose로 이루어진 독립영양생물로서, 광합성 작용이 활발하여 세포분열 능력이 뛰어나 빠른 속도로 증식한다고 알려져 있다(이 등 2004). *Chlorella*는 단백질의 함량이 40% 정도로 매우 높아, 먹이생물로서 중요한 위치를 차지하고 있고, 담수 또는 해수 등의 다양한 서식처에서 생활을 하며, 오늘날 건강식품으로 가장 각광을 받고 있고, 윤충 등의 동물 플랑크톤, 치어패류의 먹이생물로 이용되어 대량배양이 가능한 종이다(임 등 1998).

해산 녹조류인 *Dunaliella*는 배양조건에 따라 매우 높은 β -carotene 함성이 가능하여 식품의 보조색소, 산화방지제 및 화장품용 노화방지제로써 최근 많이 사용되고 있으며, 미국 FDA에 의한 β -carotene의 항산화 효과가 인정된 후, 항암제, 치료제 등의 의약품 수요가 국내외적으로 급격히 증가하

*Corresponding author (mkkim@ynu.ac.kr)

고 있다(오와 이 1998). 호주, 미국 및 이스라엘은 상업적으로 *Dunaliella*를 대량배양하고 있고, 이 미세조류를 이용하여 β -carotene을 제품화하는데 성공했다(Vonshak 1997). 최근에는 사료 개발과 미세조류로부터 생리활성물질의 추출에 대한 관심이 높아지고 있다.

미세조류를 산업화하기 위해 1차적으로 단위면적당 세포 밀도를 증가시키는 기초연구가 필수적이다. 다양한 배양조건(배지종류, 광량, 광질, 온도, 특정 무기원소의 유무 등)에 따른 미세조류의 생장에 따른 기초연구가 다수 수행되었다(Kim and Giraud 1989; Kim *et al.* 1997; Kim and Smith 2001). 특히 폐수를 이용한 *Chlorella*, *Scenedesmus*와 *Spirulina platensis*의 대량 배양연구는 수질을 정화하는 목적으로 응용되거나 고단백 사료원으로 개발되고 있다(안 등 1996; 박 등 1998). 축산폐수는 수계의 부영양화현상을 유발시키는 주원인인 질소와 인을 함유하고 있어 하천, 댐과 바다의 녹조와 적조현상으로 수계 생태계 교란을 야기시킬뿐만 아니라 어업인들에게 막대한 피해를 입히고 있다.

따라서 본 연구는 버려지는 폐자원이자 수질을 악화시키는 축산폐수(돼지노)를 자원으로 재활용하기 위한 목적으로 부식 토양미생물(방선균과 야생 효모)에 의해 발효시킨 처리수를 이용하여 해산 미세조류의 생산력을 강화할 수 있는 배지를 개발하고자 하였다. 기존에 상용되는 모든 배지(f/2, ASW 등)에는 화학합성 킬레이팅제가 포함되는데, 이는 배지 조성에 반드시 추가되는 미량의 중금속(Zn, Cu, Co 등)이 다른 성분과 용해되지 않고, 이들 이온의 독성 발현을 방지하는 기능을 한다. 이를 위해 기존의 모든 상용배지에 주로 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)가 사용되고 있고, 이 EDTA는 난분해성 합성 아미노산으로 중금속 해독제, 방부제 등으로 이용되나 자체의 독성에 따른 생체 내 부작용으로 천연 킬레이팅제 개발이 필요한 실정이다(Gilberst and Hoffmann-Glewe 1991).

배지 조성물 농도 변화에 따른 미세조류 생산성 향상을 위한 연구로서 EDTA 농도변화가 미세조류의 생장을 촉진한다는 연구보고가 있다(Sung *et al.* 1998). 하지만 EDTA는 미국의 Sigma-Aldrich 등의 산업체에서 고가로 생산 판매되고 있는 화학합성 물질이다. 미세조류를 대량생산 시에 EDTA를 사용할 경우, 생산단가의 상승으로 제품의 시장 경쟁력이 떨어지는 결점과 과다 사용 시에는 EDTA가 생체에 미치는 부작용이 많은 단점이 있다. 따라서 미세조류의 산업화를 위한 생산단가를 절감하고, 대량생산 효율을 증가시키는 친환경 천연 킬레이팅제 개발이 요구된다.

본 연구는 상용 배지(f/2)에 생물활성수(부식 토양미생물로 발효된 축산폐수를 총칭; BM, Bacteria Mineral Water)를 농도별로 달리 첨가한 배지에 BM이 EDTA 대체용 천연 킬레이팅제로서의 기능이 가능한지를 분석하고, 이를 토대

Table 1. Composition of f/2 medium containing EDTA as a chemical chelator

Elements	Stock solution	Dilution per 1 L of sea water
NaNO ₃	75 g L ⁻¹	1 mL
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g L ⁻¹	1 mL
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30 g L ⁻¹	1 mL
<u>f/2 trace metal solution</u>		
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15 g L ⁻¹	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4.36 g L ⁻¹	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8 g L ⁻¹	1 mL
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.3 g L ⁻¹	1 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 g L ⁻¹	1 mL
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 g L ⁻¹	1 mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180 g L ⁻¹	1 mL
<u>f/2 vitamin solution</u>		
vitamin B12 (Cyanocobalamin)	1 g L ⁻¹	1 mL
biotin	0.1 g L ⁻¹	10 mL
thiamine HCl	200 mg L ⁻¹	

로 해산 미세조류 중 녹조강에 속하는 *Chlorella ovalis*와 *Dunaliella parva*의 생산력을 최대화시킬 수 있는 배지조성을 탐색하고, 미세조류의 생리생화학적 특성에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

연구에 사용된 미세조류 및 배양조건

본 실험에서 사용된 해산 미세조류는 녹조류(Chlorophyceae)인 *Chlorella ovalis* (KPCCI P-M-2)와 *Dunaliella parva* (KPCCI P-M-6)로서 영남대학교 해양과학연구센터의 한국산업플랑크톤소재은행(KPCCI)으로부터 분양을 받았다. 대조구 배지는 f/2 배지였고(Guillard 1975) (Table 1), 실험구 배지는 f/2 배지에 생물활성수(부식토양미생물로 발효된 축산폐수: BM, bacteria mineral water) (Shon *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006) 3%를 첨가한 배지(E+3), BM 6% 첨가한 배지(E+6)와 동시에 BM의 천연 킬레이팅(chelating)효과를 검증하기 위해서 f/2 배지 구성물질 중에 킬레이팅제(chelator)인 Na₂EDTA를 제거한 배지(f/2-E)에 BM 3%를 첨가한 배지(-E+3)와 6%를 첨가한 배지(-E+6)에서 *C. ovalis*와 *D. parva*를 접종하였다. 접종된 미세조류는 일정한 명암주기(14h/L, 10h/D)와 24°C, 130 μ mol m⁻² s⁻¹의 광량으로 shaking incubator에서 배양되었다. 낮은 농도의 BM 첨가로 천연 킬레이팅제로서의 효과가 검증된 이후에 BM의 추가농도를 높여 두 녹조류의 생장률을 비교 분석하였다. f/2 배지에서 Na₂EDTA를 제거한 배지(f/2-E)에 10%, 20%, 30%, 40%와 50% BM을 추가한 각각의 배지(-

E+10, -E+20, -E+30, -E+40, -E+50)에서 세포분열이 왕성한 시기인 14 일간 *C. ovalis*와 *D. parva*를 배양하고, 엽록소 *a*와 광합성효율을 측정하기 위해 세포가 배지에 완전히 순치되고, 세포분열 정제기에 접어드는 27일 동안 배양하였다.

미세조류의 생장률 측정

두 녹조류를 배지에 접종한 날부터 2일마다 시료를 hemacytometer를 이용하여 미세조류의 단일세포를 측정하고, 세포분열율(*K*)을 아래 공식으로 계산하였다(Guillard 1975).

$$K = \frac{\log_2 (N_1/N_0)}{t_1 - t_0}$$

*N*₀는 초기 개체수이며, *N*₁는 최종 개체수, *t*₀는 초기 개체수일 때 배양일, *t*₁는 최종 개체수일 때 배양일을 의미한다.

엽록소 *a*의 정량 및 정성 분석

엽록소 *a*의 농도를 측정하기 위한 방법은 다양한 용매로 엽록소 계열을 분리하고 정량적인 값을 측정하는 측정법(Parsons and Strickland 1963)과 특정 파장대를 이용한 형광 측정법(Holm-Hansen et al. 1965)이 있다. 실제 해수 속에 식물플랑크톤의 밀도가 낮기 때문에 분광측정법보다 약 50배 이상 민감한 형광측정법이 일반적으로 널리 사용되고 있다(Jeffrey 1972). 본 실험에서는 엽록소 *a*의 농도 계산을 위해 흡광광도계를 이용하였다. 엽록소 *a*의 함량 측정은 시료 3 mL를 유리섬유여과지(GF/C, 45 mm)로 여과시킨 후, 여과지를 아세톤과 물을 9:1로 비율로 섞은 후, 10 mL를 추가한 후, 마쇄한 시료를 원심 분리관에 넣고, 밀봉하여 4°C 어두운 곳에서 원심분리(4000 rpm, 20 min)하였다. 상정액의 일부를 흡수셀에 옮겨 흡광광도계(Cary 50 Conc, Varian, USA)로 검액하였다. 바탕시험액으로 아세톤:물(9:1)용액을 취하여 대조액으로 하여, 663 nm, 645 nm, 630 nm와 750 nm에서 검액의 흡광도를 측정하고, 엽록소 *a*의 농도는 Sandards Methods(APPA 1995)를 기준으로 하여 계산하였다.

$$\text{엽록소 } a(\text{mg L}^{-1}) = \frac{Y \times \text{상등액의 양}(\text{mL})}{\text{여과한 시료의 양}(\text{L})}$$

$$Y = \text{엽록소 } a \text{의 양}(\text{mg L}^{-1}) = 11.64 X_1 - 2.16 X_2 + 0.10 X_3$$

$$X_1 = \text{OD}_{663} - \text{OD}_{750}$$

$$X_2 = \text{OD}_{645} - \text{OD}_{750}$$

$$X_3 = \text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}$$

엽록소 *a*의 광합성효율은 형광 분석기(Phyto-PAM, Walz, Germany)에 의해 470 nm, 535 nm와 620 nm의 파장에서 PSII에서의 최대 광량자(quantum)를 측정하였다.

$$Fv/Fm = (Fm' - Ft) / Fm' = dF / (Ft + dF)$$

Fv/Fm는 PSII에서 발산하는 형광값의 역치로 이는 광계의 광합성효율을 의미하고, dF는 형광 효율 증가치, Ft는 순간 형광률, Fm'는 최대 형광률을 의미한다.

발효 축산폐수 처리수(생물활성수, BM)의 공정 단계

발효 축산폐수 처리수(생물활성수; BM, Bacteria Mineral Water)는 4단계의 생산 공정을 거치게 되는데, 각 단계는 각각 10일간 소요 기간을 거친다. 제1단계는 부식토양박테리아(방선균, 야생효모 등)의 배양 및 증식을 일으키는 단계로서 오폐수를 여과하여 경석을 배양조에 넣어줌으로써 박테리아가 오폐수의 유기물질을 분해하게 하고, 경석의 pore는 박테리아가 서식할 수 있는 공간을 제공해 주고, 폭기를 이용하여 호기성 박테리아의 배양을 촉진시킨다. 제2, 3단계는 박테리아가 유기물질을 분해하여 대사산물을 생산하도록 유도하고 유기산, 호르몬, 효소 등의 각종 생리활성물질을 추출하는 단계이다. 제4단계는 박테리아가 배출한 유기산에 의해서 화강암이 녹아 처리수는 화강암으로부터 미네랄을 다량 포함하고, 미네랄 외에 생리활성물질을 숙성 및 농축시키는 단계를 거치고 나면, 최종적으로 미생물의 대사산물인 생리활성물질이 풍부한 생물활성수(BM)가 완성된다(Kawamoto 1996; Nagasaki 1998).

돼지노 처리수(BM)의 수질 분석

본 연구에 이용된 생물활성수는 춘천 소양강 BM농장에서 돼지노 정화 플랜트 시설에서 최종 정화된 처리수(BM)로서 미세조류의 배지로 이용하기 전에 돼지노의 원수와 처리수의 수질을 분석하였다. 탁도는 디지털 탁도계(2100N, HACH, Korea)로 측정하였고, 수소이온농도, DO와 수온은 pH/DO Meter(D-55, Horiba, Japan), 전기전도도는 712 전기전도계(Metrohm, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

COD, SS, T-N와 T-P는 수질오염공정시험방법에 준하여 분석하였다(환경부 2001). BM의 원수와 처리수의 중금속(Fe, Mg, Cu, Ti, Mn) 변화량을 측정하기 위한 정량 및 정성 분석은 시료를 적당량 채취하여 4 mL의 H₂O₂와 3 mL의 HNO₃를 첨가하여 microwave를 이용해서 분해한 후, 2-3% HNO₃로 희석하여 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer(ICP-MS)(PQ3, VG, UK)로 분석하였다(Kim and Smith 2001).

Table 2. Physico-chemical characteristics of BM (bactareia mineral water) originated from the BM farm of Chunchon, Korea

Physio-chemical elements	Samples		
	Wastewater (Swine urine)	Fermentation for 10 days	Fermentation for 40 days (BM)
COD	1560 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	270 mg L ⁻¹
SS	578 mg L ⁻¹	148.8 mg L ⁻¹	22.11 mg L ⁻¹
T-P	74 mg L ⁻¹	42.96 mg L ⁻¹	15.38 mg L ⁻¹
T-N	3510.4 mg L ⁻¹	1382 mg L ⁻¹	906.1 mg L ⁻¹
Turbidity	190 NTU	53.3 NTU	3.21 NTU
pH	8.49	6.04	5.68
DO	0.05 mg L ⁻¹	1.16 mg L ⁻¹	11.86 mg L ⁻¹
Conductivity	13.3 mS cm ⁻¹	5.5 mS cm ⁻¹	4.1 mS cm ⁻¹

결과 및 고찰

BM의 수질 변화

축산폐수의 원수인 돼지뇨는 40일간 발효과정을 거친 최종 처리수인 BM을 춘천 BM농장에서 분양받았다. 토양미생물(방선균, 야생효모)에 의해 발효되기 이전의 원수, 10일간 발효된 시료, 40일간 발효된 시료(Kawamoto 1996)를 각각 적당량 채취하여 수질을 비교 분석하였다(Table 2). 원수의 COD는 1,560 mg L⁻¹이었고, 발효 10일 후에는 500 mg L⁻¹로 68% 감소하였고, 발효 40일 후에는 270 mg L⁻¹로 원수에 비해 83%까지 감소하였다. SS(96% 감소), 탁도(98% 감소), 전기전도도(69% 감소)에서도 원수보다 발효 40일 후의 BM이 상당량 감소함을 볼 수 있고, BM의 DO는 원수에 비해 무려 237배가 증가하여 전기전도도가 감소(13.3 → 4 mS cm⁻¹)되고 수소이온농도가 산성화(8.5 → 5.7)됨에 따라 원수에 비해 최종 처리수인 BM의 화학반응이 산성을 띄면서 수질이 정화되었음을 시사한다. 총 질소의 양은 원수에서 3510 mg L⁻¹, 발효 10일 후에 1382 mg L⁻¹로 61%가 감소하였고, 발효 40일 후에는 906 mg L⁻¹로 75%가 감소하였다. 총 인은 원수에서는 74 mg L⁻¹, 발효 10일 후에는 43 mg L⁻¹로 42% 감소하였고, 발효 40일 후에는 15 mg L⁻¹로 80%가 감소하였다. 이는 원수가 토양미생물에 의해 발효되는 과정에서 미생물이 돼지뇨에 포함된 질소나 인 등으로 구성된 유기물질을 천연 킬레이팅제를 비롯한 또 다른 유기산으로 분해과정을 거치는 것으로 사료된다.

원수와 처리수인 BM의 중금속 정량 및 정성 분석결과를 보면, Cu와 Fe 함량은 원수에서 발효과정을 거치면서 감소하고, Mg와 Mn은 높아졌다(Table 3). 특히 Mg 함량이 원수보다 발효수에서 발효 10일과 40일에서 각각 15배와 12배로 증가하였다. 미세조류의 엽록소를 구성하는 Mg 이온은 4개의 피롤(pyrrole) 중 하나의 피롤 내에 구성된 질소와 착이온으로 킬레이팅된 중심 금속이온으로 광합성의 광화학 반응에서 산화환원 전위가 조절되어 명반응의 에너지 형성

Table 3. Variation of heavy metal concentrations in original swine urine and treated BM

Elements	Wastewater	Fermentation for 10 days	Fermentation for 40 days
Cu	0.30 (mg kg ⁻¹)	0.27	0.23
Fe	2.29	1.36	0.51
Mg	1.48	22.62	18.3
Mn	0	0.10	0.19
Ti	0.16	0.19	0.11

에 중요한 기능을 한다(Kim and Thomas 1991; 이 등 2004). 따라서 BM은 미세조류의 엽록소 합성을 유도할 수 있는 착이온이 다량 함유된 것이 확인되고, BM 내에 Mg 이온의 증가는 미세조류가 엽록소 합성을 용이하게 하는 인자로 작용한다고 본다. Fe 이온은 돼지뇨인 축산폐수를 10일 발효 시에 41% 감소되었고, 40일간 발효된 BM은 78%로 감소되었다. 이 결과는 원수보다 다량의 Fe 이온의 감소는 Fe 이온이 미생물이 생산한 제2차 대사산물과 결합하여 EDTA의 기능을 대신하는 천연 킬레이팅제 합성에 사용된 것으로 사료된다.

BM 농도에 따른 세포의 생장을 변화

해산 미세조류 *Chlorella ovalis*의 세포밀도는 EDTA가 첨가된 대조구 배지인 f/2 배지(Table 1)에 비해 f/2에 BM이 3%를 첨가한 배지(E+3)에서 성장한 세포분열 속도와 세포밀도가 증가(1.1배)한 반면에 f/2에 BM이 6%를 첨가한 배지(E+6)에서 성장한 세포는 오히려 감소되었다(0.6배)(Fig. 1, Table 4). 이 결과는 *Phaeodactylum tricornumtum* 고효율 배양을 위한 적정배지가 3% BM을 추가한 특허배지(김 2005, 특허번호 제0500333호)와 동일한 결과를 얻었다. 반면에 f/2 배지에서 EDTA를 제거한 -E+3, -E+6 배양액에서 배양 14일간 세포밀도는 EDTA와 BM이 동일 농도로 추가된 배지에서 성장한 세포에 비해 높았다(각각 2.5배와 1.8배)(Fig. 2). *C. ovalis*의 세포는 BM 추가농도가 높은 배지(30-50%)에서 생장률이 훨씬 높았다(-E+30: 8배; -E+40: 9배; -E+50:

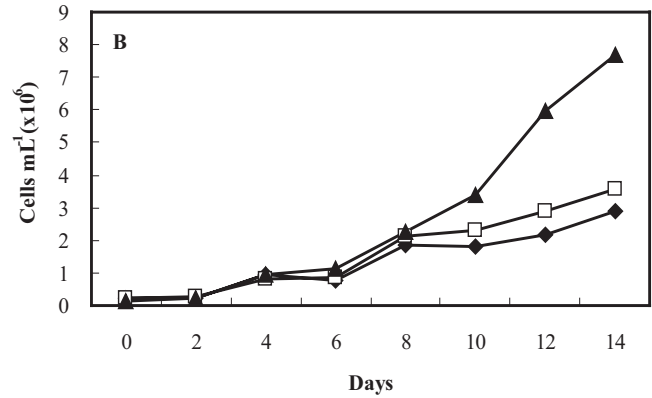
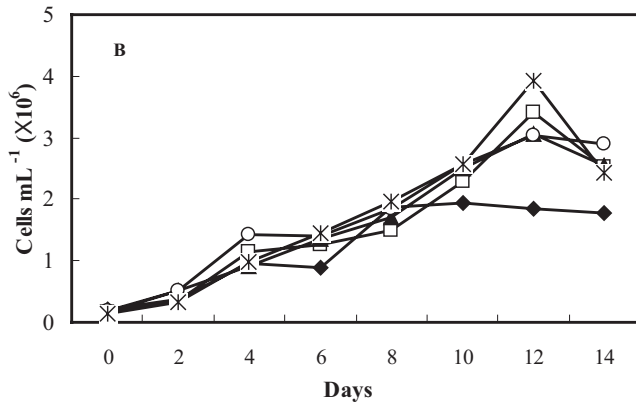
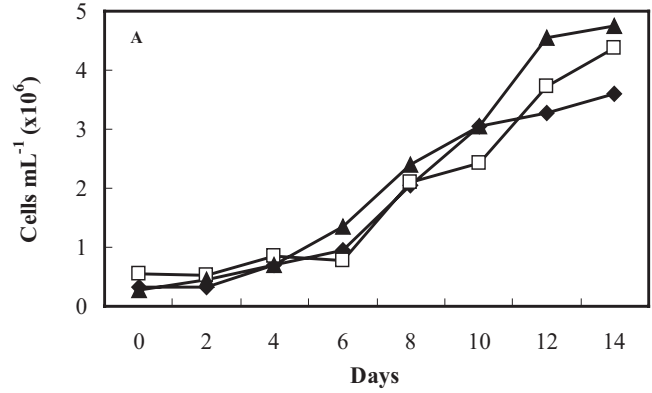
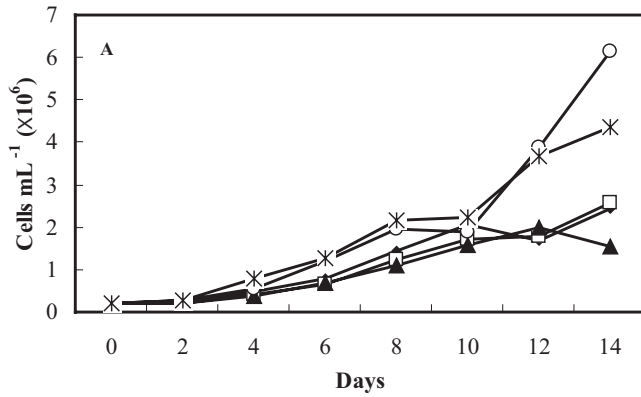


Fig. 1. Variation of cellular division rates of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunaliella parva* (B) cultured in each medium.

Fig. 2. Variation of cellular division rates of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunaliella parva* (B) cultured in each medium.

Table 4. Variation of cellular division rates and cell densities of *Chlorella ovalis* and *Dunaliella parva* cultured for 14 days in each medium

Media	Division rates and cell densities of microalgae			
	<i>C. ovalis</i> ($k \text{ day}^{-1}$)	Cells mL^{-1}	<i>D. parva</i> ($k \text{ day}^{-1}$)	Cells mL^{-1}
f/2 (control)	0.25	2,420,000	0.23	1,786,667
f/2+BM3% (E+3)	0.26	2,576,667	0.28	2,530,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM3% (-E+3)	0.21	6,156,667	0.28	2,886,667
f/2+BM6% (E+6)	0.35	1,536,667	0.28	2,550,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM6% (-E+6)	0.31	4,343,333	0.29	2,423,333
f/2-E (control)	0.24	3,590,000	0.26	2,880,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM10% (-E+10)	0.21	4,373,333	0.27	3,583,333
f/2-Na ₂ EDTA+BM20% (-E+20)	0.29	4,756,667	0.40	7,686,667
f/2-E (control)	0.14	1,080,000	0.11	2,095,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM30% (-E+30)	0.30	8,660,000	0.21	5,315,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM40% (-E+40)	0.37	10,020,000	0.20	5,950,000
f/2-Na ₂ EDTA+BM50% (-E+50)	0.42	19,980,000	0.35	13,605,000

19배)(Fig. 3). 반면에 *Dunaliella parva*는 BM 추가 농도가 3-5% 범위에서는 세포밀도의 큰 변화가 없었으나 EDTA가 제거된 -E+3 배지에서 성장한 세포밀도가 2.9×10^6 cells mL^{-1} 로 가장 높게 나타났다. -E+10 배지에서는 두 미세조류가 f/2 대조구 배지에 비해 각각 1.21배와 1.24배로 비슷한

증가율을 보였으나 -E+20 배지에서는 f/2 대조구 배지에서 성장한 *C. ovalis*(1.3배)보다 *D. parva*(3배)의 세포 증가율이 훨씬 높았다(Fig. 2). *D. parva*는 *C. ovalis*에 비해 BM 추가 농도 증가치에 따른 세포 분열율이 낮았으나 EDTA가 제거되고, BM의 추가농도가 증가할수록 *C. ovalis*의 세포와 같이 세

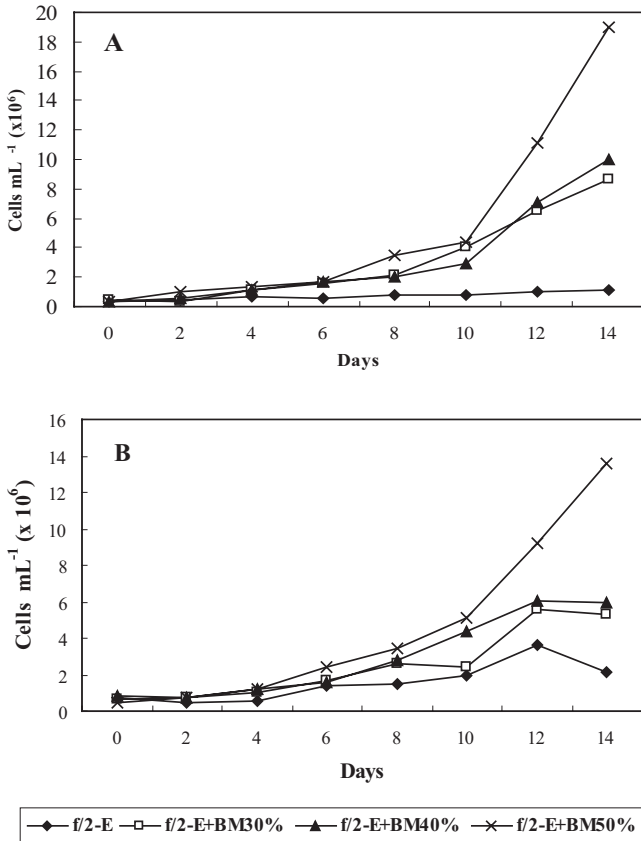


Fig. 3. Variation of cell densities of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunaliella parva* (B) cultured in each medium.

포의 밀도가 증가되었다(2.5 → 6.5배). 따라서 EDTA가 제거되고 BM이 50% 첨가된 배지(-E+50)에서 14일간 배양된 *C. ovalis*의 세포분열 속도는 0.42 day⁻¹였고, 세포밀도는 2 × 10⁷ cells mL⁻¹로써 가장 높은 생체량을 나타냈다(Fig. 3).

이 결과는 임 등(1998)이 해산 *Chlorella*의 광생물반응기 시스템을 이용한 대량생산 연구의 배양조건인 25°C에서 세포의 분열속도가 0.29 day⁻¹에 비해 본 연구에서 *C. ovalis*의 세포분열 속도가 빠르다는 것을 알 수 있다. f/2배지에 EDTA가 제거되고 50% BM을 추가한 -E+50배지가 *C. ovalis*와 *D. parva*의 배양의 최적배지였고, BM이 화학합성 EDTA의 역할을 대신할 수 있다는 결과를 얻었을뿐만 아니라 f/2배지에서 배양된 두 녹조류에서 보다 최고 19배(*C. ovalis*)와 7배(*D. parva*)의 세포분열 속도를 증가시키기에 따라 미세조류의 산업화와 수질정화 및 대기의 CO₂ 제어 실용화 기술 및 먹이생물 산업화를 위한 대량생산에 적용이 가능하리라 판단된다.

엽록소 a의 함량 변화

엽록소 a는 미세조류가 광합성 작용을 통해 빛에너지에서 생체에너지로 변환하는 매개체이고, 수계 소비자인 동물플랑크톤과 어류의 먹이가 되는 1차 생산자로서 수계 생태계의

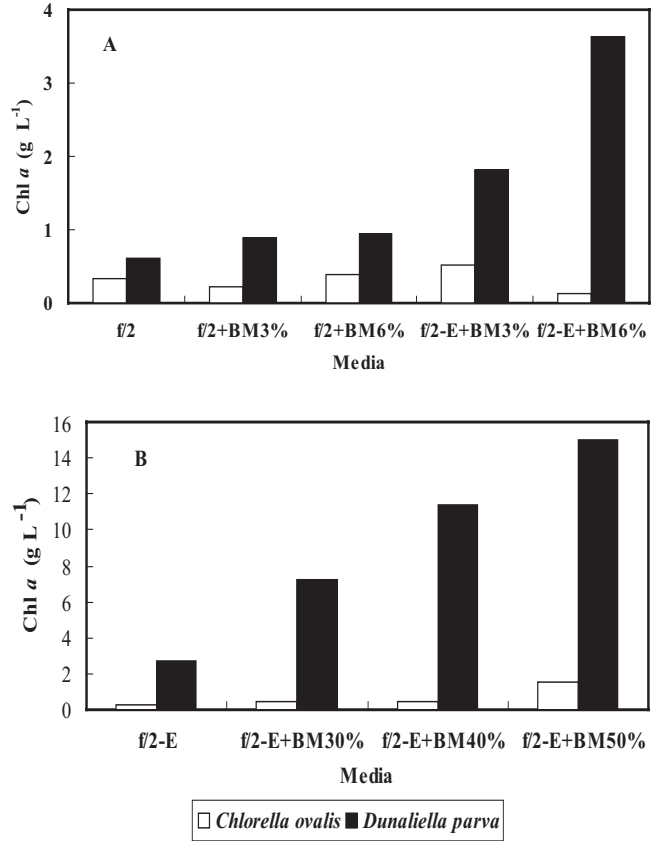


Fig. 4. Variation of chlorophyll a of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunaliella parva* (B) cultured for 27 days in each medium.

흐름과 수환경을 파악할 수 있는 지표물질이 된다(김과 김 1999; 이 등 2004). 미세조류의 1차 생산력을 분석하기 위해 엽록소 a의 함량변화를 미세조류의 세포밀도 변화와 서로 비교 검토하였다(Fig. 4). 엽록소 a는 배양 27일째 색소 함량을 비교 분석한 결과, 배지에 EDTA 유무에 따라 엽록소 a의 함량이 차별화되어 나타났다. *C. ovalis*의 엽록소 a의 농도는 -E+3 → E+6 → f/2 → E+3 → -E+6 배지 순으로 엽록소 α의 농도가 저하되었다. EDTA가 제거되고 3% BM이 추가된 -E+3 배지에서 523 mg L⁻¹으로 가장 높았다. *D. parva*의 엽록소 a 함량이 -E+6 → -E+3 → E+6 → E+3 → f/2 배지 순으로 감소하였고, EDTA가 제거된 BM이 6% 추가된 -E+6 배지에서 3,637 mg L⁻¹로 가장 높았는데, *D. parva*의 최고 엽록소 a의 농도 비는 *C. ovalis*에 비해 7배가 높았다. *D. parva*의 엽록소 a 함량이 세포밀도가 가장 높은 배지(-E+3)에서 보다 -E+6 배지에서 엽록소 a 함량이 가장 높게 나타난 이유는 이 배양 시기에 엽록소 a의 합성률이 세포의 단위당 증가하였기 때문으로 사료된다. 따라서 두 녹조류는 세포밀도의 변화에서처럼 f/2배지에서 EDTA를 제거한 배지에서 엽록소 a의 합성률이 증가함을 보여준다(Fig. 4A). BM의 농도를 증가시킨 *C. ovalis*의 엽록소 a의 함량은 -E+50에서 1,527 mg L⁻¹로 가장 높았고, *D. parva*의 엽록소 a 함량도

-E+50에서 15,004 mg L⁻¹로 가장 높았다(Fig. 4B). 이 두 종의 엽록소 a의 농도비는 10배가 나타나 EDTA를 제거한 배지에 BM의 농도가 증가할수록 *C. ovalis*에 비해 *D. parva*의 엽록소 a 합성률에 더 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다. 세포 세포분열이 왕성한 시기인 배양 14일째, -E+40과 -E+50 배지에서 배양된 *C. ovalis*의 성장률과 세포밀도가 *D. parva*에 비해 훨씬 높았지만, 세포분열이 정체기에 접어드는 시기인 배양 27일째에는 *D. parva*의 엽록소 a 함량이 *C. ovalis*에 비해 -E+40배지에서는 25배나 증가하였고, -E+50 배지에서는 10배가 증가하였다. 이는 *D. parva*의 평균 세포 직경(약 12 μm)(John et al. 2002)이 *C. ovalis*(약 3 μm)보다 크기 때문에 *D. parva*가 세포의 표면적이 큰 관계로 세포 성장률은 *C. ovalis*에 비해 낮았지만, 한 개의 세포 단위면적당 엽록소 a의 함량이 월등히 증가하였다. 이는 -E+50배지에 첨가된 천연 킬레이팅제의 조성물질과 Mg 이온이 *D. parva*의 엽록소 합성을 증가시킨 것으로 주된 요인으로 작용하였기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 두 녹조류의 엽록소 a의 최적 합성 배지는 EDTA를 제거하고 50%의 BM을 추가한 -E+50 배지가 가장 효율성이 뛰어난 BM 조성물로 나타났다.

최대광합성 효율비교

1차 생산력을 측정하기 위해 기존의 실험 방법에 의한 엽록소 a 농도나 미세조류의 현존량 측정방법이 있다. 하지만 400-1,000배율의 광학현미경에서 미세조류의 검정이 불가능한 직경이 극히 작은 미세조류나 picoplankton의 관찰은 고전적 방법으로 한계가 있다. 이런 실험상의 한계를 극복하기 위해 Phytoplankton Analyzer인 Phyto-PAM(식물플랑크톤형광유도 측정기기)를 이용하였다.

Phyto-PAM은 미세조류를 암적응 시에 유도된 엽록소 a의 형광에너지를 극초단위로 측정하는 특수 장비로서 470 nm(blue filter를 통한 광수용색소가 엽록소 b일 경우), 535 nm(green filter를 통한 광수용색소가 carotenoids일 경우), 620 nm 파장(orange filter를 통한 광수용색소가 남색소일 경우)에서 형광값의 역치를 측정하여 *C. ovalis*와 *D. parva*의 광계II에서 최고 광합성 효율을 측정하였다(Walz 1999). 배양 27일 후에 *C. ovalis*는 f/2, E+3, E+6, -E+3, -E+6 배지에서 배양된 세포의 각 파장에서 동일한 유형을 나타냈으나(Fig. 5A), *D. parva*는 배지의 종류에 따라 535 nm와 620 nm의 최대광양자수가 증가하는 반면에 470 nm는 감소하였다(Fig. 5B). 이는 *D. parva*의 세포가 배지 조성에 따라 총색소 함량 중에 보조색소인 엽록소 b에 의한 광수용 색소 안테나(light harvesting pigment antenna)보다 carotenoid에 의한 광수용 색소가 증가하여 광합성 효율이 증가한 것으로 판단된다. Fig. 6에서 BM이 더 많이 추가된 배지 그룹(f/2-E,

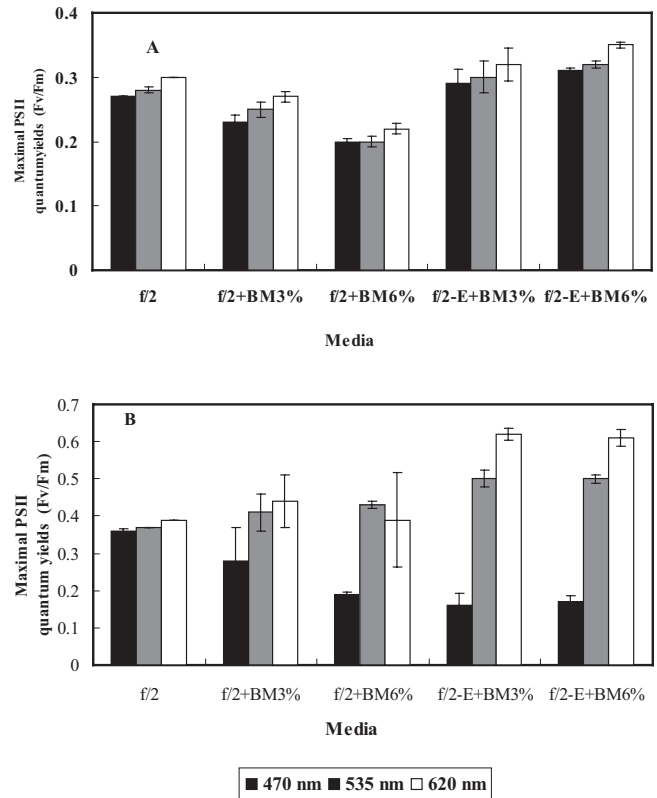


Fig. 5. Variation of maximal PSII quantum yields of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunaliella parva* (B) cultured for 27 days in each medium.

-E+30, E+40, -E+50)에서 *C. ovalis*는 470 nm에서는 -E+30 배지에서 성장한 세포가 광양자수(광합성효율)가 가장 높게 나타났고, 535 nm와 620 nm에서는 -E+40배지에서 높게 나타난 것으로 보아 배지에 BM이 추가 농도가 증가할수록 카로테노이드 광수용 색소가 증가하는 현상은 *D. parva*와 동일한 결과를 나타냈다. 이는 두 녹조류를 배양 시에 EDTA를 제거한 배지에 BM의 추가 농도를 증가시킬수록 엽록소 a 함량의 증가(Fig. 4)와 보조색소 중에 엽록소 b보다 카로테노이드에 의한 광수용 색소 안테나(Fig. 5, 6)가 더 증가하여 광합성 효율이 증가되는 경향을 나타냈다.

결론적으로 EDTA의 유무와 BM의 배지조성물에 따른 두 녹조류의 세포밀도, 엽록소 a와 파장별(470 nm, 535 nm, 620 nm) PSII의 광양자수의 결과들을 종합해 보면 f/2 대조구 배지 보다 BM이 추가된 조성물에 따라 이 성장률과 광합성률이 증가하였고, f/2 배지 조성에 추가되는 화학성분의 킬레이팅제인 Na₂EDTA를 제거시키고 BM을 50%를 추가한 배지가 가장 효율성이 높은 배지로 나타났다. 킬레이팅제는 유리 상태에 있는 금속이온과 결합함으로써 금속이온의 유해한 작용을 없애는 역할을 한다. 오늘날 EDTA는 chelation therapy의 대체의학에서 만성피로증후군, 심근육통, 루프스, 암, 관절염, 고혈압 등의 치료에 이용되나 혈중저칼슘상

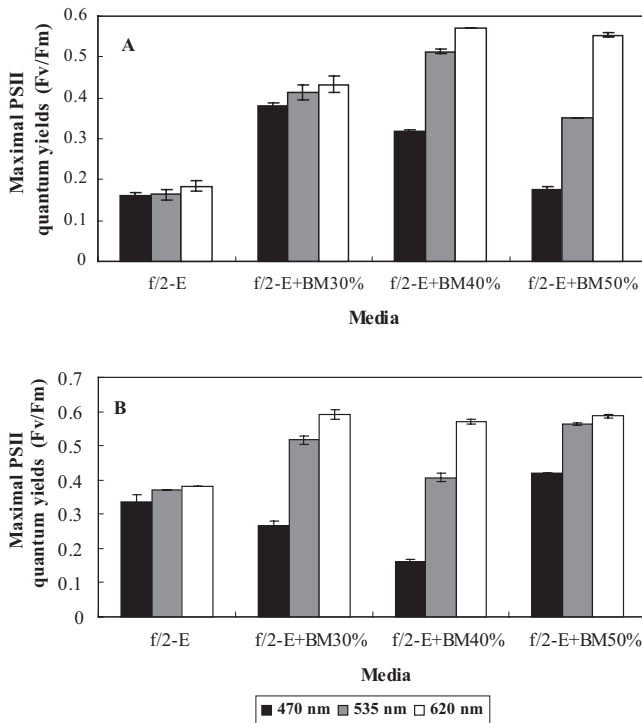


Fig. 6. Variation of maximal PSII quantum yields of *Chlorella ovalis* (A) and *Dunliella parva* (B) cultured for 27 days in each medium.

때, 알레르기, 저혈당 등과 같은 부작용이 대두되고 있고, 이러한 킬레이팅제는 유해금속에만 선택적으로 작용하는 것이 아니고 인간의 대사에 필요한 미량의 금속원소, 효소 등과도 결합하여 그 작용을 저해하여 생체에 극심한 부작용을 초래한다(<http://efilesystem.com>). 따라서 본 연구의 BM은 화학성분의 킬레이팅제가 가지는 단점을 보완할 수 있는 천연 킬레이팅 대체물질로 이용이 가능함을 입증해 준다. 같은 최적배지인 -E+50 배지에서 *C. ovalis*는 세포밀도의 증가가 19 배였고, *D. parva*는 7배가 증가하였으나, 세포 단위면적당 총 색소(엽록소 *a*, *b*와 carotenoids)의 함량 증가에 따른 광합성 효율 증가는 *D. parva*가 *C. ovalis*보다 높게 나타났으므로 CO₂ 제어 연구, 먹이생물, 환경 및 생물공학적인 생물 소재 개발을 위한 대량생산의 목적에 합당한 미세조류의 종 선택이 요구된다고 할 수 있다.

참고문헌

- 김미경, 2005. 생물활성수를 함유한 배지조성물 및 그 제조방법. 특허등록번호 제05003332호.
- 김미경, 김영환. 1999. 일반조류학. 도서출판 아카데미서적 229 pp.
- 김세권, 백호철, 변희국, 강옥주, 김종해. 2001. 해양미세조류의 생화학적 조성 및 항산화성. 한국수산학회지 34: 260-267.
- 박미경, 이석준, 서현효, 김희식, 김영호, 윤병대, 오희목. 1998. *Scenedesmus quadricauda*를 이용한 축산폐수의 고도처리. 한국

조류학회지 13: 227-233.

- 안주희, 김성수, 김태호, 이준엽, 오상집, 이진하, 이현용. 1996. 축산폐수의 효율적 처리를 위한 광합성 미세조류인 *Spirulina platensis* 배양 공정의 최적화. 산업미생물학회지 24: 519-524.
- 오희목, 이석준. 1998. 미세조류를 이용한 생물공학산업의 현황과 전망. 한국해양미세조류은행의 현황과 전망, 한국해양미세조류은행 부경대학교 수산과학연구소 Proceedings 49-65.
- 이인규, 부성민, 이상희. 2004. 조류의 다양성과 계통. 라이프 사이언스 262 pp.
- 임진영, 조만기, 한봉호. 1998. 해수산 *Chlorella*의 최적 배양 조건에 관한 연구. 한수지 31: 139-142.
- 환경부. 2001. 공정시험방법. 669 pp.
- APPA, AWWA. WEF. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Eaton A.D., Clesceri L.S. and Greenberg A.E. (eds), Baltimore 10: 157 pp.
- Gilberst E. and Hoffmann-Glewe S. 1991. Ozonation of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in aqueous solution influence of pH value and metal ions. *Water Research* 24: 39-44.
- Guillard R.R.L. 1975. Division rates. In: Stein J.R. (ed), *Handbook of Phycological Methods-Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 289-311.
- Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., and Strickland J.D.H. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 30: 3-15.
- Jeffrey S.W. 1972. Preparation and some properties of crystalline chlorophyll *c*₁ and *c*₂ from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta.*, 279: 15-33.
- John D.M., Whitton B.A. and Brook A.J. 2002. *The Freshwater of Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kawamoto S. 1996. *Experiment Results of BMW Techniques in the Farm of Kamegawa*. Ecopeace Press, Daegu.
- Kim M.K., Dubacq J.P., Thomas J.C. and Giraud G. 1996. Seasonal variation of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 43: 49-55.
- Kim M.K. and Giraud G. 1989. Characters of neutral lipids of *Detonula* sp. (Diatom) in culture. *The Korean J. of Phycol.* 4: 55-61.
- Kim M.K., Park J.W., Park C.S., Jeune S.M., Kim S.J., Jeune K.H., Jang M.U. and Acreman J. 2006. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresources Technol.* (accepted).
- Kim M.K. and Smith R.E.H. 2001. Effect of ionic copper toxicity on the growth of green alga, *Selenastrum capricornutum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 211-216.
- Kim M.K. and Thomas J.C. 1991. Studies of growth according to the concentration of mineral elements of medium in Cyanophyte SG 63. *Korean J. Bot.* 35: 1-8.
- Lee K. and C.G. Lee. 2001. Effect of light/dark cycles on wastewater treatment by microalgae. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 194-199.

- Nagasaki H. 1998. *Bacteria Save the Earth Challenge of BMW Technology*, Ecopeace Press, Daegu.
- Parsons T.R. and Strickland J.D.H. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigment, with revised equation for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* **21**: 155-163.
- Shon Y.H., Nam K.S. and Kim M.K. 2004. Cancer chemopreventive potential of *Scenedesmus* cultured in medium based on swine wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 158-161.
- Sung K.D., Lee J.S., Shin C.S. and Park S.C. 1998. Enhanced cell growth of *Chlorella* sp. KR-1 by the addition of iron and EDTA. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 409-411.
- Vonshak A. 1997. *Microalgal Biotechnology; New Development in Production Facilities and Product*. Abstracts of 2nd APMBC and 3rd APCAB. Phuket, Thailand. 21 pp.
- Walz H.G. 1999. *Phytoplankton Analyzer Phyto-PAM: System Components and Principles of Operation*. Walz, Effeltrich.
-
- Received 11 July 2006
Accepted 15 August 2006

