

*Arthrospira (Spirulina) platensis*의 종속영양배양과 *r*-Linolenic Acid 생산

최강국 · 배명숙 · 박제섭¹ · 박복준¹ · 안치용 · 오히목*
한국생명공학연구원, ¹(주)대상

Growth and *r*-Linolenic Acid Production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in Heterotrophic Culture.
Choi, Gang-Guk, Myoung-Sook Bae, Je-seop Park¹, Bok-Jun Park¹, Chi-Yong Ahn, and Hee-Mock Oh*. Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea, ¹Biotechnology Laboratory, R&D Center, Daesang Corporation, Gyeonggi-do 467-813, Korea – *Arthrospira (Spirulina) platensis* is one of the commercially important filamentous cyanobacteria. The heterotrophic cultivation of *Arthrospira* can be an alternative strategy for commercial mass production. In heterotrophic culture, the specific growth rate of *A. platensis* M9108, a glucose-resistant mutant of *A. platensis* PCC 9108, was 0.014 h⁻¹ which was 1.8 higher than that of the previous report. The mutant possessed the facility to assimilate and to metabolize glucose efficiently under heterotrophic condition. However, the *r*-linolenic acid content of 6 *Arthrospira* strains was not increased in heterotrophic culture. Four *Arthrospira* strains out of 6 tested strains were able to utilize maltose as a carbon source under heterotrophic condition. The biomass production of these strains on maltose was similar to that on glucose. The specific growth rate of *A. platensis* M9108 increased with glucose concentration up to 5.0 g/L and then decreased at a glucose concentration of 10.0 g/L. Additionally, *A. platensis* M9108 under heterotrophic condition showed no aggregation during the cultivation in contrast to *A. platensis* PCC 9108.

Key words: *Arthrospira*, *r*-linolenic acid, glucose, heterotrophic cultivation

*Arthrospira*는 주로 열대와 아열대 지방의 염호에서 서식하는 나선형(spiral) 모양의 사상형 남세균(filamentous cyanobacteria)이다. 약 35억년 전에 지구상에 나타났으며, 오래 전부터 아프리카와 남미의 원주민들이 식량으로 이용하였다[11, 24]. *Arthrospira*는 섬유소가 없이 세포막으로 구성되어 있어 체내에서 소화와 흡수가 빠르고, 100 g당 498 Kcal의 열량을 지니고 있다[12]. 최근에는 *Arthrospira*를 구성하는 성분인 carotenoid 색소와 phycocyanin, calcium spirulan, α -tocopherol, novel sulfated polysaccharide 등이 항암 효과 및 항노화, 색소 및 종양 전이 억제, 항산화와 염증 방지에 대한 효능이 보고되고 있다[7, 10]. 특히, *Arthrospira* 균체의 60~75%가 단백질로 구성되어 주요한 단백질원으로 이용될 수 있고, 지질은 GLA(*r*-linolenic acid, C18:3)의 함량이 높아 생리활성물질로도 이용 가능하다[3, 20]. 현재 *Arthrospira*의 추출물은 식품 첨가물, 화학약품, 그리고 의약품으로 이용되고 있으며[1, 4], 생물량은 건강보조 식품과 어류 및 가축의 사료로 이용되고 있다[17]. 일부의 *Arthrospira* 균주는 Spirulina라는 상호를 가지고 전세계적으로 판매되고 있어 상업적으로 매우 중요하다.

*Arthrospira*의 산업적 생산은 1978년 Dainippon Ink & Chemicals(DIC)가 태국의 방콕에서 처음으로 시작하였다. 1983년부터는 미국 캘리포니아에 위치한 Earthrise Farms에서도 *Arthrospira*를 생산하기 시작하였다. 미국의 캘리포니아와 하와이에서 연간 400톤씩 생산된다. 또한 중국과 인도 / 방글라데시에서는 1996년 이후에 생산량을 급격히 늘려 1999년에는 연간 780톤과 360톤을 생산하고 있다. 이들 나라에서 생산하는 biomass는 전세계 생산량의 70%를 차지하고 있다[8]. 미국의 하와이에 있는 Cyanotech은 2000년에 6백만 달러 이상의 판매고를 올렸으며, 해마다 20%의 신장률을 보이고 있다. 또한 전세계의 Spirulina 시장은 약 3천만 달러의 규모로 추산되고 있다.

유용한 물질을 함유하고 있고 생산성이 높으며 수확 및 처리 방법이 용이한 미세조류의 배양과 이용에 대한 연구는 국외에서는 다양하게 이루어졌으나[3, 5], 국내의 경우 자연 환경이 미세조류의 배양에 적합하지 못하여 활발한 연구가 이루어지지 않았다. 그러나 최근에는 미세조류의 실내 배양 장치 개발 및 물질 생산을 위한 기초적인 연구가 행해지고 있다[9, 21]. 일반적으로 *Arthrospira*를 포함하여 산업적으로 경제성이 큰 미세조류 대량배양 방법은 크게 개방형 배양계(open culture system)와 밀폐형 광생물반응기(closed photobioreactor)를 사용하고 있다. 개방형 배양계는 운전비나 유지비가 저렴하고 단순한 화학적 합성법 등의 다른 생

*Corresponding author
Tel: 82-42-860-4321, Fax 82-42-860-4594
E-mail: heemock@kribb.re.kr

산 방법들에 비하여 경쟁력을 가지나 외부 오염원에 노출되어 생산성을 저하시키거나 제품의 질을 떨어뜨리는 단점을 가지고 있다. 반면 밀폐형 광생물반응기는 외부의 환경과 격리되어 오염에 의한 영향을 받지 않아 고가의 생리활성물질을 생산하는 특정 미세조류 배양의 목적으로 이용되고 있다. 그러나 밀폐형 광생물반응기는 설치비, 유지비와 설치공간이 많이 들어가는 단점이 있다.

종속영양배양의 장점은 외부 오염에 대한 문제를 극복할 수 있으며, 유기탄소원을 이용할 수 있기 때문에 증식속도를 증가시켜 고농도의 배양이 가능하다. 또한 유기탄소원을 이용한 종속영양배양의 경우, 빛을 공급하기 위한 광조절 장치가 필요 없으며, 미세조류의 고밀도 배양과 batch system의 대량 생산이 가능하다. 또한 고농도 배양 기술 즉, fed-batch culture, chemostat culture와 membrane recycle systems을 이용하면 미세조류의 농도를 높일 수 있다. 또한 고농도 배양시 발생하는 광차단에 의한 성장 저해에 영향을 받지 않고 배양할 수 있는 장점이 있다. 따라서 빛을 이용하지 않고 배양할 수 있는 종속영양배양법을 개발하기 위한 기초적인 연구가 필수적이다.

본 연구에서는 산업적으로 이용가치가 높은 것으로 확인된 *Arthrospira*를 대상으로 종속영양배양 조건에 적합한 종을 선별하고, 최적의 탄소원을 선별하였으며, 적당한 배양 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 배양 배지

본 연구에 사용된 *Arthrospira* 균주는 Table 1에서 나타내었다. *A. platensis* M9108은 *A. platensis* PCC 9108를 UV 처리하여 고농도 glucose(40 g/L)에 대한 내성을 가진 돌연변이주이고, *A. platensis* KCTC AG20590은 국내에서 분리된 토착균주이다.

*Arthrospira*의 배양은 알칼리성 무기 배지인 SOT 배지[19]를 사용하였으며, 1 liter의 조성은 다음과 같다: NaHCO₃ 16.8 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaNO₃ 2.5 g, K₂SO₄ 1.0 g,

NaCl 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.04 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, Na₂ EDTA 0.081 g, 1 mL의 A5 trace solution. A5 trace solution의 1 liter 조성은 H₃BO₃ 2.86 g, MnSO₄ · 7H₂O 2.5 g, ZnSO₄ · 7H₂O 222 mg, CuSO₄ · 5H₂O 79 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 21 mg이다.

배양 조건

종균배양을 위하여 SOT 배지를 250-mL Erlenmeyer flask에 50 mL 넣고, 광도 100 μmol photons/m²/s, 온도 30±1°C를 유지하며 125 rpm으로 진탕하며 배양한 후 10일 마다 계대배양하여 실험에 사용하였다. 종속영양배양은 SOT 배지에 유기 탄소원을 실험조건에 따라 첨가하여 사용하였고, Erlenmeyer flask를 호일로 감싸서 빛을 차단하였으며, 종균배양 조건과 동일하게 배양하였다.

탄소원 선별을 위하여 14가지 탄소원(acetate, casamino acid, fructose, galactose, glycerol, lactose, mannose, ribose, ribose + casamino acid, starch, sucrose, xylose, glucose, maltose)을 사용하였다. 탄소원의 농도별 최적의 성장을 보기 위한 실험에서는 glucose와 maltose를 각각 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 g/L의 농도로 SOT 배지에 첨가하여 사용하여 종속영양배양을 실시하였다. 배지 최적화를 위한 실험에서는 다양한 조성의 배지를 사용하여 종속영양배양을 실시하였다.

분석 방법

성장 곡선은 Spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecacy Ltd., Korea)를 이용하여 680 nm에서 측정된 Optical density (OD) 값과 건조 건조 균체량과의 상관식을 이용하여 계산하였으며, 상관식은 $Y = 0.542 X + 0.005$ ($r^2 = 0.994$, X: Optical density, Y: Dry weight)였다. 이 때 시료의 OD값이 1을 초과할 경우 적절하게 희석하여 측정하였다. 아울러 건조 균체량은 25 mm Whatman GF/C filter paper (Whatman, UK)로 배양액 1 mL을 여과하여 여지를 건조기 (100°C)에서 1시간 건조 후 얻어진 건조무게로부터 건조 균체량을 계산하였다. 성장률(μ)은 $(\ln N_t - \ln N_0)/(t-t_0)$ 의 식으로 구하였다[23].

Table 1. *Arthrospira* strains used in this study.

Source	Strain	Name	Origin
NIES	39	<i>Arthrospira platensis</i>	Chad lake, Chad
SAG	21.99	<i>Arthrospira platensis</i>	Walfishbay, Lagune, Namibia
PCC	9108	<i>Arthrospira platensis</i>	Commercial culture facility, Cheng-hai, Yunnan, China
	M9108	<i>Arthrospira platensis</i>	In this study
KCTC	AG20590	<i>Arthrospira platensis</i>	Jeju, Korea
SAG	49.88	<i>Arthrospira maxima</i>	Italy

KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Korea.

NIES: National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

PCC: Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains, Paris, France.

SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen, Germany.

총 지질은 Bligh와 Dyer의 방법[2]을 변형하여 사용하였다. 지질의 분획은 chloroform-methanol(2:1, vol/vol)을 사용하여 용출하고, 물을 총 부피의 2/5를 첨가하여 형성된 chloroform 층을 회수한 후, evaporator를 사용하여 chloroform을 증발시키고 남은 지질의 무게를 측정하였다.

지방산 조성 분석은 Lepage와 Roy의 방법[13]을 따랐다. 건조 건체량 10 mg을 뚜껑이 있는 시험관에 넣고, 포화된 KOH-CH₃OH 용액 1 mL을 가하고 75°C에서 10분간 반응하여 비누화한 후, 5% HCl을 1 mL 가하고 75°C에서 10분간 반응하여 메틸화하였다. 증류수 2 mL을 첨가하여 층을 분리한 후 지방산이 녹아있는 층을 회수하였다. Flame ionization detector가 부착된 Gaschromatography(HP 5890A, HP, USA)를 사용하여 분석을 수행하였다. 지방산의 분리를 위한 컬럼은 ED-WAX(25 m×Φ 0.32 mm)를 사용하였다. Injector와 detector의 온도는 250°C(split ratio 99:1)로 하고, 이동상 기체는 질소를 2 mL/min의 속도로 흘려 보냈다. 주입량은 1 µL로 하였으며, 오븐 온도는 80°C에서 시작하여 1분에 10°C씩 증가시켜 200°C까지 올리고 5분간 유지하였다. 조성물의 확인 표준물질의 머무름 시간과 분획 모양을 보고 판단하였다.

결과 및 고찰

Arthrospira spp. 성장률

종속영양배양이 우수한 균주를 선별하기 위하여 SOT배지에 유기탄소원으로 glucose를 첨가하여 8일 동안 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 균주에 따른 성장의 차이가 뚜렷하였으나, 첨가된 glucose 농도 (1.0과 5.0 g/L)에 따른 성장은 큰 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 Marquez 등의 Arthrospira를 이용한 종속영양배양 실험에서도 glucose의 농도에 따른 차이가 없는 결과[15]와 일치하였다. 또한 glucose의 농도에 따른 이용 효율에 변화가 없었으며, glucose가 고갈되는 시점까지 지속적으로 성장하는 결과를 보였다. 그러나 본 실험에서는 배양기간이 짧아 정점까지의 결과는 얻지 못하였다. 또한 실험한 모든 균주에서 SOT배지만을 사용하여 종속영양배양한 결과 성장이 전혀 일어나지 않았다(data not shown).

본 실험에서 사용한 6종의 Arthrospira 중 A. platensis M9108(A. platensis PCC 9108의 고농도 glucose 내성 돌연변이)의 경우, glucose 5 g/L를 첨가한 조건에서 9일 동안 배양하여 생물량은 0.54 g/L이었으며, 일일생산량은 0.068 g/L/day를 보였다. 이는 이전 실험에서 얻은 0.052 g/L/day[14]보다 1.3배 향상된 결과이다. A. platensis NIES 39와 A. platensis KCTC AG20590의 경우 다른 균주에 비하여 성장이 상당히 느렸다. 두 균주를 8일간 배양한 결과, 생물량은 A. platensis M9108 생물량의 45%에 머물렀다. A. maxima SAG 49.88의 경우, 초기의 성장은 A. platensis

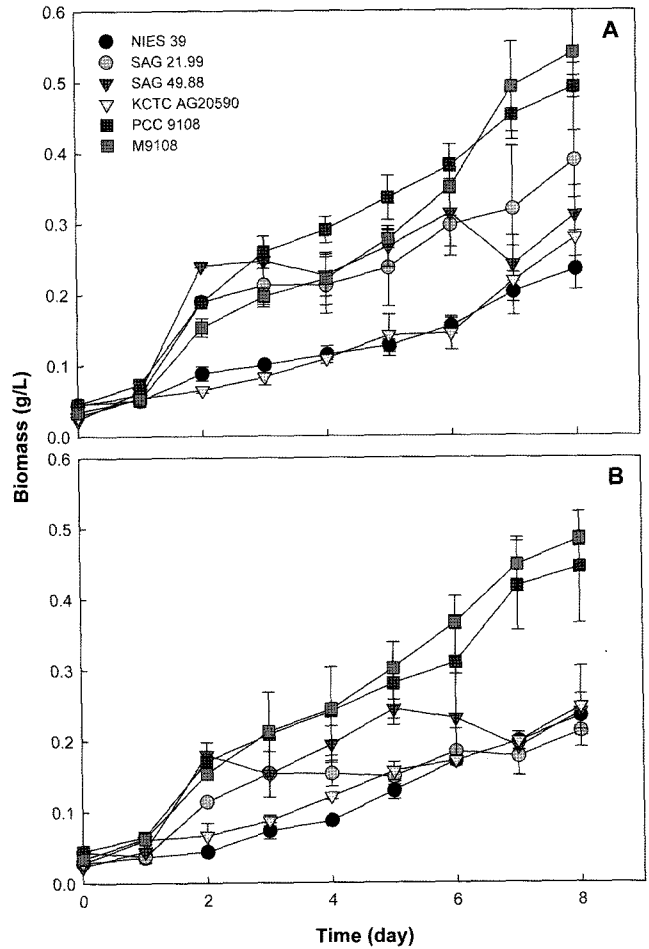


Fig. 1. Growth Arthrospira strains in various glucose concentrations of SOT + glucose 0.5% (A) and SOT + glucose 0.1% (B). The cultures were incubated at 30°C on a shaker at 120 rpm under heterotrophic condition.

M9108과 비슷하였으나, 배양 6일 이후에 정치기를 거치면서 8일째 생물량은 상대적으로 적었다.

A. platensis M9108의 8일간 종속영양배양을 통하여 얻은 생물량(0.54 g/L)의 경우 독립영양배양한 결과에 비하여 1/3 수준이었다. 이는 Arthrospira의 specific growth rate(μ)가 독립영양배양의 경우에 비하여 1/3이 수준으로 느리기 때문이다. 종속영양배양에서 탄소원의 공급량을 늘려도 생산성의 향상이 한계를 보이는 이유는 μ 가 낮기 때문이라고 사료된다.

Glucose의 농도에 따른 μ 의 차이는 거의 없었으나, 균주 간에는 μ 의 차이를 보였다(Table 2). 고농도의 glucose에 내성을 가진 A. platensis M9108의 경우, glucose 5.0 g/L이 첨가된 조건에서 μ 는 0.014/h를 보여 A. platensis PCC 9108의 μ 0.012/h에 비하여 1.2 배 높았다. 이와 같은 결과는 A. platensis M9108의 경우 고농도 glucose에 내성을 지닌 돌연변이로서 glucose의 이용능이 향상된 것으로 판단된다.

Table 2. Specific growth rates (μ) of *Arthrospira* strains during heterotrophic cultivation with different glucose concentration^a.

Strains	Glucose concentration (g/L)	
	1.0	5.0
NIES 39	0.0110	0.0085
SAG 49.88	0.0082	0.0114
SAG 21.99	0.0121	0.0135
KCTC AG20590	0.0113	0.0119
PCC 9108	0.0119	0.0125
M9108	0.0138	0.0144

^aThe cultures were incubated at 30°C under dark condition on a shaking at 120 rpm for 8 days.

The μ was calculation from the data shown in Fig. 2.

다. 또한 Chen과 Zhang이 제시한 μ 값 0.008/h[4]에 비하여 1.8배 높았다. 그러나 *Chlorella vulgaris*의 μ 값 0.098/h[18] 보다는 낮은 값이었다.

*Arthrospira*의 종속영양배양에 대한 연구의 흐름은 다음과 같다. Ogawa와 Terui는 광도를 증가 시킴에 따라 *A. platensis*의 성장률이 증가하였으나, 암조건에서 glucose의 농도가 0.28%까지 증가시켜도 성장이 되지 않았다고 보고하였다[19]. Tomaselli 등은 *A. maxima*의 경우 과당(fructose)을 탄소원으로 이용하여 성장이 일어난다고 발표하였다[22]. 이후 Marquez 등은 *A. platensis*의 경우에도 광합성과 종속영양적으로 성장이 일어난다고 보고하였다[15]. 최근 남세균의 상업적 생산을 위하여 종속영양배양에 대한 관심이 증가하고 있다. *Arthrospira*의 생산성 증가와 조성에 대한 연구가 활발히 진행되었으며, phycobiliprotein 함량이 증가하였다고 발표하였다[4, 14].

Arthrospira spp.의 *r*-linolenic acid 합성

본 실험에서 *Arthrospira* spp. 6종의 지방산 함량은 균주에 따라 전체량의 1.9~5.0%를 보여 상당히 다양하였다. 이와 같은 결과는 다양한 *Arthrospira* spp.의 지방산 함량이 전체량 중 1.6~5.2%를 차지한다는 결과[6]와 일치하였다. 지방산 조성 중 *r*-linolenic acid(GLA)는 20.8~29.3%를 보였으며, GLA 함량은 전체량의 0.13~1.33%를 보여 균주에 따

라 상당히 다양하였다(Table 3). *A. platensis* SAG 21.99의 경우 GLA 함량이 1.33%로 가장 높았으며, *A. platensis* PCC 9108과 M9108의 GLA 함량은 각각 0.84%와 0.63%이었다. 지방산의 함량과 조성은 이전의 결과[6]와 비슷한 양상을 보였다. 또한 *Arthrospira* spp.를 종속영양배양하여 합성한 GLA 함량은 독립영양배양을 통해서 합성된 GLA 함량과 비슷하였다. 따라서 광합성을 통하여 만들어진 유기탄소화합물과 종속영양합성을 통해서 만들어진 유기탄소원의 체내에서 지방산을 합성하는 비율이 비슷한 결과라고 사료된다.

Arthrospira spp. 성장의 최적 탄소원

Arthrospira spp.를 대상으로 종속영양배양에 가장 적합한 탄소원을 선별하기 위하여 세균과 효모의 대량 배양에 많이 사용되고 있는 14종의 탄소원(1 g/L)에 대한 이용능 실험을 수행한 결과를 Table 4에 정리하였다. *Arthrospira*의 초기 접종량을 0.029~0.038 g/L의 농도로 접종하여 종속영양 배양한 결과, 14가지 탄소원 중 3가지의 탄소원(glucose, maltose, glycerol)을 첨가해준 배지에서는 뚜렷한 성장을 보였으나, 나머지 탄소원은 이용하지 못하는 결과를 얻었다. 가장 좋은 성장을 보인 것은 *A. platensis* M9108 균주를 glucose와 maltose가 첨가된 배지에서 배양한 것으로 각각 0.41 g/L와 0.42 g/L의 생산량을 얻었다. 그러나 *A. platensis* NIES 39와 SAG 21.99는 maltose를 이용하지 못하는 결과를 보였다. Glycerol을 탄소원으로 한 실험에서는 모든 균주가 비슷한 생산량(0.15~0.23 g/L)을 얻었다. 또한 이전의 보고에서는 탄소원으로 glucose가 좋은 것으로 보고[4, 15]되었지만, 본 실험에서는 maltose도 유용한 탄소원임을 확인 할 수 있었다. 최근 35종의 *Arthrospira* 종 중 34 균주가 탄소원으로 glucose를 이용했다는 보고[16]와도 일치하였다.

Arthrospira spp. 성장의 탄소원 농도

우수균주로 선발된 *A. platensis* M9108을 대상으로 가장 좋은 탄소원인 glucose와 maltose의 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 탄소원의 농도를 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 g/L로

Table 3. Fatty acid content of *Arthrospira* strains grown in heterotrophic condition^a.

Strains	Fatty acid composition (% of total fatty acid)							Total FA (% of biomass)	GLA (% of biomass)
	16:0	16:1	16:2	18:0	18:1	18:2	18:3		
SAG 49.88	49.4	- ^b	-	-	9.6	16.2	24.9	1.94	0.13
SAG 21.99	41.9	6	2.1	1.3	1.4	15.7	29.3	4.97	1.33
KCTC AG20590	44.6	4.2	2.2	1.5	7.8	17.6	20.8	3.72	0.64
PCC 9108	44.9	3.7	2.3	1.4	8.7	13.9	22.4	4.38	0.84
M9108	46.2	2.5	2.1	1.5	8.6	15.4	23.7	3.29	0.63

^aThe cultures were incubated at 30°C under dark condition on a shaking at 120 rpm for 8 days.

^b -: not detected.

Table 4. Effect of organic carbon source on the biomass production in *Arthrospira* strains under heterotrophic condition^a.

Strains Substrates ^b	NIES 39	SAG 21.99	SAG 49.88	KCTC AG20590	PCC 9108	M9108
Acetate	N.U ^c	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Casamino acid	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Fructose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Galactose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Glucose	0.21 ^d	0.18	0.20	0.28	0.36	0.41
Glycerol	0.16	0.15	0.19	0.18	0.21	0.20
Lactose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Maltose	N.U	N.U	0.21	0.30	0.37	0.42
Mannose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Ribose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Ribose + casamino acid	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Starch	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Sucrose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U
Xylose	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U	N.U

^aThe cultures were incubated at 30°C under dark condition on a shaking at 120 rpm for 8 days.

^bSubstrates concentration (1.0 g/L).

^cN.U: no utilization.

^dBiomass (g/L).

SOT배지에 첨가하여 종속영양배양을 실시하였다. *A. platensis* M9108의 경우, 첨가된 glucose의 농도가 5.0 g/L까지는 생산량이 증가하였으나, 10.0 g/L의 glucose를 첨가해 준 경우에는 감소하였다(Fig. 2). *A. platensis* M9108을 glucose 5.0 g/L를 첨가해준 SOT배지에서 9일 동안 배양하여 0.61 g/L의 생산량을 보였으며, 일일 생산량이 0.068 g/L/day이었다. 또한 *A. platensis* M9108의 μ 는 glucose 5.0 g/L첨가한 경우에 0.012/h로 최고값을 보였다. 반면 maltose를 첨가해 준 경우에는 1.0 g/L에서 생산량이 0.44 g/L로 가장 높았으며 maltose의 농도가 높아짐에 따라 생산량은 감소하였다. 첨가된 maltose의 농도가 증가함에 따라 μ 도 0.011/h에서 0.008/h로 감소하였다. 결론적으로 *A. platensis* M9108 균주를 사용하여 glucose를 5.0 g/L가 첨가해준 SOT 배지에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. Glucose의 농도를 5.0 g/L로 첨가해준 종속영양배양 조건에서 가장 좋다는 보고[4]와 일치하였다. 본 실험에서도 glucose의 농도를 5.0 g/L로 첨가해준 조건에서 생산성이 높게 나왔으며, 10.0 g/L로 첨가해준 경우에는 성장에 저해를 받는 것으로 나왔다.

배양 과정 중에 사상균의 경우 서로 뭉치는 현상이 발생하는데 이와 같이 뭉치는 현상이 발생하면 균체의 증식률이 감소하는 양상을 보인다. 따라서 배양 도중 뭉침을 방지할 수 있으면 생산량을 증가시키는 결과를 가져온다. 또한, 배양과정에서 *A. platensis* M9108의 큰 차이점 중 하나는 배양 중간에 *A. platensis* PCC 9108은 서로 뭉쳐서 덩어리를 형성하지만 *A. platensis* M9108은 뭉치는 현상이 전혀 발견되지 않았다(Fig. 3). 또한, 독립영양배양과 복합영양배양에서 빛은 성장의 주요한 원인인데 배양과정에서 서로 뭉치는

현상이 발생하면 빛의 공급이 원활하지 않아 성장에 방해를 받게 된다. 그러나 *A. platensis* M9108은 장기간 배양을 하여도 뭉치는 현상이 발생하지 않기 때문에 빛의 강도를 높여주면 높은 생산성을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

Arthrospira spp. 성장의 질소원

이전의 실험에서 0.1% glucose와 0.1% peptone을 첨가한 실험에서 생산량이 2배 정도 증가한 결과를 보였다고 보고되었다[19]. 따라서 본 연구에서 nutrient broth 배지와 SOT 배지에 질소원인 peptone과 yeast extract를 첨가하여 종속영양배양을 실시하였다. 모든 조건의 실험에서 SOT배지에 glucose만을 첨가해 준 실험에 비하여 모두 낮은 성장률을 보여 질소원이 *Arthrospira*의 성장에 저해 요인으로 작용하는 것을 보였다(Fig. 4). 특히, nutrient broth 배지를 사용한 경우 4일 이내에 사멸하는 양상을 보여, 고농도의 배지 성분은 *Arthrospira* spp.의 성장을 저해하였다.

미세조류의 종속영양배양은 광배양장치를 사용하지 않으며, 미세조류의 농도와 생산성을 높일 수 있는 가능성을 제시하고 있지만 실제 산업적으로 종속영양배양을 실시하고 있는 것은 *Chlorella*만이 시도되고 있다. 이와 같은 현상은 미세조류의 종속영양 성장에 대한 기작과 만들어지는 산물에 대한 이해가 부족하기 때문이다. 종속영양배양이 가능한 종의 광범위한 탐색이 필요하며 생화학적 그리고 물리적 특성에 대한 연구가 절실하다. 미세조류는 세균이나 효모에 비하여 상대적으로 낮은 농도의 유기탄소원에 대한 내성을 가지고 있기 때문에 기질의 농도를 낮게 유지할 수 있는 고농도 배양 방법의 개발도 절실하다.

본 연구에서는 *A. platensis* M9108의 경우, 고농도의

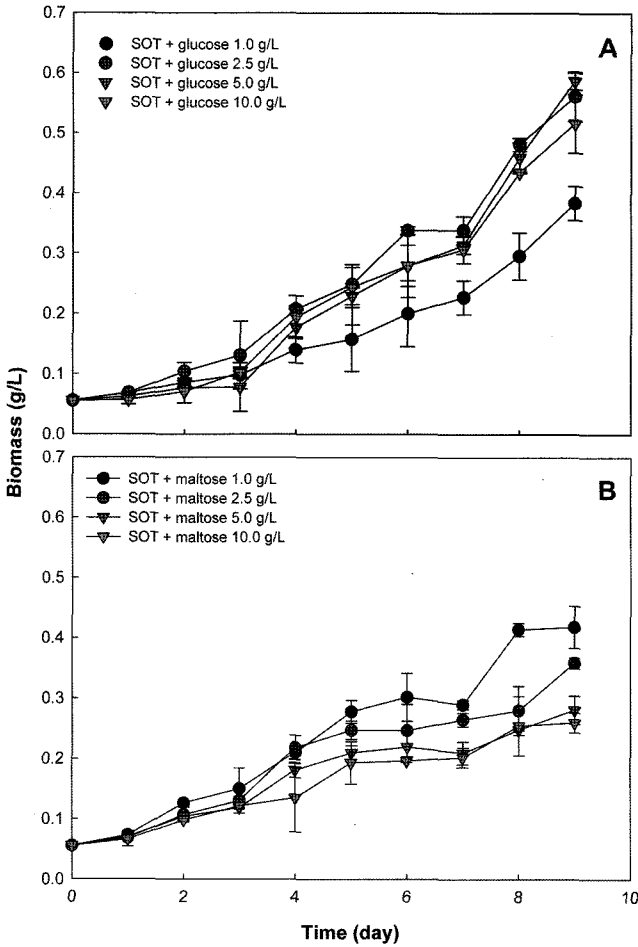


Fig. 2. Time courses of biomass of *Arthrospira platensis* M9108 in various concentrations of glucose (A) and maltose (B) in SOT medium. The cultures were incubated at 30°C on a shaker at 120 rpm under heterotrophic condition.

glucose에 대한 내성을 보인 돌연변이가 glucose를 이용한 종속영양배양에서 좋은 결과를 얻었으며, 기존의 결과와 비교하여 상당히 높은 값을 얻었다. 따라서 종속영양배양을 위한 균주로 적절하다고 판단된다.

요 약

*Arthrospira*에 대한 종속영양배양 결과, *A. platensis* M9108(*A. platensis* PCC 9108의 고농도 glucose 내성 돌연변이)은 glucose 5.0 g/L 첨가된 SOT 배지에서 8일 동안 배양하여 0.54 g/L의 생물량을 얻었으며, 일일생산량은 0.068 g/L/day를 보였고, specific growth rate(μ)는 0.014/h를 보였다. *A. platensis* M9108의 일일생산량과 μ 는 모균주인 *A. platensis* PCC 9108에 비하여 각각 1.3배와 1.2배 향상된 결과를 보였으며, 이전에 보고된 결과에 비하여 각각 1.3배와 1.8배 증가하였다. *Arthrospira*의 전체량 중 지방산과 *r*-linolenic acid의 함량은 각각 1.94~4.97%와 0.13~1.33%로

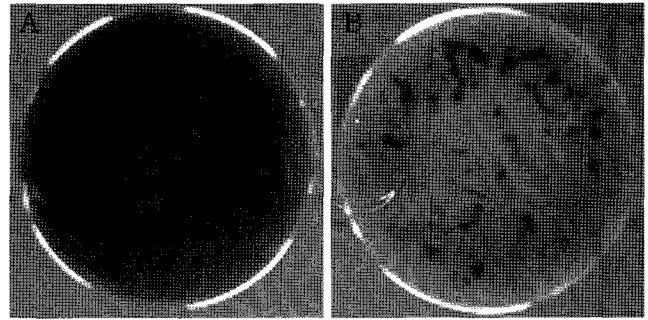


Fig. 3. Photograph of *Arthrospira platensis* M9108 (A) and PCC 9108 (B) incubated for 18 days in SOT medium under dark condition in Erlenmeyer flask. The cultures were incubated at 30°C in a shaking incubator under dark condition.

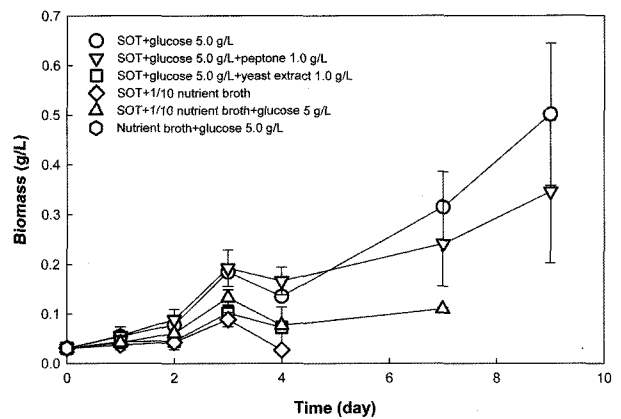


Fig. 4. Time courses of biomass of *Arthrospira* strain M9108 in various media composition. The cultures were incubated at 30°C on a shaker at 120 rpm under dark condition.

균주에 따라 상당히 다양하였다. *Arthrospira*는 유기탄소원으로 glucose를 첨가한 조건에서 성장이 가장 좋았으며, *A. platensis* M9108의 경우 maltose의 이용능도 glucose 이용능과 비슷하였다. *A. platensis* M9108의 성장은 glucose의 5.0 g/L까지는 증가하였지만, 10.0 g/L에서는 저해되는 양상을 보였다. 또한 고농도의 탄소원을 이용한 종속영양배양 중 발생하는 세포의 뭉침 현상이 *A. platensis* M9108에서는 관찰되지 않아 안정적으로 고농도 생산에 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 지원하는 21세기 프런티어사업(이산화탄소 저감 및 처리기술), 한국생명공학연구원 기관고유사업 및 (주)대상 위탁연구(스피루리나 발효생산의 기반기술 개발)의 일환으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Becker, E. W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge UK: Cambridge University Press.
2. Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
3. Borowitzka, M. A. 1994. Products from algae, pp. 5-15. In Phang, S. M., Y. K. Lee, M. A. Borowitzka, and B. A. Whitton (eds.), *Algal Biotechnology in Asia-Pacific Region*. University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.
4. Chen, F. and Y. Zhang. 1996. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 221-224.
5. Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* **47**: 551-578.
6. Cohen, Z. 1997. The chemicals of *Spirulina*, pp. 205-212. In Vonshak, A. (ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis Ltd., London, UK.
7. Grinstea, G. S., S. S. Tokach, R. D. Goodband, and J. L. Nelssen. 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **83**: 237-247.
8. Henrikson, R. 1999. Earth Food *Spirulina*: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet, 5th ed, on line (<http://www.spirulinasource.com/index.html>).
9. Joo, D. S., M. G. Cho, R. Buchholz, and E. H. Lee. 1998. Growth and fatty acid composition with growth conditions for *Spirulina platensis*. *J. Korean Fish. Soc.* **31**: 409-416.
10. Kaji, T., Y. Fujiwara, Y. Inomata, C. Hamada, C. Yamamoto, S. Shimada, J. B. Lee, and T. Hayashi. 2002. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Life Sci.* **70**: 1841-1848.
11. Kay, R. A. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30**: 555-573.
12. Kim, H. S., C.-H. Kim, J.-H. Kim, M.-C. Kwon, J.-H. Cho, H.-G. Gwak, B.-Y. Hwang, J.-C. Kim, and H.-G. Lee. 2006. Comparison of anticancer activities from the culture and extraction conditions of the *Spirulina platensis*. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **34**: 143-149.
13. Lepage, G. and C. C. Roy. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* **25**: 1391-1396.
14. Marquez, F. J., N. Nishio, S. Nagai, and K. Sasaki. 1995. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **62**: 159-164.
15. Marquez, F. J., K. Sasaki, T. Kakizono, N. Nishio, and S. Nagai. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 408-410.
16. Mühling, M., A. Belay, and B. A. Whitton. 2005. Screening *Arthrospira (Spirulina)* strains for heterotrophy. *J. Appl. Phycol.* **17**: 129-135.
17. Nandeesha, M. C., B. Gangadhara, J. K. Manissery, and L. V. Venkataraman. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* **80**: 117-120.
18. Ogawa, T. and S. Aiba. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1121-1132.
19. Ogawa, T. and G. Terui. 1970. Studies on the growth of *Spirulina platensis*: I. On the pure culture of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.* **48**: 361-367.
20. Piorreck, M., K. H. Baasch, and P. Pohl. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* **23**: 207-216.
21. Sung, K. D., J. H. Ann, J. Y. Lee, S. J. Ohh, and H. Y. Lee. 1995. Kinetics of cultivating photosynthetic microalga, *Spirulina platensis* in an outdoor photobioreactor. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 401-405.
22. Tomaselli, L., E. Pelosi, and C. Paoletti. 1978. Composition of organic materials in *Spirulina platensis* and *S. maxima*. In Proceedings of the 18th Congress National Italian Society Microbiology, Fiuggi Terme, Italy.
23. Xu, N., X. Zhang, X. Fan, L. Han, and C. Zeng. 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). *J. Appl. Phycol.* **13**: 463-469.
24. Yang, H. N., E. H. Lee, and H. M. Kim. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sci.* **61**: 1237-1244.

(Received Feb. 13, 2007/Accepted Mar. 12, 2007)