

알긴산이 *Nannochloropsis oculata* NIES-2145의 생장에 미치는 영향

박현진¹, 김영화², 이재화^{1,2*}

Effect of Alginate on the Growth of *Nannochloropsis oculata* NIES-2145

Hyun-Jin Park¹, Young-Hwa Kim², and Jae-Hwa Lee^{1,2*}

접수: 2011년 4월 20일 / 게재승인: 2011년 5월 30일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The growth effect of *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*), unicellular microalgae, by alginate was investigated. Alginate was depolymerized with sulfuric acid (H₂SO₄) and heat (121 °C), simultaneously. Addition of 0.75% alginate oligomer depolymerized with 0.2 N H₂SO₄ showed the maximum yield and the growth rate of *N. oculata*. Chlorophyll content and reducing sugar was increased by alginate oligomer in a dose-dependent manner. Alginate oligomer promoted the growth of *N. oculata*, whereas the original alginate polysaccharides had no significant effect. *Laminaria japonica* (*L. japonica*) extract containing high level of alginate was also increased growth rate and chlorophyll content. CO₂ supply addition to *L. japonica* extract showed no change the growth rate, although addition to alginate oligomer showed prominently increased. *N. oculata* could use more saccharides in presence of CO₂ according to reducing sugar determination. From these results, it is useful to establish optimal condition for high cell density cultivation of *N. oculata*.

Keywords: Alginate, *Nannochloropsis oculata*, *Laminaria japonica*, CO₂

1. 서론

알긴산 (alginate)은 α-L-glucuronic acid (G)와 β-D-mannuronic acid (M)으로 구성되어 있고 갈조류의 세포벽을 이루는 구조성 다당류이다. 이 두 성분이 각각 homopolymer 형태로 결합된 polyglucuronate 또는 polymannuronate 형태로 존재하거나, heteropolymer 형태로 존재하기도 한다. G와 M 잔기가 α-1,4 결합 또는 β-1,4 결합으로 이루어져 있는 직쇄형 다당류로써 M/G의 비율과 M, G 사슬 분포는 해조류의 종류에 따라 다르다 [1-4]. 알긴산은 강한 점성의 겔 (gel)을 형성하는데 이러한 특성으로 인해 식품이나 의약품 등에 많이 이용되며 다양한 생리활성으로 고부가 가치 이용에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한 재생 가능한 차세대 에너지원으로써 관심이 주목되고 있다. 특히 알긴산으로부터 유래된 올리고당에 대한 연구가 많이 진행되었는데, 알긴산 올리고머가 bifidobacteria의 생장을 촉진시켰고 [5], 식물 세포의 생장을 촉진시키는 인자로 보고 된 바 있다 [6].

미세조류는 해양 및 담수에 많이 존재하며, 에너지원으로 태양광을 사용하여 이산화탄소를 고정하는 탄소동화기능을 가지고 있다. 미세조류의 광합성 기능을 향상시키고 최적 배양 환경에서 미세조류를 대량 배양하여 이산화탄소 저감 효과가 나타나고 동시에 생산된 바이오매스로부터 유용물질을 생산함으로써 고부가 가치를 창출할 수 있다 [7,8].

광합성 미세조류 중 하나인 *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)는 단세포 녹조류로 양식용 사료로 이용되며 많은 양의 eicosapentaenoic acid (EPA)를 함유하고 있어 기능성 식품으로서의 이용 가치가 높다 [9]. 최근 *N. oculata*로부터 추출한 생리활성물질이 결핵 치료제, 항산화제, 화장품 원료 등으로 이용되고 있다. 일반적으로 미세조류는 육상식물보다 생장이 빠르며 쉽게 배양되는 장점이 있지만, 갑작스럽게 대량 사멸하는 경우로 인해 상업적으로 주요한 해양 자원의 생산에

¹신라대학교 의생명과학대학 생명공학과
¹Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5748, Fax: +82-51-999-5636
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

²신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5748, Fax: +82-51-999-5636
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

심각한 문제를 초래할 수 있다. 따라서, *N. oculata*를 효율적이고 안정적으로 대량 배양할 수 있는 적절한 환경 조건에 대한 연구가 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 식물 세포와 유사한 시스템을 가지는 미세조류의 생장에 알긴산의 영향을 보고자 하였다. 앞선 보고 [10]를 통하여 밝혀진 *N. oculata*의 최적배양 조건을 토대로 알긴산의 첨가에 따른 성장 효과를 보았다. 그리고 해조류 중 다시마 추출물을 이용하여 이에 다량 함유되어 있는 알긴산과 비교 분석하였다. 최근 alginate oligosaccharide mixture (AOM)가 *N. oculata*의 성장을 촉진하는 것으로 보고된 바가 있다 [11]. 이 알긴산은 미생물로부터 정제된 알긴산 분해효소 (alginate lyase)를 이용하여 가수분해하였는데, 미생물에서 분리한 알긴산 분해효소는 활성이 비교적 낮은 편이다. 한편, 산 처리와 가압가열하는 방법으로 알긴산을 저분자화하는 최적 조건이 제시되었다 [12]. 따라서, 본 연구에서는 점성이 강한 알긴산을 강산 (황산)과 고열 (121°C)을 이용하여 분해하였고, 이 알긴산 올리고머를 이용하여 *N. oculata*의 생장에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 이산화탄소 주입 여부에 따라 *N. oculata*의 생장에 알긴산이 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 광합성 미세조류 *Nannochloropsis oculata* NIES-2145 (Npo-2145)는 일본 국립환경연구소 (www.nies.go.jp) Microbial Culture Collection at NIES (NIES)로 부터 분양받아 사용하였다. 균주 배양에 사용된 배지는 f/2 배지를 사용하였으며 [13], 121°C에서 15 분간 멸균하고, 냉각 후 사용하였다.

2.2. 배양 조건

*N. oculata*는 f/2 배지 200 mL, 초기 pH 8.5±0.2, 온도 25°C, 교반속도 180×g, 광도 3,000 lux의 조건 하에 초기 접종농도 0.45 g/L로 배양하였다 [14]. 실험 환경은 온도와 조도가 적절히 조절되는 배양기 내부에서 실시하였으며, 광주기는 12시간 : 12시간 (명 : 암)으로 명반응시 형광등을 이용하여 조사하였다. CO₂의 영향에 대한 조건으로는, CO₂와 공기를 혼합하여 반응기 내에 들어가는 CO₂ 농도를 5%로 유지하고 0.1 vvm (vol/vol·min)으로 반응기 내에 흘려주었다. 주입되는 기체는 0.2 µm의 필터를 이용, 이물질 및 미생물로 인한 오염을 방지하도록 하였다 [15].

2.3. 알긴산 가수분해

중류수 100 mL에 1%의 알긴산을 녹인 후 황산 (sulfuric acid) 0.05 N에서 0.3 N까지 0.05 N 단위 농도로 용액을 사용하였다. 산 처리 후 분해 효율을 높이기 위하여 물리적 처리법으로 121°C에서 30분간 가열하였다. 전 처리한 배양액은 6 N NaOH를 이용하여 pH 8.5±0.2로 조절하였으며, 중화 후 분해된 알긴산은 0.2 µm 필터로 여과하여 침전물을 최소화

하였다. 그 후, 2배 농도의 f/2 배지 100 mL을 첨가하여 최종 배양 부피 200 mL로 조절하였다.

다시마 알긴산을 이용하기 위해, 다시마를 구입하여 ball mill을 이용하여 분쇄한 다음, 가수분해 방식은 알긴산 전 처리와 동일하게 진행하였다.

2.4. 균체량 분석

균체량은 UV/Vis 분광 분석기 (Optizen 2120UV, Mecacy Ltd, Korea)를 이용하여 680 nm에서 측정된 흡광도를 통하여 측정하였다. 건조 균체량은 항량된 여과종이를 이용하여 105°C 건조기에서 3시간 동안 건조시킨 후 얻어진 건조 무게로부터 상관관계식을 산출하였다.

$$\text{Dry cell weight (DCW, g/L)} = 0.2563 \times A_{680} + 0.3709$$

2.5. 클로로필 추출 및 분석

*N. oculata*의 클로로필 추출은 P. C. Chen의 방법 [16]을 변형하여 사용하였다. 배양 중 시료 1 mL을 13,000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 상층액은 버리고 100% methanol 1 mL을 첨가하였다. 60°C에서 30분간 추출하고 0°C에서 5분간 냉각시킨 다음 650 nm, 665 nm에서 측정하여 상관식을 산출하였다.

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = 25.5 \times A_{650} + 4 \times A_{665}$$

2.6. 환원당 측정

전처리에 따른 환원당 변화는 dinitrosalicylic acid (DNS)법을 이용하였다 [17]. 시료 1 mL을 12,000 rpm으로 5분간 4°C에서 원심분리하여 상층액 500 µL에 DNS 용액 2 mL을 가한 후 100°C에서 10분간 가열하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 maltose를 이용하여 생성된 환원당을 정량화하여 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 고분자 다당류에 의한 *N. oculata*의 성장

*N. oculata*의 생장에 고분자 다당류에 의한 영향을 알아보기 위해, 점성을 가지는 알긴산과 전분, 점성을 가지지 않은 셀룰로오스를 배지에 1%의 농도로 첨가하고 27일 간 배양하였다. 셀룰로오스를 첨가한 배지에서는 기본 배지인 f/2 배지보다 오히려 세포 생장이 느렸으며, 알긴산과 전분을 첨가한 배지에서는 비슷한 생체량을 보였다. 점성을 가지는 다당류가 *N. oculata*의 성장을 촉진시키는 것으로 보여, 이후 알긴산에 대한 연구를 진행하였다 (Fig. 1).

3.2. 알긴산 가수분해 조건에 따른 *N. oculata*의 성장

Fig. 1의 결과에 따르면, 다당류 자체를 그대로 균주에 처리했을 때 세포 생장의 효과가 두드러지게 나타나지 않았다. 따라서 점성이 강한 알긴산을 강산과 고열을 동시에 처리하여 가수분해 한 후 *N. oculata*에 처리하였다. 산 처리는 H₂SO₄

를 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 N 농도로, 고열 처리는 121°C에서 30분간 처리하였다. 가수분해한 알긴산 올리고머를 배지에 1%로 첨가하여 27일간 배양하여 균체 생체량을 측정하였다. 그 결과, 알긴산을 첨가하지 않은 배지에서는 균체 생체량이 0.63 g/L이었으며, 0.2 N H₂SO₄로 가수분해한 알긴산 올리고머를 처리한 배지에서의 생체량이 1.22 g/L로 약 1.9배의 높은 생체율을 보였다 (Fig. 2). 0.2 N H₂SO₄ 외의 다른 농도에서도 1.3~1.8배 증가된 생체율을 보여, 알긴산 자체보다는 가수분해한 알긴산 올리고머가 *N. oculata*의 생장 촉진에 영향을 주는 것으로 보였다.

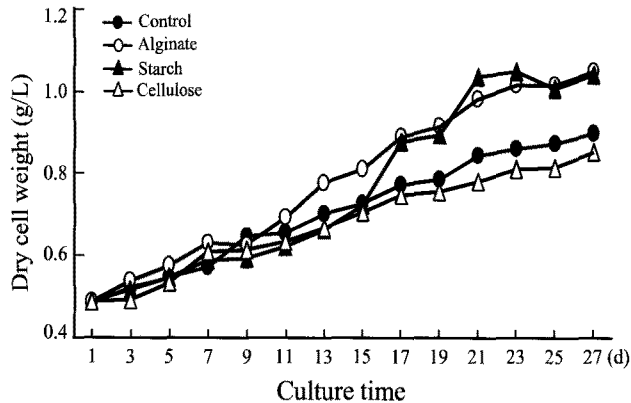


Fig. 1. Effect of polysaccharides on the growth of *N. oculata*.

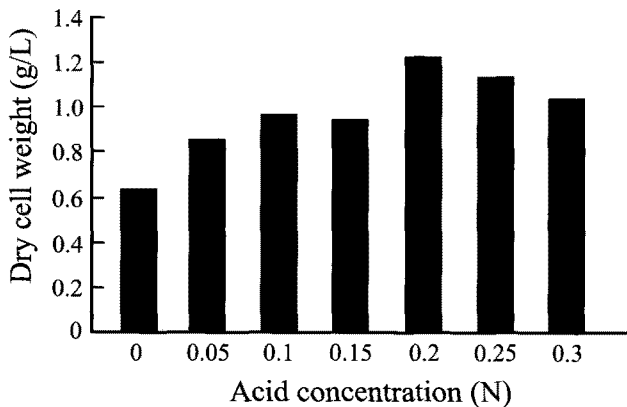


Fig. 2. Growth rate of *N. oculata* by alginate oligomer. Alginate was hydrolyzed with heat and several H₂SO₄ concentration.

3.3. 알긴산 올리고머 농도에 따른 영향

*N. oculata*의 생장에 다양한 농도의 알긴산 올리고머의 영향을 살펴보기 위해, 0.2 N H₂SO₄과 고열로 가수분해한 알긴산 올리고머를 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5%를 배지에 첨가하고 27일 동안 배양하였다. 알긴산 올리고머를 0.25, 0.5, 0.75% 첨가했을 경우 농도 의존적으로 세포 생장이 1.3배, 1.5배, 1.6배로 증가하였지만, 0.75% 이상 첨가했을 경우 세 농도 모두 1.5배로 더 이상 생체량이 증가하지 않음을 확인하였다 (Fig. 3(a)).

알긴산 올리고머를 첨가하면 육안적으로 배양액의 색이 더 진해져 있는 것을 확인하였고, 클로로필 함량을 측정한 결과 알긴산 올리고머의 농도에 비례하여 증가하였다. 1.5%의

알긴산 올리고머 첨가 시 가장 많은 클로로필을 생성했으며 알긴산 올리고머를 처리하지 않은 대조군에 비해 4배 이상 높았다 (Fig. 3(b)).

알긴산 첨가 배지 내의 환원당 변화를 확인하기 위해 DNS법을 이용하였다. 알긴산이 가수분해에 의해 분해되면 환원당을 생성하므로 DNS 측정을 통해 배지 내에 존재하는 다당류의 가수분해 및 소모를 확인할 수 있다. 알긴산 농도가 증가함에 따라 환원당 생성이 증가하는 것으로 보아, *N. oculata*가 알긴산의 가수분해 과정에서 생성되는 환원당을 기질로 이용하여 생장이 촉진됨을 검증하였다. 27일간 배양 후에는 환원당이 감소되었는데, 이는 배양 기간 중 *N. oculata*의 생장으로 당이 소모되었기 때문으로 보였다 (Fig. 3(c)).

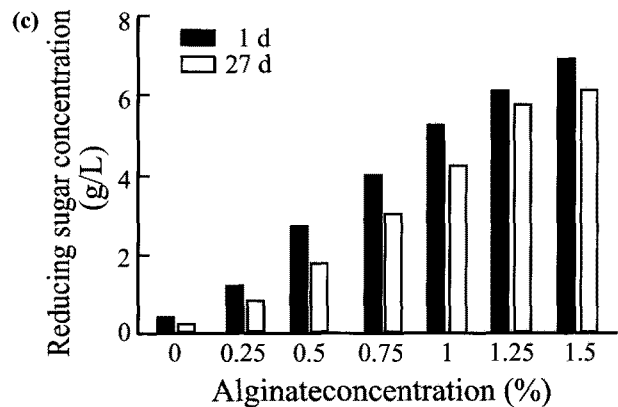
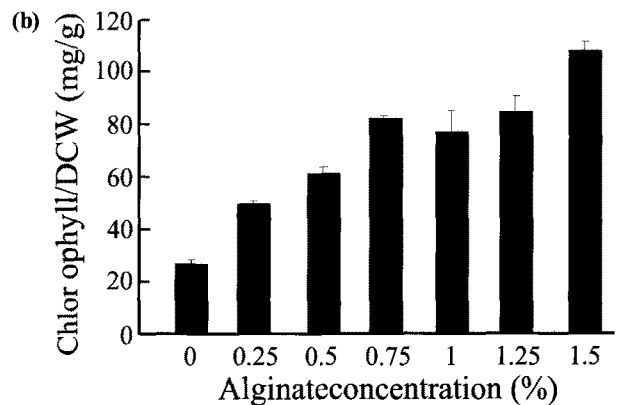
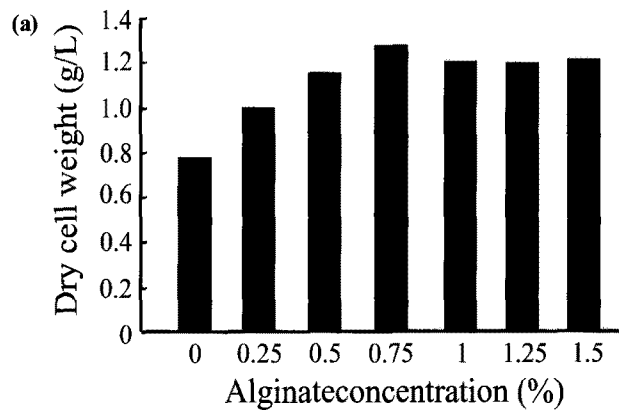


Fig. 3. Effect of alginate oligomer concentration on the growth of *N. oculata*. (a) Cell growth, (b) Production of chlorophyll per dry cell weight (DCW), (c) Change in reducing sugar content.

3.4. 다시마 추출물 첨가에 따른 *N. oculata* 성장

알긴산 올리고머에 대한 생체 촉진 효과를 확인한 다음, 일반적으로 알긴산이 많이 함유되었다고 알려져 있는 해조류 중 하나인 다시마 (*Laminaria japonica*) [18]를 이용하여 *N. oculata* 생체량을 살펴보았다. 다시마를 분쇄하여 1%의 농도로 첨가한 후 0.2 N H₂SO₄와 고열로 가수분해한 후 27일 동안 배양하였다. 다시마 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 다시마 추출물 첨가시 약 1.6배 높은 세포 생체량을 보였다 (Fig. 4(a)).

클로로필 함량은 다시마 추출물을 첨가하지 않은 군주에서 25.18 mg/g, 다시마 추출물을 첨가한 군주에서 46.69 mg/g으로 약 1.8배 증가하였다 (Fig. 4(b)). 앞선 알긴산 올리고머의 결과와 마찬가지로 다시마 추출물에 함유된 알긴산 성분에 의해서 *N. oculata*의 생장이 촉진되었음을 유추할 수 있다.

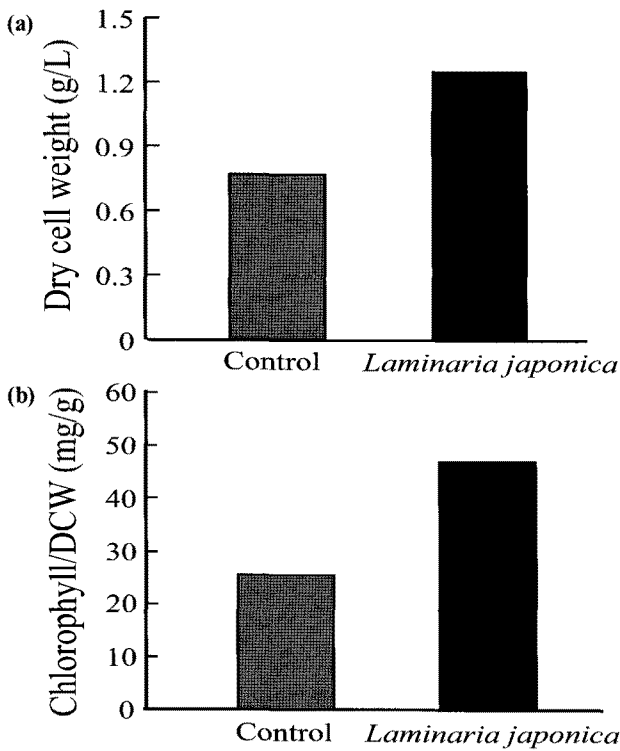


Fig. 4. Cell growth and chlorophyll content of *N. oculata* treated with *Laminaria japonica* extract. *L. japonica* extract was prepared with treatment of heat and 0.2 N H₂SO₄.

3.5. CO₂에 의한 영향

광합성 미세조류는 지상식물과 마찬가지로 빛을 필수 에너지 원으로, CO₂를 기질로 유기물을 합성하는 특성을 가지고 있으며 유기물 생산성은 식물에 비해 4~20배 가량 높다. CO₂를 주입하면 미세조류를 빠른 속도로 대량 배양하는 것이 가능해진다. *N. oculata*의 기본 배지인 f/2 배지에 알긴산 올리고머와 다시마 추출물을 각각 1% 첨가하고 CO₂ 주입 여부에 따른 생체량을 알아보았다.

알긴산 올리고머 첨가 시 CO₂를 주입한 경우 주입하지 않을 때 보다 약 1.5배 높은 생체량을 보였고 클로로필도 약 1.8배 증가된 함량을 보였지만, 다시마 추출물의 경우 CO₂

주입은 오히려 세포생장을 감소시켰고, 클로로필 함량도 약 2.7배 낮게 측정되었다 (Fig. 5(a)(b)).

알긴산에 CO₂를 주입하지 않고 배양한 배지의 당 함량은 1.61 g/L이었으며, CO₂를 주입한 배지의 당 함량은 2.43 g/L로 환원당이 1.5배 증가하였다. 다시마 추출물에 *N. oculata*를 배양하였을 경우 CO₂를 주입하지 않았을 때 환원당 함량은 0.61 g/L이었으나, 다시마 추출물에 CO₂를 주입한 배지의 당 함량은 0.78 g/L로 CO₂ 주입으로 인해 환원당이 1.2배 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 5(c)).

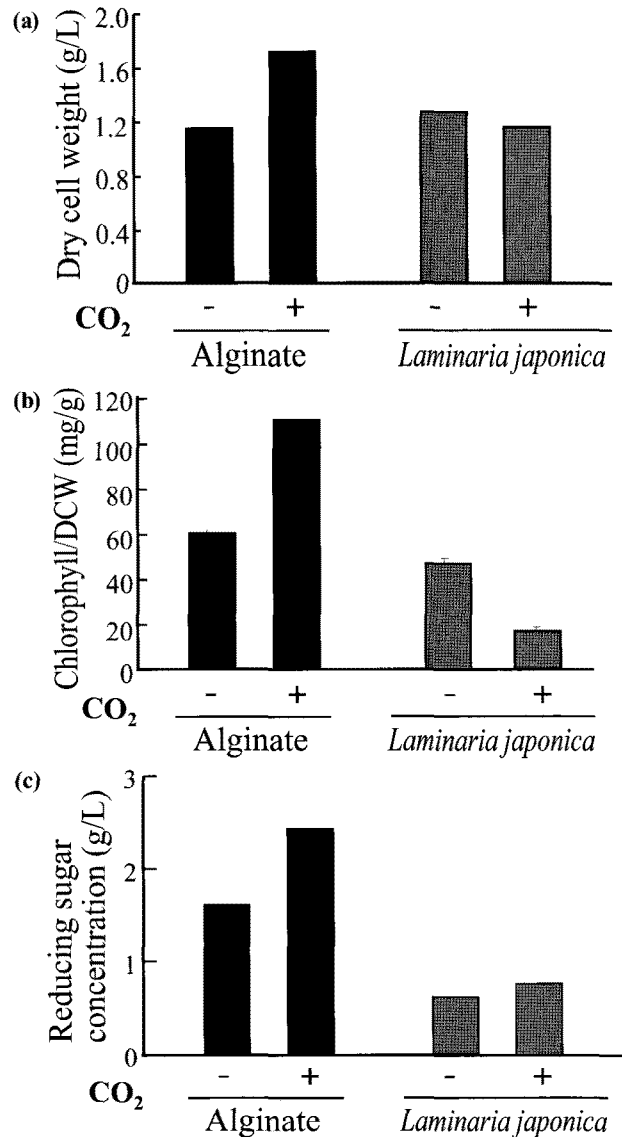


Fig. 5. Effect of CO₂ supply addition to alginate oligomer or *L. japonica* extract on the growth of *N. oculata*. (a) Cell growth, (b) Production of chlorophyll per dry cell weight (DCW), (c) Change in reducing sugar content.

알긴산 올리고머와 다시마 추출물을 비교한 결과, 알긴산 올리고머를 첨가했을 때 *N. oculata*의 생장이 더 촉진되었고 클로로필 함량도 증가하였다. 갈조류에 속하는 다시마에서 알긴산은 약 20~30%를 차지하는데, 갈조류의 생육기간 및

환경 조건에 의해 알긴산 추출함량이 다르다. 또한, 갈조류인 다시마의 경우 산 처리에 따른 성장율이 알긴산 올리고머에 비해 낮은데, 이것은 다시마의 입자 크기가 가수분해 효과를 기대하기에는 너무 크기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 다시마 추출물 내의 알긴산 함량에 따른 결과에 의한 것으로 사료되며 다시마의 알긴산만을 추출해서 비교하는 것이 필요하다. CO₂를 주입하면서 배양한 결과, 알긴산 올리고머와 다시마 추출물 첨가시 환원당이 증가하였다. 이는 *N. oculata*가 알긴산 가수분해시 생성되는 환원당을 기질로 사용하여 생장이 촉진되었음을 암시한다.

일반적으로 미세조류는 쉽게 오염이 잘되며, 주변 환경 영향에 의해 생장이 저해되기도 한다. 미세조류의 성장을 촉진시키는 알긴산을 첨가하는 것이 효과적일 것이며, 알긴산을 다량 함유하고 있는 다시마는 가격이 저렴하고 쉽게 구할 수 있어 경제적으로 미세조류의 고농도 배양이 가능하리라 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)의 고농도 배양을 위한 적정 조건을 확립하기 위해 고분자 다당류 중 하나인 알긴산의 영향을 살펴보았다. 알긴산 자체 보다는 황산과 고열에 의해 가수분해한 알긴산 올리고머가 *N. oculata*의 성장 촉진에 영향을 주었다. 0.2 N의 황산과 고열을 동시에 처리하여 가수분해한 조건에서 *N. oculata*의 생장이 가장 두드러졌다. 해조류 중 다시마 추출물을 이용하여 이에 다량 함유되어 있는 알긴산과 비교 분석하였다. 알긴산 올리고머와 다시마 추출물을 비교한 결과, 알긴산 올리고머를 첨가했을 때 *N. oculata*의 성장율이 더 촉진되었고 클로로필 함량도 증가하였다. CO₂를 주입하면서 배양했을 때, 알긴산 올리고머 첨가에 의한 *N. oculata*의 성장과 클로로필 함량, 환원당의 양이 두드러지게 증가하였다. 이 결과를 토대로 황산과 고열을 이용한 물리 화학적인 방법을 통해 가수분해한 알긴산 올리고머를 처리하고 CO₂를 주입함으로써 광합성 미세조류 *N. oculata*의 고농도 대량 배양에 이용될 수 있을 것이다.

References

1. Yoon, M. O., S. C. Lee, J. W. Rhim, and J. M. Kim (2004) Comparison of alginic acid yields and viscosity by different extraction conditions from various seaweeds (*Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme*, and *Undaria pinnatifida*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 747-752.
2. Park, K., S. Park, G. Kim, and W. Kim (2008) Preparation and characterization of sodium alginate/PEO and sodium alginate/PVA nanofiber. *Polymer (Korea)* 32: 206-212.
3. Park, S. J. and J. Y. Kang (2005) Preparation and characterization of calcium alginate microcapsules by emulsification-internal gelation. *Polymer (Korea)* 29: 369-374.
4. Kim, K. S., H. S. Choi, and J. Lee (2007) Characterization of the controlled adsorption of chitosan on alginate gel surface: Effect of pH and concentration. *J. Chitin Chitosan* 12: 43-47.
5. Akiyama, H., T. Endo, R. Nakakita, K. Murata, Y. Yonemoto, and K. Okayama (1992) Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 355-356.
6. Xu, X., Y. Iwamoto, Y. Kitamura, T. Oda, and T. Muramatsu (2003) Root growth-promoting activity of unsaturated oligomeric uronates from alginate on carrot and rice plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2022-2025.
7. Kim, J. H., C. M. Choi, W. I. Kim, J. S. Lee, G. B. Jung, J. D. Shin, J. S. Sung, J. T. Lee, and S. G. Yun (2007) Application of microalgae for managing agricultural water quality. *Korean Journal of Environmental Agriculture* 26: 7-16.
8. Joo, D., C. Jung, C. Lee, and S. Cho (2000) Content of phycocyanins and growth of *Spirulina platensis* with culture conditions. *J. Korean Fish. Soc.* 33: 475-481.
9. Fabregas, J., A. Maseda, A. Dom in, and M. Ferreira (2004) The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 31-35.
10. Park, H. J., E. J. Jin, T. Jung, H. Joo, and J. H. Lee (2010) Optimal culture conditions for photosynthetic microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Chem. Eng.* 21: 659-663.
11. Yokose, T., T. Nishikawa, Y. Yamamoto, Y. Yamasaki, K. Yamaguchi, and T. Oda (2009) Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 450-453.
12. Joo, D. S., Y. S. Choi, and S. Y. Cho (2003) Preparation of the depolymerized alginates by physical treatment processing with organic acids. *J. Korea Fish Soc.* 36: 1-5.
13. Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) gran. *Can. J. Microbiol.* 3: 229-239.
14. Krienitz, L., D. Hepperle, H. B. Stich, and W. Weiler (2000) *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39: 219-227.
15. Kim, Y. M., J. Y. Kim, S. M. Lee, J. M. Ha, T. H. Kwon, and J. H. Lee (2010) Carbon dioxide fixation using *Spirulina platensis* NIES 39 in polyethylene bag. *Appl. Chem. Eng.* 21: 272-277.
16. Chen, P. C. and Ph. D. Dissertation (1979) Physiologische und biochemische untersuchungen zur rhythmik synchronisierter Chlorella. Göttingen Univ. Germany.
17. Lee, J. H. and E. Lee (2003) Isolation of alginate degrading marine bacteria and characterization of alginate. *J. Life Sci.* 23: 718-722.
18. Lee, S. M. and J. H. Lee (2010) Influence of acid and salt content on the ethanol production from *Laminaria japonica*. *Appl. Chem. Eng.* 21: 154-161.