

M102KP010032-04K1601-03210

이산화탄소 저감 및 처리 기술개발 사업  
CO<sub>2</sub> Reduction and Sequestration R&D

Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가  
생물제품화 기술 개발  
CO<sub>2</sub> Fixation by Cyanobacteria and Production of  
High-Value Biomaterials form Their Biomass

한국생명공학연구원

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가 생물제품화 기술 개발”에 관한 연구의 보고서로 제출합니다.

2005. 3. 31.

주관연구기관명: 한국생명공학연구원

주관연구책임자: 오 희 목

연 구 원: 안 치 용, 김 충 재,  
이 완 석, 최 강 국,  
최 애 란, 김 성 건,  
박 찬 선, 김 민 수

위탁연구기관명: (주)프로바이오틱스  
기술연구소

위탁연구책임자: 이 인 선

# 여 백

## 보고서 초록

과제관리번호	DC1-104	해당단계 연구기간	2002.10.1-2005.3.31	단계 구분	1 / 3
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	이산화탄소저감및처리기술개발사업단			
연구과제명	중 과제명	CO <sub>2</sub> 재활용 기술			
	세부(단위)과제명	Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가 생물제품화 기술 개발			
연구책임자	오 회 목	해당단계 참여연구원수	총 : 40 명 내부 : 12 명 외부 : 28 명	해당단계 연구비	정부: 409,500 천원 기업: 145,167 천원 계: 554,667 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 환경생명공학연구실		참여기업명	(주)프로바이오닉	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 : (주)프로바이오닉 기술연구소		연구책임자 : 이인선		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	180
<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 광합성 미생물로서 cyanobacteria를 포함한 미세조류 500여 strains 분리 및 계대보존하고 있으며, Web site에 등재하여 활용성을 극대화</li> <li>◦ <i>Spirulina</i> sp.의 우량 균주를 확보하였으며, 다양한 환경조건, 영양조건에서 성장률 및 생물량의 변화를 조사하여 생산성(CO<sub>2</sub> 고정화 효율) 향상(<i>Spirulina</i> sp. 1.14 g dw/L/일, 0.4 kg CO<sub>2</sub>/일-200-L 광생물반응기)</li> <li>◦ CO<sub>2</sub> 0.01-1%의 범위에서 <i>Spirulina</i> sp.는 0.07% CO<sub>2</sub>에서 성장률과 biomass 생산량이 가장 높았으며, 200-L 광생물반응기 운전의 최적화 조건 정립</li> <li>◦ Cyanobacteria의 부유허성을 이용한 수확법을 개발하여 <i>Spirulina</i> sp. 대량배양시 수확의 편리성, 경제성 확보</li> <li>◦ Cyanobacteria를 대상으로 인-제한, 인-충분 등의 조건에서 배양하여 600여 추출물 은행을 구축하였고, 항암물질 탐색계로 VHR DS-PTPase 활성 측정, 항생물질 탐색계로 13종의 병원성 세균 검출시스템 및 paper disk법을 구축하고, 항당뇨물질을 추가</li> <li>◦ 생리활성(항암, 항당뇨, 항생 활성)을 갖는 30여 cyanobacteria를 1차로 선정하여 NMR 구조분석을 실시하고 2단계 탐색후보물질을 선정</li> <li>◦ 사료첨가제 후보로 선정된 cyanobacteria의 조성 조사, 영양가치 평가, 어류독성 시험, 돈사료 및 새우사료에 첨가하여 효능을 조사하고, 실제로 돈축사 및 새우양식장에서 현장실험 수행</li> <li>◦ “스피루리나를 이용한 이산화탄소 고정화 및 기능성 사료첨가제 제조” 기술을 참여기업인 (주)프로바이오닉에 기술이전(2005. 1. 4.)</li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	이산화탄소 저감, 생물학적 고정화, 남세균(남조류), 스피루리나, 사료첨가제, 생리활성 물질, 광합성, 미세조류			
	영 어	CO <sub>2</sub> sequestration, Biological fixation, Cyanobacteria, <i>Spirulina</i> , Feed-additive, Bioactive material, Photosynthesis, Microalgae			

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가 생물제품화 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 우리나라의 CO<sub>2</sub> 배출량은 세계 10위로 CO<sub>2</sub> 저감을 위한 적극적인 노력이 요구됨
- 광합성 미생물(미세조류, cyanobacteria 등)의 CO<sub>2</sub> 고정화 속도는 매우 효율적이고, 광합성 미세조류는 고밀도 배양이 가능하며, 생명공학기술 (Biotechnology, BT)을 이용한 CO<sub>2</sub> 고정화 효율 증대가 용이함
- 또한 cyanobacteria의 대량배양을 통하여 얻어진 biomass는 축사료 및 어사료 첨가제, 식품용 천연색소, 의약품 원료, 건강식품 등의 고부가 생물제품 생산에도 직 결됨
- 따라서 고농도의 CO<sub>2</sub> 가스를 고정하여 유기물을 합성하는 cyanobacteria 등의 미세조류를 분리 및 개량하여,
- 실제적인 CO<sub>2</sub> 가스의 저감을 위한 대량의 CO<sub>2</sub>가스 배출업체에 적용하고,
- 생산된 생물량으로부터 고부가 유용물질의 개발 및 상품화를 목적으로 함

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존기술 확립

### 2. Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구

- 미세조류의 성장과 광합성에 대한 N source의 영향
- 미세조류의 성장과 광합성에 대한 CO<sub>2</sub>의 영향
- 균주개량 및 고정화 효율 증대

### 3. Cyanobacteria의 대량배양공정 연구

- 광생물반응기 설계 및 제작
- 대량배양의 최적화 및 모델시스템 정립
- 배양의 최적화를 위한 배지 조성물 연구
- Cyanobacteria의 수확법 개발
- 대량배양의 실증화

### 4. Cyanobacteria로부터 고부가 유용물질 탐색 및 선정

- 유용물질 탐색을 위한 추출물 은행 구축
- 생리활성물질 탐색계 구축
- 생리활성 후보물질 선정
- 생리활성물질 구조 규명
- 유용물질의 *in vivo*, *in vitro* 생물활성 검정

### 5. 유용물질 생산의 실증화

- Cyanobacteria biomass의 사료 적합성 시험
- 새우사료 첨가제
- 돈사료 첨가제

## IV. 연구개발결과

### 1. Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존기술 확립

총 6회에 걸쳐 전국의 호수나 강을 대상으로 cyanobacteria를 중심으로 미세조류를 수집하기 위하여 채집을 실시하였다. 1차년도에 251 strains, 2차년도에 160 strains, 3차년도에 90 strains를 분리하여 총 500여 strains를 분리, 보관하고 있다. 분리한 균주들을 형태학적으로 동정한 결과 Chlorophyceae가 23 종(species) 209 strains로 가장 많았고, cyanophyceae는 18종 178 strains, 기타 84 strains, 미동정이 38 strains이다.

## 2. Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구

### 가. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 N source의 영향

회분배양에서 다양한 질소원 즉, 암모니아(ammonium), 질산염(nitrate), 아질산염(nitrite), 그리고 요소에 따른 *Spirulina platensis*의 성장과 탄소의 고정능에 대해서 알아보았다. 질소원으로 질산염을 배지에 첨가해준 경우 최고의 건체량을 얻은 반면, 아질산염을 질소원으로 첨가해준 배지에서 세포내(intracellular) 탄소의 양이 많았다. 또한, 미세조류의 탄소 고정의 효율만을 고려한다면 배양 후 6-10 일 사이에 수확하는 것이 가장 좋은 결과를 얻었다. 결론적으로 질소원으로는 질산염을 사용하여 7-8일간 회분배양하면 탄소 고정능이 최대가 되는 최적의 조건임을 알았다.

### 나. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 CO<sub>2</sub>의 영향

다양한 CO<sub>2</sub> 농도의 조건에서 *Spirulina platensis*의 성장과 광합성에 미치는 영향에 대해서 실험하였다. 주어진 CO<sub>2</sub>의 농도가 0.01% 에서는 용존무기탄소가 고갈되어서 cyanobacteria의 성장이 매우 저조하였다. CO<sub>2</sub>의 농도를 0.03%와 0.07%로 공급한 경우에는 cyanobacteria의 성장률에는 크게 차이를 보이지 않았으나, 미세조류의 수확량은 0.07%로 CO<sub>2</sub>를 공급한 경우에 0.03%로 공급한 경우보다 3배로 높았다. 그러나 CO<sub>2</sub>를 1.0%로 공급한 경우에는 용존무기탄소가 50-60 mg/l로 남아 있음에도 불구하고 미세조류의 성장률과 수확량이 가장 작았다. 또한 광합성률도 0.03%와 0.07%의 CO<sub>2</sub>를 공급해준 조건에서 높게 조사되었다. 따라서 *S. platensis*의 고농도 배양을 위한 CO<sub>2</sub>의 공급 농도는 0.07%가 최적이었다.

### 다. Cyanobacteria의 균주개량 및 고정화 효율 증대

Cyanobacteria의 유전체 연구로 *Spirulina*, *Microcystis* 등이 공통적으로 갖고 있는 광합성 보조색소인 phycocyanin 합성 관련 유전자를 조사하였다. 이때, 사용되는 primer(PC1F 와 PC1R)는 GenBank에 등록된 염기서열을 근거로 *cpcB*와 *cpcA* 사이 약 450 bp의 길이가 증폭되도록 제작하였다. 흥미롭게도 *Microcystis*-like 그룹(group F)을 제외한 다른 6 그룹은 기존에 알려진 유전자와 95-70%의 유사도를 보여 매우 진화적으로 거리가 있었다. 특히, 그룹 C, D, 그리고 G는 알려진 유전자와 85% 이하의 유사도를 보여 상당히 불일치하는 결과를 보였다.

*Spirulina platensis*를 다양한 농도의 이산화탄소 농도에서 배양하여 성장률을 조사한 결과 공급되어지는 이산화탄소의 농도가 0.07%까지는 공급되어지는 이산화탄소의 농도가



증가함에 따라 성장률과 생물량은 증가하여 0.07%의 이산화탄소 농도에서 최대값을 얻었으나, 1.0%의 이산화탄소 농도에서는 성장률과 생물량이 최저치로 나왔다. *Spirulina*의 성장은 용존무기탄소(Dissolved inorganic carbon; DIC)의 농도에 영향을 받음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 0.07%의 이산화탄소 농도에서는 탄소의 제한을 공급되어지는 공기의 양으로 극복하였으나, 0.01%의 이산화탄소의 경우에는 DIC의 양이 고갈되면서 cyanobacteria의 성장이 멈추었다. 또한 1.0%의 이산화탄소 농도에서는 DIC의 농도가 50-60 mg/L의 수준으로 일정하게 유지되었다. 그러므로 공장의 배기가스 내에 존재하는 이산화탄소의 양이 4-16%이므로 회석하여 연속적으로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

### 3. Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구

#### 가. 광생물반응기 설계 및 제작

본 연구팀이 설계·제작한 200-L 광생물반응기의 반응성능을 향상시키기 위한 개·보수를 실시하고, 이를 미세조류의 배양에 적용하여, CO<sub>2</sub> 고정화 및 biomass 생산성 등 운전결과를 검토하였다. Cyanobacteria의 배양을 실시하여 *in vivo* fluorescence, chlorophyll *a* 함량, 균체량 등을 통해 성장률을 조사함으로써 온도, 광도, 공기주입량 등 대량배양시의 문제점을 보완하였다. 수정·보완된 200-L 대량배양기는 유용물질의 탐색을 위한 다양한 조류종의 대량배양에 이용되었으며, 유용균주의 사료화를 위한 대량배양에 이용되었다.

#### 나. Cyanobacteria의 배양공정의 최적화 및 모델시스템 정립을 위한 배양공정 연구

CO<sub>2</sub> 농도가 cyanobacteria의 성장과 광합성 특성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저농도(100 ppm), 표준농도(300 ppm), 고농도(700 ppm)의 서로 다른 CO<sub>2</sub>를 탄소원으로 공급하는 변형된 SOT 배지를 사용하여 실린더형 광생물반응기에서 *Spirulina platensis*를 배양하였다. pH는 20 mM 인산염 완충용액을 사용하여 8.0으로 조절하였다. 배양 온도는 25°C, 광량은 130  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조절하였다.

생산된 건조 균체량은 13일 배양 후 고농도 CO<sub>2</sub>에서 2.4 g/L로 가장 높았으며, 저농도에서는 표준농도와 고농도 배양에 비교하여 낮은 성장을 보였다. 대수성장기에 각 배양 조건에서의 비성장률은 저농도, 표준농도, 고농도 CO<sub>2</sub>에서 각각 0.17, 0.40, 0.62 g/d로 고농도 배양에서 가장 높았다. 저농도의 CO<sub>2</sub> 배양에서는 배지에 남아있는 무기탄소의 농

도는 균체가 성장하면서 고갈되어 CO<sub>2</sub> 공급량을 0.1 vvm에서 0.3 vvm으로 증가시켜도 증가하지 않았다. 반면, 표준농도나 고농도 배양에서는 무기탄소가 고갈되지 않아 균체의 생장이 유지되었는데, 배지에 남아있는 무기탄소의 농도는 표준농도보다 고농도 CO<sub>2</sub> 배양에서 더 높았다.

#### 다. 배양의 최적화를 위한 배지 조성물 연구

*S. platensis*의 생장에 있어 가장 유리한 질소의 농도 조건을 알아보기 위하여 NaNO<sub>3</sub>를 0.607 g/L(질소 100 mg/L), 0.911 g/L(질소 150 mg/L), 1.214 g/L(질소 200 mg/L), 1.788 g/L(질소 300 mg/L) 또는 3.035 g/L(질소 500 mg/L)을 각각 주입하여 조체를 배양하면서 조체의 chlorophyll a 농도와 건조중량을 측정하였다. NaNO<sub>3</sub>를 1.214 g/L 주입한 경우 즉, 질소 200 mg/L 포함된 경우에 대체로 높은 chlorophyll a 농도와 조체의 건조중량을 나타냄을 알 수 있다. Cyanobacteria의 생장에 있어 가장 유리한 탄소의 농도 조건을 알아보기 위하여 질소농도를 배양의 최적조건인 NaNO<sub>3</sub>를 1.214 g/L로 주입하고, 탄소원인 NaHCO<sub>3</sub>의 주입량을 달리하여 탄소 농도의 구배를 주어 *S. platensis*를 배양한 결과, 8.4-16.8 g/L에서 최대 비생장률이 가장 높게 나타났다.

NaHCO<sub>3</sub> 주입량 16.80 g/L와 NaNO<sub>3</sub> 주입량 1.21 g/L의 조건에서 chlorophyll a 농도 및 건조중량을 토대로 한 최대 비생장률 값이 모두 높게 나타났다. 이는 이들 주입량이 *S. platensis*의 생장에 가장 효율적인 농도임을 시사한 것이라고 판단된다.

배양의 최적화 배지 조성을 규명함에 있어, 조체의 성장에 철을 비롯한 미소량 성분 원소에 대한 영향의 특이성은 확인되지 않았으며, 여전히 질소농도를 NaNO<sub>3</sub> 1.214 g/L로 조정된 배지에서 배양한 조체가 최대 비생장률과 최대 상대빈도 값이 가장 높게 나타났다. 이로써, 질소 농도가 *S. platensis*의 성장에 큰 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

3-L 배양기에서 *S. platensis*를 배양한 결과, 최대 생장률이 1.11 g/L/d였는데, 이러한 결과는 광도, 온도 등을 조절하고 배양기를 특수 제작하여 운용한 많은 연구사례에서 지금까지 보고된 *S. platensis*의 최대 생장률 값과 비교해 본 결과 유사한 수준임을 알 수 있었다.

#### 라. Cyanobacteria의 대량배양의 실증화

본 연구에서는 기존 200-L 광생물반응기를 보완 설계하여 제작 후 시험 가동하였다.

Cyanobacteria의 배양을 실시하여 *in vivo* fluorescence, chlorophyll *a* 함량, 균체량 등을 통해 성장률을 조사함으로써 온도, 광도, 공기주입량 등 대량배양시의 문제점을 보완하였다. Cyanobacteria(*Spirulina platensis*)를 대량배양하여 연속적 배양 및 회수법을 시도한 결과, 2주간 총 35 g/80 L를 회수하였다. 기존 광생물반응기를 이용하는 것과 더불어, biomass로부터 고부가 유용물질을 탐색하고자 여러 종류의 균주를 대량 배양하는 연구가 요구되었기에 8-L 용량, 광도 100 - 130  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ , 온도 24 - 26°C, 광주기 24L : 0D로 조정된 광교반기(Illuminated shaking incubator)를 추가로 다수 운용하여 조류를 배양하였다.

#### 마. Cyanobacteria의 수확공정

*S. platensis*는 공기로 가득 찬 기낭(gas vesicle)이 있어 부상하는 특성을 이용하여 간편하고 경제적인 회수법을 개발하였다. 세포의 건조중량과 chlorophyll *a*는 7일까지 증가하여 최고 1.9 g/l과 16.4 mg/l에 달했다. 건조중량에 대한 chlorophyll *a*의 비율은 5일까지는 증가한 후, 감소하였다.

광생물반응기에서 성장한 *S. platensis*의 부상활성은 대수성장기에서 배양시간에 따라 증가하여 6일까지 배양된 조체는 정치 2시간에 부상률이 80%에 달하였으며 10시간이 지나면서 거의 모든 조체는 표면으로 부상하였다.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Fe}^{3+}$ 에 대해서 조류는 멍치는 현상을 나타내었지만, 부상의 증가는 확인되지 않았고, 일부 세포는 침전하였다. 그러나  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Mg}^{2+}$ 는 부상활성을 증가시켰다. 특히, *S. platensis*의 부상에 대한 NaCl 농도의 영향을 다양한 정치시간에 따라 조사한 결과, 농도의 증가에 따라 부상활성도 증가하는 것으로 나타났다. 2%의 NaCl의 첨가는 1%에 비해 유의적으로 부상활성을 증가시키는 결과를 나타내었다.

이상의 결과는 *S. platensis*의 부상활성을 이용하여 수확공정을 쉽게 수행할 수 있음을 보이고 있다. 이는 기계적인 동력 없이 수층에 세포가 부상하는 특징을 이용한 수확은 세포의 물리적 충격을 최소화하고, 이렇게 부상한 세포는 수확을 용이하게 한다. 또한 이러한 수확법은 기낭을 형성하는 다른 cyanobacteria에도 적용될 수 있을 것이다. 결론적으로 부상활성에 기초하여 *S. platensis*를 수확하기 위해서는, 생산성, 건조중량에 대한 chlorophyll *a*의 비, 탄소의 농도에 대한 단백질의 비율이 최적의 수확시기를 결정하기 위한 지표로서 사용되어 질수 있을 것이다.

## 4. Cyanobacteria로부터 고부가 유용물질 탐색 및 선정

### 가. 유용물질 추출을 위한 추출물 은행 구축

미세조류 추출물 은행을 위해 사용된 154 strains를 Allen 또는 GL 배지, 질소제한 배지, 인제한 배지, 질소인 제한배지의 4가지 group으로 나누어 배양한 후 미세조류를 아세톤으로 추출한 후 원심분리하고 상정액을 정량된 E-tube에서 용매를 휘발한 후 최종 500  $\mu\ell$ 가 되게 methanol로 희석하였다. 미세조류 추출물 은행은 154 strains에서 616 samples로 구성되었으며 -70°C에 보관하여 활성을 유지하였다.

### 나. 생리활성 물질 탐색계 구축

항암 및 항당뇨 활성은 enzyme assay법을 사용하였으며 항암 활성 탐색은 Vaccinia H1-related protein tyrosine phosphatase(VHR DS-PTPase)를 사용하였고, 항당뇨 활성 탐색은 protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B)를 사용하였다. 각 enzyme이 p-NPP를 기질로 발생하는 탈인산화 반응을 저해하는 정도를 활성으로 정의하였다. 항생활성은 13종의 병원균의 성장을 저해하는 정도를 paper disk 법을 사용하여 생성되는 clear zone의 지름을 측정하였다.

### 다. 생리활성 후보물질의 선정

생리활성 물질을 선정하기 위하여 구축된 추출물 은행의 시료를 대상으로 항암, 항당뇨 및 항생활성을 측정하였다. 총 154 strains 중 항암활성은 24 strains에서 나타났으며 AG10011에서 79% VHR 저해율을 보여 가장 높게 조사되었으며, 10 strains에서 활성을 나타낸 항당뇨 활성은 AG10007 strain에서 97%의 PTP1B 저해율을 나타내어 가장 높게 조사되었다. 13종의 병원균을 대상으로 조사한 항생활성은 AG10059 strain에서 8종의 병원균에 대하여 항생활성을 나타내어 가장 항생활성이 우수한 균주로 조사되었다.

각각의 활성을 배지조건에 따라 조사해 본 결과 항암 및 항당뇨 활성은 질소 및 인제한 배지에서 활성이 높게 나타났으며 항생활성은 배지조건에 상관없이 활성이 나타나는 것으로 조사되었다.

### 라. 생리활성 물질의 구조 결정

추출물의 NMR spectrum을 분석한 결과 AG10011 및 AG10152 등 6 strains에서 활성유기화합물이 많은 것으로 조사되었다. 선정된 6 strains에서 생리활성 물질의 구조를 결정하기 위하

여 200-L photobioreactor를 통하여 대량배양을 수행하여 물질을 추출하였다. AG10011 및 AG10152 strains를 대량 배양하여 얻은 추출물은 약 4 g이었으며 다양한 chromatography 및 spectrometry를 이용하여 생리활성 물질의 구조를 동정하고 있다.

## 5. 유용물질 생산의 실증화

### 가. Cyanobacteria biomass의 사료 적합성 시험

조류의 biomass를 이용한 사료첨가제 개발을 위하여 cyanobacteria 중 단백질 함량이 60-70%인 것으로 알려진 *Spirulina platensis*를 200-L 광생물반응기에서 대량배양하였다. 조체를 회수한 후 사료첨가제 후보물질 가능성을 알아보기 위하여 영양분석을 실시한 결과, 조섬유 0.16%, 조단백 0.27%, 조회분 1.25%, 조지방 0.16%를 함유한 것으로 나타났다. 더불어, 물벼룩(*Daphnia magna*) 및 어류를 이용한 독성시험 장치 및 방법을 구축하여 독성 평가를 실시한 결과, 독성이 없는 것으로 조사되었다.

### 나. 새우사료 첨가제

실험구는 상업용 새우 사료(T1), 상업용 새우 사료와 미생물제제(T2), 상업용 새우 사료와 *S. platensis*(T3), 상업용 사료와 미생물 제제 및 *S. platensis*(T4) 그리고 T4의 1/2(T5)로 하였다. 사료는 3 g/d를 3회 나누어 투여하였다. 양식 초기에는 규조류가 종수에서 우점하였지만, 점차 cyanobacteria로 천이하였다. 주요 우점종은 *Oocystella radios*, *Thalassiosira eccentrica* 및 *Oscillatoria* sp. 1이었다. 대하의 생존율은 전 구간에서 70-80%로 높게 나타났고, *S. platensis*를 사료첨가제로 사용한 T3에서 가장 높은 증체량을 보여 전체 평균의 20%이상이었다. 이러한 결과는 사료첨가제로 사용한 *S. platensis*가 대하의 성장에 주요하게 작용한 것으로 사료된다.

### 다. 돈사료 첨가제

200-L 광생물반응기에서 배양된 *S. platensis*는 배양 후 수확하였다. 수차례 배양, 회수된 조체를 사료첨가제에 5% 첨가하여 개량된 사료첨가제를 제조하였다. 제조된 사료첨가제는 사료에 0.1% 추가하여 충남 서산시 다운농장에서 돈사료 첨가제 시험을 실시하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

생물학적 CO<sub>2</sub> 고정화의 혁신적 기술은 생명공학기술을 이용한 균주개발으로 광합성 효율을 획기적으로 증대시키는 것이다. 따라서 1단계에서 개발된 광합성 미생물 균주탐색, CO<sub>2</sub> 고정화 기능의 향상, 유전자 구조 및 기능 연구, 배양의 최적화 등을 활용하여 2단계 후속연구에서는 광합성 기능 향상을 위한 분자생물학적 균주개발 및 CO<sub>2</sub> 고정화 시스템 개발이 가능하다고 판단된다.

생물학적 고정화의 결과로 생산되는 biomass의 상품화기술 개발로는 1단계에서 개발하여 기업체에 기술이전한 "스피루리나를 이용한 이산화탄소 저감 및 사료첨가제 제조" 기술을 양식장 현장에서 대규모로 적용하여 이산화탄소의 저감과 동시에 유용물질을 생산하여 상품화하는데 크게 기여하게 된다. 또한 생리활성물질탐색 결과는 2단계의 후속연구를 통하여 고부가 유용물질의 생산 및 상품화에 직접적으로 활용이 예상된다.

끝으로 본 연구를 통하여 확보된 500여 strains의 미세조류 및 600여 점의 미세조류 추출물은 우리나라의 중요한 토착 생물자원으로서 향후 관련 연구자 및 산업체에 유용한 생물자원으로 활용될 수 있다.

여 백

# S U M M A R Y

## I. Title

CO<sub>2</sub> fixation by cyanobacteria and production of high-value biomaterials from their biomass

## II. Objective and Importance of Research

CO<sub>2</sub> can be transformed into organic compounds by photosynthetic plants and microorganisms, which is a key function in the geobiochemical cycle of substances in nature. Therefore, this study was mainly focused on the screening of photosynthetic cyanobacteria (blue-green algae), strain improvement, optimization of culture process, and screening of high-value materials. On the basis of this research, technology development for 1) the efficient fixation of CO<sub>2</sub> by using cyanobacteria (*Spirulina* 1 g dw/L/d, 0.37 kg CO<sub>2</sub>/d) and 2) the production of high-value materials (bioactive compounds, feed-additives, etc.) from their biomass were aimed.

## III. Contents and Scope of Research

1. Establishment of collection, isolation and maintenance technologies of microalgae including cyanobacteria
2. Study on ecophysiological characteristics of cyanobacteria
  - Growth and carbon fixation of cyanobacterium *Spirulina platensis* with different nitrogen sources
  - Effect of CO<sub>2</sub> concentration on growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*
  - Strain improvement and efficiency enhancement of CO<sub>2</sub> fixation
3. Study on the mass cultivation process of cyanobacteria
  - Design and manufacture of the photobioreactor
  - Optimization and model system construction of mass cultivation
  - Study on composition of the medium components for culture optimization
  - Development of harvesting method of cyanobacteria



4. Selection of high-value biomaterials from cyanobacteria
  - Construction of microalgal extract bank for screening of bioactive materials
  - Construction of screening system of bioactive materials
  - Candidate selection of potential bioactive materials
  - Structure identification of bioactive materials
  - *In vivo* and *in vitro* bioactivity assay of bioactive materials
5. An actual proof of bioactive materials production
  - Test of feed suitability of cyanobacterial biomass
  - Feed additives for shrimp culture
  - Feed additives for swine rearing

## **IV. Research Results**

### **1. Establishment of the collection, isolation and maintenance technologies of microalgae including cyanobacteria**

In total, the sampling was conducted 6 times for collection of microalgae from the nationwide freshwaters. The number of isolated strains was 251, 160, 90 at 1st year, 2nd year, and 3rd year, respectively. Total over 500 strains were isolated and preserved. The isolated microalgae were composed of taxonomically 11 classes: Chlorophyceae (23 species, 203 strains), Cyanophyceae (18 species 178 strains), others (84 strains), and unidentification (38 strains).

### **2. Study on ecophysiological characteristics of cyanobacteria**

#### **(1) Growth and carbon fixation of cyanobacterium *Spirulina platensis* with different nitrogen sources**

The growth and C fixation of *Spirulina platensis* were investigated with ammonium, nitrate, nitrite, and urea as the N source in a batch culture. The nitrate group produced a higher dry weight yield, while the nitrite group contained more intracellular C. Finally, when considering the efficiency of C fixation, the culture should be harvested from day 6-10.

## **(2) Effect of CO<sub>2</sub> concentration on growth and photosynthesis of *Spirulina platensis***

The effect of different CO<sub>2</sub> concentrations on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* NIES 46 was examined in terms of cell growth and photosynthetic parameters. Under 0.01% CO<sub>2</sub>, growth stopped after the depletion of the dissolved inorganic carbon and the cell yield was low. The cells grown under 0.07% CO<sub>2</sub> exhibited no change in their growth rate when compared with the 0.03% CO<sub>2</sub>-grown culture, yet the cell yield increased from 1.2 to 3.6 g/l. The cells under 1% CO<sub>2</sub> showed the lowest growth, even though the inorganic carbon remained at 50-60 mg/l and pH 7.5-8.0. The photosynthetic rates under 0.03 and 0.07% CO<sub>2</sub> were higher than those under 0.01 or 1%. Accordingly, among the tested CO<sub>2</sub> concentrations, 0.07% CO<sub>2</sub> was found to be the best for a high-density culture of *S. platensis* NIES 46.

## **(3) Strain improvement and efficiency enhancement of CO<sub>2</sub> fixation**

Specific detection of cyanobacteria is necessary especially for environmental samples to reduce effort and time since cyanobacteria is not always major bacterial components in the samples. The primers (PC1F and PC1R) were designed to amplify an approximately 450-bp region of the *cpcBA* IGS by comparing representative sequences from all available sequences of GenBank database. Intriguingly, except *Microcystis*-like group (group F), other 6 groups of *cpcBA* genes were distantly related to previously reported genes (about 95-70% similarity in CpcB protein sequence to closest relatives). Among these, Group C, D, and G were highly divergent from known genes (less than 85 % in protein sequence similarities).

Global warming, as a consequence of increasing atmospheric concentrations of greenhouse gases, is one of the major environmental issues. The CO<sub>2</sub> released by industries accounts for more than half of the total CO<sub>2</sub> emissions. One of the future applications of microalgae is to the removal of CO<sub>2</sub> from exhaust gases at sites of industrial emission, such as power plants and steel factories. It has been established that photosynthesis is much more efficient in microalgae than in terrestrial plants. Therefore, microalgae are considered to be more suitable candidates than terrestrial plants as biological catalysts for CO<sub>2</sub> fixation. It is suggested that the direct biotreatment of discharged gases may reduce the cost, but imposes on microalgae extreme

conditions such as high concentrations of CO<sub>2</sub> and low pH caused by CO<sub>2</sub> aeration. Suppression of algal photosynthesis by both high concentrations of CO<sub>2</sub> and low pH has been reported. Thus microalgae suitable for the CO<sub>2</sub> treatment should be selected in terms of tolerance to these stresses.

### **3. Study on the mass cultivation process of cyanobacteria**

#### **(1) Design and manufacture of the photobioreactor**

The 200-L photobioreactor designed and manufactured in the previous study was improved to enhance efficiency of mass cultivation, and then was operated for microalgal cultivation to investigate the fixation efficiency of CO<sub>2</sub> and biomass productivity. Culture conditions such as temperature, light intensity, air flow rate were complemented according to the results of the microalgal growth rate estimated through *in vivo* fluorescence, chlorophyll a concentration and cell density. The complemented 200-L photobioreactor was used for mass cultivation of diverse microalgae containing cyanobacteria, such as *Spirulina platensis*, for screening of bioactive materials and feed additives.

#### **(2) Optimization and model system construction of mass cultivation**

*Spirulina platensis* was cultured in SOT medium modified by diverse CO<sub>2</sub> concentration in cylindrical photobioreactor to investigate effects of the CO<sub>2</sub> on the species growth and photosynthetic characteristic. The highest dry weight of the biomass was 2.4 g/L and was cultured under high CO<sub>2</sub> concentration. Specific growth rates estimated during the exponential growth phase were 0.17, 0.40, and 0.62 g/d at the low, middle, and high CO<sub>2</sub> concentration, respectively.

#### **(3) Study on composition of the medium components for culture optimization**

A study on the composition of medium components for growth optimization and enhancement of biomass productivity was conducted. SOT medium modified with diverse carbon and nitrogen concentration were used to investigate specific growth rate of *Spirulina platensis*. *S. platensis* was cultured in 3-L photobioreactor. In nitrogen concentration, high chlorophyll a concentration and dry weight of biomass were found in the medium containing

200 mg/L nitrogen (1.214 g/L NaNO<sub>3</sub>), which was lesser than 2.5 g/L NaNO<sub>3</sub> in the generally used SOT medium. To investigate the most favorable concentration of carbon at the 200 mg/L nitrogen concentration, NaHCO<sub>3</sub> as a carbon source, 1.68, 3.46, 8.4, 16.8, 34.6 and 56 g/L, were added to each medium. The highest maximum specific growth rate was found at the NaHCO<sub>3</sub> 16.8 g/L. The results of the cultures at the different concentration of N, Fe, Zn, Cu, Mn showed that maximum specific growth rate based on the dry weight was 0.42/d at the NaNO<sub>3</sub> 1.54 g/L treatment on 6 day from the beginning culture. Consequently, optimized medium composition obtained in this study produced maximum growth rate 1.11 g/L/d in the 3-L photobioreactor culture.

#### **(4) An actual proof of mass cultivation of cyanobacteria**

The existing 200-L photobioreactor was complemented and operated for cyanobacterial mass cultivation. *Spirulina platensis* was continuously cultured in the photobioreactor for 2 weeks. The production of the culture reached to total 35 g biomass/80 L, which showing a successful proof of mass cultivation of cyanobacteria.

#### **(5) Development of harvesting method of cyanobacteria**

This study aimed to investigate an effective harvesting method for *Spirulina platensis*. Eighty percent of *S. platensis* cells in the logarithmic growth phase were harvested by flotation when the cells were set in a static condition for 2 hours. The optimum harvesting time was about day 6 of cultivation. The flotation activity of *S. platensis* cells was enhanced by the addition of NaCl. The harvesting of *S. platensis* by flotation is a cost effective and straightforward method that can retain the algal quality. The optimum harvesting time of *S. platensis* can be predicted by the cellular protein to carbon ratio.

### **4. Selection of high-value biomaterials from cyanobacteria**

#### **(1) Construction of microalgal extract bank for screening of bioactive materials**

The bank of microalgal extracts was consisted of 616 samples from 154 strains. The strains, newly isolated from nationwide freshwaters in Korea, were screened for their

anticancer, diabetic and antibiotic activities. The microalgal strains were cultured with different nutritional conditions that were divided into 4 groups as follows; a normal medium such as Allen and GL, nitrogen (N)-limited medium, phosphorus (P)-limited medium, and N and P-limited medium. Algal biomass was extracted with acetone : H<sub>2</sub>O (1 : 1, v : v) and the extracts were used for the screening of bioactive materials. The extracts was kept at -70°C.

## **(2) Construction of screening system of bioactive materials**

Anticancer and antidiabetic activities were screened by the methods of Vaccinia H1-related protein tyrosine phosphatase (VHR DS-PTPase) inhibition and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition, respectively. The activities were defined by inhibition rate of dephosphate from p-NPP. The Antibiotic materials were screened by paper disk methods with 13 bacterial pathogens. The activity was defined by diameter of clear zone.

## **(3) Candidate selection of potential bioactive materials**

Anticancer, antidiabetic and antibiotic activity were investigated for selection of bioactive materials. The VHR DS-PTPase inhibition activity was observed in 24 strains, having a maximum 79% inhibition in AG10011 and the PTP1B inhibition activity was observed in 10 strains, having a maximum 97% in AG10007. AG10059 incubated in an N and P-limited medium showed antibiotic activity in 8 species out of 13 pathogenic bacteria. As a whole, N and P limitation increased the production of bioactive materials.

## **(4) Structure identification of bioactive materials**

The bioactive materials in the microalgal extracts were investigated by analysis of NMR spectrum data and most of bioactive materials were contained in the microalgal extracts of 6 strains, such as, AG10011 and AG10152. Therefore the 6 strains were selected for further identification of bioactive materials in the extracts. The extracts was obtained by 200-*l* mass culture and it was over 4 g. Bioactive materials in the extracts are identified by various chromatography and spectrometry.

#### **(5) *In vivo, in vitro* bioactivity test**

Seventy seven unialgal microalgae containing cyanobacteria were subjected to screening antibiotic materials under diverse cultures conditions of general, N-limited, P-limited, and N and P-limited Allen medium. Total 280 extracts obtained from the 77 strains were concentrated and used to test antibiotic activity to the pathogenic organisms. Among the extracts, 21 were found to be bioactive materials showing antibiotic activity against diverse pathogenic organisms. In particular, a strain AG10005 showed strong antibiotic activity to *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC2208, and *Shigella flexneri* KCTC 2008.

### **5. An actual proof of bioactive materials production**

#### **(1) Test of feed suitability of cyanobacteria biomass**

In order to develop feed additives using cyanobacterial biomass, *Spirulina platensis* was mass-cultured in a 200-L photobioreactor and its biomass was subjected to analysis of nutritional composition. *S. platensis* was composed of crude fibroid 0.16%, crude protein 0.27%, crude ashes 1.25%, and crude lipid 0.16%. In toxicity test, the biomass of *S. platensis* was found to be non-toxic to *Daphnia magna* and fish.

#### **(2) Feed additives for shrimp culture**

*Spirulina platensis* was provided as a feed additive for the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* culture and its effect was compared with those of the treatments. Members of the diatom dominated in the species numbers at initial culture period, but were gradually replaced with those of the cyanobacteria. Major dominant species were *Oocystella radiosa*, *Thalassiosira eccentrica* and *Oscillatoria* sp. 1. Survival rates of the *F. chinensis* ranged from 70 to 80% in all the treatments. The T3 fed *S. platensis* weighted the most and showed 20% weightier than that of the other treatments ( $P < 0.1$ ), suggesting that *S. platensis* significantly contributed to improving *F. chinensis* growth.

#### **(3) Feed additives for swine rearing**

Biomass of *Spirulina platensis* was used as a feed additives for rearing domestic swine for 5 months. Feed demand rate was 2.75 in use of new feed, lower than 2.9-3.0 in general feed, and rearing period became 7 days shorter. Therefore, addition of *S. platensis* to commercial feed for swine rearing increased economic benefit.

여 백

# C O N T E N T S

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	31
<b>I . Object of research</b> .....	31
<b>II . Importance of research</b> .....	31
1. Technical aspects .....	31
2. Economical aspects .....	31
3. Sociocultural aspects .....	32
<b>III . Scope of research</b> .....	32
<b>Chapter 2. Status of technology development</b> .....	35
<b>I . Foreign status of technology development</b> .....	35
<b>II . Domestic status of technology development</b> .....	36
<b>III . Status of patent related to the microalgae</b> .....	40
<b>IV . Recent research status related to the microalgae</b> .....	44
<b>Chapter 3. Contents and results of the research</b> .....	49
<b>I . Establishment of collection, isolation and maintenance of cyanobacteria</b> .....	49
1. Introduction .....	49
2. Collection of microalgae .....	57
3. Medium for microalgae .....	58
4. Micromanipulation for isolation .....	60
5. Axenic isolation of cyanobacteria .....	60
6. Maintenance of microalgal culture .....	62



7. Establishment of strains .....	63
<b>II. Study on the ecophysiological characteristics of cyanobacteria .....</b>	<b>68</b>
1. Growth and carbon fixation of cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> with different nitrogen sources .....	68
2. Effect of CO <sub>2</sub> concentration on growth and photosynthesis of <i>Spirulina platensis</i> .....	73
3. Strain improvement and efficiency enhancement of CO <sub>2</sub> fixation .....	79
<b>III. Study on the mass cultivation process of cyanobacteria .....</b>	<b>84</b>
1. Design and manufacture of the photobioreactor .....	84
2. Optimization and model system construction .....	87
3. Study on composition of the medium components for culture optimization .....	90
4. An actual proof of cyanobacterial mass cultivation .....	102
5. Development of harvesting method of <i>Spirulina platensis</i> .....	102
<b>IV. Screening and Selection of high-value biomaterials from cyanobacteria</b>	<b>109</b>
1. Introduction .....	109
2. Construction of of microalgal extract bank for screening of bioactive materials ..	111
3. Construction of screening system of bioactive materials .....	113
4. Candidate selection of potential bioactive materials .....	117
5. Structure identification of bioactive materials .....	134
6. <i>In vivo, in vitro</i> bioactivity test .....	139
<b>V. An actual proof of boactive material production .....</b>	<b>143</b>
1. Test of feed suitability of the cyanobacteria biomass .....	143
2. Feed additives for shrimp culture .....	143
3. Feed additives for swine rearing .....	145
<b>Chapter 4. Achievement and contribution of the research .....</b>	<b>155</b>
<b>Chapter 5. Application of the results .....</b>	<b>157</b>

<b>Chapter 6. Overseas science technologies collected in development process of the research .....</b>	<b>159</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>161</b>

# 여 백

# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	31
제 1 절 연구개발의 목적 .....	31
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	31
1. 기술적 측면 .....	31
2. 경제·산업적 측면 .....	31
3. 사회·문화적 측면 .....	32
제 3 절 연구개발의 범위 .....	32
1. Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존기술 확립 .....	32
2. Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구 .....	32
3. Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구 .....	32
4. Cyanobacteria로부터 고부가 유용물질 탐색 및 선정 .....	32
5. 유용물질 생산의 실증화 .....	33
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	35
제 1 절 국외의 기술개발 현황 .....	35
제 2 절 국내의 기술개발 현황 .....	36
1. 국내의 기술개발 현황 .....	36
2. 국내·외 기술수준 비교 .....	37
3. 현기술상태의 취약성 및 전망 .....	39
4. 미세조류 및 cyanobacteria로부터 유용물질의 국내·외 시장규모 .....	39
제 3 절 국내외 관련특허 동향 .....	40
제 4 절 Cyanobacteria 및 미세조류에 대한 최근의 연구 동향 .....	44
1. 미세조류의 탐색 및 개량 .....	44
2. Cyanobacteria 중 사상형(filamentous type)인 Spirulina의 대량 배 .....	44

3. CO <sub>2</sub> 의 생물학적 고정화 시스템 .....	45
4. 광합성 미생물 광반응기 및 배양공정의 개발 .....	45
5. Cyanobacteria로부터 유용물질 생산 .....	46
<b>제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....</b>	<b>49</b>
<b>제 1 절 Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존 기술 확립 .....</b>	<b>49</b>
1. 서론 .....	49
2. 분리용 미세조류의 채집 .....	57
3. 미세조류의 배지 .....	58
4. 분리조작 .....	60
5. 남조류의 무균분리 .....	60
6. 미세조류의 보존 .....	62
7. 균주확보 .....	63
<b>제 2 절 Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구 .....</b>	<b>68</b>
1. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 N source의 영향 .....	68
가. 서론 .....	68
나. 재료 및 방법 .....	68
다. 결과 및 고찰 .....	68
2. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 CO <sub>2</sub> 의 영향 .....	73
가. 서론 .....	73
나. 재료 및 방법 .....	73
다. 결과 및 고찰 .....	73
3. Cyanobacteria의 균주개량 및 고정화 효율 증대 .....	79
가. 균주개량 .....	79
나. CO <sub>2</sub> 고정화 효율 증대 .....	83
<b>제 3 절 Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구 .....</b>	<b>84</b>
1. 광생물반응기 설계 및 제작 .....	84
2. Cyanobacteria의 배양공정의 최적화 및 모델 시스템 정립을 위한 배양공정 연구	

.....	87
3. 배양의 최적화를 위한 배지 조성물 연구 .....	90
가. 서론 .....	90
나. 재료 및 방법 .....	92
다. 결과 및 고찰 .....	93
4. Cyanobacteria 대량배양의 실증화 .....	102
5. Cyanobacteria의 수확공정 .....	102
가. 서론 .....	102
나. 재료 및 방법 .....	102
다. 결과 및 고찰 .....	103
제 4 절 고부가 유용물질 탐색 및 선정 .....	109
1. 서론 .....	109
2. 유용물질 탐색을 위한 미세조류 추출물 은행 구축 .....	111
가. 조류의 분리 .....	111
나. 대상 조류의 배양 .....	111
다. 생리활성물질 추출 .....	115
라. 결과 .....	115
3. 생리활성 물질 탐색계 구축 .....	115
가. 항암 및 항당뇨 물질 탐색계 .....	115
나. 항생 물질 탐색계 .....	119
4. 생리활성 후보물질 선정 .....	119
가. 항암, 항당뇨 및 항생 활성 .....	119
나. 배지 조건별 생리활성 .....	122
5. 생리활성 물질의 구조 결정 .....	134
가. 미세조류의 대량 배양 및 추출 .....	134
나. 구조동정 미세조류 추출물의 선정 .....	134
다. 생리활성물질의 구조 결정 .....	134
6. 유용물질의 <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> 생물활성 검정 .....	139
제 5 절 유용물질 생산의 실증화 .....	143

1. Cyanobacteria biomass의 사료 적합성 시험 .....	143
2. 돈 사료첨가제 .....	143
3. 새우 사료첨가제 .....	145
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>155</b>
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>157</b>
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>159</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>161</b>
<b>연구결과 활용계획서 .....</b>	
<b>첨부 1. 연구결과 활용계획서 .....</b>	
<b>첨부 2. 기술 요약서 .....</b>	

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

이산화탄소등 대기 중의 온실효과 가스는 지구의 온난화뿐만 아니라, 기후변동을 통해서, 식량공급의 불안정화 및 해면상승, 더욱이 지구전체의 생태계의 변화를 초래할 수 있다. 본 연구는 고농도의 CO<sub>2</sub> 가스를 고정하여 유기물을 합성하는 cyanobacteria 등의 미세조류를 분리 및 개량하여 대량의 CO<sub>2</sub>가스 배출업체에 적용하여 실제적인 CO<sub>2</sub> 가스의 저감과 동시에 생산된 생물량으로부터 유용 생리활성물질의 개발 및 상품화를 목적으로 하고 있다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

대기 또는 수중의 CO<sub>2</sub>는 식물 또는 미생물(미세조류, cyanobacteria 등)의 광합성 작용에 의하여 유기물질로 고정된다. 즉, 광합성 작용은 자연계 물질순환의 핵심기능이며, CO<sub>2</sub> 저감을 위한 환경친화적인 방법이다. 광합성 미생물(미세조류, cyanobacteria 등)의 CO<sub>2</sub> 고정화 속도는 소마무의 15배로 매우 효율적이며(Matsumoto 등, 1995), 고밀도 배양이 가능하므로 유용생물자원의 확보 측면에서도 중요한 기술분야이다. 21세기 Post-genome시대를 맞이하여 급속히 발전하고 있는 생명공학기술(Biotechnology, BT)을 이용한 광합성 미생물의 CO<sub>2</sub> 고정화 효율증대가 중요하다. 즉, cyanobacteria의 CO<sub>2</sub>고정과 유용물질 생산에 관련된 유전자 확보 및 functional genomics(기능유전체학)에 의하여 고기능의 균주개발이 가능하다.

### 2. 경제 · 산업적 측면

우리나라는 당분간 지속적 경제성장을 위하여 온실가스의 배출량이 규제되지 않기를 희망하는 입장이므로, CO<sub>2</sub>의 배출감소에 대한 자발적이고도 적극적인 노력이 필요하다. Cyanobacteria의 대량배양을 통하여 얻어진 biomass는 축사료 및 어사료 첨가제, 식품용 천연색소, 의약품 원료, 건강식품 등의 고부가 생물제품 생산에도 직결되어 생물산업의



발달을 촉진함으로써 국가 경제·산업 발전에 도움이 된다.

### 3. 사회·문화적 측면

우리나라의 화석에너지 의존도는 매우 높으며(1990년 83%), CO<sub>2</sub> 배출량은 세계 10위(1999년 IEA 발표, 410.4백만톤)로 상당기간 지속될 전망으로 CO<sub>2</sub>저감을 위한 적극적인 노력이 요구된다. 기후변화협약 제3차 당사국총회(1997년 12월, 일본 교토)에서 2008-2012년 간 선진국 전체의 CO<sub>2</sub> 배출총량을 1990년 수준보다 최소 5.2% 감축하는 교토의정서를 채택하였다. 우리나라는 현재 경제규모 세계 13위의 OECD 회원국으로서, 교토의정서 2차공약이 발효되는 2013년부터 참여를 피할 수 없을 것으로 예상되고 있다. 따라서 CO<sub>2</sub>의 저감 및 처리에 대한 보다 적극적인 노력이 필요하다.

## 제 3 절 연구개발의 범위

### 1. Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존기술 확립

### 2. Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구

- 미세조류의 성장과 광합성에 대한 N source의 영향
- 미세조류의 성장과 광합성에 대한 CO<sub>2</sub>의 영향
- 균주개량 및 고정화 효율 증대

### 3. Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구

- 광생물반응기 설계 및 제작
- 대량배양의 최적화 및 모델시스템 정립
- 배양의 최적화를 위한 배지 조성물 연구
- Cyanobacteria의 수확법 개발
- 대량배양의 실증화

### 4. Cyanobacteria로부터 고부가 유용물질 탐색 및 선정

- 유용물질 탐색을 위한 추출물 은행 구축
- 생리활성물질 탐색계 구축
- 생리활성 후보물질 선정

- 생리활성물질 구조 규명
- 유용물질의 *in vivo*, *in vitro* 생물활성 검증

## 5. 유용물질 생산의 실증화

- Cyanobacteria biomass의 사료 적합성 시험
- 새우사료 첨가제
- 돈사료 첨가제

# 여 백

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외의 기술개발 현황

일본의 경우 미세조류를 이용한 CO<sub>2</sub> 고정화 연구(지구환경산업기술연구소, RITE)는 1990-1999년(10년간)에 걸쳐 생물학적 고정화 연구에 약 1,000억원을 투자하였다. 고온, 낮은 pH, 고농도의 CO<sub>2</sub>를 이용할 수 있는 미세조류의 광범위한 탐색을 수행하였다. 또한 고농도, 대용량의 배양기와 태양광의 효율적 이용기술 개발을 추진하였으며, 소규모의 생물학적 고정화 system을 개발하였다. 광합성을 통해 얻어지는 유용물질과 에너지 생산기술에 관한 연구를 수행하였다. 이산화탄소를 고정하는 우량 미세조류의 확보, 숲보다 10배의 광합성 용량을 갖는 광생물반응기 개발 등과 소규모의 생물학적 고정화 system을 실증화 하였다. 육상의 미세조류뿐만 아니라, 해양에서도 대상 미세조류를 탐색하여 낮은 pH, 제한된 광조건에 대한 내성 및 고농도의 CO<sub>2</sub>농도에서 높은 증식을 보이는 종을 분리하였고, 전력중앙연구소(CRIEPI)는 원추형 나선 관상 광생물반응기를 이용하여 태양광 조사에 의해 *Chlorella* sp.의 최대 광합성량이 33.2 g dry weight/m<sup>2</sup>/d에 도달하였다.

미국의 NREL(National Renewable Energy Laboratory)은 1978-1996년에 걸쳐 미세조류로부터 재생 가능한 수송 연료의 개발을 추진하고 있다. 고지질 함량의 미세조류를 이용하여 CO<sub>2</sub>로부터 biodiesel을 생산하고 있으며, 미세조류와 cyanobacteria의 유전자 분석, 유전체 연구, 유전자 조작 등 생명공학기술을 이용한 균주개발을 중점적으로 시도하고 있다. Hawaii에 위치한 Cyanotech Inc.는 미세조류 배양 시설의 난방 목적으로 설치한 보일러에서 배출되는 연소가스를 cyanobacteria인 *Spirulina* 배양 원료로 사용하는 폐쇄 시스템을 실증 규모로 운전하여 처리 비용을 "\$0"으로 낮출 수 있다고 보고하였다. US DOE는 국가적 난제를 해결하기 위하여 "Genomes to Life(GTL) Program"을 2001년부터 추진하고 있다. 미생물 군집의 대사활성을 조절하여 자연계 생물학적 순환의 변화를 유도함으로써 과잉의 이산화탄소를 육상생물체, 토양, 해양 생물체에 저장하도록 하는 연구를 수행하고 있다.

독일은 2000년 Wolfsburg에서 온실 내에 유리로 제조된 산업용의 관형 광생물반응기가 총길이 500 km, 총부피 700 m<sup>3</sup>의 규모로 설치되었으며, 연간 *Chlorella* 생산량은 130-150 ton dry weight로 추정된다. 노르웨이는 자연 수계로부터 cyanobacteria의 분

리·확보, cyanobacteria로부터 생리활성물질의 탐색 등의 연구를 지속적으로 수행하고 있으며, 최근 30종 이상의 신규 항생물질을 보고하였다(Skulberg, 2000).

## 제 2 절 국내의 기술개발 현황

### 1. 국내의 기술개발 현황

1990년대 중반부터 G-7 환경공학기술개발사업, 중점국가연구개발사업 등으로 CO<sub>2</sub>의 고정화 연구가 수행되었으나, 화학적 고정화 연구에 치중하였으며 생물학적 고정화는 그 규모가 매우 작은 실정이다. 생물학적 고정화는 광생물반응기 개발, 배양공정의 최적화 등에 중점을 두고 추진하여 많은 경험과 know-how를 축적하였다(에너지기술연구원, KIST, 포항공대, KAIST 등). 그러나 CO<sub>2</sub> 고정화 효율 증대를 위한 균주 탐색, 균주개량 그리고 biomass로부터 유용물질 생산에 대한 연구는 아직까지 본격적으로 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 본 연구팀(한국생명공학연구원)은 미세조류 및 cyanobacteria의 산업적 이용에 대한 연구로서 1995년부터 3년간에 걸쳐 미세조류(*Botryococcus* sp.)를 이용한 석유류 대체에너지의 생산(통산부 대체에너지기술개발사업), 1995년부터 2년간 미세조류를 이용한 축산폐수의 고도처리기술 개발(농림수산기술개발사업), 1997년부터 2003년까지 cyanobacteria가 생산하는 생리활성물질의 일종인 microcystins의 연구(과기부 중점국가연구개발사업) 등을 수행하면서 microalgal biotechnology 분야의 기반기술을 축적하였다고 평가된다. 또한 본 연구진에 소속한 항암물질연구실은 미생물로부터 신규 항암·항생물질을 개발하기 위한 연구를 지속적으로 수행하고 있다. 이외에도 한국생명공학연구원 부설 유전자원센터에서는 1998년부터 국내의 토착 미세조류와 cyanobacteria를 주요 대상으로 균주 분리, 동정, 보존 및 분양을 목적으로 culture collection을 시작하여 현재 약 600여 균주를 보존하고 있다. 국내 생명공학기술은 선진국 수준에 근접하지만 cyanobacteria를 포함하여 미세조류의 유전체 구조 및 기능 연구는 기초연구 수준이며, 광합성 미생물의 생명공학기술을 이용한 균주 개량 분야는 선진국의 약 40% 수준으로 평가된다. KIER(에기연)에서 이산화탄소 전환 효율을 크게 향상시킨 광생물반응기를 개발하였고(2003). 포항공대에서 내부복사 air-lift 광생물반응기를 개발하였으나(2001), 광생물반응기 개발기술 분야는 선진국의 약 70% 수준으로 평가된다 KIER는 연소가스를 생물학적 전환하는 실증 공정(1 kL) 시스템을 구축하였다. 생물학적 전환의 실증 공정은 선진

국의 약 60% 수준으로 평가된다. KRIBB(생명연)은 미세조류의 분리 및 배양 기술, 생리 활성물질 탐색기술 확보하고 있으나, 유용물질 탐색 및 생산기술은 선진국의 약 70% 수준으로 평가된다. 참고로 국내의 연구기관에서 수행한 CO<sub>2</sub> 고정화 연구의 대표적 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. The present status of biological CO<sub>2</sub> fixation studied in the national and international institutes

배양형태		연구기관	배양규모, L	CO <sub>2</sub> 고정화 속도, g CO <sub>2</sub> /m <sup>2</sup> /d	비고
이론적	태양광 이용	Richmond 등, 1997		240	최대치
폐쇄형	관형반응기	동경전력	200	80	인공 광원
"	관형반응기	일본해양연구소	300	140	유용물질 생산 ⇒ 본 연구의 모형으로 선정
"	광섬유반응기	동경전력연구소	5	160	
"	수직관형반응기	에너지기술(연)	50	40	사료생산
개방형	Raceway	미국 NREL	1.5 × 10 <sup>5</sup> , 1000 m <sup>2</sup>	20-40	디젤유 생산
"	Raceway	Tohoku 전력	360	25-40	디젤유 생산
참고: 1. 미세조류 또는 cyanobacteria C g x 약 2 = dry wt g 2. 미세조류 또는 cyanobacteria C g x 약 3.7 = CO <sub>2</sub> g 3. Volumetric productivity (g/L/d) x ≐ 10~100 = Areal productivity (g/m <sup>2</sup> /d)					

## 2. 국내·외 기술수준 비교

우리나라가 보유하고 있는 미세조류 및 cyanobacteria의 순수분리 및 보존, 대량배양 기술은 최근 이 분야의 저명 국외 학술지(Appl. Environ. Microbiol., J. Phycology 등)에

국내 연구결과를 계속적으로 발표하는 등 선진국 수준에 근접한 것으로 평가된다. 또한 세균 및 곰팡이 등의 미생물로부터 유용물질의 탐색, 분리 및 정제 기술은 우리나라에서 G7 선도기술개발사업 등을 통하여 꾸준히 연구개발되어 상당한 수준에 있다고 평가된다. 따라서 지금까지 개발된 기술을 미세조류와 cyanobacteria에 적용하는 응용연구가 필요하다.

한편 미생물의 유전자 분석과 유전체 기능연구를 통한 균주개량, 옥외배양, 유용물질의 생산, 상품화 기술 등의 실용화 관련 기술수준은 선진국에 비하여 크게 뒤지고 있는 것으로 평가된다. 따라서 이에 대한 집중적 연구가 병행되어야 한다. 광합성 미생물의 대량배양에 의한 CO<sub>2</sub>의 생물학적 고정화에 수반되는 주요 핵심기술의 최고 선진국 대비 우리나라의 기술수준은 Table 2와 같다.

Table 2. Comparison of national technology level with those of the developed countries in major core technologies for biological CO<sub>2</sub> fixation

핵심기술명	선진국 수준	우리나라 수준(2002)	우리나라 수준(2005)
Cyanobacteria의 순수 분리	100	80	90
Cyanobacteria의 유전체 연구	100	30	40
Cyanobacteria의 기능강화	100	30	40
광생물반응기 개발	100	60	70
개방형 배양 기술	100	20	30
Cyanobacteria 대량 배양	100	70	70
배양공정의 최적화	100	60	70
유용물질 탐색	100	70	70
유용물질의 분리, 정제	100	60	70
상품화	100	40	40

### 3. 현기술상태의 취약성 및 전망

연소 배출가스에 포함된 CO<sub>2</sub>의 직접고정은 1) 대규모 설비(배가스를 수증으로 주입하는 시설) 필요, 2) 배가스 중에 포함된 SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>에 의한 고정화의 저해, 3) 생산된 biomass의 저부가가치(의료 및 식품용으로 사용 곤란) 등으로 실용화에 어려움이 있다. 또한 배가스 중 평균 CO<sub>2</sub> 농도는 10-20%로 대부분의 광합성 미생물이 생육활성을 갖는 CO<sub>2</sub> 농도인 5%에 비해 너무 높다. CO<sub>2</sub> 생물학적 고정화의 주체는 광합성 미생물이다. 그러나 현재까지 국내의 환경에서 적응하여 활발히 성장할 수 있는 토착 미세조류나 cyanobacteria의 광범위한 탐색 및 고정화 효율 증대에 대한 연구가 미흡하다. 광합성 미생물의 생산성을 결정하는 핵심요소는 광량이다. 그러나 효율적 광생물반응기 개발, 효과적인 광집진 장치 등에 대한 연구가 매우 취약하다. CO<sub>2</sub>의 생물학적 고정화 연구에서 다량으로 생산되는 biomass는 일부 biodiesel, 어사료 등으로 개발을 시도하였을 뿐 경제성 있는 고부가 자원으로 개발되지 못하였다.

상기의 취약성을 극복하기 위한 본 과제 기술개발 전략 및 향후 기술개발의 전망은 다음과 같다. 분리된 CO<sub>2</sub>의 고정화는 배가스의 화학적 막분리를 통해 확보된 CO<sub>2</sub>를 대상으로 고정화 및 고부가의 유용물질 생산을 수행한다. 우량균주 확보: 광합성 미생물 중에서 상대적으로 생장이 빠르고 CO<sub>2</sub>의 고정화 효율이 높은 cyanobacteria를 대상으로 하며, 자연계로부터 광범위한 탐색, 생명공학기술을 이용한 균주개량 등 고정화효율이 증대된 우량 균주의 확보에 중점을 둔다. 광집진 장치 개발은 효율적, 경제적으로 태양광을 공급할 수 있는 광 집진장치의 설계 및 이를 고려한 광생물반응기의 제작에 중점을 둔다. 고부가 유용물질 생산을 위하여 광합성 미생물 중에서 의약소재 등 고부가 유용물질 생산의 가능성이 큰 cyanobacteria를 실험대상으로 선정하였다.

### 4. 미세조류 및 cyanobacteria로부터 유용물질의 국내·외 시장규모

미국의 기능성 건강식품 시장은 1999년 기준 270억 달러이며, 이에 대한 연구비도 1993년 2백만 달러에서 2000년에는 6천 9백만 달러로 대폭 증액되어 기능성 건강식품을 포함한 대체의료 관련 연구를 미 정부차원에서 지원하고 있다. 일본의 건강식품 시장규모는 2000년 1조 3000억엔에 달하며, 특히 뇌기능 개선, 비만방지, 면역증강, 염증개선, 혈압 조절제, 항암제 등이 주축을 이루고 있다. 국내 건강식품시장은 IMF 이후 회복되면서 년 10% 이상의 지속적인 상승세를 보이고 있으며, 2001년 기준 약 1조 2000억원에 이르고



있다. Cyanobacteria로부터 cyanovirin과 같은 항암, 항생물질 생산은 전세계 시장규모는 1억 달러 이상, 향후 급격한 증가 예상된다. Cyanobacteria, 미세조류로부터 phycobili-proteins,  $\beta$ -carotene 등의 색소 생산은 전세계 시장규모는 1억 달러 이상이며, 국내의 경우에는 미개척 분야이다. 건강식품 및 수산양식용 식물먹이로 *Chlorella*의 시장규모는 전세계 시장규모는 수억 달러, 국내에서 양식용 식물먹이 수입규모는 200억원/년으로 추정된다. 미세조류 또는 cyanobacteria로부터 생산되는 대표적 유용물질의 부가가치 및 추정되는 시장규모는 Table 3과 같다.

Table 3. Representative bioactive materials from microalgae containing cyanobacteria and potential market size

미세조류	유용물질	함량 (% 건량)	생산물 가격 (\$/kg)	조류의 가격 (\$/kg)	시장규모 (백만 \$)
<i>Chlorella</i>	Health food	100	25	25.00	>100
<i>Spirulina platensis</i>	Phycocyanin	2	500	10.00	10-100
<i>Dunaliella salina</i>	Glycerol	40	2	0.80	10-100
	$\beta$ -Carotene	10	600	60.00	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin	1	3000	30.00	10-100
<i>Botryococcus braunii</i>	Biofuel	20	1	0.2	>100

### 제 3 절 국내외 관련특허 동향

조류로부터 유용물질 생산, 조류의 배양, 조류를 이용한 환경개선 등의 응용분야에 대한 특허동향을 파악하기 위하여, 1991년부터 2000년에 걸쳐 10년간 Journal of Applied Phycology에 보고된 특허자료를 종합적으로 분석하였다. 상기 조사된 자료에 의하면 미세조류 응용분야에서 지난 10년간 보고된 특허는 총 587건으로, 1990년대 중반에 많이 분포하였다. 1990년대에 제출된 미세조류의 특허분야별 분포백분율은 Figure 1과 같다. 특허분야별로는 유용물질 및 생리활성물질 분야가 전체의 28.1%에 해당하는 165건으로 가장 많았다. 그 다음으로 항생물질 분야가 19.4%로 114건, 미세조류의 배양기술 분야가 11.1%로 65건에 달하였다. 이외에도 광생물반응기 개발(9.0%), 폐수처리 등 환경개선에

활용하는 분야(8.5%), 건강보조식품 생산분야(6.0%) 등으로 조사되었다. 1990년대의 10년간 제출된 미세조류의 특허 국가별 분포는 Figure 2와 같다. 일본이 216건으로 전체의 37.3%로 가장 많았으며, 미국이 2위로 119건(20.6%), 전 세계 특허가 96건(16.6%)으로 조사되었다. 개별 국가별로는 유럽에서 독일, 러시아, 영국 등에서 비교적 많은 특허를 보유하고 있었다. 특기할 내용으로는 미세조류의 특허는 1995년까지 일본의 특허가 주를 이루었으나 1996년부터 미국 특허가 크게 증가하였으며 아울러 세계 특허가 증가하는 경향을 보이고 있다.

조류로부터 유용물질 생산, 발생된 CO<sub>2</sub>를 유용물질로 전환하는 기술인 CO<sub>2</sub>의 자원화 및 처리기술의 전체출원건수는 811건이며, 이중 촉매화학적 방법에 관한 특허출원 건수가 584건(72%), 미생물을 이용한 생물학적 전환 및 유용물질 생산이 127건(16%)을 차지하였다(특허청, 2001). 그러므로 CO<sub>2</sub>의 자원화 및 처리기술 분야의 특허출원은 화학 및 생물학적 방법에 의해 이루어졌음을 알 수 있다. 따라서 화학 및 생물학적 기술이 다른 기술 분야에 비하여 실용화에 근접하였음을 알 수 있다.

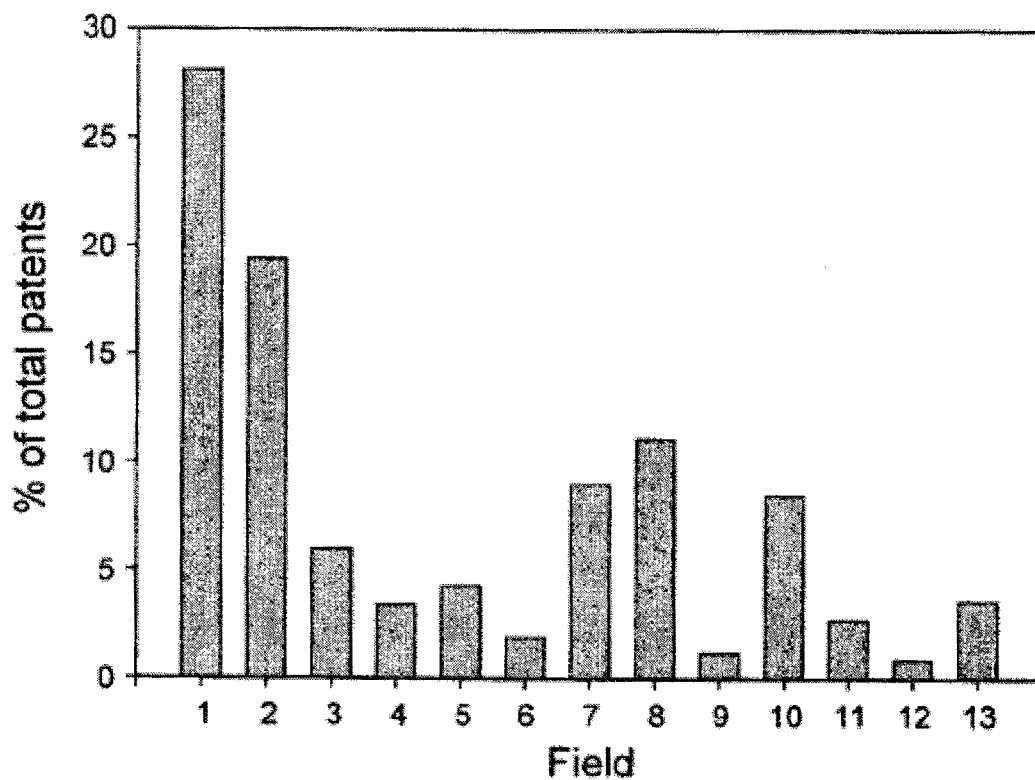


Figure 1. Percentage of each application field of the microalgae-related patents (1991-2000). 1, Bioactive and Useful compounds; 2, Biocides and Biological control; 3, Health foods; 4, Medical materials; 5, Feeds; 6, Pulp; 7, Photobioreactor; 8, Cultivation; 9, Harvest; 10, Environmental research; 11, CO<sub>2</sub> fixation; 12, Biofertilizers; 13, Molecular biology research.

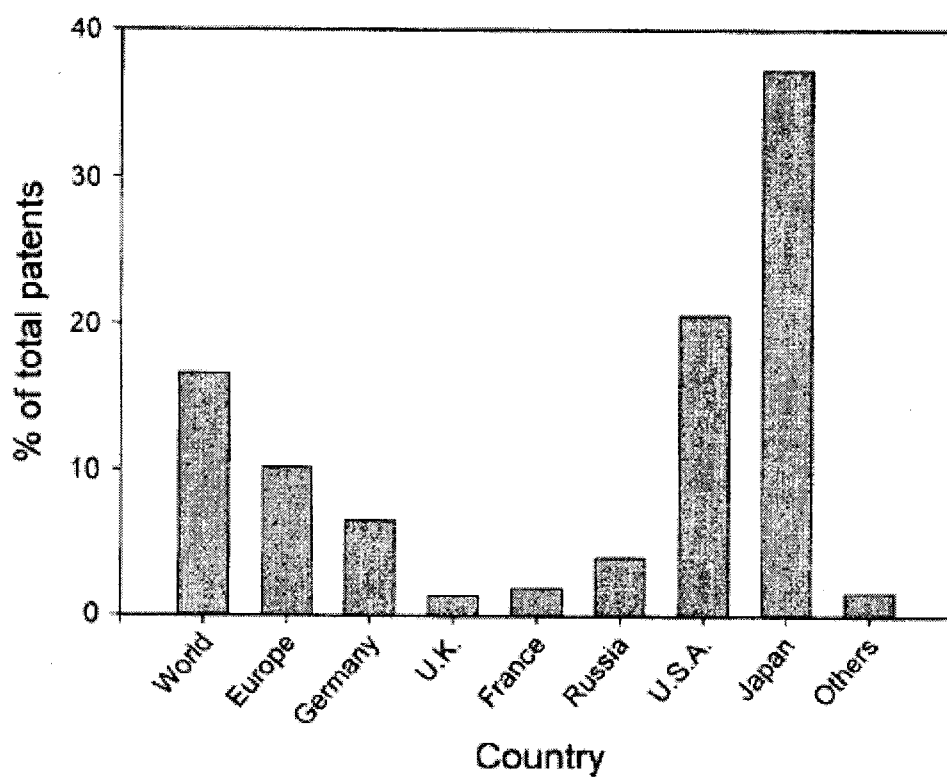


Figure 2. Percentage of each registered country of the microalgae-related patents (1991-2000).

## 제 4 절 Cyanobacteria 및 미세조류에 대한 최근의 연구 동향

### 1. 미세조류의 탐색 및 개량

CO<sub>2</sub> 배출원으로부터 CO<sub>2</sub>의 생물학적 고정을 실현하기 위해서는 고농도의 CO<sub>2</sub> 및 각종 화합물이 혼합된 배출가스가 수중에 유입되는 상태에서 광합성능이 우수하고, 지속적인 배양이 가능한 조류종의 탐색이 무엇보다 우선되어야 한다. Kurano 등(1995)은 해양 녹조류인 *Chlorococcum littorale*로부터 CO<sub>2</sub>의 분압 20%에서 4 g CO<sub>2</sub>/L/d의 높은 CO<sub>2</sub> 고정률을 보고하였다. 산성 및 고온조건에서도 내성을 가진 조류주를 탐색한 결과 단세포 홍조인 *Galdieria partita*는 pH 1, 50°C, 50 ppm SO<sub>2</sub>의 조건에서도 성장 가능한 것으로 보고되었다(Kurano 등, 1995). 실제로 화력발전소 배출가스는 탈황, 탈질 후에 40°C를 넘지 않으며, 석탄을 연소시켰을 때 배출가스의 CO<sub>2</sub> 농도는 20% 이내로 조사되었으므로, 이와 같은 조류주는 산업체 배출가스의 생물학적 고정에 직접 이용될 수 있다고 판단된다. CO<sub>2</sub>의 효율적 고정을 위해서는 고농도의 CO<sub>2</sub> 및 낮은 pH에 대한 내성, 안정적이고 높은 성장률, 고밀도 배양의 가능성, NO<sub>x</sub>나 SO<sub>x</sub> 등 산성가스에 대한 내성, 내열성 등의 특성을 고루 갖춘 cyanobacteria가 필요하다.

광합성 효소인 Rubisco내로 무기탄소의 운송은 광합성능을 결정하는 중요한 요인이다. Cyanobacteria인 *Synechococcus* sp.의 탄소농축기작(Carbon Concentrating Mechanisms, CCMs)은 에너지 의존적 수송체에 의한 무기탄소의 세포내 축적과 대부분의 Rubisco가 위치한 carboxysome내에서 carbonic anhydrase에 의한 CO<sub>2</sub> 고정의 두단계로 구분되며, 이에 관여하는 유전자의 분석이 이루어진 바 있다. 분자생물학의 발달은 특정물질의 생산이 우수하며 다른 미생물과 경쟁하여 생존할 수 있는 유전적으로 조작된 미생물(Genetically Engineered Microorganisms, GEMs)의 개발을 가능하게 하였다. 따라서 자연계로부터 분리한 cyanobacteria에 대하여 돌연변이 유발과 같은 재래식 방법을 사용하거나 외부 유전자의 도입 및 유전자 조작 등을 통하여 세균에 대한 내성이 강하며, 최종적으로 생산수율이 높고 생장이 왕성한 우량 cyanobacteria의 개발에 대한 연구가 수행되고 있다.

### 2. Cyanobacteria 중 사상형(filamentous type)인 *Spirulina*의 대량 배양

원주형 나선 관상 광생물반응기를 이용하여 CO<sub>2</sub>의 농도가 4%로 강화된 공기를 공급하면서 회분식 배양에서 30.2 g dry weight(14.6 gC)/m<sup>2</sup>/d의 생산률에 도달하였다(Watanabe와 Hall, 1995). Pirt 등(1983)은 관형반응기를 고안하여 조류의 최대농도가 20 g dry weight/L를 증가하는 배양기술을 이루었으며, Samon과 Leduy(1985)는 *Spirulina maxima*를 평판형광반응기에서 다단연속배양으로 1.17 g dry weight/L/d의 수율을 얻었다.

### 3. CO<sub>2</sub>의 생물학적 고정화 시스템

이 분야의 연구에서 세계적으로 앞서고 있는 일본에 있어서 아직까지 실용화된 CO<sub>2</sub> 고정시스템은 없으나 앞으로 제품화할 경우 새로운 시장형성의 가능성은 매우 높게 평가되고 있다. 일례로 CO<sub>2</sub> 고정시스템을 갖출 후보지로서 철강사업소만도 6,207개소에 이른다. 1997년에 일본 교토회의에서 일본은 2008년부터 1990년의 CO<sub>2</sub> 배출량보다 6%를 저감하기로 약속하고, 이 분야의 기술개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 우리나라의 경우 화력발전용량은 14,000 MW정도이며, 대규모 철강산업체 등으로 CO<sub>2</sub> 고정화시스템에 대한 수요는 충분하다고 판단된다.

### 4. 광합성 미생물 광반응기 및 배양공정의 개발

광합성 미생물은 고등식물에 비하여 배양장치가 단순하고 차지하는 토지면적이 적은 유리한 점을 지니고 있다. 광합성 미생물의 배양을 위해서는 탄소원으로 이용되는 CO<sub>2</sub>를 적정량 공급하는 것이 필수적이며, 광합성 효율을 극대화하기 위해서는 광량 및 광도의 조절과 최적화, 온도조절, 혼합 그리고 영양염류의 균형 있는 공급 등이 수반되어야 한다. 폐쇄성 반응기로서 Takano 등(1993)은 광섬유 광반응기를 이용하여 단세포성 조류인 *Emiliania huxleyi*를 8일간 배양하여 43 mg/L의 초미세 방해석 입자의 생산을 확인하였다. 즉, CO<sub>2</sub>를 불용성의 탄산칼슘으로 전환하여 CO<sub>2</sub>를 제거하는데 효과적임을 보였다. 한편 Javanmardian과 Palsson(1991)은 광섬유 생물반응기를 이용하여 *Chlorella vulgaris*를 10<sup>9</sup> cells/ml의 고농도로 배양한 바 있다. 사상형 cyanobacteria인 *Spirulina platensis*의 배양에 원주형 나선 관상 광반응기(cylindrical shaped helical tubular photobioreactor)를 이용하여 CO<sub>2</sub>의 농도가 4%로 강화된 공기를 공급하면서 회분식 배양에서 30.2 g dry weight(14.6 gC)/m<sup>2</sup>/d의 생산률에 도달하였다(Watanabe와 Hall, 1995).

개방형 배양장치로서 Matsumoto 등(1995)은 *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum* sp. 등 미세조류를 화력발전소의 배출가스를 이용하여 raceway culture를 실시하여 생산된 생물량을 고체연료로 사용하였다. 이때 미세조류의 생산성은  $42 \text{ g/m}^2/\text{d}$ ,  $\text{CO}_2$ 의 평균이용률은 54%,  $\text{CO}_2$  고정량은  $48 \text{ tC/ha/yr}$ 이며, 조류배양조 설치에 필요한 토지면적은 8,900 ha에 달하였다. 특히, 개방형 배양의 경우 다른 조류종에 의한 간섭, 환경변화에 따른 생산물의 변화 등의 어려움이 있으므로 조류의 생리 및 영양요구 등에 대한 기초연구를 바탕으로 물질생산의 최적조건을 맞출 수 있다고 사료된다. Laws와 Berning(1991)은 shallow outdoor flume에서 해양 규조인 *Cyclotella cryptica*를 발전소 배출가스를 이용하여 대량 배양하였으며, 순생산률은  $15\text{-}20 \text{ gC/m}^2/\text{d}$ 이었다. 이상에서 살펴본 바와 같이 조류의 성장을 조절하는 환경요인으로 중요한 것은 태양에너지의 이용, 온도, 영양염류의 이용성 등이다. 따라서 반응기의 설계시 광을 효과적으로 이용할 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다.

광합성 미생물의 대량배양을 통한 유용물질의 생산과정에서 해결되어야 할 중요한 과제중의 하나가 경제적인 harvesting법의 개발이다. 배양된 조류의 harvesting은 여과(filtration), 침전화(sedimentation), 부유(flotation), centrifugation과 같은 복잡한 과정을 통해 이루어지며, 많은 비용이 소모된다. 그러나 종(species)에 따른 특이적 harvesting방법의 개발로서 *Botryococcus* sp.와 같이 지질함량이 높은 경우에는 비중이 낮아져 부유하는 물리적인 특성을 잘 이용하여 배양된 조류체를 경제적으로 수확할 수 있는 방법도 고려할 수 있다.

## 5. Cyanobacteria로부터 유용물질 생산

Cyanobacteria 및 미세조류로부터 지금까지 약 500여종 이상의 생리활성물질이 분리 보고되었으며, 이 중 수종(Aeruginosin, Cryptophycin, Microginin, Nostodione 등)의 화합물이 항암제 등 의약품으로의 개발을 위한 전임상, 임상 연구가 진행 중이다. Cyanobacteria에서 추출한 phycobiliproteins는 단백질성 형광색소로서 적색의 phycoerythrin과 청색의 phycocyanin으로 구분되며, 의료용 진단시약, 식품 및 화장품 색소 등으로 사용되고 있다. 또한 *Spirulina* 균체는 protein, vitamin B12,  $\beta$ -carotene, iodine,  $\gamma$ -linolenic acid 등이 풍부하며, 식욕감퇴에 의한 체중감량, 콜레스테롤 감소, 항암 등의 효과가 있어 건강식품의 소재로서 시장이 크게 확대되고 있다. 조류의 산업적 이용에 대

한 대표적인 것으로 *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* 등이 급성 독성을 갖지 않고 수산양식의 사료로서 유용한 단백질원이 될 수 있음이 보고되었다(Becker, 1986). *Dunaliella salina*로부터  $\beta$ -carotene은 이미 상품화된 고부가의 조류산물로서, 호주(Western Biotechnology Ltd, Betatene Ltd), 미국(Microbio Resources Inc), 이스라엘(Naturebeta) 등에서 생산하고 있다. 긴 사슬의 불포화 지방산인 arachidonic acid(AA), eicosapentaenoic acid(EPA), docosahexaenoic acid(DHA)의 생산에도 많은 관심이 모여지고 있으며, 규조류인 *Phaeodactylum tricornutum*은 총지방산의 35% 이상이 EPA로 구성되었음이 보고되었다(Veloso 등, 1991). 이외에도 항종양, 항세균, 항진균, 항바이러스와 같은 생리활성물질들이 미세조류에 의하여 생산 가능한 것으로 알려져 있다. 미세조류의 생물량은 식물성 기름이나 탄화수소와 같은 액상 연료로 전환될 수 있다. Carotenoids의 생산목적으로 *Dunaliella* sp.와 C<sub>17</sub>-C<sub>34</sub>의 혼합물로서 대체연료로 이용될 수 있는 *Botryococcus braunii*가 많이 연구되었다. 한편, 2차 처리된 하수에서 *B. braunii*를 배양하여 탄화수소를 생산하여 액체연료로 전환하고 아울러 폐수로부터 질소와 인은 물론이고 As, Cd, Cr등의 중금속이 제거되는 효과를 보였다.

광합성 미생물이 생산하는 가치 있는 물질로서  $\beta$ -carotene과 astaxanthin 등의 carotenoids는 *Dunaliella*와 *Haematococcus* sp.등의 미세조류에 건조중량의 14%에 이르는 고농도로 존재하며, 높은 시장가격(\$600/kg for  $\beta$ -carotene)으로 인하여 유용한 조류생산물질로 주목되고 있으며, 일부는 상품으로 시판되고 있다. 불포화지방산인 arachidonic acid(AA), eicosapentaenoic acid(EPA), docosahexaenoic acid(DHA) 등도 관심의 대상이며, 단세포성의 홍조류인 *Porphyridium cruentum*은 총 fatty acid의 30%이상을 AA 또는 EPA로 저장함이 알려져 있다.

Phycocyanin과 phycoerythrin 등의 phycobilin계 색소는 홍조나 cyanobacteria로부터 쉽게 분리할 수 있는 색소로 식품, 화장품의 착색제로 시장확대가 기대되고 있다. 이외에도 미세조류로부터 생리활성물질의 추출에 대한 관심이 높아지고 있으며, 해수나 담수에서 수화현상(algal bloom)을 일으키는 쌍편모조류나 cyanobacteria를 대상으로 다양한 toxin의 기능 및 이들의 이용에 대해서도 연구하고 있다.

이외에도 담수산 *Chlorella*를 윤충(Rotifer)의 사료로 이용하며, heterotrophically 배양된 해양조류인 *Tetraselmis*를 "Algal 161"의 상표명으로 이때때 유생의 사료로 실용화하고 있다.



여 백

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존 기술 확립

#### 1. 서론

산업의 발달에 따라 석탄, 석유, 천연가스과 같은 화석 연료의 사용이 증가되고, 도시화와 공업화에 의한 무분별한 산림의 황폐화로 인하여 대기 중의 이산화탄소, 메탄가스 등 온실 기체의 농도가 증가하고 있으며 이로 말미암아 지구 기상의 기후 변화를 초래하는 지구 온난화를 초래한다. 특히 이산화탄소는 여러 가지 온실기체 중 온실효과에 큰 영향을 미치는 기체로 알려져 있다. 따라서 현재 전 세계에서는 이산화탄소의 분리, 회수, 저장, 재활용을 위한 다양한 측면의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 중에서 생물학적인 방법은 광합성 기작을 지닌 생물체를 사용하는 것으로 특히, 육상의 소나무보다 탄소의 고정능이 15배 우수한 미세조류(microalgae)를 이용하여 대기 중의 이산화탄소를 섭취하여 생체내의 바이오매스(biomass)로 고정화 시키는 방법에 대한 연구가 활발하다. 또한 체내에 축적된 바이오매스를 유용하게 활용하는 고부가 가치적 방법이라 할 수 있다 (Figure 3). 또한, 미세조류에 대한 관심은 수질환경의 악화로 인한 적조, 녹조문제의 발생과 더불어 인류의 관심이 되었다. 또한 열대 우림의 파괴에 따른 지구상의 산소 공급원에 대한 연구를 수행하면서 미세조류가 상당 부분 담당하고 있다는 사실을 알게 되면서 관심을 갖게 되었다. 또한 식량자원, 사료원, 환경정화, 및 에너지 생산 그리고 항암제 등의 신약 개발 등 육안으로는 세포를 관찰할 수 없는 미세조류들의 중요성이 크게 부각되어 왔다.

조류의 배양은 19세기말부터 시도되어 Faminitzin(1871), Beijerinck(1890), Miquel(1892), Molisch(1895), Benecke(1897) 등에 의해 초기 연구가 진행되었다(Provasoli, et al. 1957). 조류의 분리와 배양의 기본은 세균학의 분야에서 개발된 기술을 기초로 발전했지만 그 진전은 상당히 늦은 편이었으나 금세기 중엽부터 그 중요성이 강하게 인식됨에 따라 급속한 진보를 보이게 되었다. 담수산 미세조류의 배양에 지대한 공헌을 한 Pringsheim은 그의 저서 "Pure Culture of Algae; their preparation and maintenance"

중에서 조류연구에서 배양의 중요성을 강조하면서 미세조류 배양의 목적으로서 다음과 같은 항목을 들었다.

- ① 형태학적 및 세포학적 연구
- ② 개체발생에 관한 연구
- ③ 종의 동정
- ④ 종의 변이와 종의 기원의 양식
- ⑤ 세포 병리
- ⑥ 세포 생리
- ⑦ 발생 생리
- ⑧ 영양 생리
- ⑨ 대사 생리
- ⑩ 피자극성(주광성)의 생리에 관한 연구
- ⑪ 생태학적 연구
- ⑫ 생물학적 수법에 의한 수질 분석
- ⑬ 사료화 연구

Pringsheim은 토양과 물에 의한 이상배지(soil water biphasic medium)와 단조배양의 개발 등 조류의 실내배양 기술의 진보에 크게 공헌했다. 그리고 살아 있는 그리고 출처가 확실한 조류주를 연구재료로 사용해야 하는 필요성을 역설하면서 조류주 계통보존시설의 설립에 노력하였다. 영국의 캠브리지에 있는 세계에서 가장 오래된 조류주 계통보존시설인 Culture Collection of Algae and Protozoa(CCAP)의 창설에 Pringsheim의 이전 근무지인 Prague에서 배양해온 조류가 기초가 되었으며, 미국의 텍사스대학에 있는 조류보존시설(UTEX)도 CCAP에서 분양받은 조류주를 근간으로 하였다. 조류 배양을 위한 배지의 경우, 초기에는 저농도의 무기영양염 배지 및 토양추출액을 첨가한 배지 등 조류의 배양에 적합한 배지의 개량과 개발이 진행되어 왔으며, 생물의 발전이 왕성한 1950년 이후에 조류 배양연구도 장족의 진보가 있었다. 이 시기에 조류의 배양에 대해 탁월한 업적을 발표한 대표적인 연구자로 Provasoli를 들 수 있다. Provasoli는 해산조류용 배지 개발과 개량의 면에서 크게 공헌하여 지금 널리 사용되고 있는 ASP-2, ASP-6, ASP-12 및 ES 등의 배지를 개발하였다(Provasoli, et al. 1968). 현재 세계적으로 유명한 미세조류 계통보존시설로는 영국의 CCAP, 미국의 UTEX, 더불어 남조류를 주 대상으로 하는 프랑스의

Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains(PCC), 독일의 Sammlung von Algenkulturen(SAG), 일본의 National Institute for Environmental Studies Microbial Culture Collection (NIES) 등이 있으며, 국내에는 부경대학교의 한국해양미세조류은행(KMCC)과 국립환경연구원의 미세조류종균관리센터(CCFM), 그리고 한국생명공학연구원의 유전자은행(KCTC) 등에서 공식적으로 미세조류의 계통보전을 수행하고 있다(Table 4).

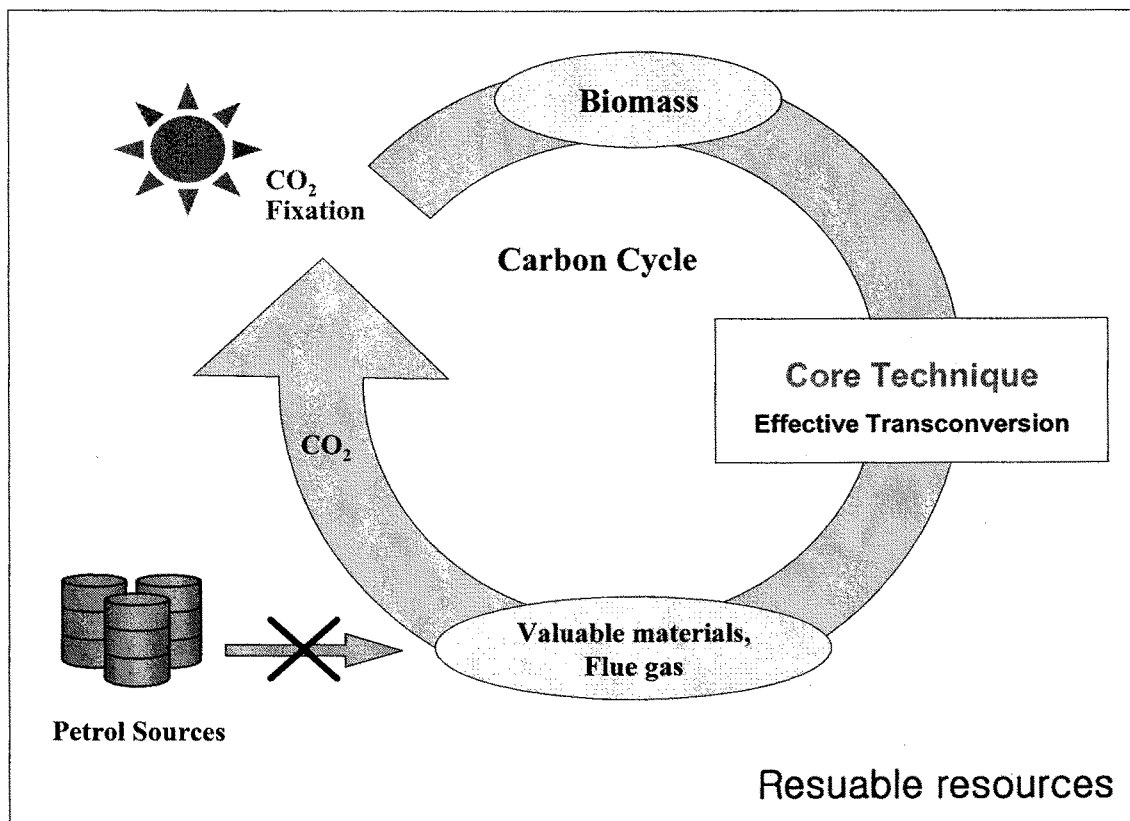


Figure 3. Carbon recycle in the earth.

Table 4. The list of microalgae culture collections

Culture collection	Strains	Home page address
Abroad	CCAP	over 2,000 <a href="http://www.ife.ac.uk/ccap/">http://www.ife.ac.uk/ccap/</a>
	UTEX	over 2,300 <a href="http://www.bio.utexas.edu/research/utex/">http://www.bio.utexas.edu/research/utex/</a>
	NIES	over 1,400 <a href="http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home.htm">http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home.htm</a>
	SAG	2,213 <a href="http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html">http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html</a>
Domestic	KMCC	over 1,000 <a href="http://www.kmcc.re.kr/index-2.htm">http://www.kmcc.re.kr/index-2.htm</a>
	CCFM	over 80 <a href="http://www.nier.go.kr/nierdepart/ccem/infodata/index.htm">http://www.nier.go.kr/nierdepart/ccem/infodata/index.htm</a>
	KCTC	over 650 <a href="http://www.brc.re.kr/_KTC/index.aspx">http://www.brc.re.kr/_KTC/index.aspx</a>

한국해양미세조류은행은 주로 치어의 사료가 되는 해산 규조류를 중심으로 약 1,000여 strains의 해양미세조류를 보유하고 있으며, 국립환경연구원의 미세조류종균관리센터에서는 수질문제 원인조류를 중심으로 약 80여 균주를, 그리고 유전자은행의 경우 담수의 남조류와 녹조류를 중심으로 약 650여 균주를 관리하고 있으며, 이 외에도 관련된 연구를 수행하고 있는 연구기관 및 학계에서 수십 종의 미세조류를 분리하여 배양하고 있는 것으로 알려져 있다.

조류를 분리하는 것은 "pure culture(순수배양)"를 얻기 위한 것이나 조류에서 순수배양은 박테리아와 같은 세균의 경우와 약간의 차이가 있다. Pringsheim(1949)은 조류 배양을 다음과 같은 6가지의 유형으로 구분하였다.

- ① 보존배양(Conservation or preservation culture)
- ② 조배양(Crude or gross culture)
- ③ 농후배양(Accumulation or enrichment culture)
- ④ 단일종배양(Species pure culture)
- ⑤ 절대순수배양(Absolute pure culture)
- ⑥ 단일세포기원의 배양(monocell or clone culture)

그러나 위와 같이 6 종류로 분리하는 것은 어렵기 때문에 일반적으로 ① 조배양(Crude culture) ② 단일종배양(uni-algal culture) ③ 무균배양(bacteria free or axenic

culture)의 3단계로 구분한다. 현재 당 연구실에서는 자연계에서 미세조류를 분리하여 단일종배양의 방법을 통하여 단일종의 미세조류를 배양하고 보관하고 있다.

미세조류의 분리를 위해 현재까지 사용되고 있는 대표적인 방법을 열거하면 희석법(dilution method), 피펫세정법(pipette washing), 조류의 운동 및 생장을 이용하는 방법, 미세조작기법(Micromanipulator)(Figure 4), 조류의 성장단계를 이용하는 방법 등이 있다. 위의 방법 중 한 가지 방법만으로 무균분리가 성공하는 경우도 있지만, 일반적으로 미세조류와 박테리아가 공생하고 있기 때문에 먼저 단일종배양을 얻고, 여기에서 다시 항생물질, 화학살균제, 계면활성제 처리 또는 자외선 조사 등을 병행하여 무균균주를 분리한다(Figure 5). 이와 같은 방법의 병행은 미세조류의 형태와 특성 등을 고려하여 결정해야 하며, 분리하고자하는 조류의 생육환경과 생태에 대해서 미리 조사하여 분리방법, 배지, 배양조건 등을 선정하는데 도움이 된다.

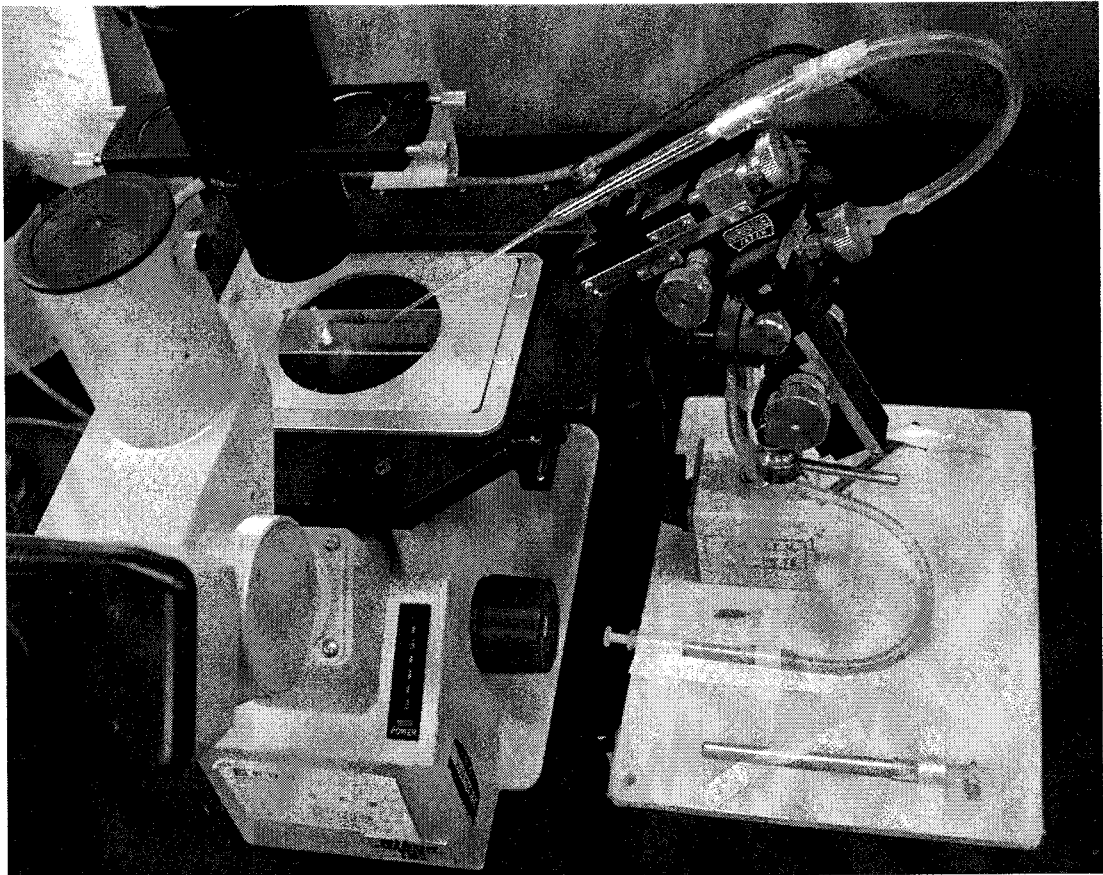


Figure 4. The photograph of a micromanipulator that used in this study(Oh and Rhee 1990).



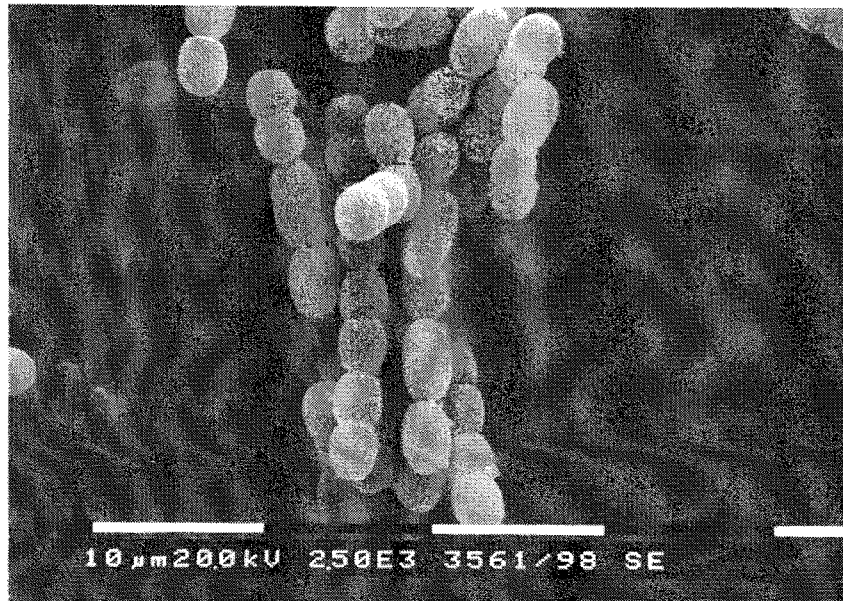
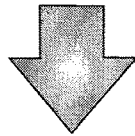
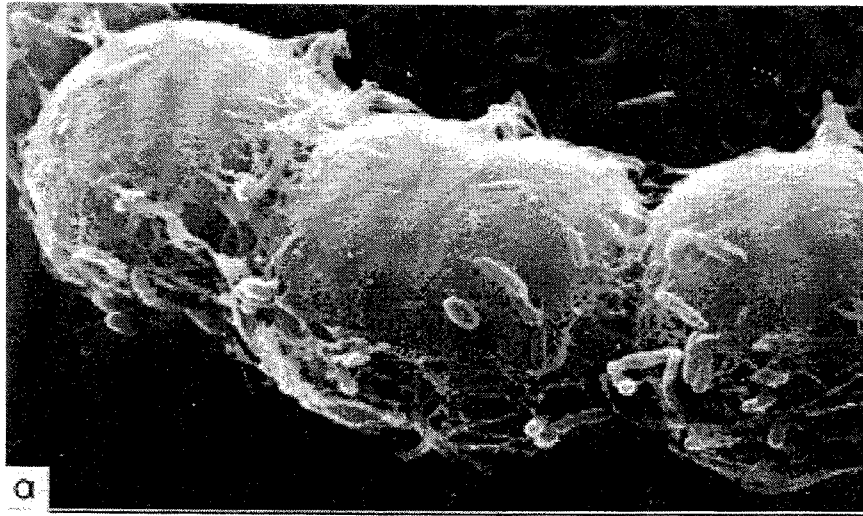


Figure 5. Axenic strains of cyanobacteria (*Anabaena* sp.) treated with lysozyme and ampicillin. top: bacteria contamination, bottom: bacteria free (Kim et al. 1999)

## 2. 분리용 미세조류의 채집

일반적으로 해산 미세조류는 해양의 식물플랑크톤을 말하는 반면, 담수산 미세조류는 호소와 강의 식물플랑크톤 뿐만 아니라 생태적 특성이 다른 다양한 조류를 포함하고 있다. 예를 들면, 논, 낮은 연못, 습원 등의 저생조(benthic algae)와 착생조(epiphytic algae), 온천의 용출구 부근에서 자라는 호온성 미세조류(thermophilic algae), 고산의 잔설과 극지의 설원에 존재하는 빙설 조류(cryoalgae), 밭과 같은 토양이나 사막과 같은 건조지에서 생육하는 토양조(soil algae), 석탄과 수피, 건물의 벽면에서 발견되는 기생조(aerial algae), 등 생태적으로 매우 다양한 조류가 있다.

일반적으로 해산 미세조류나 호소의 식물플랑크톤은 낮은 농도로 존재하므로 이들 미세조류를 분리하기 위해서는 플랑크톤 네트(plankton net)를 사용하여 농축하여 수집한다. 그러나 해양 플랑크톤의 대 발생에 의해서 만들어진 적조나 담수 식물플랑크톤의 대 발생으로 만들어진 녹조에서는 개체수가 많기 때문에 단순히 바가지 등으로 채집하면 된다. 플랑크톤 네트의 경우 채집하고자하는 조류의 크기에 따라 적당한 것을 선택하여 사용하는데, 국제규격은 No. 12 = 0.119 mm, No. 15 = 0.094 mm, No. 25 = 0.064 mm 등이 있다. 최근 많은 관심이 집중되고 있는 nanoplankton과 같은 미세조류의 경우에는 반돈식 채수기(Van Dorn sampler)를 이용해 적당량의 해수 또는 담수를 채수해서 실험실에서 원심분리기를 이용하여 수집한다.

채집한 시료의 농축법으로는 여과법, 침전법, 원심법, 및 정치부상법 등의 방법이 사용된다. 유영 능력이 없는 규조류와 녹조류의 농축에는 일반적으로 침전법이 이용된다. 유영 능력이 있는 미세조류의 경우에 원심분리를 사용 할 때는 3,000 rpm 전후에서 5분 정도 하되 미세조류의 크기, 세포구조, 유영능력 등을 고려하여 원심분리 속도를 조절하는 것이 중요하다. 또한 농도가 높은 물질(NaCl)을 적절하게 사용하면 쉽게 미세조류 층을 얻을 수 있다. 해양 및 담수의 적조의 원인 미세조류인 편모조류는 주광성을 가지고 있으므로 한쪽 방향에서 빛을 주어 모인 미세조류를 피펫을 이용하여 흡입하여 농축하는 기법도 상당히 유용하다. 녹조현상의 원인 남조류(Cyanobacteria)와 같이 세포내 기포를 가지고 있어 부상능력을 가진 미세조류는 정치시켜 표면에 부상하여 모인 층을 피펫을 이용하여 모으는 방법이 효과적이다. 저질 중에 존재하는 미세조류의 cyst를 분리하기 위해서는 채니기를 이용하여 저질과 함께 채집해야한다. 저질 표면에서 2 cm 깊이까지의 저질을 채취하여 그물눈 150  $\mu$ m 정도의 금속체를 이용하여 물속에서 흔들어 모래와 흙을

제거한다. 여액은 침전시켜 상등액을 버리고 남은 침전물을 농축자당액 또는 포화식염수를 섞어서 부상한 현탁액을 모으면 된다.

### 3. 미세조류의 배지

과거에는 미세조류는 완전한 독립영양생물(autotroph)로 알고 있었으나, 1950년 이후부터는 많은 조류가 비타민 등의 보조 영양소를 필요로 하는 영양요구성 생물(auxotroph)인 것이 알려졌고 그때부터 미세조류의 배양액에 보조 영양소인 유기 영양소를 첨가하기 시작하였다. 담수조류 배지의 경우 Provasoli & Pintner(1959)등이 개발한 저농도의 무기 배지와 같이 천연의 중탄산에 질산염, 인산염 및 규산염 등으로 영양화한 무기염 배지가 대부분이다. 현재 사용되고 있는 대부분의 미세조류 배지는 무기 영양염을 위주로 하고 미량 금속류 및 비타민 등이 첨가된 합성배지를 사용하나 경우에 따라서는 천연해수나 토양추출액을 첨가해 줄 필요가 있다. 미세조류의 종류에 따라 필요로 하는 증식촉진인자가 다르고, pH 조건, 영양염의 농도 등이 다르므로 분리, 배양하고자하는 대상의 미세조류를 위한 최적의 배지를 선정하여야만 다양한 종류의 미세조류를 강이나 호소에서 분리가 가능하다.

미세조류 배지를 만들 때는 구성하는 무기염의 농도가 극미량이므로 미리 각 구성 무기염의 농축용액(stock solution)을 만들어서 냉장 보관하면서 배지 조제시 적당량의 증류수 또는 해수에 pH 범위에 따라 tris, HEPES, bicine 등의 완충제를 넣고, 각 구성 무기염 농축액을 첨가하여 만든다. 고압멸균시 염을 형성하기 쉬운 것들은 따로 멸균하여 무균적으로 섞어주거나, 여과멸균을 통하여 만드는 것이 좋다.

일반적으로 미세조류는 액체배지에서 배양이 용이하다. 그러나 보관상의 어려움과 미세조류의 분리조작을 위하여 고체 배지를 사용하는 경우가 있다. 미세조류용 고체 배지는 동일한 액체배지에 한천(agar)을 1.0-1.5% 되도록 섞어서 고압멸균 후 굳혀서 사용한다. 그러나 남조류와 같이 영양요구가 까다로운 경우에는 한천속의 불순물에 영향을 받아 성장하지 않는 경우가 종종 있다. 이와 같은 경우에는 한천을 물로 씻어서 불순물을 제거하거나, agar의 농도를 낮추거나, 영양액과 agar를 분리하여 멸균하거나, agarose와 같은 순도가 높은 다른 고형제를 사용하기도하고, glass fiber filter를 사용하여 불순물을 제거한 후 사용하는 방법 등이 있다.

담수에서 미세조류를 분리 배양하는 많이 사용되고 있는 배지를 Table 5에서 소개한

다. 자세한 정보는 각 미세조류 보존센터의 홈페이지(Table 4)에 들어가면 다양한 종류의 배지 목록이 있다.

Table 5. Composition of media for freshwater microalgae

<b>Allen medium (pH 7.8)</b>	
Constituents	Concentration (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1.500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.039
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.021
CaCl <sub>2</sub>	0.036
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.058
Ferric citrate	0.006
Citric acid	0.006
EDTA	0.001
Microelement	1 ml
Microelement stock solution	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.391
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0494

#### 4. 분리조작

자연 시료에서 소수 존재하는 미세 조류를 쉽게 분리하기 위해서 예비배양을 실시하는 것이 좋다. 이는 미세조류의 수를 늘리는 집적배양법으로 다양한 종류의 배지에 자연 시료를 적당량 넣고, 1 주일정도 예비배양하여 소수의 미세조류의 수를 증가 시킨 후 분리하는 방법이다. 가능하면 여러 종류의 배지를 사용하면 다양한 종류의 미세조류를 얻을 수 있다. 분리의 원리는 단일종, 또는 클론배양의 경우에는 1개의 조류세포, 또는 그것에서 증식한 콜로니를 집어내는 것을 말한다. 미세조류의 순수분리의 궁극적인 목적은 무균 배양(axenic culture)이나 미세조류의 종류에 따라 무균분리가 쉽지 않고 또한 실험 목적에 따라 단일종배양이 필요한 경우도 있으므로 단일종의 미세조류를 얻는 것으로 분리 작업을 마칠 수 있다. 이런 작업이 용이하게 하기 위해 조류 세포의 분산, 희석, 또는 하나의 미세조류만을 고르는 micromanipulator를 이용하기도 한다.

무균분리의 경우 오염세균의 제거가 중요하며 이를 위해 크게 3가지 방법이 사용되고 있다. 이들의 방법들은 미세조류의 특성에 따라 선택적으로 사용이 가능하다.

- ① 조류의 생리적 성질을 이용하는 방법 (주광성, 운동성)
- ② 물리적인 방법 (피펫 세정법, 희석 도말법, micromanipulator법, 원심분리법, 자외선 조사법)
- ③ 화학적인 방법 (살균제 처리법, 항생제 처리법)

위의 3가지 방법 중 한가지만으로도 무균 미세조류를 얻을 수 있지만 경우에 따라서는 위의 방법들을 여러 가지 조합하여 사용하여야만 한다. 특히, 항생물질 등을 사용하는 화학적인 방법의 경우 미세조류의 내성이 종에 따라 상당히 다르므로 각 물질에 대한 내성도를 미리 실험해보아야 한다. 또한 위의 방법들을 적용할 때 가장 중요한 점은 활발히 증식하고 있는 오염이 적은 어린 미세조류를 사용하는 것이 성공의 관건이다.

#### 5. 남조류의 무균분리

수질오염과 관련하여 녹조현상 원인 조류, 독소생산 조류, 이취미생산 조류, 질소고정 조류 등으로 많은 연구의 대상이 되고 있는 남조류(cyanobacteria)들은 다른 조류들과는 달리 세균과 같은 원핵세포로 구성되어 있으며, 단단한 군체를 형성하고 점질에 둘러싸여

있는 등, 위에서 설명한 여러 가지 방법으로는 무균 분리가 어려운 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로 많은 남조류들이 단일종배양의 상태로 보존되고 있으나 분자유전학적 연구, 생리적 연구를 위해서는 무균주의 확보가 필수적이므로 많은 학자들에 의해 남조류 무균분리기술이 개발되고 있다. Micromanipulator를 이용해 남조류와 오염세균을 물리적으로 분리하는 기술, 분획여과, 반복적인 세포계대, 남조류의 부상하는 성질을 이용한 원심분리법, 광도조절에 의한 분리 등이 있으며, 이 외에는 남조류에게는 비교적 무해하지만 오염세균을 죽일 수 있는 제제를 사용하는 방법 등이 있다. 이때 사용되는 제제로는 phenol, sodium hypochlorite, 계면활성제, sodium sulfide, 항생제가 있으며, 자외선이나 고온으로 처리하는 방법이 이용되고 있다.

특히, 호소나 하천의 부영양화 현상이 전 세계적인 수질문제로 떠오르면서 부영양수역에서 이상 증식하여 녹조현상(water-bloom)을 형성하는 부유성 남조류에 대한 관심이 증폭되고 있으며 이러한 녹조현상 원인 미세조류인 남조류에 의해 인간과 가축에 급성독성을 나타내는 간장독과 신경독이 생산된다는 사실이 밝혀지면서 이에 대한 많은 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 독소를 만드는 남조류의 확보가 중요시 되고 있다. 그러나 *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등의 녹조현상 원인 미세조류들은 대부분 자연상태에서 군체(colony)를 형성하고 있으며, 이런 군체는 두꺼운 점질층으로 둘러 싸여 있고, 많은 공생미생물이 이런 점질층에 붙어서 살고 있다. 따라서 이와 같은 남조류들은 물리적인 방법으로 점질층에 깊숙이 박혀 있는 미생물들을 분리하는 것이 매우 어렵다.

*Microcystis*(녹조현상을 일으키는 대표 미세조류)의 분리를 위하여 agar 대신에 agarose와 low-melting agarose를 사용하였으며, 특히 0.4% gel에서 가장 높은 분리 능을 보였다. 또한 무균의 미세조류를 얻기 위하여 *Microcystis*의 부유성을 이용하여 두단계의 원심분리법을 개발하였다. 대수기 중기까지 배양한 현탁액을 교반기(Voltex mixer)를 이용하여 미세조류와 미생물을 분리하고, 150xg에서 30분간 1단계 원심분리한 후 바로 1,000 - 4,000xg에서 5분간 2단계 원심분리를 수행하였다. 2단계 원심분리 후 표층을 피펫으로 따서 고체배지에 도말하여 무균의 *Microcystis*를 얻었다. 또한 이와 같은 방법을 세포내 기포를 가지고 수표층으로 부상하는 능력을 가진 미세조류에 대하여 적용하면 좋은 결과를 얻을 것으로 생각된다.

희석법, 획선도말법, 2단계 원심분리법 등의 물리적인 방법만으로는 군체 형성 남조류

를 무균화하는 것은 한계가 있다. 그러므로 물리적인 방법뿐만 아니라 미생물을 사멸시킬 수 있는 항생제를 사용하는 방법에 대해서도 연구가 활발하다. 특히, 미생물의 세포벽의 주성분이 peptidoglycan층의 합성을 저해하는  $\beta$ -lactam 계열의 항생들을 사용하여 암조건과 높은 유기물 농도 하에서 미생물을 배양하면 미생물의 세포분열이 활발하게 일어나게 되고 항생제의 세포벽 합성 저해능으로 인하여 미생물들이 사멸하게 된다. 특히, imipenem의 경우 다른  $\beta$ -lactam계 항생제들보다 월등히 효과가 좋았다.

## 6. 미세조류의 보존

한번 분리한 조류는 소실하지 않도록 또는 다시 오염되지 않도록 보존하여야 하며, 언제라도 필요시에는 배양, 사용할 수 있도록 관리되어야 한다. 연구자들이 연구에 이용하기 위해 어렵게 분리한 미세조류들이 제대로 보존되지 못해 연구가 종료되면 소실되는 경우가 많다. 전 세계적으로 해수, 담수의 미세조류의 보존, 관리는 다른 미생물에 비해 매우 미진하다. 이렇듯 미세조류의 계통보존이 미진한 원인으로는 계통보존주의 관리의 어려움을 들 수 있다.

현재까지 미세조류의 계통보존을 위해서 정기적인 조류 이식 및 계대배양법에 의해서 보존균주를 관리하였다. 그러나 최근 들어 미생물을 장기보존 하는 동결보존 및 동결건조법 등의 장기 보존기술로 미세조류 계통분류를 관리하고 있다.

현재까지도 미세조류주의 계통보존방법으로 가장 널리 사용되는 방법이 계대배양법이다. 계대배양에는 뚜껑이 있는 시험관(screw cap test tube)을 많이 사용하고 있으며, 조류주에 따라 액체배지, 한천사면배지, 연한한천배지 등을 사용한다. 대부분의 편모조류와 부유성 남조류는 일반적으로 한천사면배지에서 잘 자라지 않는다. 따라서 이와 같은 미세조류는 액체배지를 이용해서 계대 배양을 한다. 계대배양은 이식 후 미세조류가 충분히 증식할 때까지 약 1 주간 최적 증식조건에서 배양한 다음 배양조건보다 온도와 광도가 낮은 보존조건으로 옮겨 다음 이식할 때까지 그대로 보존하는 것이 가장 좋다. 이식시 접종량은 가능하면 적은 것이 좋다.

동결건조 및 동결처리는 모두 결빙(ice crystal)의 생성과 세포내 삼투압의 변화 등으로 세포에 손상을 입히는 과정이다. 그러나 최소한의 손상을 입히도록 조절된 조건에서 처리를 할 경우 미생물을 포함한 많은 생물이 동결이나 동결건조처리에 내성을 나타내며 재생되는 것이 알려졌다. 이와 같은 동결 및 동결건조처리 방법을 이용하여 미세조류의 장

기적인 보존에 대하여 일본, 미국 등의 조류 보존기관에서는 꾸준히 연구를 지속한 결과 현재는 일부 미세조류에 대한 장기 보존이 가능하게 되었다(Figure 6). 일부 미세조류에 대한 동결처리 및 동결건조처리 후 15일 후의 재생율을 조사결과는 다음과 같다. *Anabaena*의 경우에는 deep freezer에 동결보관한 시료의 재생율은 높게 나왔으나, 액체질소내에서 동결한 경우에는 전혀 재생이 되지 않았다. *Oscillatoria*의 경우, 모든 조건에서 양호한 재생율을 나타냈다. 특히 액체질소내에서 동결한 시료에서는 DMSO의 보호효과가 높게 나타났다. *Microcystis*의 경우, 모든 동결보존으로 1년간 보존 후에도 90% 이상의 높은 재생율을 나타내었으며, 동결보호제의 첨가 유무에 상관없이 매우 높은 재생율을 나타냈다. 따라서 녹조현상 원인 남조류의 장기보존법으로 동결건조법보다는 동결보존법이 적용 가능한 방법으로 사료된다. 그러나 *Aphanizomenon*의 경우에는 동결건조법 및 동결보존법에서는 모두 전혀 재생되지 않아 이 미세조류에 대한 장기 보존이 불가능한 것으로 나타났다.

동결건조법(Lyophilization)은 얼린 상태에서 물과 그 외의 용매가 승화에 의해 제거되는 과정을 이용한다. 동결건조는 시료의 전동결, 대부분의 물이 제거되는 1차 건조, 결합수를 제거하는 2차 건조의 3단계로 구성된다. 남조류의 경우에는 동결건조처리에 의해 2년 이상 유지할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 동결건조 후 일정기간 보관한 조체를 무질소배지에 이식하여 30°C의 실온에서 배양한 결과로서 남조류는 녹조류에 비해 동결건조처리에 내성이 있는 것이 밝혀졌다. 동결보호제로는 milk solids를 사용한 경우에 가장 좋은 보호효과를 나타냈다.

## 7. 균주 확보

Figure 7은 미세조류의 수집 및 분리, 동정에 대한 흐름도를 나타내었다. 미세조류 분리를 위한 물시료는 총 6회에 걸쳐 충청남북도, 전라남북도 등지에 산재한 호소, 하천 등의 담수역에서 채취하였다(Table 6). 냉장 운반한 물시료로부터 plate streaking, capillary pipetting, micropipette technique, micromanipulator 방법에 의해 cyanobacteria 및 미세조류를 순수분리하였다. Allen, MA, SOT 평판배지를 제조한 후 시료 50  $\mu$ l를 streaking하여 항온실에서 2주간 배양 후 성장한 cyanobacteria 및 미세조류는 순수분리될 때까지 같은 조건에서 2-3회 계대 배양하였다. 이 후 광도 100-120  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s, 광주기 14L : 10D, 온도 25-27°C의 조건 하에서 배양하였다.



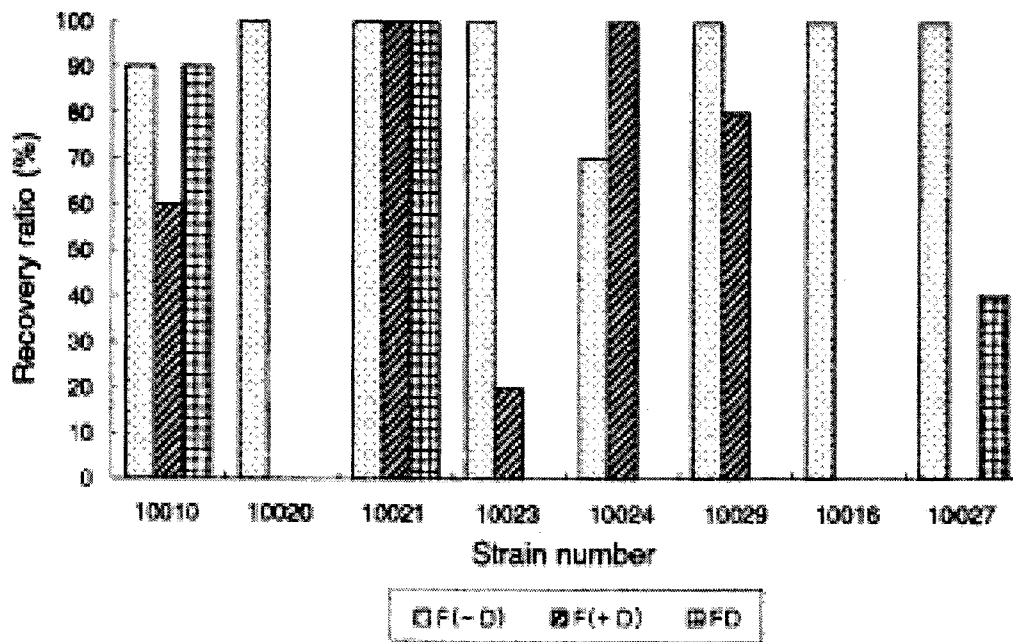


Figure 6. The recovery ratio of test strains after one year preservation by preservation methods.

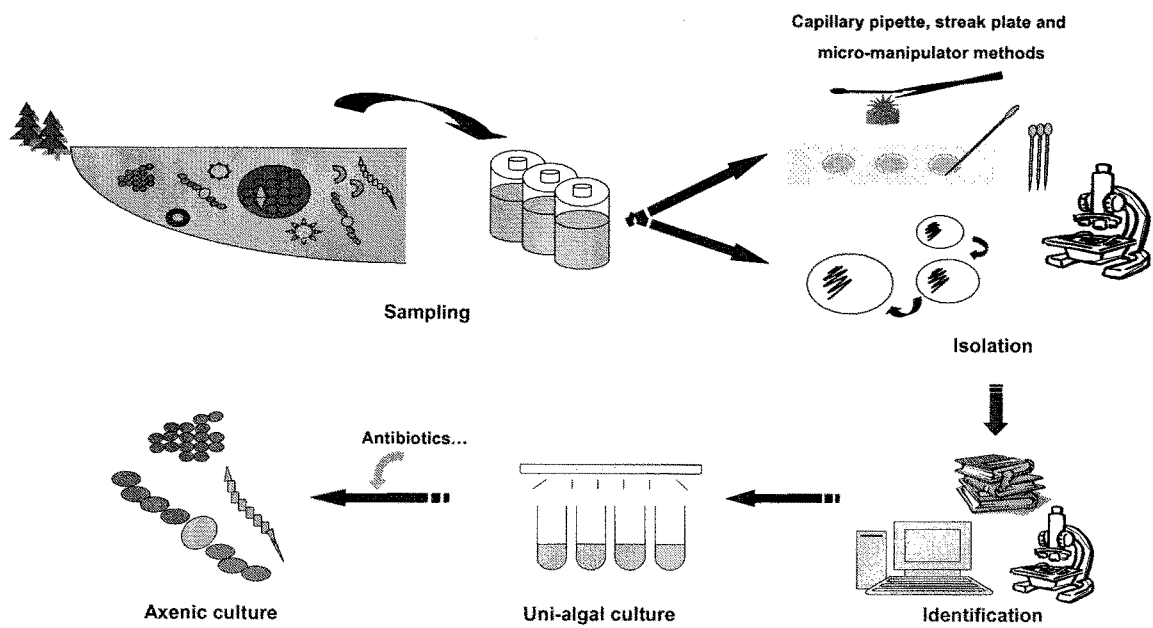


Figure 7. Flow chat of microalgal isolation from the environment.

현재 전국의 호소, 하천 등으로부터 cyanobacteria를 포함하여 1차년도에 미세조류 251 strains를 확보한 이 후, 2차년도에 160여 strains를 추가 확보하였고, 3차년도에는 90여 strains를 확보하여 1 단계 사업기간중 총 500 여 strains의 미세조류를 확보하였다(Table 6). 확보된 미세조류 중 Chlorophyceae가 23 종에 209 strains으로 가장 많았으며, Cyanophyceae는 18 종 178 strains을 확보하였다. 다른 7개 분류군에 속하는 84 strains을 확보하였으며, 현재까지 동정되지 않은 38 strains이 있다. 확보된 미세조류는 1.5% agar slant media에 접종 후 계대하면서 18℃ 와 25℃의 항온실에서 장기 보존하고 있다.

Table 6. The site of reservoir and river for microalgae screening

Times	Date	Collection position	Number of sites	Remarks
1	2002. 6. 16-17.	Chungchengnamdo	19	reservoir, river
2	2002. 9. 23-24.	Chungchengnamdo	19	“
3	2003. 3. 24-25.	Chungchengnamdo, Junlabukdo	19	“
4	2003. 6. 16-17.	Chungchengnamdo, Junlabukdo	20	“
5	2003. 9. 23-24.	Gyungsangnamdo, Gyungsangbukdo	22	“
6	2003. 11. 24-25.	Gyungsangnamdo, Gyungsangbukdo	25	“

Table 7. Number of isolated microalgae strains

Taxonomy	Habitat	Capacity
Cyanophyceae	Freshwater & seawater	178
Chlorophyceae	Freshwater & seawater	209
Charophyceae	Seawater	23
Bacillariophyceae	Freshwater & seawater	45
Chrysophyceae	Freshwater & seawater	2
Xanthophyceae	Freshwater	2
Cryptophyceae	Seawater	7
Euglenophyceae	Freshwater & seawater	2
Dinophyceae	Freshwater & seawater	1
Rhodophyceae	Freshwater & seawater	2
Unidentification		38
Total		509

## 제 2 절 Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구

### 1. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 N source의 영향

#### 가. 서론

현재 미세조류 중 건강보조식품으로 상품화되어 고부가가치 미생물로 각광을 받고 있는 종은 *Chlorella*로 식품에 첨가하거나, 자체로 판매가 되고 있다. 최근, 미세조류 중 한 종류인 *Spirulina*는 단백질의 함량이 건중량의 46-71%로 매우 높으며, GLA, phycocyanin, myxoxanthophyll, zeaxanthin 등 약리작용을 나타내는 물질을 다량 함유하고 있으며, 특히 동물의 다이어트에 영향을 미치는 물질인 *r-linolenic acid*를 함유하고 있어서 건강보조식품으로 관심의 대상이 되고 있다. 또한 *Spirulina*는 옥외 배양이 가능하고, 고온성(35-37°C)이며, 호알칼리성(pH 10)으로 비교적 배양이 용이하여 전 세계적으로 다수의 기업이 생산에 참여하고 있다. 실제로 미국의 Earthrise Farms에서는 못(pond) 배양을 통하여 360톤(1995년)의 *Spirulina*를 생산하였고, 이외에도 Cyanotech Corporation(USA), Ballarpur Industries Ltd(India), Siam Algae Co.(Thailand), Wuhan Micro-alga Biotechnology Company(China) 등에서도 많은 양의 *Spirulina*로부터 건강보조식품, 식품 착색제 등을 생산, 판매하고 있다.

#### 나. 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 Cyanobacteria는 *Spirulina platensis*를 이용하였다. 변형된 SOT 배지에 질소원으로 암모니아(NH<sub>4</sub>-N), 질산염(NO<sub>3</sub>-N), 아질산염(NO<sub>2</sub>-N), 요소((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-N)를 각각 150 µg N/L의 농도로 첨가해 주었다. 배양시의 온도는 25 ± 1°C로 고정하였으며, 빛을 주기 위해서 삼파장램프를 이용하여 120 µmol photons/m<sup>2</sup>/s 광도로 14 시간동안 빛을 주고 10시간은 암의 조건으로 실험하였다. 건체량 측정은 일정량의 배양액을 GF/C 필터를 이용하여 세포를 모은 후, 105°C의 건조기에서 4시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하였다. 총유기탄소분석기(Total organic carbon analyzer)를 이용하여 총무기탄소(Total inorganic carbon)를 측정하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

각 질소원 따른 최대 성장률과 Chlorophyll *a*와 건체 중량의 차이를 Table 8에 나타내었다. Chlorophyll *a*의 양과 Chlorophyll *a*에 기초한 최대 성장률은 질산염을 질소원으로 사용한 경우 배양 10일 후에 가장 높은 값을 보였다. 건체량을 바탕으로 한 최대 성장률은 유리아를 사용한 경우 배양 3일 후에 최대치를 보였다. 그러나 건체량의 경우에는 아질산염을 질소원 사용한 경우 배양 16일 후에 2,683 mg/L로 최대치를 나타내었다. 결과적으로 Chlorophyll *a*를 얻기 위한 질소원으로는 질산염이 좋았으며, 건체량을 얻기 위한 질소원으로는 아질산염이 좋았다. 전체적으로 *Spirulina*를 배양하기 위한 질소원은 질산염과 아질산염을 이용하는 것이 좋은 것으로 판단된다.

Table 8. Maximum specific growth rate (Chl-*a* or dry weight based), Chl-*a* concentration, and dry weight of *Spirulina platensis* with different nitrogen sources

Parameters	Sources				Days after cultivation
	Ammonium	Nitrate	Nitrite	Urea	
$\mu_{\max}$ (Chl) (d-1)	0.412	0.594	0.475	0.297	10
$\mu_{\max}$ (DW) (d-1)	0.673	0.717	0.747	0.760	3
Chl <sub>max</sub> ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	1,090	2,096	1,947	1,763	10
DW <sub>max</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	2,517	2,567	2,683	1,717	16

Figure 8은 *Spirulina* 배양 시간에 따른 배양액내의 탄소와 질소의 농도와 건체량의 변화를 보여준다. 암모니아를 질소원으로 사용한 경우 질소는 배양 기간 동안에 공기의 섞임 때문에 배양 10일 이후에는 완전히 고갈됨을 보였다. 세포내의 탄소량과 *Spirulina*의 건체량 사이에 95%의 유의성을 가지고 상관관계가 성립하였다(Figure 9). 배지로부터 세포내로 흡수되는 탄소의 양은 질산염을 첨가해준 경우에 높았다. *Spirulina*를 배양하는 시간별 C:N 비율을 측정한 결과 초기에는 질소원에 따른 차이가 거의 없었다(Figure 10). 그러나 배양 10 일후에는 C:N 비율이 약간 증가하였다. 이와 같은 결과는 이전의 결과에 비해서 낮은데 이는 고정화된 탄소가 배지로 나오거나 낮은 탄소 고정 때문이라고 생각된다. 배양 기간동안 배지내의 탄소의 양이 증가하지 않는 것으로 보아 배지로 고정화된 탄소가 나오는 것 같지는 않다(Figure 8). 배양 16일 이후로는 C:N 비율이 급격히 증가하는데 이는 질소원이 고갈되어 나타나는 현상이라고 생각된다.

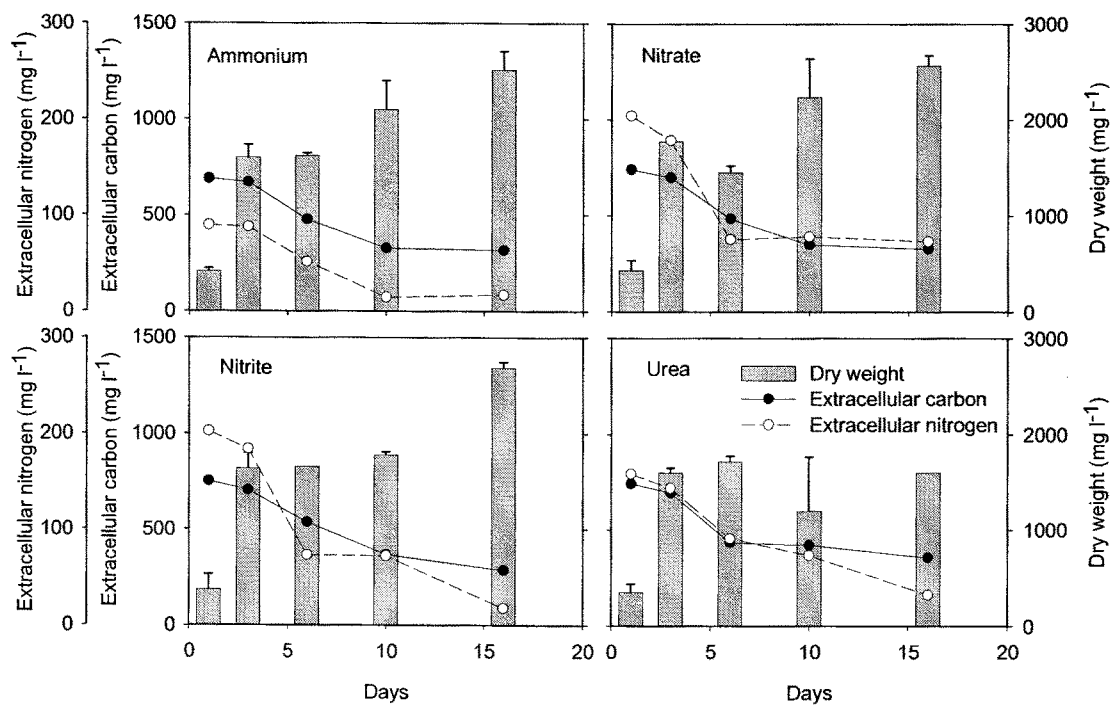


Figure 8. Changes in carbon and nitrogen concentrations in medium and dry weight of *Spirulina platensis* with different nitrogen sources.

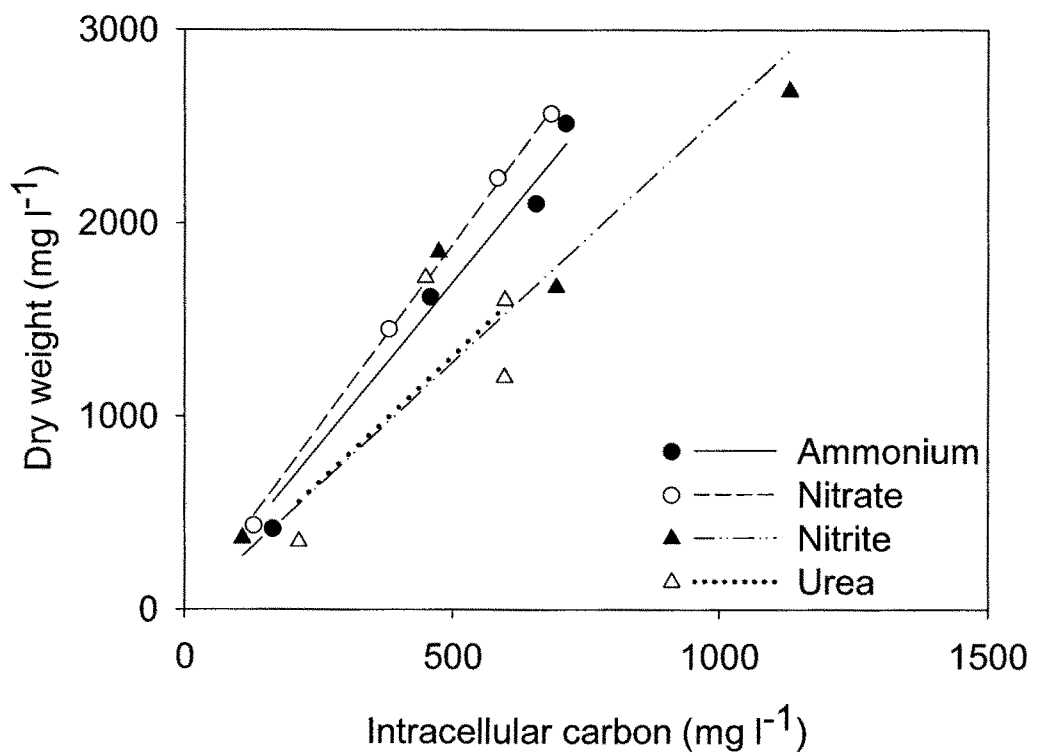


Figure 9. Relation between cellular carbon and dry weight of *Spirulina platensis*.



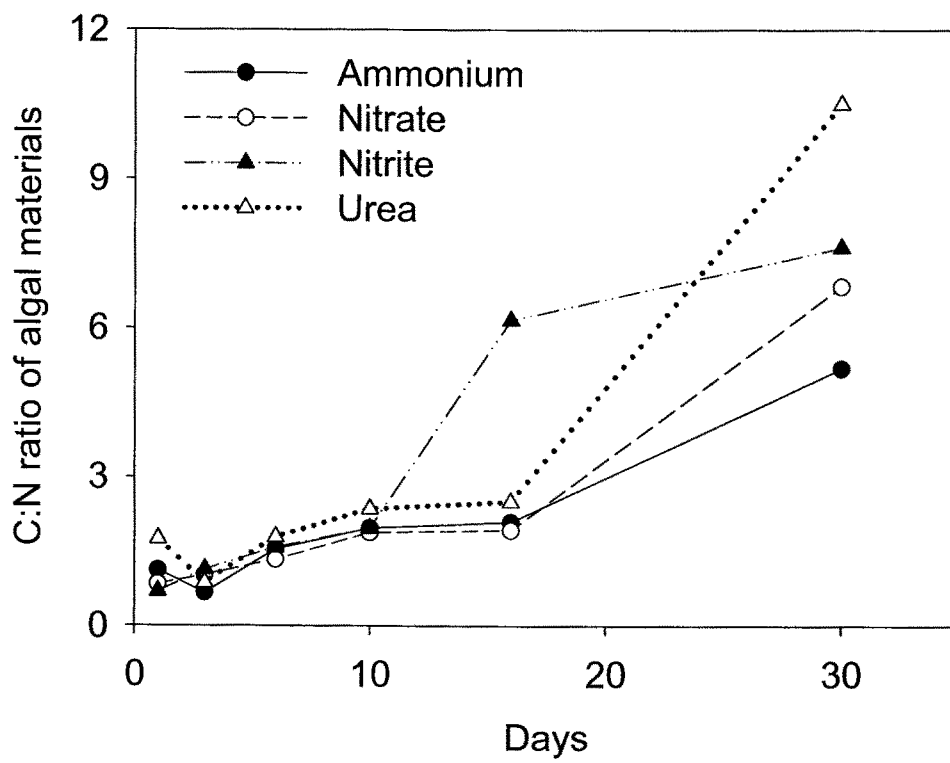


Figure 10. Time course of C:N atomic ratios of *Spirulina platensis*.

## 2. 미세조류의 성장과 광합성에 대한 CO<sub>2</sub>의 영향

### 가. 서론

일반적으로 발전소와 공장에서 사용되는 연료는 석탄과 석유가 대부분이다. 이와 같은 연료를 사용하는 경우 과도한 양의 CO<sub>2</sub>가 발생하게 되어 지구 온난화에 주 원인으로 사회적으로 심각한 문제가 발생하게 된다. 현재 전 세계의 모든 국가에서는 산업화로 인하여 증가된 CO<sub>2</sub>의 제거를 위해서 다양한 방법에 대해서 연구를 수행하고 있다. 이 중 생물학적인 CO<sub>2</sub>의 제거는 물리·화학적으로 처리하는 것보다 2차적인 오염원을 줄일 수 있으며, 배양 생물의 생물량과 이차 산물을 산업적으로 사용할 수 있는 부가적인 이득이 발생한다. 특히, 원핵(prokaryotic) 광합성(photosynthesis) 미생물인 남조류(Cyanobacteria)의 이산화탄소 고정화 기능은 대기 중의 CO<sub>2</sub>의 저감과 동시에 향암물질, 항생물질 등 고부가 의약 활성물질을 생산하여 경제적 부가가치를 창출한다. 이산화탄소의 생물학적 전환 기술은 생물의 광합성 기능에 의해 대기 중의 이산화탄소를 생물체 내에 유기물로 생물 전환(Bioconversion)하는 것이다. 광합성 생물 중에서 이산화탄소의 고정화 속도가 소나무의 15배로 매우 효율적이고, 다양한 종류의 유용물질을 포함하며, 고밀도 배양이 가능하다고 알려진 Cyanobacteria를 대상으로 고농도의 CO<sub>2</sub>를 사용하여 성장에 미치는 영향과 광합성 효율에 대해서 알아보았다.

### 나. 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 Cyanobacteria는 *Spirulina platensis*를 이용하였다. CO<sub>2</sub>의 농도에 따른 성장과 광합성율을 알아보기 위해서 변형된 SOT 배지에 탄소원으로 가스 상태의 CO<sub>2</sub>를 0.01, 0.03, 0.07 1.0% 농도로 각각 공기와 섞어서 0.3 vol/vol/min의 속도로 공급하여 실험하였다. 배양시의 온도는 25 ± 1°C로 고정하였으며, 빛을 주기 위해서 삼파장램프를 이용하여 130 μmol photons/m<sup>2</sup>/s 광도를 유지하였다. 건체량 측정은 일정량의 배양액을 GF/C 필터를 이용하여 세포를 모은 후, 105°C의 건조기에서 4시간동안 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 총유기탄소분석기(Total organic carbon analyzer)를 이용하여 총무기탄소(Total inorganic carbon)를 측정하였고, 광합성률은 <sup>14</sup>C technique을 이용하여 측정하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

다양한 농도의 이산화탄소 농도에서 배양하여 성장률을 조사한 결과 공급되어지는 이산화탄소의 농도가 0.07%까지는 공급되어지는 이산화탄소의 농도가 증가함에 따라 성장률과 생물량은 증가하여 0.07%의 이산화탄소 농도에서 최대값을 얻었으나, 1.0%의 이산화탄소 농도에서는 성장률과 생물량이 최저치로 나왔다(Figure 11A). *Spirulina*의 성장은 용존무기 탄소(Dissolved inorganic carbon; DIC)의 농도에 영향을 받음을 알 수 있었다(Figure 11B). 이와 같은 결과는 0.07%의 이산화탄소 농도에서는 탄소의 제한을 공급되어지는 공기의 양으로 극복하였으나, 0.01%의 이산화탄소의 경우에는 DIC의 양이 고갈되면서 cyanobacteria의 성장이 멈추었다. 또한 1.0%의 이산화탄소 농도에서는 DIC의 농도가 50-60 mg/L의 수준으로 일정하게 유지되었다. 일반적으로 공급되어지는 이산화탄소의 농도를 높여 주면 이산화탄소의 용해율도 증가한다고 알려져 있으나, 1.0%의 이산화탄소를 공급한 경우에는 과도한 DIC에 의해서 성장에 저해를 받음을 확인하였다. 그러므로 공장의 배기가스 내에 존재하는 이산화탄소의 양이 4-16%이므로 회석하여 연속적으로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 공급되어지는 이산화탄소가 배지 속에 녹아들어가고 이산화탄소 고정에 의해서 생물량의 증가로 변화됨을 확인하였다. 또한 공급되어지는 이산화탄소의 농도가 증가함에 따라 배지 내에 질소의 농도가 감소하였다. 이는 이산화탄소의 고정화가 증가함에 따라 질소의 섭취와 대사가 촉진되는 것을 나타내므로 배기가스내의 질소를 제거하는 역할도 동시에 수행할 수 있는 장점이 있다.

Chlorophyll *a*에 근간한 광합성 효율을 보기 위하여 P-I 곡선을 그려본 결과 0.07%의 이산화탄소를 공급한 경우에서 최대값을 보였다(Table 9). 이와 같은 결과는 *Microcystis*를 0.035와 0.07% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양한 것과 비슷하게 0.03과 0.07 %CO<sub>2</sub> 사이에 광합성적인 특성의 차이를 보이지 않았다.

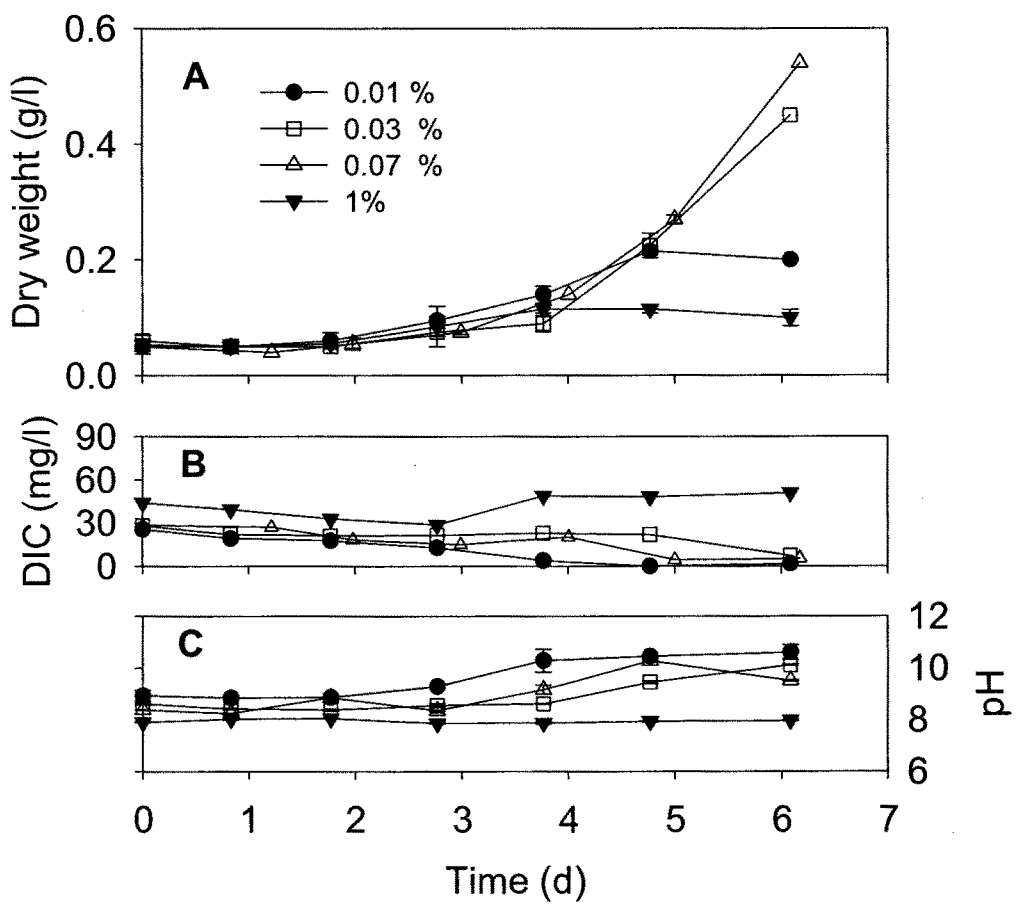


Figure 11. Growth (A), dissolved inorganic carbon (DIC) in medium (B) and pH (C) of *Spirulina platensis* under different CO<sub>2</sub> concentrations.

Table 9. Maximum dry cell weight and internal carbon and nitrogen contents of *Spirulina platensis* grown under 0.01, 0.03, 0.07 and 1% CO<sub>2</sub>. Standard deviation is in brackets

CO <sub>2</sub> (%)	Maximum dry cell weight (g/l)	Total internal C (mg/g DW)	Total internal N (mg/g DW)	C:N (atomic ratio)
0.01	0.2 (0)	433 (± 35)	109 (± 8)	4.6 (± 0.1)
0.03	1.2 (± 0.01)	456 (± 21)	72 (± 4)	7.4 (± 0.3)
0.07	3.6 (± 0.1)	564 (± 27)	70 (± 3)	9.4 (± 0.2)1
1.00	0.12 (± 0.01)	105 (± 5)	nd*	nd

\*nd: not determined.

또한 공급되어지는 이산화탄소의 양에 대하여 빛의 강도에 따른 short-term <sup>14</sup>C-고정화가 건조무게에 대한 C-고정화보다 컸다(Figure 12). 이와 같은 차이는 배지내로 유출과 호흡을 위한 탄소의 고정에 이용되기 때문이다. 1% 이산화탄소를 공급한 경우를 제외하고, 이산화탄소의 양과 전체량 기준의 C-고정 속도가 양의 상관관계를 보였다(Figure 12). 공급된 이산화탄소의 양이 0.03%와 0.07%에서 생물량의 차이가 큰 이유는 성장 지수기 동안 cyanobacteria가 DIC를 이용하는 능력에 차이가 있기 때문이다. 위의 실험 결과를 바탕으로 *Spirulina*의 최대 성장률과 광합성률을 얻기 위해서는 공급되는 CO<sub>2</sub>의 양은 0.07%로 하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

Table 10. Photosynthetic parameters of *Spirulina platensis* grown under 0.01, 0.03, 0.07 and 1% CO<sub>2</sub> concentration

CO <sub>2</sub> (%)	$\alpha$ (mgC/mg chl a/h/(mmol/m <sup>2</sup> /s))	P <sub>max</sub> (mgC/mg chl a/h)	I <sub>k</sub> (mmol/m <sup>2</sup> /s)	r <sup>2</sup>
0.01	0.023	5.59	245	0.940
0.03	0.027	5.58	206	0.847
0.07	0.027	6.09	222	0.781
1	0.014	4.42	316	0.943

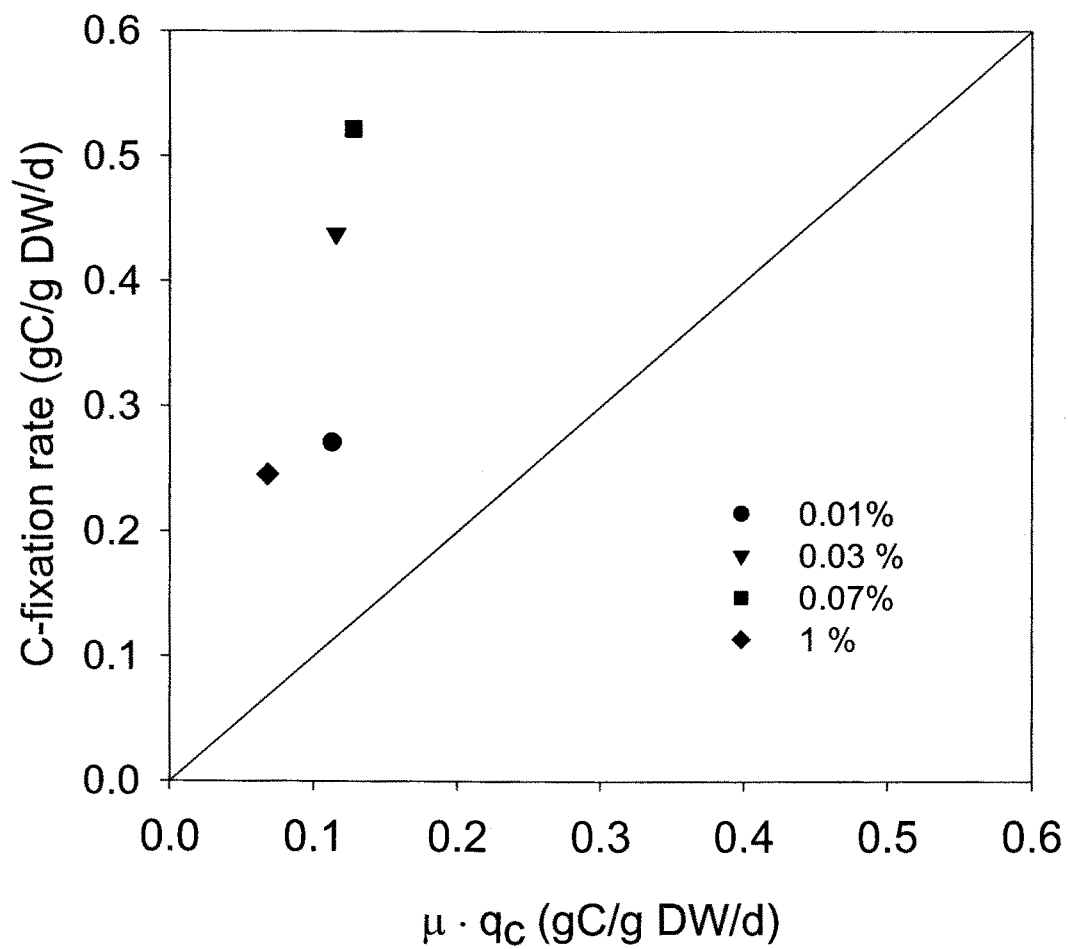


Figure 12. C-fixation rate vs.  $\mu \cdot q_c$  indicates the internal carbon content, while the linear line represents  $y = x$ .

### 3. Cyanobacteria의 균주개량 및 고정화 효율 증대

#### 가. 균주개량

수원지에서 cyanobacteria(남조류)의 다양성을 현미경을 통하여 형태학적으로 분리하는 작업은 매우 힘들고, 시간을 요구하는 작업이다. 또한 저수지의 담수로부터 주요 남조류의 분리 작업은 성공하기 쉽지 않고, 배양하지 않고 녹조류를 신속하게 동정하는 것이 중요하다. 16S rDNA 유전자를 이용한 분자생물학적 방법은 환경 시료에서 미생물의 동정 분석에 매우 유용하게 사용되고 있다. 그러나 16S rDNA 유전자의 경우 진화적으로 매우 느리게 변했기 때문에 속(genus) 간의 구분은 가능하지만 종(species) 간에서는 구분이 어렵다. 특히, 균주(strains) 간의 구분에 적용은 어렵다는 보고가 많다. 더구나, 환경시료에서 미생물에 비해 적은 수로 존재하는 남조류를 쉽고 빠르게 찾기 위한 여러 가지 연구가 시도되었다. 남조류의 분석과 분류를 위하여 PC-IGS, RuBP carboxylase, *nifH*, 그리고 *rpoC1* 등 여러 가지 기능 유전자의 PCR을 통하여 증폭된 산물이 이용되었다. 대부분의 이와 같은 연구는 순수분리된 남조류의 계통분류 연구에 중점을 맞추고 있다. 기능성 유전자 중 phycocyanin은 남조류에만 유일하게 존재한다. 그래서 *cpc-BA* 유전자의 PCR 증폭 산물에 대한 분석을 통하여 환경 시료로부터 남조류의 다양성에 대한 연구도 시도되고 있다.

본 연구에 환경 시료는 금강의 상류에 존재하는 대청댐에서 채취한 담수를 대상으로 하였다. 2003년 7월 27일부터 10월 14까지 일주일간격으로 시료를 채취하였다. 시료의 남조류로부터 genomic DNA를 뽑기 위하여 G-spin II (intron, Korea) kit을 사용하였다. *cpc-BA* 유전자의 PCR 증폭을 위한 primer의 제작을 위하여 GeneBank에서 얻은 다양한 남조류의 *cpc-BA* 유전자들을 ClustalX program을 이용하여 보존된 부분을 찾았으며, 이를 바탕으로 primer(PC1F와 PCR)를 제작하여 PCR을 통하여 *cpcBA-IGS*를 증폭하였다. 이때 PCR의 조건은 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 반응을 25회 반복하여 반응하였다. PCR 산물을 T-vector에 cloning하여 *Escherichia coli*에 형질전환(transformation)한 후, plasmid를 뽑아서 염기서열을 읽었다. 이와 같은 염기서열을 바탕으로 Neighbor-Joining 프로그램을 이용하여 계통도를 그렸다.

남조류의 *cpcBA-IGS* 유전자들을 증폭하기 위한 primer를 제작하기 위하여 GeneBank에 등록된 300여개의 *cpc-BA* 유전자를 찾아 잘 보존된 부분을 찾아 primer를 제작하였다. *cpcB* 유전자의 C-말단 부분의 266bp에서 72%의 유사도를 가지고 있기 때문에 아주



잘 보존되어 있으므로 primer로 매우 좋은 부분이라고 판단되어 PC1F의 primer를 만들었다. PC1R은 *cpcA* 유전자의 N 말단 부분을 선택하여 만들었다. PC1F와 PC1R을 이용하여 남조류에서 성공적으로 증폭되어 약 450bp의 PCR 산물이 만들어짐을 확인하였다 (Figure 13).

대청담에서 채취한 시료의 *cpcBA* 유전자의 다양성을 알아보기 위하여 위에서 만들어진 primer (PC1F와 PC1R)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 17의 시료 중 4개의 시료에만 PCR 산물을 얻었다. 이 PCR 산물을 T-vector에 cloning하고 *E. coli*에 형질전환하였다. 각 시료에서 얻은 형질전환 된 *E. coli*를 50여 개씩 선별하여 plasmid를 뽑고, 염기 서열을 읽었다. PCR 산물의 *cpcB* 유전자를 대상으로 계통분석을 수행하여 dendrogram을 그렸다 (Figure 14). 흥미롭게도, Microcystis-like 그룹(group F)을 제외한 6개의 그룹은 기존에 알려진 유전자와 95-70%의 유사도를 가지고 있어 매우 가깝다고 판단된다. 그러나 이 중 group C, D 와 G는 85%이하의 유사도를 가지고 있어서 상당한 거리가 있다고 판단된다.

남조류에서만 존재하는 *cpcB*, *cpcA* 유전자를 이용한다면 미생물에 의해서 오염되어진 환경 시료에서 빠르고 쉽게 남조류를 찾을 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 현미경상으로 구분이 힘든 종간의 구분뿐만 아니라 각 strain 사이의 정확한 차이점까지도 찾을 수 있는 가장 혁신적인 방법이라고 생각된다. 그러나 현재는 남조류에 대한 유전적인 정보가 부족하여 앞으로도 많은 정보를 찾는 실험을 해야 한다고 생각된다.

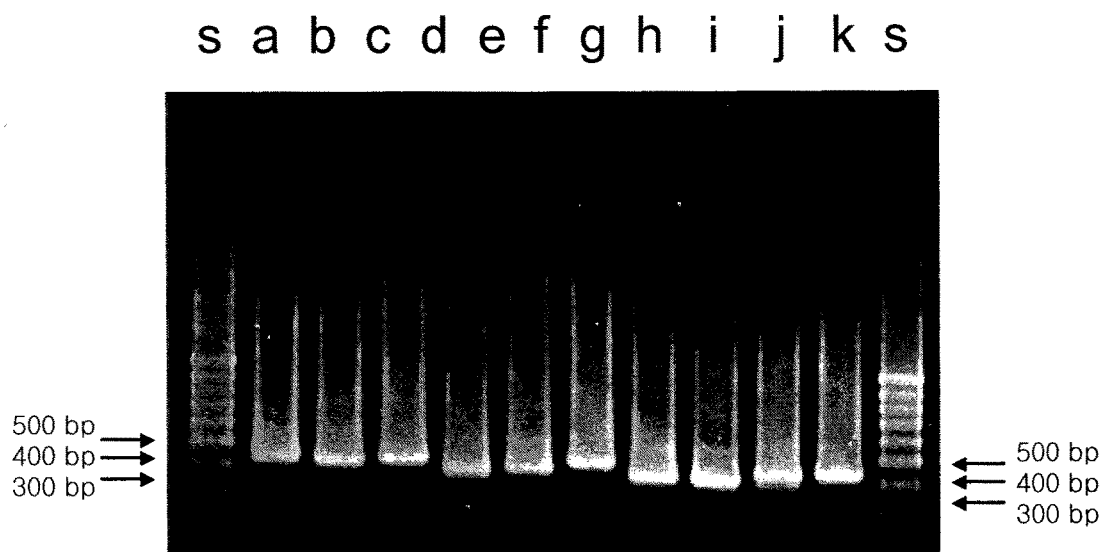


Figure 13. Photographs of ethidium bromide-stained gel showing the amplification products of *cpcBA* of strains of reference cyanobacteria. [S: Marker, a: *Cylindrospermopsis raciborskii* (AF426795); b: *Arthrospira* sp. (AF426792), c: Cyanobacteria sp. (AJ401168), d: *Fischerella* (V) sp. (AJ003181), e: *Anabaena* sp. PCC7120 (M75599), f: *Nodularia spumigena* (X05239), g: *Thermosynechococcus elongatus* (AF101444), h: *Synechocystis* sp. PCC9413 (D13173), i: *Pseudanabaena* sp. (AF068771), j: *Calothrix* sp. (M99426), k: *Fremyella diplosiphon* (M36276)].

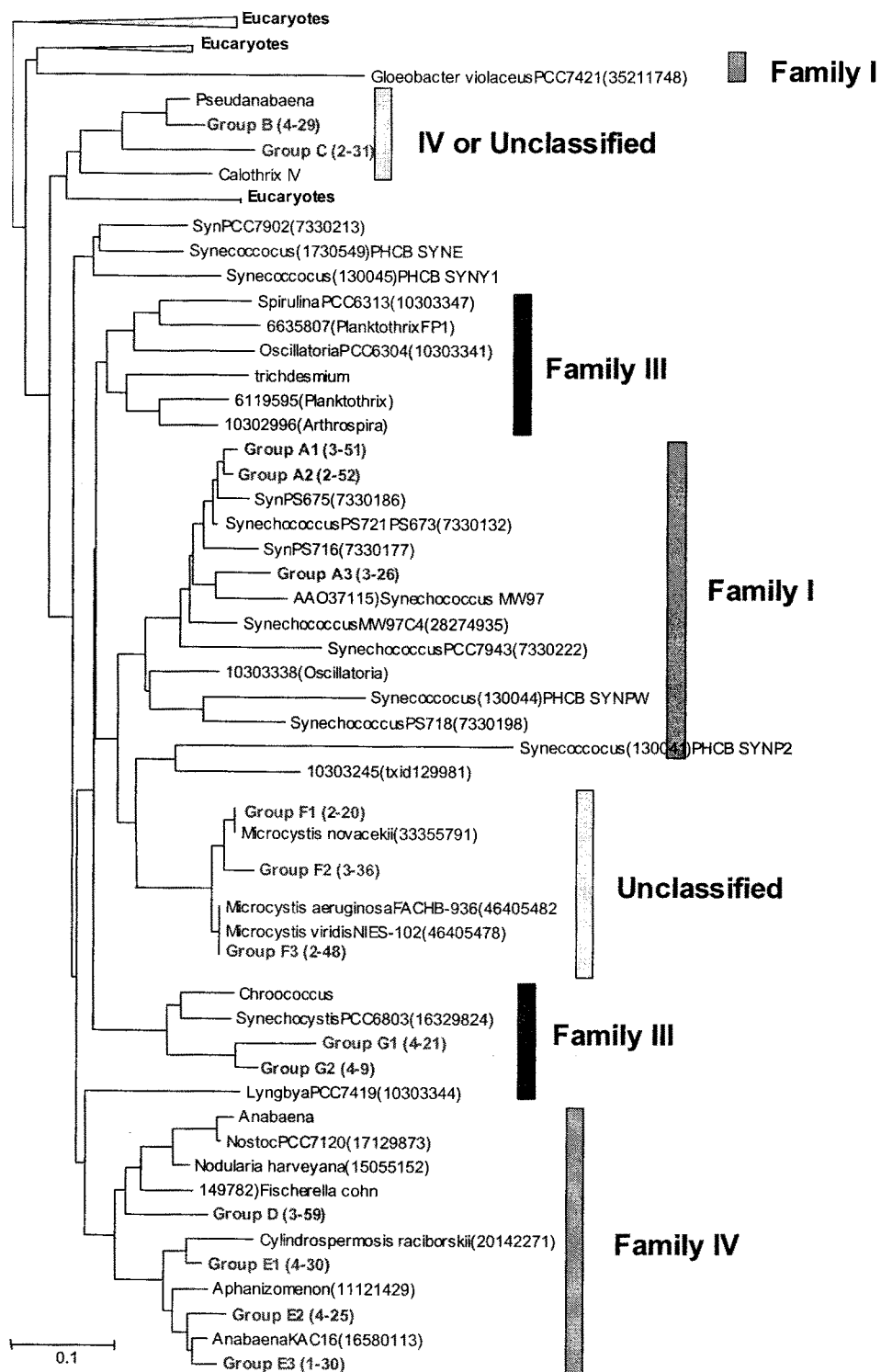


Figure 14. Distance dendrogram of the *cpcB* gene, including groups isolated from Daechung Reservoir. Translated protein sequences from clones were used for phylogenetic analysis.

## 나. CO<sub>2</sub> 고정화 효율 증대

광합성(photosynthesis) 미생물인 남조류(Cyanobacteria)의 이산화탄소 고정화 기능은 대기 중의 CO<sub>2</sub>의 저감과 동시에 항암물질, 항생물질 등 고부가 의약 활성물질을 생산하여 경제적 부가가치를 창출한다. 이들 생물을 이용한 생물학적 CO<sub>2</sub>의 고정은 2차적인 오염원을 줄일 수 있으며, 배양 생물의 생물량과 대사산물은 산업적으로 유용한 고부가 유용물질로서 이용될 수 있다. 특히, 이산화탄소의 생물학적 전환기술은 생물의 광합성 기능에 의해 대기 중의 이산화탄소를 생물체 내에 유기물로 생물전환(Bioconversion)하는 것이다. CO<sub>2</sub> 고정화 효율 증대를 위하여 앞서 기술되었듯이, 변형된 SOT 배지에 탄소원으로 가스 상태의 CO<sub>2</sub>를 다양한 농도로 하여 공기와 섞어서 0.3 vol/vol/min의 속도로 *Spirulina platensis*의 배양에 공급하였다. 이에 따른 성장률을 조사한 결과 공급되어지는 이산화탄소의 농도가 0.07%까지는 이산화탄소의 농도가 증가함에 따라 성장률과 생물량은 증가하여 0.07%의 이산화탄소 농도에서 최대값을 얻었으나, 1.0%의 이산화탄소 농도에서는 성장률과 생물량은 낮은 것으로 나타났다. 일반적으로 이산화탄소의 농도를 높여 주면 이산화탄소의 용해율도 증가한다고 알려져 있으나, 일정농도 이상(1.0%)의 이산화탄소를 공급할 경우에는 과도한 DIC에 의해서 조류의 성장은 저해될 수 있음을 확인하였다. 따라서 이산화탄소를 저감하기 위하여 이산화탄소 배출업체에 적용할 경우에는 희석하여 공급할 필요성을 제시하였다.

앞에서 설명되었듯이 이산화탄소의 고정화가 진행되면서 동시에 질소의 농도가 감소함으로써, 수질개선의 측면에서도 고려될 수 있을 것이다.

공급되어지는 이산화탄소의 양에 대하여 빛의 강도에 따른 short-term <sup>14</sup>C-고정화가 건조무게에 대한 C-고정화보다 큰 결과는 배지내로 유출과 호흡을 위한 탄소의 고정에 이용되었기 때문이었다. 특히, 이산화탄소의 농도가 0.03%와 0.07%에서 생물량의 차이가 큰 차이를 나타낸 것은 성장 지수기 동안 cyanobacteria가 DIC를 이용하는 능력에 차이가 있기 때문이다. 따라서 *Spirulina*의 최대 성장률과 광합성률을 위한 적절한 이산화탄소의 농도는 0.07%인 것으로 나타났다.

### 제 3 절 Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구

#### 1. 광생물반응기 설계 및 제작

미세조류를 이용한 이산화탄소의 생물학적 고정화에 의한 이산화탄소의 저감은 효과적인 광생물반응기(photobioreactor)의 설계 및 제작이 필수적인 요소이다. 광생물반응기의 디자인은 최근 많은 논쟁의 대상이 되고 있다. 대규모의 조류생산을 위해서는 배양의 대부분이 대기에 노출되는 개방형이거나 대기에 거의 노출되지 않는 폐쇄형 시스템으로 디자인 되어야 한다. 광합성 미세조류의 상업적 생산은 비용의 측면에서 주로 개방형 시스템에서 이루어진다. 최근에 폐쇄형 광생물반응기가 의학적으로 중요한 생화학물질의 생산을 위하여 많은 관심의 대상이 되고 있다. 특히 화학합성에 의해서는 얻어질 수 없는 물질을 미세조류로부터 얻고자 할 때의 경우가 그러하다. 가장 일반적으로 사용되는 야외에서의 폐쇄형 광생물반응기는 tubular(Pirt et al., 1983), thin panel(Tredici and Materassi, 1992) 및 flat plate 광생물반응기(Ratchford and Fallowfield, 1992)이다. 외부 또는 내부 광원이 장착된 폐쇄형 광생물반응기 또한 최근 개발이 시도되고 있다. 이들 시스템의 조작에 있어서 배양기의 깊이, 빛의 투과율, 혼합, 배지의 함량과 공급, 배양의 방식(정치배양, 연속배양, 반연속배양 혹은 혼합배양 등), 생물량의 농도, 포기의 정도, 광합성계의 상태 등은 주요한 인자가 될 것이다. 그는 또한 높은 생물생산과 배양의 최적화를 이루기 위해서는 배양의 대상이 되는 미생물의 생리적 특징의 이해정도에 달려있다고 지적하고 있다. 광생물반응기의 고안에 있어서 단위세포에 대한 빛의 이용성은 많은 인자들 중에서도 가장 중요하게 고려되어야 할 것이다.

본 연구는 본 연구진에 의해서 설계 제작된 200-L 광생물반응기의 반응성능을 향상시키기 위한 개·보수를 실시하고, 이를 미세조류의 배양에 적용하여 운전결과를 검토, CO<sub>2</sub> 고정화 및 biomass 생산성을 조사하였다. Cyanobacteria의 배양을 실시하여 *in vivo* fluorescence, chlorophyll *a* 함량, 균체량 등을 통해 성장률을 조사함으로써 온도, 광도, 공기주입량 등 대량배양시의 문제점을 보완하였다.

Figure 15에서와 같이 200-L 광생물반응기는 투명한 아크릴 판으로 제작되었다. 탄소원의 공급은 에어펌프 및 상부의 노출된 공간으로 대기로부터 공급되도록 하였다. 포기에 의한 혼합은 바닥에 설치된 4열의 에어스톤에 의해 이루어지고 유압조절판을 이용하여

폭기의 정도를 조절 할 수 있도록 하였고 좌우 두개의 전열판을 통하여 온도를 조절할 수 있게 제작하였다. 광생물반응기 제작에서 무엇보다도 중요한 광원은 반응조 외부의 상부와 하부에 여러 형광 전구를 설치하여 빛의 강도를 조절할 수 있도록 하였다. 수정·보완된 200-L 대량배양기는 유용물질의 탐색을 위한 다양한 조류종의 대량배양에 이용되었으며, 유용균주를 이용한 사료화를 위한 대량배양에 이용되고 있다.

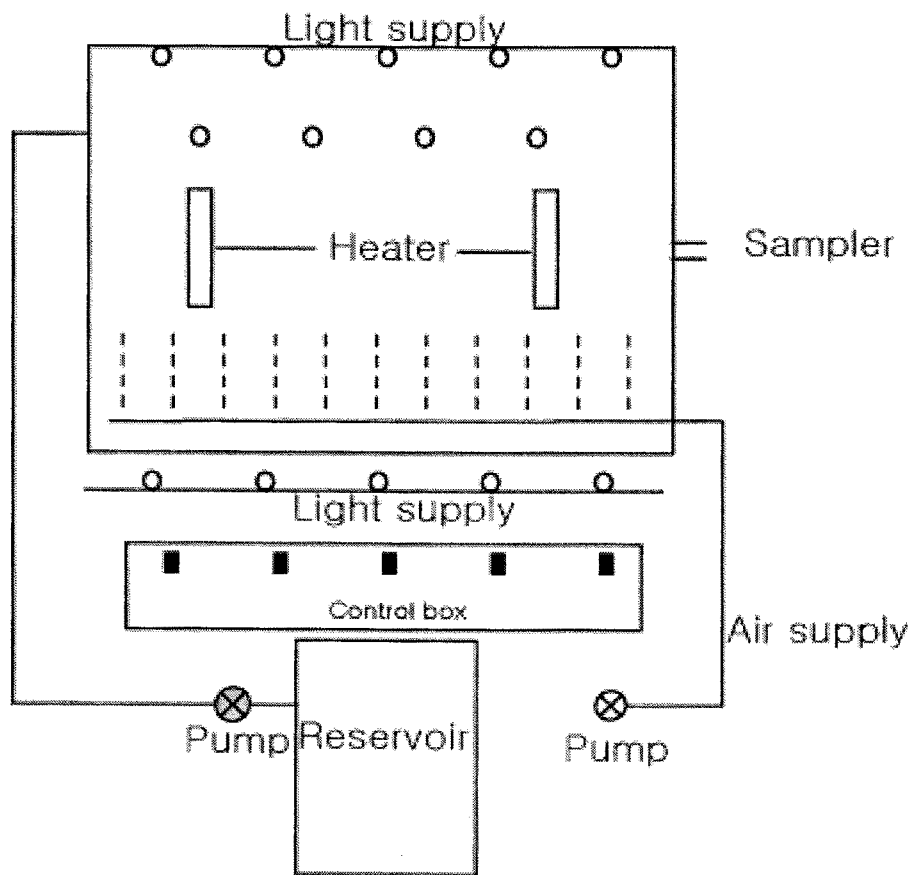


Figure 15. Schematic diagram of the 200-L photobioreactor.

## 2. Cyanobacteria의 배양공정의 최적화 및 모델 시스템 정립을 위한 배양공정 연구

광합성 미생물의 배양을 위해서는 탄소원으로 이용되는 CO<sub>2</sub>를 적정량 공급하는 것이 필수적이며, 광합성 효율을 극대화하기 위해서는 광량 및 광도의 조절과 최적화, 온도조절, 혼합 그리고 영양염류의 균형 있는 공급 등이 수반되어야 한다. 폐쇄성 반응기로서 Takano 등(1993)은 광섬유 광반응기를 이용하여 단세포성 조류인 *Emiliania huxleyi*를 8일간 배양하여 43 mg/L의 초미세 방해석 입자의 생산을 확인하였다. 즉, CO<sub>2</sub>를 불용성의 탄산칼슘으로 전환하여 CO<sub>2</sub>를 제거하는데 효과적임을 보였다. 한편 Javanmardian과 Palsson(1991)은 광섬유 생물반응기를 이용하여 *Chlorella vulgaris*를 10<sup>9</sup> cells/ml의 고농도로 배양한 바 있다. 사상형 cyanobacteria인 *Spirulina platensis*의 배양에 원주형 나선 관상 광반응기(cylindrical shaped helical tubular photobioreactor)를 이용하여 CO<sub>2</sub>의 농도가 4%로 강화된 공기를 공급하면서 회분식 배양에서 30.2 g dry weight(14.6 gC)/m<sup>2</sup>/d의 생산물에 도달하였다(Watanabe와 Hall, 1995).

개방형 배양장치로서 Matsumoto 등(1995)은 *Nannochloropsis* sp., *Phaeodactylum* sp. 등 미세조류를 화력발전소의 배출가스를 이용하여 raceway culture를 실시하여 생산된 생물량을 고체연료로 사용하였다. 이때 미세조류의 생산성은 42 g/m<sup>2</sup>/d, CO<sub>2</sub>의 평균이용률은 54%, CO<sub>2</sub> 고정량은 48 tC/ha/yr이며, 조류배양조 설치에 필요한 토지면적은 8,900 ha에 달하였다. 특히, 개방형 배양의 경우 다른 조류종에 의한 간섭, 환경변화에 따른 생산물의 변화 등의 어려움이 있으므로 조류의 생리 및 영양요구 등에 대한 기초연구를 바탕으로 물질생산의 최적조건을 맞출 수 있다고 사료된다. Laws와 Berning(1991)은 shallow outdoor flume에서 해양 규조인 *Cyclotella cryptica*를 발전소 배출가스를 이용하여 대량 배양하였으며, 순생산률은 15-20 gC/m<sup>2</sup>/d이었다. 이상에서 살펴본 바와 같이 조류의 성장을 조절하는 환경요인으로 중요한 것은 태양에너지의 이용, 온도, 영양염류의 이용성 등이다. 따라서 반응기의 설계시 광을 효과적으로 이용할 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다.

CO<sub>2</sub> 농도가 cyanobacteria의 성장과 광합성 특성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저농도(100 ppm), 표준농도(300 ppm), 고농도(700 ppm)의 서로 다른 CO<sub>2</sub>를 탄소원으로 공급하는 변형된 SOT 배지를 사용하여 실린더형 광생물반응기에서 *Spirulina platensis*를 배양하였다. pH는 20 mM 인산염 완충용액을 사용하여 8.0으로 조절하였다. 배양 온도는



25°C, 광량은 130  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조절하였다.

생산된 건조 균체량은 13일 배양 후 고농도  $\text{CO}_2$ 에서 2.4 g/L로 가장 높았으며, 저농도에서는 표준농도와 고농도 배양에 비교하여 낮은 성장을 보였다(Fig. 16A). 대수생장기에 각 배양조건에서의 비성장률은 저농도, 표준농도, 고농도  $\text{CO}_2$ 에서 각각 0.17, 0.40, 0.62 /d로 고농도 배양에서 가장 높았다. 저농도의  $\text{CO}_2$  배양에서는 배지에 남아있는 무기탄소의 농도는 균체가 성장하면서 고갈되어  $\text{CO}_2$  공급량을 0.1 vvm에서 0.3 vvm으로 증가시켜도 증가하지 않았다. 반면, 표준농도나 고농도 배양에서는 무기탄소가 고갈되지 않아 균체의 생장이 유지되었는데, 배지에 남아있는 무기탄소의 농도는 표준농도보다 고농도  $\text{CO}_2$  배양에서 더 높았다. 비성장률과 균체량 차이는 용존 무기탄소염의 농도에 영향을 받으며 용존 무기탄소염의 농도는 공급된  $\text{CO}_2$  농도와 상관이 있었다. 또한, 건조 균체량을 기초로 한 chlorophyll *a* 농도가 무기탄소가 고갈된 저농도 배양에서는 증가하지 않는 반면, 표준이나 고농도 배양에서는 증가하여 균체 증가 및  $\text{CO}_2$  고정에 영향을 주었음을 알 수 있었다(Fig. 16B). 결론적으로 cyanobacteria의 고농도 배양을 위해서는 어느 정도 고농도의  $\text{CO}_2$ 가 필요하다고 할 수 있다.

한편 배양된 *S. platensis*의 경제적인 harvest(수확)를 위하여 cyanobacteria의 생리적 특성을 이용한 방법을 연구 중에 있다. 즉, 배양 말기에 공기를 공급하면서 암조건으로 1일 정도 적응시킨 후, 교반 및 공기공급을 차단하여 *S. platensis*를 수표면으로 부유하도록 유도하여 수확하는 부유회수법이 효과적인 것으로 판단되었다.

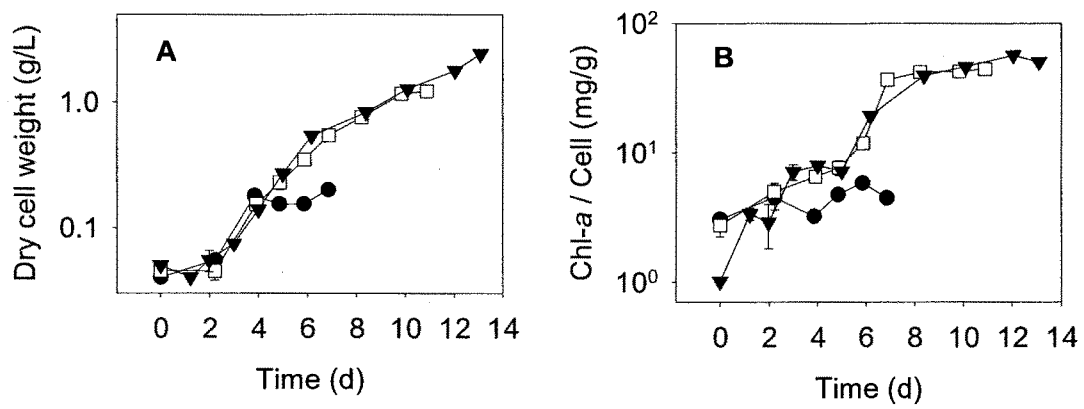


Figure 16. Growth (A) and chlorophyll-*a* content on the basis of dry cell weight (B) during cultivation of *Spirulina platensis* at different CO<sub>2</sub> concentrations of 100 ppm (●), 300 ppm (□) and 700 ppm (▼).

### 3. 배양의 최적화를 위한 배지 조성물 연구

#### 가. 서론

*S. platensis*는 70% 이상의 고 단백질을 함유하여 단백질원으로 사용될 수 있고, 일반 영양원에서 부족하기 쉬운 라이신, 메티오닌 등과 같은 필수 아미노산을 풍부하게 함유하고 있어 의약품 대용 식품 또는 체질 개선용 식품으로 널리 인식되고 있다. *S. platensis*는 단백질의 함량이 높을 뿐만 아니라 그 필수 아미노산의 조성이 매우 균형적이어서 소화흡수율(95% 이상) 등의 생체 이용률이 매우 높고, 많이 먹어도 인체에 축적될 수 있는 성분이 별로 없을 뿐만 아니라 그 지방산 조성, 미네랄 성분이 인체의 건강증진에 이상적으로 되어 있고 강력한 항산화 활성 물질인 베타-카로틴 등의 카로티노이드의 함량이 어떤 식품보다 높은 완전식품이다. 초기에는 단순한 양식어류의 먹이 사료로서 배양되기 시작하여 현재에는 건강식품개발, 기능성 물질인 감마-리놀렌산 추출 등 그 연구가 증가되어 가고 있는 실정으로 그 이용 범위가 점점 확대되어 가고 있다. *S. platensis*는 식물과 같이 태양광을 에너지원으로 사용하여 탄산가스를 유기물로 바꾸고 증식한다. 따라서 *S. platensis*가 선호하는 배양 조건은 풍부한 태양광과 미네랄이 풍부한 깨끗한 물(예컨대, 적도에 가까운 열대기후의 해양 심층수), 자생하고 있는 열대의 호수와 같은 따뜻한 물, 다른 생물이 사는 것이 곤란한 강한 알칼리성 배지(pH 9.5 ~ 11) 등이 바람직하다. 그 동안 배양기, 광도 또는 온도 등의 배양 조건을 조절하여 최대 건조중량의 조체를 생산하려는 노력이 있어 왔다. 종래에는 *S. platensis*의 배양시 일반적인 SOT 배지를 사용하였다. 일반적인 SOT 배지의 조성은 다음의 Table 11과 같다. 성장 최적화 및 최대 수확을 위하여 배지의 조성보다는 배양 조건 및 방법을 조절하였다. *S. platensis*를 30°C, 2500 lux, pH 9.5 및 4 vvm로 100-L 규모의 원통형 배양기와 에어 리프트형(air lift) 배양기를 사용하여 두 배양조에서의 생산성 및 최고 성장 농도를 비교하는 방식으로 최적 조건에 대한 실험이 이루어졌다.

배지 조성을 변화시키지 않고 배양기, 광도 또는 온도 등의 배양 조건을 변화시켜 *S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확을 유도하는 방법은 배양기를 제조하기 위하여 비용이 많이 소요되어 경제적으로 문제가 있었고 최적의 조건을 찾기 위하여 실험 시간이 많이 걸리는 문제도 있었다. 따라서 *S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확을 위한 새로운 접근이 요구되고 있었으나, SOT 배지의 원소 농도를 조절하여 *S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확을 유도하려는 시도는 없었다.

Table 11. Component composition of the generally used SOT medium for *Spirulina platensis* culture

배지 성분	함량(mg/100 ml)
NaHCO <sub>3</sub>	1680
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50
NaNO <sub>3</sub>	250
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100
NaCl	100
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> EDTA	8
A <sub>5</sub> solution	0.1 ml
<b>A<sub>5</sub> solution (/100 ml)</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	286
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.2
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	7.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.1

수중에 분포하는 다양한 생물 중에서 생리활성 물질을 생산하는 생물군으로 알려진 cyanobacteria에 대한 생리적 특성에 따른 분리 및 배양 등에 대한 오랜 연구 경험을 바탕으로 하여 *S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확을 유도하는 방법에 대한 다른 방법에 대해 연구하였다. 즉, *S. platensis*의 배양에 사용되는 SOT 배지의 질소 및 탄소의 농도를 조절한 최적 조성의 배지를 개발함으로써 *S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확이 가능하여 경제적으로 유용할 뿐만 아니라 다양하게 산업적으로 응용될 수 있도록 하였다.

#### 나. 재료 및 방법

*S. platensis*의 경우에는 SOT 배지를 사용하는데, SOT 배지는 탄소, 질소 및 각종 무기염류를 포함한다. 질소와 탄소는 *S. platensis*가 대사를 통하여 만들어 내는 아미노산, 단백질 등의 대사 산물의 필수 구성 요소가 되고 특별히 이산화탄소를 흡수하여 산소를 만들어 내는 *S. platensis*에게는 중요한 원소이다. 또한, 각종 무기염류는 균체의 구성 성분으로 이용되기도 하고, 배지의 pH와 삼투압의 조절에도 중요한 작용을 한다. 주요 무기염은 P, Na, K, Mg, S, Fe, Cl 등이며, Ca, Mn, Zn, Cu 등도 포함될 수 있다.

*S. platensis*의 성장 최적화 및 최대 수확을 위한 최적 조성의 배지를 개발하기 위하여 일본 국립환경연구소에서 *S. platensis*를 분양받았다. *S. platensis*를 위의 Table 11의 조성을 가지는 일반적인 SOT 배지에서 계대배양(subculture)하였다. 통상의 cyanobacteria와 같이 *S. platensis*는 광독립영양(photoautotrophic) 조건에서 생육하기 때문에 빛에너지 공급원인 형광등(cool white fluorescent lamps)을 사용하여 성장에 적합한 광도 160-180  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 를 유지하였다. 온도 35°C, 광주기 L:D = 24:0 하에서 70 rpm으로 교반하면서 배양하여 대용량 배양을 위한 예비 균주를 확보하였다. *S. platensis*의 성장에 중요한 영향을 줄 수 있는 질소 및 탄소의 농도를 변수로 하여 여러 종류의 변형된 SOT 배지를 제조하였다. 제조된 배지에 *S. platensis*를 150 mL 씩 넣고 매일 chlorophyll *a* 함량과 균체의 건조중량을 1 회 측정하여 성장률(성장 최적화)을 조사하였다. *S. platensis*의 성장 최적화를 위한 배지 조성을 규명한 후, 그 조성에 따라 배지를 제조하여 3 L 용량, 광도 180  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ , 온도 35°C, 광주기 L:D = 24:0으로 조정된 광교반기(Illuminated Shaking Incubator)를 운용하여 *S. platensis*의 일일최대생산량(최대 수확)을

측정하였다. 다른 식물플랑크톤과 마찬가지로 *S. platensis* chlorophyll *a*를 함유하고 있으므로 이를 측정하여 *S. platensis*의 현존량을 산정하였다. 매일 1회 5 mL의 시료를 채취하여 와트만 유리섬유여과지(GF/C)로 여과한 후, 여과지를 90 % 아세톤 용액에 담가 마쇄한 뒤 12 시간 이상 암냉 상태에서 방치한 후 chlorophyll *a*를 추출하였다. 추출 후 여과지로 걸러 750 nm, 664 nm, 647 nm 및 630 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 조체의 건조중량은 매일 1회 시료를 채취한 후, 사전에 건조하여 여과 전 무게를 측정해 둔 유리섬유여과지로 여과하여 측정하였다. 이 때 여과 후에는 반드시 3차 증류수로 조체를 세정하여 조체 주변에 남아 있는 염분을 제거하였고, 여과지를 4시간 동안 80℃에서 충분히 건조시킨 다음 무게를 측정하여 여과 전·후 무게의 차이로 조체의 건조중량을 산정하였다. 배양된 *S. platensis*의 생물량(biomass)을 나타내기 위해서 생물체 전체 또는 부분 사이의 상대적 성장 관계를 비교할 목적의 비생장률을 구하였다. 비생장률은 chlorophyll *a*의 함량과 건조중량 값을 토대로 하였고 비생장률을 비교하여 상대적으로 유리한 성장 조건을 밝혔다. 성장률( $\mu$ )은  $(\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$ 로 계산하여 구하였는데, 여기서  $t_1$ 은 처음 측정일,  $t_2$ 는 나중 측정일이고,  $x_1$ 은  $t_1$  측정일의 chlorophyll *a*의 함량 또는 건조중량,  $x_2$ 는  $t_2$  측정일의 chlorophyll *a*의 함량 또는 건조중량을 의미하고  $t_2 - t_1$ 은 측정일의 차이이다. 상기 모든 실험은 3 회 반복 실시하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

비생장률 값은 결과적으로 일일생산량과 높은 상관관계를 나타내었다. *S. platensis*의 비생장률과 동일시기의 일일생산량과의 상관관계는 Figure 17과 같다. *S. platensis*의 성장에 있어 가장 유리한 질소의 농도 조건을 알아보기 위하여 NaNO<sub>3</sub>를 0.607 g/L(질소 100 mg/L), 0.911 g/L(질소 150 mg/L), 1.214 g/L(질소 200 mg/L), 1.788 g/L(질소 300 mg/L) 또는 3.035 g/L(질소 500 mg/L) 각각 주입하여 조체를 배양하면서 조체의 chlorophyll *a* 농도와 건조중량을 위와 같은 방법으로 측정하였다.

그 결과는 Figure 18에 도시하였으며, NaNO<sub>3</sub>를 1.214 g/L 주입한 경우 즉, 질소가 질소 200 mg/L 포함된 경우에 대체로 높은 chlorophyll *a* 농도와 조체의 건조중량을 나타낼 수 있다. 따라서 *S. platensis*의 배양에 일반적으로 사용되고 있는 SOT 배지의 경우 2.5 g/L의 NaNO<sub>3</sub>가 주입되는 것은 질소의 과다 주입임을 시사한다. 조체의 chlorophyll *a* 농도와 건조중량의 측정 자료를 토대로 한 비생장률을 조사한 결과, Table

12와 같이 비슷한 경향을 보임을 알 수 있었다. Cyanobacteria의 생장에 있어 가장 유리한 탄소의 농도 조건을 알아보기 위하여 질소농도를 배양의 최적조건인  $\text{NaNO}_3$  1.214 g/L로 주입하고, 탄소원인  $\text{NaHCO}_3$ 의 주입량을 1.68 g/L(탄소 240 mg/L), 3.46 g/L(탄소 494 mg/L), 8.4 g/L(탄소 1200 mg/L), 16.8 g/L(탄소 2400 mg/L), 34.6 g/L(탄소 4940 mg/L) 또는 56 g/L(탄소 8000 mg/L)을 각각 주입하여 탄소 농도의 구배를 주어 *S. platensis*를 배양하였다. 그 결과는 Table 13과 같고 8.4-16.8 g/L에서 최대 비생장률이 가장 높게 나타났다. Figure 19는 탄소의 농도를 변화시키면서 배양된 조체의 최대 비생장률의 변화를 나타내고 있다.

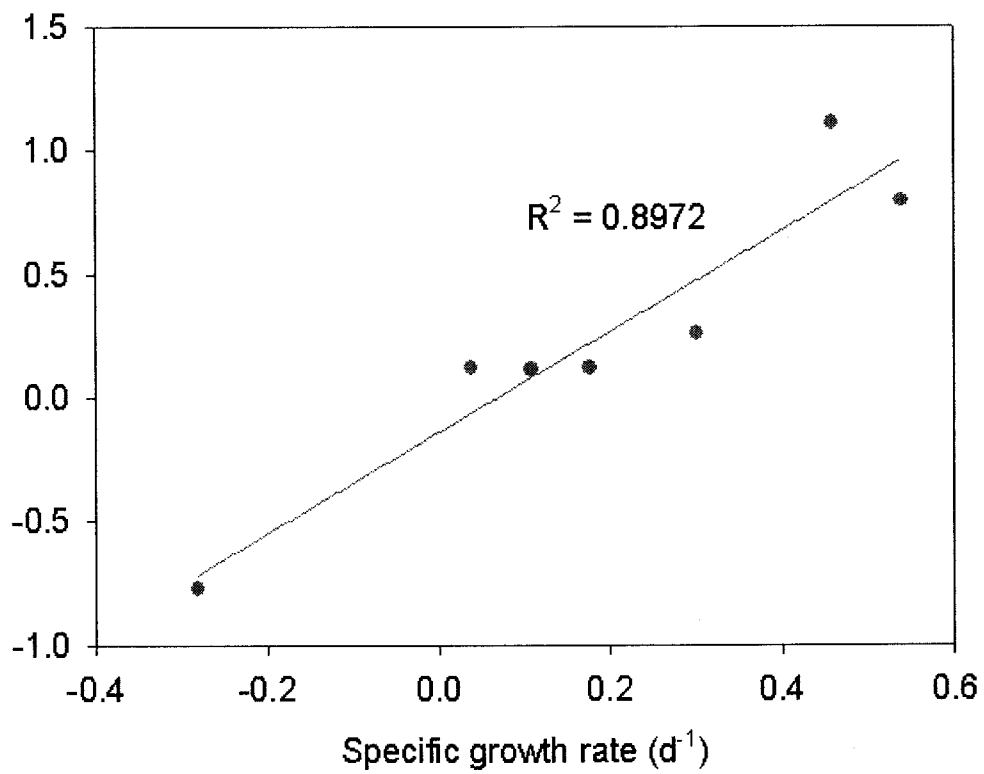


Figure 17. Relation between Specific growth rate and daily production of *Spirulina platensis*.



Table 12. Maximum specific growth rate of *Spirulina platensis* by different nitrogen concentration

NaNO <sub>3</sub> 농도 (g/L)	최대 비성장률(/d)	
	$\mu_{\max}(\text{Chl})$	$\mu_{\max}(\text{DW})$
0.607	0.66	0.29
0.911	0.54	0.21
1.214	0.68	0.50
1.788	0.65	0.33
3.035	0.72	0.47

Table 13. Maximum specific growth rate of *Spirulina platensis* by different carbon concentration

NaNO <sub>3</sub> 농도 (g/L)	최대 비성장률(/d)	
	$\mu_{\max}(\text{Chl})$	$\mu_{\max}(\text{DW})$
1.68	0.33	0.28
3.46	0.36	0.34
8.4	0.40	0.46
16.8	0.27	0.55
34.6	0.29	0.35
56	0.28	0.32

식물에서와 마찬가지로 미세조류의 경우에도 각 종에 따라 조체 내부의 최적 질소와 탄소 농도의 비를 갖고 있다. 따라서 주입된 질소와 탄소 농도 자체가 아니라 이들 농도 비가 조체의 생장에 영향을 미치는지 여부에 대하여 조사하였다.

Table 14과 같이 질소와 탄소 농도의 비를 달리하여 조체 생장의 변화를 조사한 결과, 주입된 질소와 탄소 농도의 비는 조체의 생장에 큰 영향을 미치지 않았고, 이보다는 주입된 질소와 탄소 각각의 농도에 따라 최대 비생장률이 달라지는 것을 알 수 있었다. 또한, 이전 실험의 결과와 마찬가지로  $\text{NaHCO}_3$  주입량 16.80 g/L와  $\text{NaNO}_3$  주입량 1.21 g/L의 조건에서 chlorophyll *a* 농도 및 건조중량을 토대로 한 최대 비생장률 값이 모두 높게 나타났다. 이는 이들 주입량이 *S. platensis*의 생장에 가장 효율적인 농도임을 시사한 것이라고 판단된다.

Table 14. Maximum specific growth rate of *Spirulina platensis* grown in different nitrogen and carbon concentration

C:N 비 (무게비)	$\text{NaHCO}_3$ 농도 (g/L)	$\text{NaNO}_3$ 농도 (g/L)	최대 비생장률(/d)	
			$\mu_{\text{max}}(\text{Chl})$	$\mu_{\text{max}}(\text{DW})$
6:1	1.68	0.250	0.094	0.132
	8.40	1.214	0.227	0.168
12:1	3.46	0.250	0.344	0.145
	16.80	1.214	0.476	0.182
60:1	16.80	0.250	0.433	0.174

Table 15. Maximum specific growth rate and maximum relative frequency based on the dry weight of *Spirulina platensis* grown in the different metal concentration

변형된 SOT 배지	최대 비생장률(/d)	최대 상대빈도
Original	0.369	1.45
×3 Fe	0.354	1.42
×5 A <sub>5</sub> solution	0.290	1.34
1.214 g $\text{NaNO}_3$	0.420	1.52
×5 A <sub>5</sub> solution + 1.214 g $\text{NaNO}_3$	0.328	1.39

배양의 최적화 배지 조성을 규명함에 있어, 조체의 성장에 철을 비롯한 미소량 성분 원소의 영향이 있으므로 배지의 구성분인 Fe, Zn, Cu, Mn 등의 무기염류의 농도를 조절하여 SOT 배지를 제조한 후 *S. platensis*를 배양하였다. 그 결과는 Table 15에 나타내었는데, 결과적으로 특이한 영향을 발견할 수 없었고 여전히 질소농도를  $\text{NaNO}_3$  1.214 g/L로 조정된 배지에서 배양한 조체가 최대 비생장률과 최대 상대빈도 값이 가장 높게 나타났다. 이로써, 질소 농도가 *S. platensis*의 성장에 큰 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

상기 실험을 통해 결정된 배양 최적화 배지 조성을 이용하여 3 L 배양기에서 *S. platensis*를 배양한 결과, Figure 20에서 산정할 수 있는 바와 같이, 최대 생장률이 1.11 g/L/d였는데, 이러한 결과는 광도, 온도 등을 조절하고 배양기를 특수 제작하여 운용한 많은 연구사례에서 지금까지 보고된 *S. platensis*의 최대 생장률 값과 비교해 본 결과 유사한 수준임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구결과는 단지 배지의 조성만을 조절하여 가장 경제적인 방법으로 높은 조체 회수율을 얻을 수 있었다. 유용물질의 경제적 생산을 위해서는 기체상의  $\text{CO}_2$  공급과 함께 배지에 무기탄소원을 추가함으로써 cyanobacteria의 성장을 촉진할 수 있다. 탄소원으로  $\text{NaHCO}_3$  주입량을 달리한 탄소 농도 구배 하에서 *S. platensis*를 배양한 결과, 16.8 g  $\text{NaHCO}_3$  처리구에서 비생장률이  $0.5539 \text{ d}^{-1}$ 로 최대값을 보였다. 배양의 최적화 배지 조성을 규명하고자 배지의 주요 구성분인 N, Fe, Zn, Cu, Mn 등의 농도를 달리하여 배양한 결과,  $\text{NaNO}_3$ 를  $1.54 \text{ g l}^{-1}$  주입한 처리구에서 배양 6일째 dry weight based-비생장률이  $0.420 \text{ d}^{-1}$ 로 최대값을 보였다. 상기 실험을 통해 결정된 배양 최적화 배지 조성을 이용하여 3-L 배양기에서 *S. platensis*를 배양한 결과, 최대생장률이 1.11 g/l/d를 나타내었다.

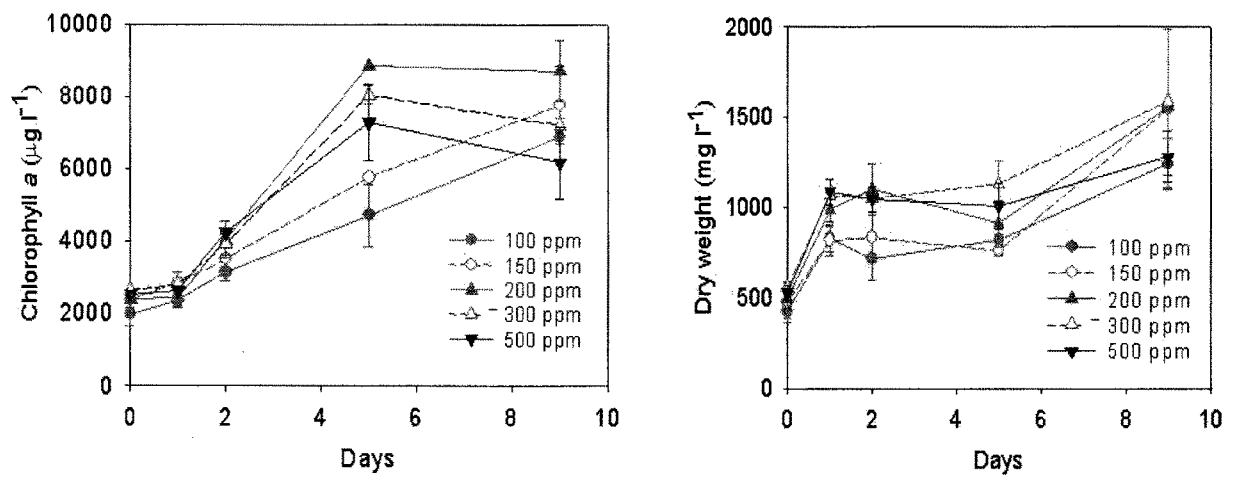


Figure 18. Chlorophyll *a* concentration and dry weight of *Spirulina platensis* grown in different nitrogen concentration.

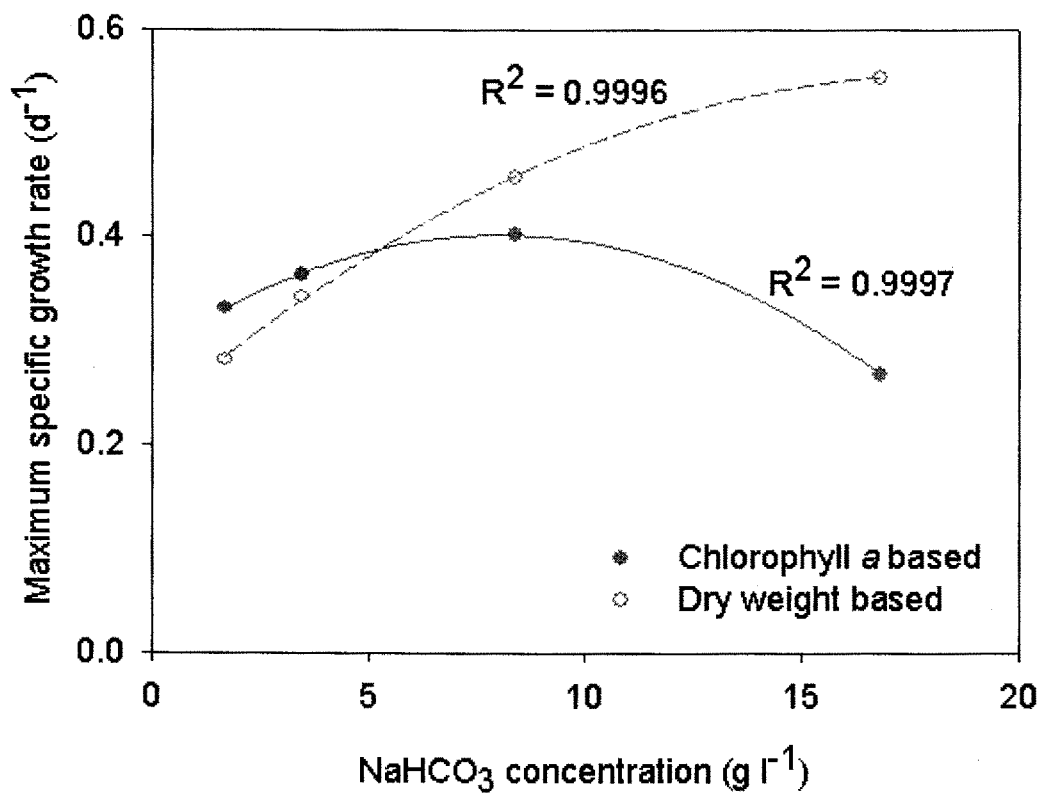


Figure 19. Maximum specific growth rate of *Spirulina platensis* grown in different carbon concentration.

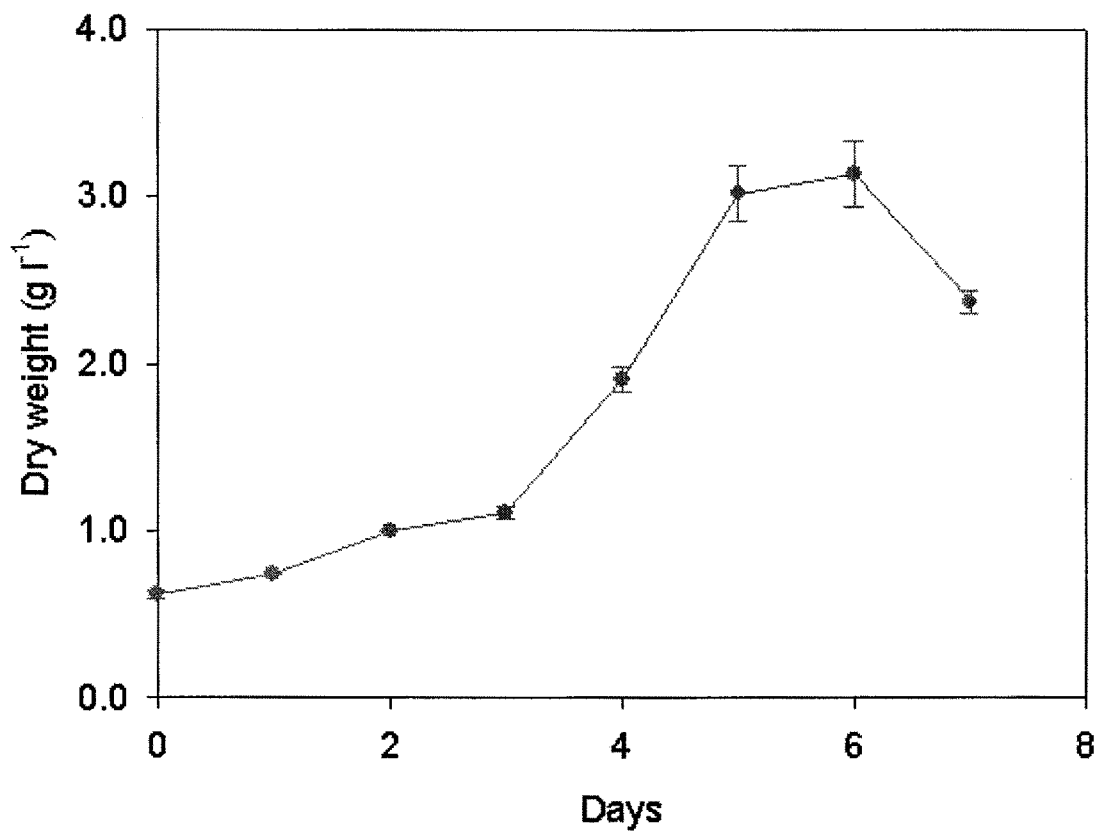


Figure 20. Dry weight of *Spirulina platensis* grown in different nitrogen and carbon concentration.

#### 4. Cyanobacteria 대량배양의 실증화

본 연구에서는 기존 200-L 광생물반응기를 보완 설계하여 제작 후 시험 가동하였다. Cyanobacteria의 배양을 실시하여 *in vivo* fluorescence, chlorophyll 함량, 균체량 등을 통해 성장률을 조사함으로써 온도, 광도, 공기주입량 등 대량배양시의 문제점을 보완하였다. Cyanobacteria(*Spirulina platensis*)를 대량배양하여 연속적 배양 및 회수법을 시도한 결과, 2주간 총 35 g/80 L를 회수하였다. 기존 광생물반응기를 이용하는 것과 더불어, biomass로부터 고부가 유용물질을 탐색하고자 여러 종류의 균주를 대량 배양하는 연구가 요구되었기에 8-L 용량, 광도 100 - 130  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 온도 24 - 26°C, 광주기 24L : 0D로 조정된 광교반기(Illuminated shaking incubator)를 추가로 다수 운용하여 조류를 배양하였다.

#### 5. Cyanobacteria의 수확공정

##### 가. 서론

미세조류로부터 유용 생리활성물질의 상업적 생산시 배양된 생물량의 수확(harvesting)은 매우 중요한 과정 중 하나이다. 배양된 조류의 harvesting은 여과(filtration), 침전(sedimentation), 부유(flotation), centrifugation과 같은 복잡한 과정을 통해 이루어지며, 많은 비용이 소모된다. 통상 20-30%의 비용이 요구되는(Gudin and Therpenier, 1986) 생물량의 회수과정은 비용절감을 최대화, 생물량의 질적 손실을 최소화 및 배양공정을 향상시킬 수 있는 수확법의 개발은 필수적으로 요구되는 공정이다. 침강제를 사용하여 농축하는 방법이 시도되고 있지만, 이 방법은 원심분리 및 여과의 과정을 거치면서 세포가 파괴되는 등의 생물량의 질적 측면에서 문제가 제시되고 있다(Lee et al. 1998). 더욱이 침강제는 주로 높은 농도의 금속염이 사용됨으로써 최종 산물의 위해성 마저 문제시 되고있다. 본 연구에서는 *S. platensis*는 공기로 가득 찬 기낭(gas vesicle)이 있어 부상하는 특성을 이용하여 간편하고 경제적인 회수법을 개발하고자 하였다.

##### 나. 재료 및 방법

*Spirulina platensis*는 SOT배지를 이용하여 5-L 광생물반응기에서 배양하였다. 최대의 수확수율을 나타내는 수확시기를 결정하기 위해서 세포의 건조중량에 대한 생산성 및 chlorophyll *a* 농도를 측정하였다. 조류의 성장단계별 세포의 부상 특성을 측정하기 위하

여 조류를 수지성장기 단계별로 수확하였다. 조류의 부상특성은 680 nm의 파장에서 흡광도를 이용하였고, 일정 시간별로 배지를 회수하여 측정하였다. 부상특성의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Flotation activity (\%)} = (1 - \text{OD}_t) / \text{OD}_i \times 100$$

OD<sub>t</sub>는 시간 t에서의 흡광도, OD<sub>i</sub>는 초기의 흡광도.

부상특성에 대한 금속 양이온의 영향을 조사하기 위하여, 지수기 말기에 수확한 세포에 6.8 mmol/l의 NaCl, MgCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 14-18H<sub>2</sub>O 및 FeCl<sub>3</sub>를 혼합하였다. 기낭이 파괴된 세포와 그렇지 않은 세포를 비교하기 위하여, 주사기를 이용하여 기낭을 파괴하여 현미경 관찰 및 부상특성을 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

세포의 건조중량과 chlorophyll a는 7일까지 증가하여 최고 1.9 g/l과 16.4 mg/l에 달했다(Figure 21A). 건조중량에 대한 엽록소 a의 비율은 5일까지는 증가한 후, 감소하였다. 건조중량의 생산성은 Figure 21B에 제시되어 있다.

광생물반응기에서 성장한 *S. platensis*의 부유활성은 대수성장기에서 배양시간에 따라 증가하여 6일까지 배양된 조체는 정치 2시간에 부상률이 80%에 달하였으며 10시간이 지나면 거의 모든 조체는 표면으로 부상하였고, 정치 10시간 이후에는 거의 모든 세포가 부상하였다(Figure 22). 그러나 배양 7일에는 일부 세포는 부유활성을 소실하였고, 침전하거나 뭉치는 것으로 나타났다. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>3+</sup>에 대해서 조류는 뭉치는 현상을 나타내었지만, 부상의 증가는 확인되지 않았고, 일부 세포는 침전하였다. 따라서 이들의 양이온은 부상활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 Na<sup>+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>는 부상활성을 증가시켰다. 특히, *S. platensis*의 부상에 대한 NaCl 농도의 영향을 다양한 정치시간에 따라 조사한 결과, 농도의 증가에 따라 부상활성도 증가하는 것으로 나타났다(Figure 23). 2%의 NaCl의 첨가는 1%에 비해 유의적으로 부상활성을 증가시키는 결과를 나타내었다. Cyanobacteria의 기낭은 주로 소수성의 단백질로 구성되어 있어서, 탄수화물의 양을 조절하여 부상정도를 조절한다(Walsby, 1994). 따라서 세포 단백질과 탄소의 농도를 성장단계에 따라 측정하여 최적의 수확시기를 결정하고자 하였다. Figure 24에서와 같이 탄소에 대한 단백질의 비는 배양 5일까지는 증가하였다. 탄소에 대한 단백질의 비는 Figure 21의 결과(6일) 이전의 수확시기에 대한 지표로서 나타났다. 주사기를 이용하여 기낭을 파괴한 세포는 침전하였고 현미경상 기낭은 파괴되어 관찰되



지 않았다.

이상의 결과는 *S. platensis*의 부상활성을 이용하여 수확공정을 쉽게 수행할 수 있음을 보이고 있다. 이는 기계적인 동력 없이 수층에 세포가 부상하는 특징을 이용한 수확은 세포의 물리적 충격을 최소화하고, 이렇게 부상한 세포는 수확을 용이하게 한다. 또한 이러한 수확법은 기낭을 형성하는 다른 cyanobacteria에도 적용될 수 있을 것이다. 결론적으로 부상활성에 기초하여 *S. platensis*를 수확하기 위해서는, 생산성, 건조중량에 대한 엽록소 a의 비, 탄소의 농도에 대한 단백질의 비율이 최적의 수확시기를 결정하기 위한 지표로서 사용되어 질수 있을 것이다.

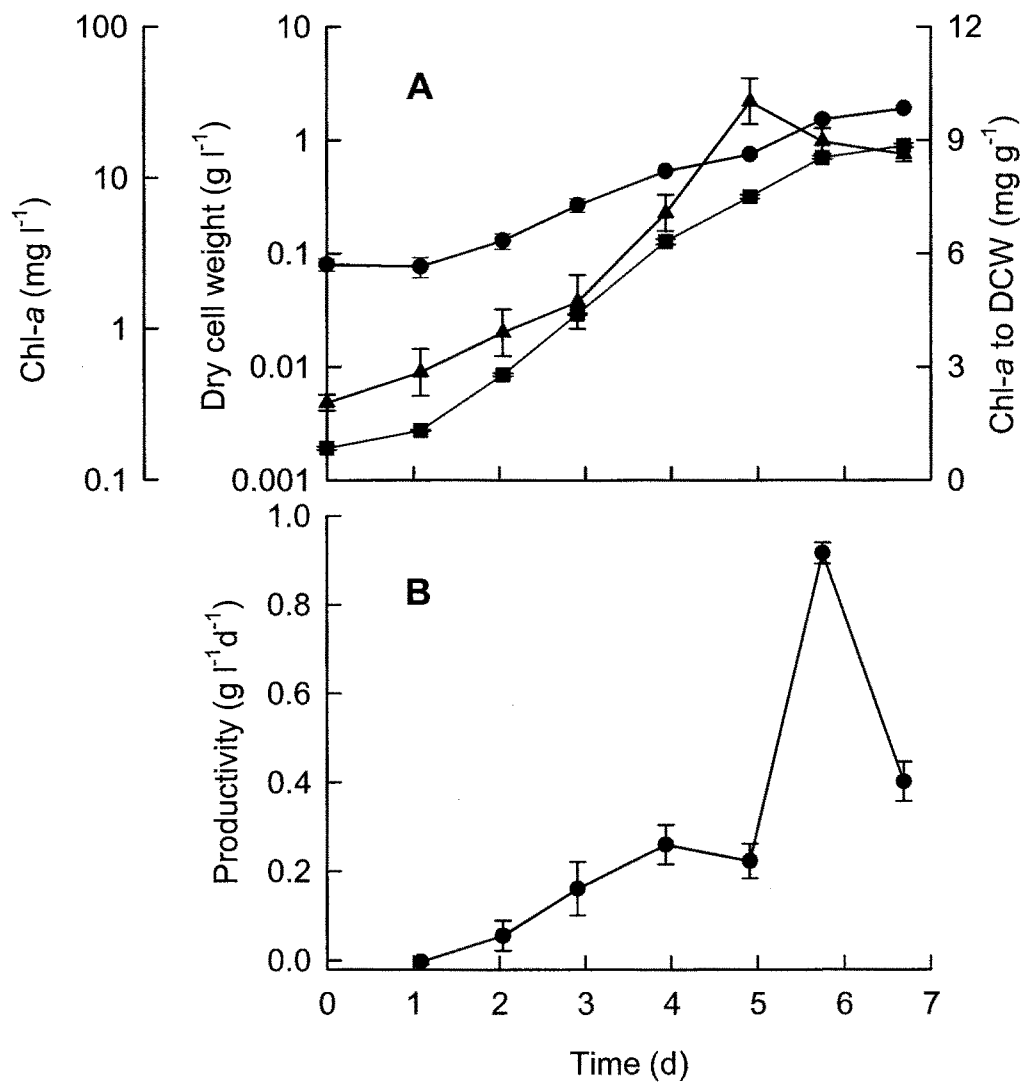


Figure 21. Dry cell weight (●), chlorophyll *a* concentration (■), and ratio of chlorophyll *a* to dry cell weight (▲) of *Spirulina platensis* cultivated in SOT medium (A). Productivity on basis of dry cell weight (B).

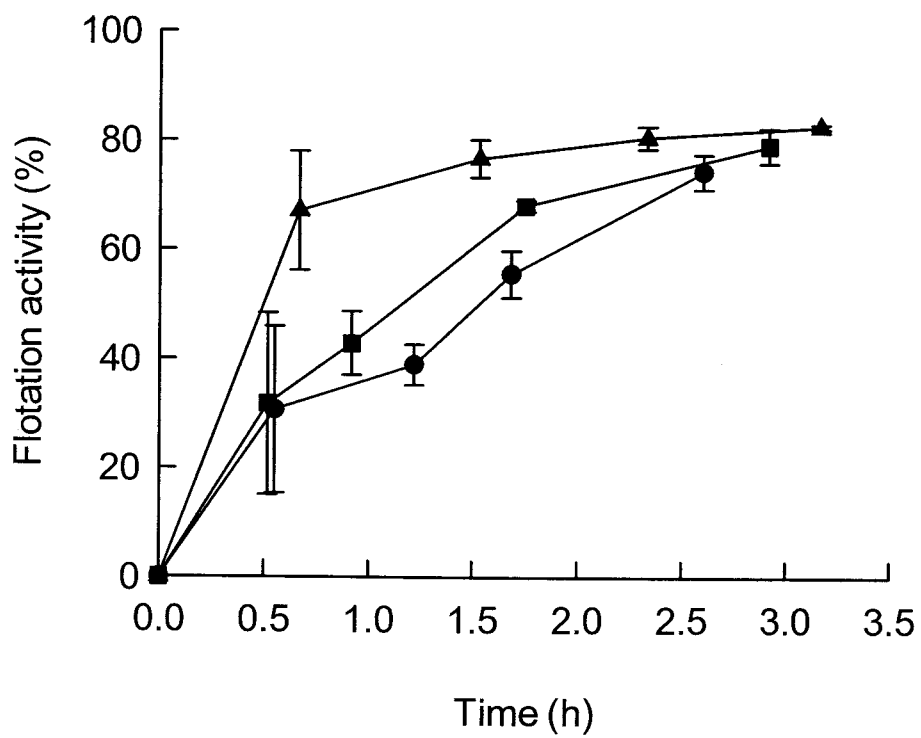


Figure 22. Flotation activity of *Spirulina platensis* harvested at different growth stages. Algal cultures collected from exponential growth phase were left under static conditions in 50-ml cylinder. Harvesting time: day 4 (●), day 5 (■), and day 6 (▲).

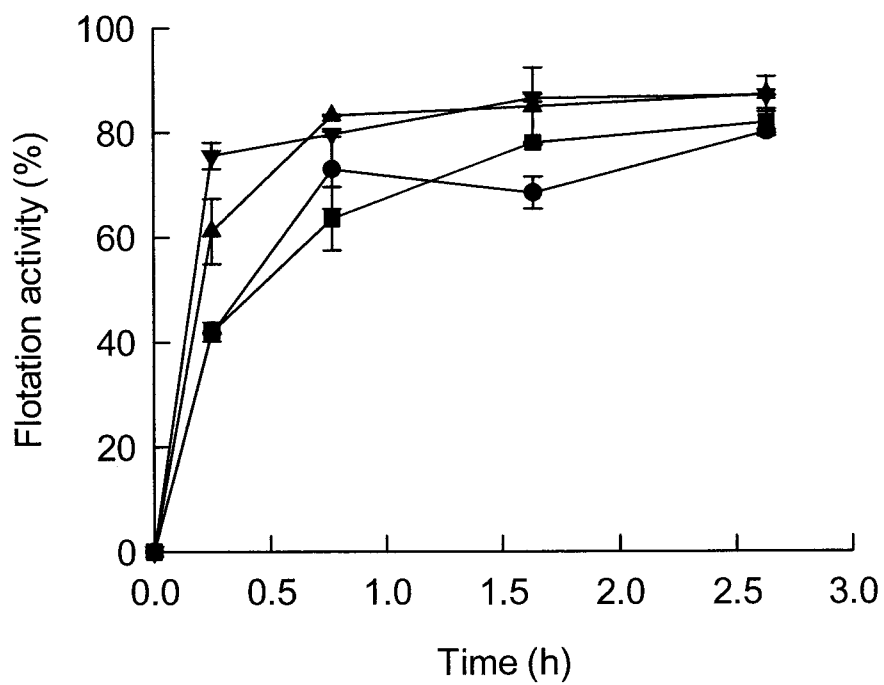


Figure 23. Enhanced flotation activity of *Spirulina platensis* with addition of NaCl. Algal cultures collected from exponential growth phase (about day 6) were mixed with NaCl and then left under static conditions in 50-ml cylinder. NaCl concentrations: 0% (●), 1% (■), 2% (▲), and 5% (▼).

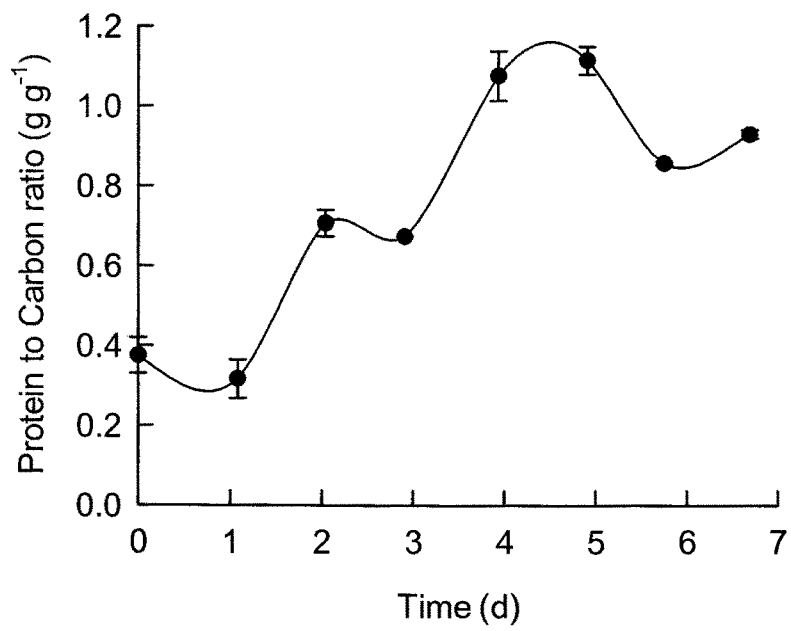


Figure 24. Cellular protein to carbon ratio in *Spirulina platensis* at different growth stages

## 제 4 절 고부가 유용물질 탐색 및 선정

### 1. 서론

조류(algae)는 약 40,000종의 많은 종류가 알려져 있는 매우 다양한 특성을 지닌 생물 군으로 자연 상태에서 다양한 유용물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Enoki et al., 2002; Radmer and Parker, 1994). 미세조류(microalgae) 유래의 유용물질은 잘 알려진 건강보조식품 외에도 천연색소, 의약품 물질, 생화학 물질, 사료, 대체에너지 등으로 매우 다양하다. 대표적 유용물질로는 vitamin, carotenoid, phycobili-proteins, polysaccharides 등이 있다.

미세조류 배양의 가장 큰 장점은 작물생산에 적합하지 않은 염분 농도가 높거나 강한 알칼리 등의 극한 환경에서도 성장 가능하다는 점이다. 지금까지 주로 동물, 식물, 세균 등을 대상으로 biotechnology가 발전하였으며, 근래에는 조류로부터 유용생물자원을 탐색, 생산, 이용하고자 하는 algal biotechnology 분야의 연구 및 산업화가 급속히 진전되고 있다.

담수산 미세조류의 일부 종은 호소 및 하천에서 수화(bloom)를 형성하여 독소를 생산하고, 이취미(taste and odor)를 발생시키는 등 수질을 악화시키기 때문에 이들 미세조류의 발생억제와 제거에 관한 연구가 많이 수행되었다(Ahn et al., 2003; Kang et al., 2003). 또한 미세조류가 생산하는 2차대사산물은 독소에 대한 연구가 주를 이루었다(Dittmann et al., 1997; Fairey and Ramsdell, 1999). 그러나 최근 *Spirulina*와 같은 남조류에서 다양한 생리활성물질이 발견되었으며, 이를 자원으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되면서 담수의 미세조류가 생산하는 고부가가치 생리활성물질에 관심이 증대되고 있다(Costa et al., 2004; Danesi et al., 2004). 미세조류는 수중에서 태양광, 이산화탄소 등을 이용하여 비교적 적은 비용으로 대량의 생물량을 얻을 수 있고(Gorenbein et al., 2001; Radmer, 1996; Radmer and Parker, 1996), 생산된 생물량은 Table 16에 정리된 바와 같이 다양한 종류의 유용물질을 함유한다(Vilchez et al., 1997).

Table 16. Commercial compounds produced from microalgae

Type	Compound
Amino acids	Proline, aspartate, alanine, histidine, serine, threonine, phenylalanine, leucine, ornithine, glutamate
Lipids	Lipids, fatty acids, sterols
Pharmaceuticals	Alkylguanidine compounds, arachidonic acid, microcystin, anatoxins, gallotannin, aponin, malyngolide
Pigments	Carotenoids, astaxanthin, chlorophyll, biliproteins
Polyols/Carbohydrates	Trehalose, glucose, sucrose, sorbitol, glycerol, glycolate, mannitol, mannose
Polysaccharides	Containing D-xylose, D-glucose, D- and L-galactose, methylxylose, D-glucuronic acid, etc.
Primary alcohols	Phytol
Vitamins	B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, E, biotin, rivoflavin, nicotinic acid, pantothenate

미세조류 중에서 남조류는 발생의 기원은 오래되었으나 그 역사에 비해 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다(Rantala et al., 2004). 남조류가 생산하는 2차대사산물은 현재까지 밝혀지지 않은 새로운 화합물이 대부분이며, 독특한 구조를 형성하며, 생리·생화학적인 특성이 규명되지 않는 화합물들이 많은 부분을 차지하고 있다(Shimizu, 2003). 미생물로부터 유용물질의 생산은 대부분 세균, 곰팡이, 방선균 등을 대상으로 수행되었으며, 이들은 종속영양생물로서 생태계에서 대부분 분해자의 역할을 수행하고 있다. 그러나 미세조류는 광합성에 의해 탄소원을 공급 받는 독립영양생물이며, 수중생태계에서 1차 생산자로서 매우 중요한 구성원이다. 따라서 미세조류는 세균, 곰팡이, 방선균 등과는 다른 종류 또는 기능을 갖는 각종 대사산물을 생산하는 것으로 추정된다. 그럼에도 불구하고 미세조류에서 고부가가치 생리활성물질인 항암, 항당뇨 및 항생물질의 탐색 및 개발에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

본 연구에서는 국내에 분포하고 있는 담수산 미세조류를 분리하고, 고부가가치의 생리활성물질인 항암, 항당뇨 및 항생물질을 생산하는 미세조류를 탐색하였다. 또한 미세조류가 생리활성물질을 생산하기 위한 최적 조건을 조사하기 위하여 다양한 배양조건에서 연구를 수행하였다.

## 2. 유용물질 탐색을 위한 미세조류 추출물 은행 구축

### 가. 조류의 분리

실험에 사용된 남조류 및 녹조류는 전국의 하천 및 호수에서 채취한 물시료로부터 분리 배양한 조류 및 한국유전자원은행(KCTC)에 보존되고 있는 조류로서 남조류 속에 속하는 96 strains, 갈조류에 속하는 1 strain, 규조류에 속하는 33 strains, 황녹색조류에 속하는 2 strains, 갈색편모조류에 속하는 5 strains, 유글레나에 속하는 2 strains 및 녹조류 속에 속하는 201 strains 등 총 340 strains를 분리하였다(Table 17).

### 나. 대상 조류의 배양

분리한 340 strains 중 실험에 사용한 154 strains는 Allen medium(Allen, 1968) 100 ml 을 250-ml flask에 넣고 멸균한 후 대상 조류를 접종하여 130-150  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 배양하였으며, 온도는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.



Table 17. Number of microalgal strains isolated from the nationwide freshwaters

Class	Genus	No. of strains			Genus	No. of strains		
		1차	2차	3차		1차	2차	3차
<b>Cyanophyceae</b>	<i>Chroococcus</i>	24	1		<i>Microcystis</i>	13		
	<i>Oscillatoria</i>	22	2		<i>Anabaena</i>	12		
	<i>Pseudanabaena</i>	1			<i>Merismopedia</i>	1		
	<i>Aphanizomenon</i>	1			<i>Aphanothece</i>	8		
	<i>Nostoc</i>	1			<i>Synechocystis</i>	1		
	<i>Phormidium</i>	2			<i>Nodulari</i>	1		
	<i>Anabaenopsi</i>							
<b>Phaeophyceae</b>	<i>Heribaudiell</i>	1						
<b>Bacillario- phyceae</b>	<i>Navicula</i>	12	6	7	<i>Stephanodiscus</i>		1	
	<i>Nitzschia</i>	1			<i>Surirella</i>	1		1
	<i>Aulacoseira</i>	1			<i>Cymbell</i>			1
	<i>Melosir</i>	2						
<b>Xanthophyceae</b>	<i>Tribonem</i>	2						
<b>Cryptophyceae</b>	<i>Cryptomona</i>	5						
<b>Euglenophyceae</b>	<i>Euglen</i>	1						
<b>Chlorophyceae</b>	<i>Protococcus</i>	2			<i>Ankistrodesmus</i>	3		
	<i>Chlamydomonas</i>	15	9	8	<i>Sphaerocystis</i>	1		
	<i>Coelastrum</i>	2			<i>Selenastrum</i>	4		
	<i>Stigeoclonium</i>	2			<i>Eudorina</i>	2		
	<i>Scenedesmus</i>	13	13	2	<i>Botryococcus</i>	3		
	<i>Chlorella</i>	76	6	10	<i>Palmella</i>	1		
	<i>Chlorococcum</i>	8			<i>Rhado</i>	1		
	<i>Asterionella</i>	1			<i>Dictyospherium</i>	1		
	<i>Botryococcus</i>	2			<i>Oocystis</i>	1		
	<i>Hyalotheca</i>			1	<i>Klebsormidium</i>			4
	<i>Gleotil</i>			1	<i>Ulothri</i>			9

Allen medium은 4가지 group으로 일반 Allen medium, N-limited Allen medium, P-limited Allen medium 그리고 NP-limited Allen medium으로 나누어 실험하였다. N 또는 P-limited medium은 일반 Allen medium에 비해 질소 또는 인 농도가 각각 1/10씩 되도록 첨가하였다.

#### 다. 생리활성물질 추출

배양된 조류를 50-ml conical tube로 옮겨 3,500 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상정액을 제거하고 pellet과 1 : 1 (v:v) 비율로 acetone을 첨가하여 초음파분쇄기(Vibra cell)로 10분간 조류 세포를 파쇄하였다. Acetone 추출액을 다시 원심분리하여 조체를 제거하고 정량된 e-tube에 옮겨 Speed-vac(Savant SC100)을 사용하여 용매를 휘발시켰다. 용매가 휘발된 e-tube를 재 정량하여 그 중량의 차이로 생리활성물질을 정량하고 최종 농도가 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 methanol에 용해시켰다. Figure 25는 미세조류로부터 생리활성물질을 추출하는 방법을 도식화 한 그림이다.

#### 라. 결과

미세조류 추출물 은행은 Table 18에 나타내었으며 남조류 88 strains에서 352개 및 녹조류 66 strains에서 264개로 총 616개의 시료로서 미세조류 은행을 구축하였다. 또한 미세조류 추출물은  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 활성을 유지하였다.

### 3. 생리활성 물질 탐색계 구축

#### 가. 항암 및 항당뇨 물질 탐색계

현재 항암 및 항당뇨 물질을 탐색하기 위한 다양한 방법이 수행되고 있으나 본 연구에서는 Vaccinia H1-related phosphatase(VHR) 및 Protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B)가 para-nitrophenyl phosphate(p-NPP)를 기질로 이용한 enzyme assay 법을 이용하여 탐색하였다(Fig. 25). 이 두 효소는 phosphatase의 일종으로서 Figure 26에 나타낸 것과 같이 생체 내에서 단백질의 ser, thr, tyr기에 포함된 phosphate ion을 떼어냄으로써 해서 단백질의 변형을 가져오는 효소이다. 따라서 이러한 효소활성을 억제시키는 생리활성 물질을 탐색하는 방법이다.

Table 18. List of microalgal extract bank of bioactive materials

Class	Genus	No. of		Genus	No. of	
		Strains	Material s		Strains	Material s
Cyanophyceae	<i>Microcystis</i>	11	44	<i>Synechocystis</i>	2	8
	<i>Anabaena</i>	17	68	<i>Nostoc</i>	1	4
	<i>Merismopedia</i>	1	4	<i>Spirulina</i>	3	12
	<i>Aphanothece</i>	9	36	<i>Nodularia</i>	2	8
	<i>Aphanocapsa</i>	1	4	<i>Phormidium</i>	6	24
	<i>Chroococcus</i>	2	8	<i>Lyngbya</i>	3	12
	<i>Oscillatoria</i>	30	120			
Chlorophyceae	<i>Ankistrodesmus</i>	3	12	<i>Hydrodictyon</i>	1	4
	<i>Chlorella</i>	11	44	<i>Spirogyra</i>	1	4
	<i>Scenedesmus</i>	2	8	<i>Closterium</i>	1	4
	<i>Sphaerocystis</i>	1	4	<i>Roya</i>	1	4
	<i>Selenastrum</i>	3	12	<i>Staurastrum</i>	1	4
	<i>Eudorina</i>	4	16	<i>Penium</i>	2	8
	<i>Botryococcus</i>	4	16	<i>Micrasterias</i>	1	4
	<i>Palmella</i>	1	4	<i>Hyalotheca</i>	1	4
	<i>Chlorococcum</i>	2	8	<i>Chlorokybus</i>	1	4
	<i>Chlamydomonas</i>	4	16	<i>Mougeotia</i>	2	8
	<i>Rhodo</i>	2	8	<i>Bambusina</i>	1	4
	<i>Dictyosphaerium</i>	1	4	<i>Zygnemopsis</i>	1	4
	<i>Oocystis</i>	2	8	<i>Phymatodocis</i>	1	4
	<i>Tetraspora</i>	3	12	<i>Botryococcus</i>	1	4
	<i>Mesothaenium</i>	3	12	<i>Protodema</i>	1	4
	<i>Gloeocystis</i>	2	8	<i>Haematococcus</i>	1	4
Total		154 (616)				

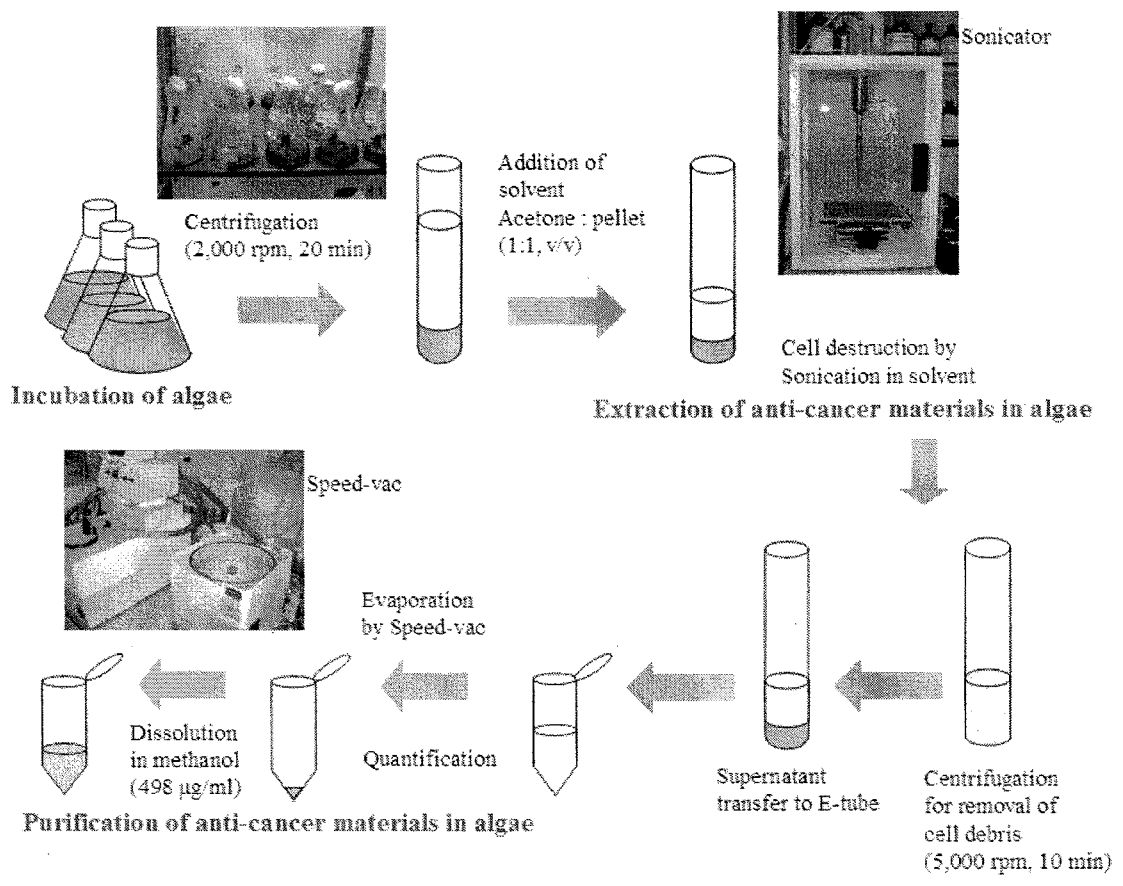


Figure 25. Scheme of purification of bioactive materials from microalgae.

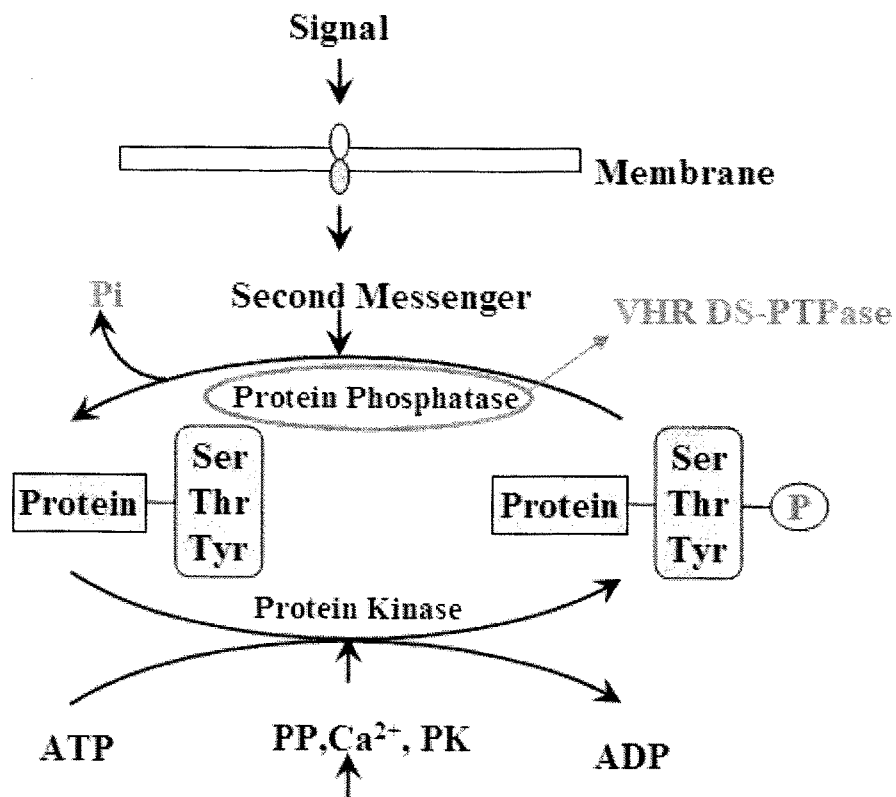


Figure 26. Phosphorylation and dephosphorylation of protein by phosphatase and kinase in cell.

항암 및 항당뇨 활성의 측정은 Tonks et al.(1988)의 방법에 따라 p-NPP를 기질로 이용하여 탈인산화 정도를 측정하여 VHR 및 PTP1B에 대한 저해활성을 조사하였다(Figure 27). 효소활성은 96-well plate에 VHR 및 PTP1B(25  $\mu$ l/5 ml) 50  $\mu$ l, 조류 추출물(500  $\mu$ g/ml) 3  $\mu$ l, 그리고 p-NPP(2 mM) 50  $\mu$ l를 연속적으로 첨가한 후 30°C에서 반응시켰다. 반응 1시간 후 10 M의 NaOH 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Spectrophotometer(UV 160-A)를 사용하여 405 nm에서 실험구의 흡광도를 측정하여 VHR 및 PTP1B를 첨가하지 않은 대조구(Figure 27a)와 흡광도의 차이를 시료의 항암 및 항당뇨 활성(Figure 27b)으로 나타내었다. Figure 28은 항암활성 측정을 도식화한 그림이다.

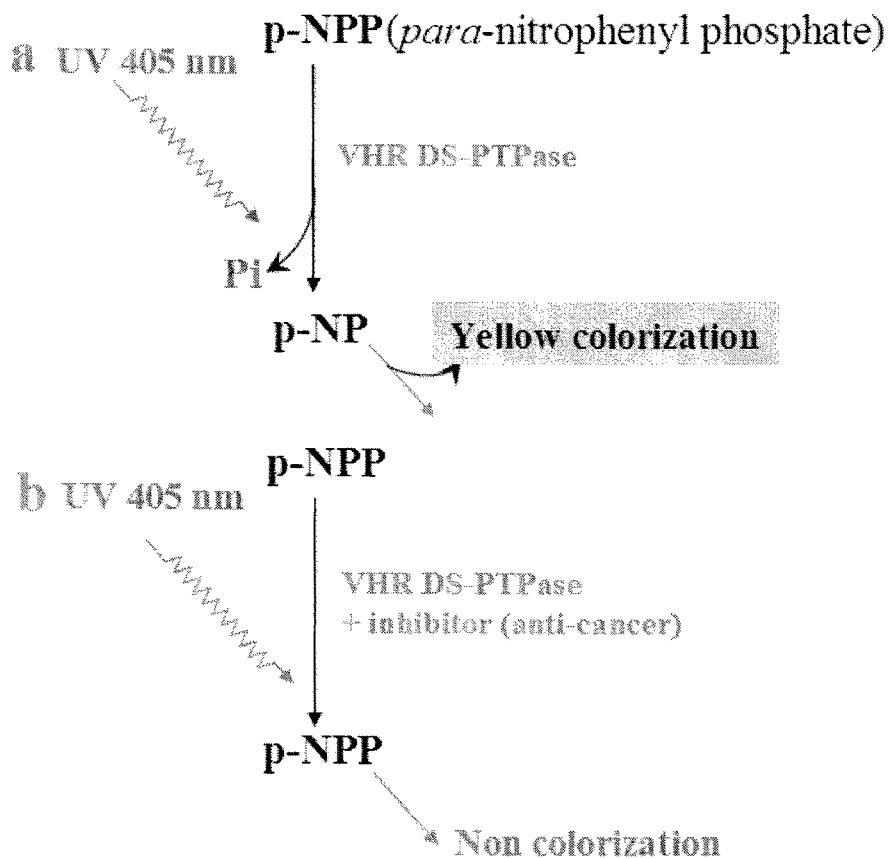
#### 나. 항생 물질 탐색

항생 활성은 13종의 병원균(*Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Citrobacter freundii* KCTC 2006, *Klebsiella pneumonia* KCTC 2208, *Bacillus megaterium* KCTC 1096, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae*)을 대상으로 paper disk법을 수행한 후 생성되는 환의 지름을 측정하여 항생 활성으로 나타내었다.

### 4. 생리활성 후보물질 선정

#### 가. 항암, 항당뇨 및 항생 활성

담수산 미세조류 154 strains의 배양액 추출물을 대상으로 각각 항암, 항당뇨, 항생 활성을 측정하여 생리활성물질을 생산하는 미세조류를 탐색한 결과 항암 18(12%), 항당뇨 9(6%), 항생 23(15%) strains에서 각각 활성을 나타내었다(Figure. 29). 배지 중 질소와 인의 조성을 달리하여 배양한 총 616 시료 중에서 항암은 34(6%), 항당뇨는 19(3%), 항생 75(12%) 시료에서 각각 활성을 나타내었다. 따라서 배지조성에 따라 각 생리활성물질의 활성이 다르게 나타나는 것을 알 수 있으며, 항암 및 항당뇨 활성이 배지 조건에 따른 영향을 많이 받는 것으로 조사되었다. 항생 활성은 조사된 strains 중 15%, 배지별로 조사된 총 시료의 12%에서 활성을 나타내어 그 차이가 적었으며, 이는 한 strain이 4가지 배지조건에서 동시에 활성을 보이는 경우가 많다는 것을 의미한다.



**Principle of enzyme (VHR) assay with p-NPP. a is without inhibitor and b is with inhibitor.**

Figure 27. Principle of enzyme (VHR) assay with p-NPP. a is without inhibitor and b is with inhibitor.

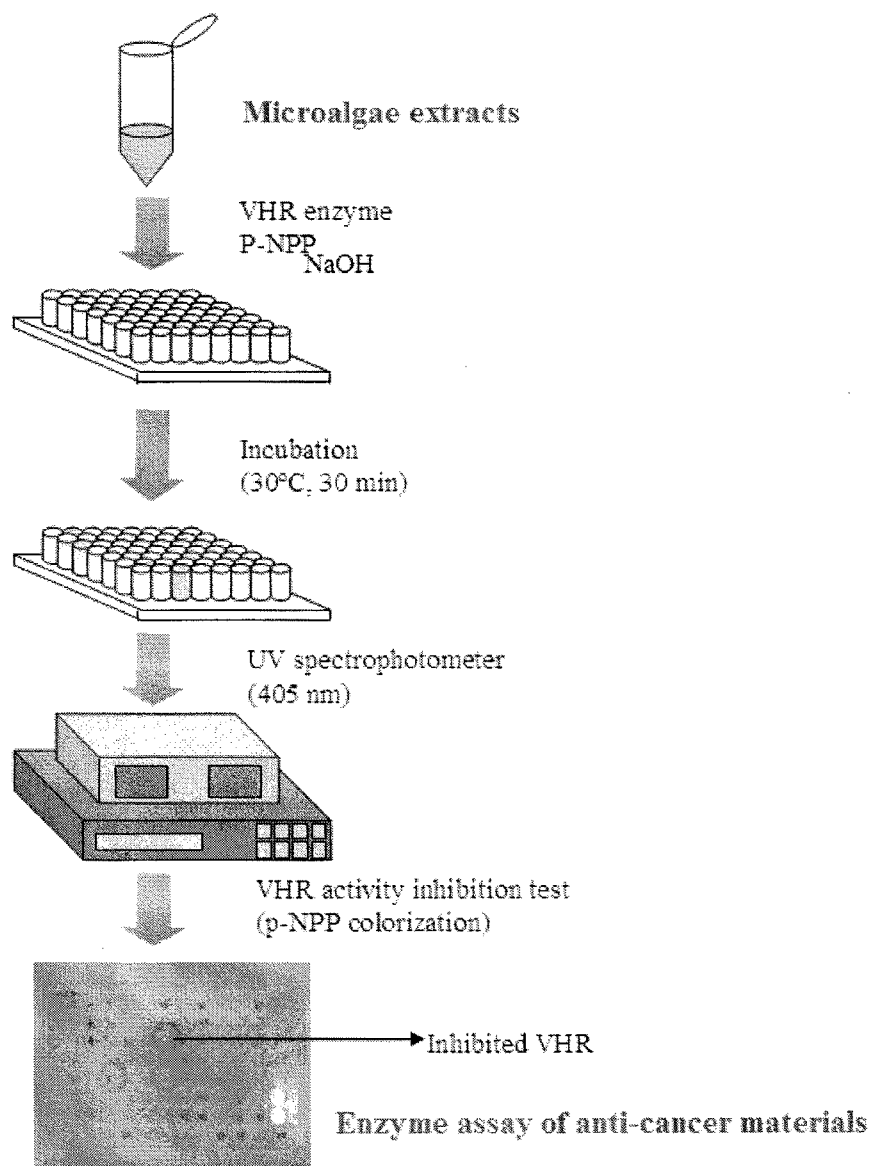


Figure 28. Scheme of VHR enzyme assay for anticancer materials.



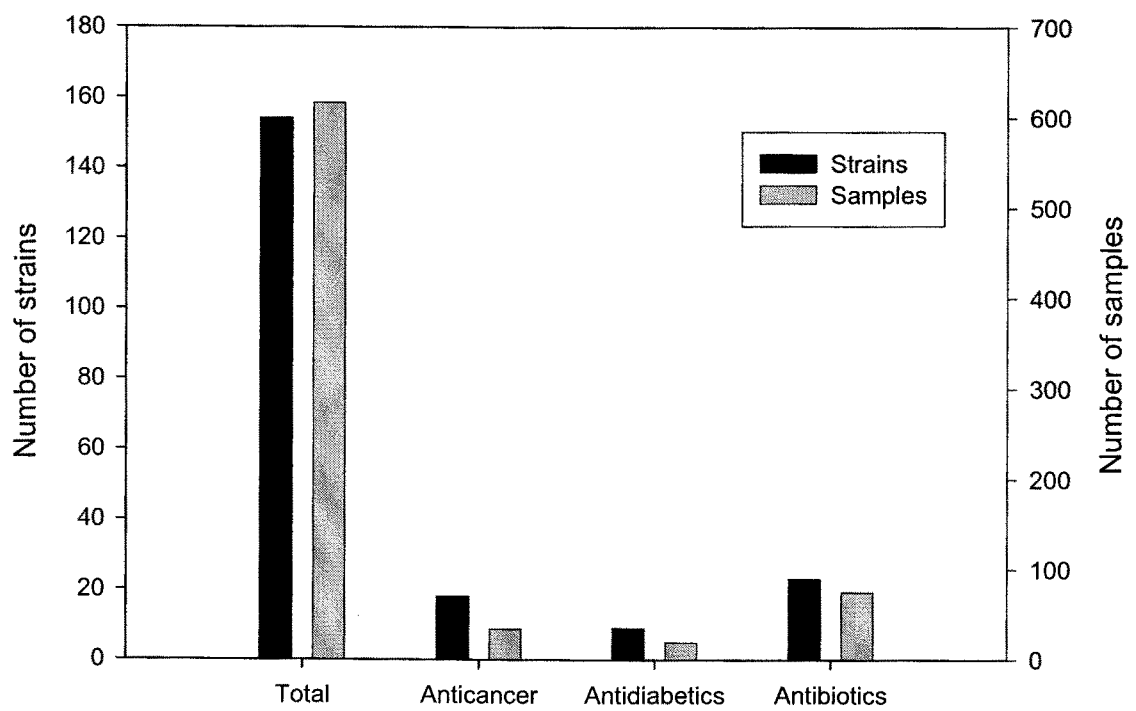


Figure 29. Number of microalgal strains and samples containing bioactive materials.

조사한 미세조류 중 항암과 항당뇨 활성의 대표적 결과는 Table 19에 요약하였다. 항암 활성은 AG10011이 79%의 VHR 저해 활성을 보여 가장 우수한 것으로 나타났으며, 항당뇨 활성은 AG10007이 97%의 PTP1B 저해 활성을 나타내어 가장 활성이 우수하였다. 특히 AG10011은 항당뇨 활성이 92%로 높아 항암과 항당뇨 모두에 우수한 활성을 갖는 것으로 조사되었다.

미세조류의 항생 활성을 조사한 결과는 Figure 29 및 Table 20에 나타내었다. Figure 30에 나타난 것과 같이 항생 활성이 있는 추출물을 흡착시킨 paper에서는 대상 병원균을 배양한 배지위에 선명한 clear zone을 형성함을 관찰할 수 있었다. AG10011, AG10039, 및 AG10059는 조사된 총 13종의 병원균 중에서 8종의 병원균에 항생 활성을 나타내어 비교적 항생 활성이 우수한 strain으로 조사되었다. 미세조류 추출물은 시험에 사용된 대부분의 병원균 성장에 억제 활성을 보였으나 *Edwardsiella tarda* 및 *Lactococcus garvieae*의 생장억제 활성을 갖는 미세조류 추출물은 없었다.

#### 나. 배지 조건별 생리활성

항암 활성을 나타내는 미세조류 18 strains가 4가지 배지에서 배양되었을 때 나타내는 항암 활성을 box-plot으로 나타내었다(Figure 31A). 인-제한과 질소인-제한 배지의 median(중간값)이 각각 36%와 45%로 정상과 질소-제한 배지 보다 높게 나타났다. 또한 box의 분포는 질소인-제한 배지에서 26%부터 62%까지로 나타나 질소, 인을 제한하여 배양한 배지에서 항암 활성이 높음을 알 수 있었다. 배지 조건에 따른 미세조류의 항당뇨 활성은 Figure 31B에 나타내었다. 항당뇨 활성은 항암 활성의 결과에 비해 box의 범위가 넓게 나타나 시료에 따른 항당뇨 활성의 차이가 크음을 알 수 있었다. 정상과 질소-제한 배지에서 median이 각각 14%와 17%로서 낮게 나타났으나, 인-제한 배지에서 37%로 비교적 높게 조사되었다. 미세조류 추출물이 항생 활성을 나타내는 대상 병원균의 수를 배지 조성 별로 조사하였다(Figure 31C). 항생 활성은 배지 조건에 따른 box plot의 median 값이 정상, 질소-제한, 인-제한 및 질소인-제한 배지에서 각각 3.11, 3.6, 3.6 및 4.0으로 나타나 실험구 간에 저해 병원균 수에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 19. Primary screening of cyanobacteria against VHR DS-PTPase and PTP1B inhibition activity

Microalgal strains	Incubation*	Inhibition (%)	
		VHR	PTP1B
AG10011	P-limited	79	92
AG10059	Normal	-**	91
AG10039	NP-limited	54	89
AG10055	Normal	-	89
AG10055	P-limited	51	76
AG10152	NP-limited	68	81
AG10007	Normal	-	97
AG10007	N-limited	62	86
AG10039	Normal	-	84

\* Normal, Allen medium; N-limited, nitrogen-limited Allen medium; P-limited, phosphorus-limited Allen medium; NP-limited, nitrogen and phosphorus-limited Allen medium.

\*\* Less than 40% inhibition

Table 20. Clear zone test of algal extracts for searching antibiotics (Clear zone: mm)

Strains	Incubation	P1*	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
AG10026	Normal**	10	-	9	-	-	9	9	-	-	9	-	9	-
AG10011	N-limited	10	-	9	9	-	9	10	9	10	-	-	9	-
AG10059	NP-limited	9	-	11	-	9	9	10	-	-	-	-	10	-
AG10041	Normal	10	9	9	-	10	11	10	-	-	9	-	-	-
AG10043	Normal	9	-	10	-	-	-	-	-	10	-	-	11	-
AG10036	Normal	-	9	10	-	-	-	10	9	11	-	-	10	-
AG10059	P-limited	9	11	12	9	-	9	10	9	-	-	-	9	-
AG10059	NP-limited	10	10	9	-	-	10	10	9	-	11	-	9	-
AG10055	Normal	10	-	-	-	9	9	10	-	-	-	-	9	-
AG10152	P-limited	11	-	-	10	-	-	-	-	-	9	-	10	-
AG10039	N-limited	10	10	9	-	10	11	10	-	11	-	-	9	-

\* Pathogen strains: P1, *Salmonella typhimurium*; P2, *Salmonella gallinarum*; P3, *Escherichia coli* KCTC 2441; P4, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; P5, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917; P6, *Shigella flexneri* KCTC 2008; P7, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361; P8, *Citrobacter freundii* KCTC 2006; P9, *Klebsiella pneumonia* KCTC 2208; P10, *Bacillus megaterium* KCTC 1096; P11, *Edwardsiella tarda*; P12, *Escherichia coli*; P13, *Lactococcus garvieae*.

\*\* Normal, Allen medium; N-limited, nitrogen-limited Allen medium; P-limited, phosphorus-limited Allen medium; NP-limited, nitrogen and phosphorus-limited Allen medium.

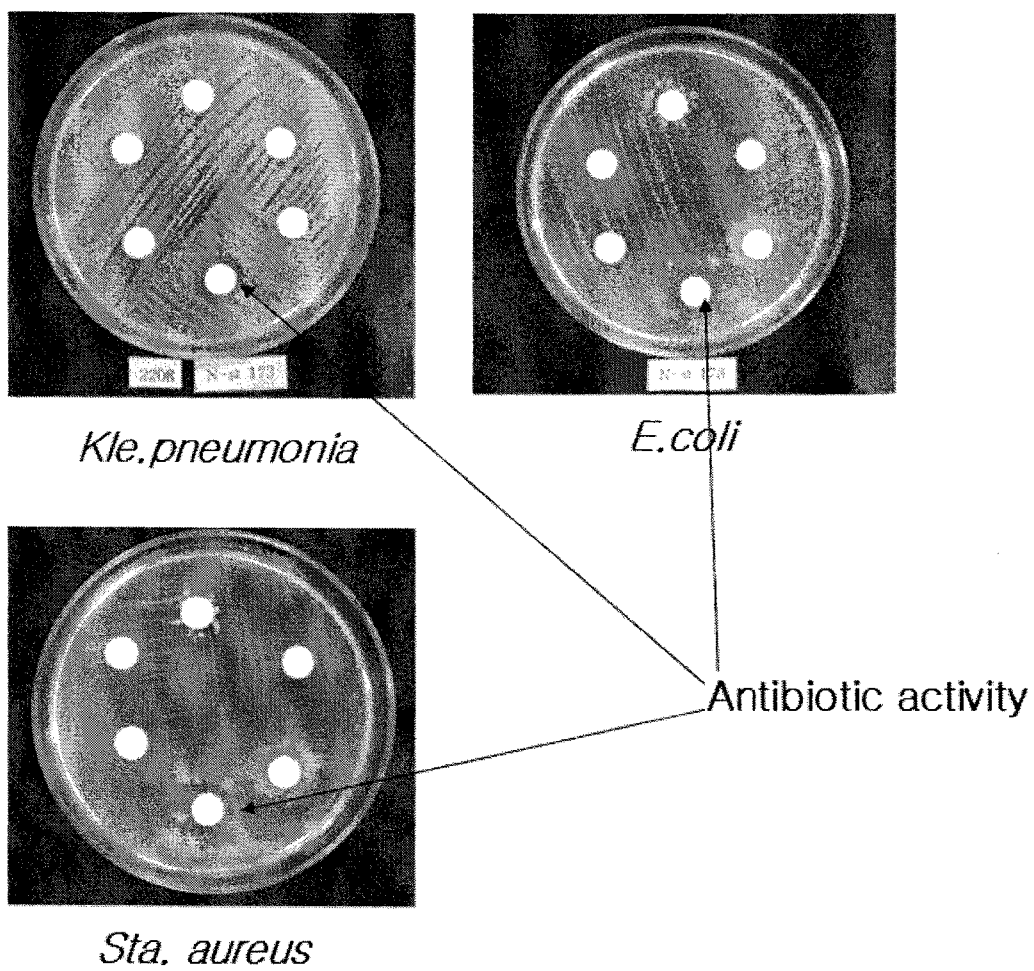


Figure 30. Antibiotic activity of microalgal extracts in paper disk methods.

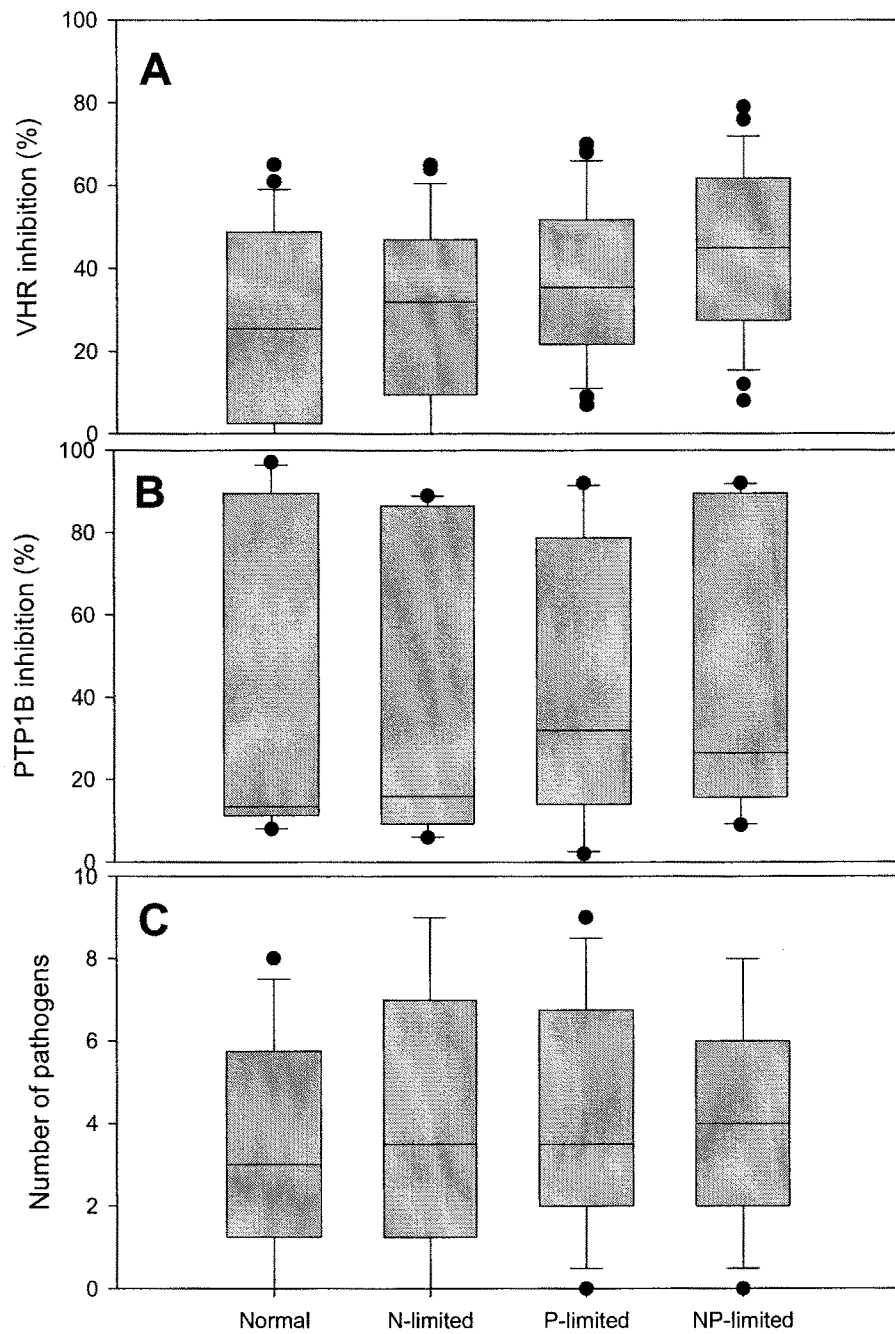


Figure 31. Comparison of anticancer, antidiabetic and antibiotic activities of microalgae cultured in different medium condition. A, anticancer activity; B, antidiabetic activity; C, antibiotic activity.

미세조류 추출물의 항암, 활성을 배지조건 따라 조사한 결과는 Table 21에 나타내었으며 활성을 가지는 18 strains 중 4가지 배지조건에서 모두 활성을 나타내는 strains은 발견되지 않았으며 AG10008 등의 5개 strains에서 3가지 조건에서 활성을 나타내었다. 항당뇨 활성 또한 4가지 배지조건에서 모두 활성을 나타내는 strains는 없었으며 2개 strains에서 3가지 조건에서 활성을 나타내었다(Table 22). 항생 활성의 결과는 항암 및 항당뇨 활성과는 달리 23 strains 중 9 strains에서 4가지 배지조건 모두에서 활성을 나타내었다(Table 23).

본 연구의 결과를 배양 조건 및 남조류와 녹조류로 세분화 하여 살펴보면 총 88 strains의 남조류 중 정상 배지에서 항암, 항당뇨 및 항생 물질을 생산하는 남조류 strains가 각각 5%, 3%, 15%였으며 질소 및 인 제한 배지에서의 결과는 각각 18%, 7%, 18%로 나타나 제한 조건에서 생리활성물질을 생산하는 strains가 많은 것으로 조사되었다(Table 24). 실험한 총 66 strains의 녹조류 중 정상 배지에서 항암, 항당뇨 및 항생 물질을 생산하는 녹조류 strains가 각각 2%, 2%, 5%였으며 질소 및 인 제한 배지에서의 결과는 각각 3%, 3%, 5%로 나타나 녹조류에서는 일반 배지와 제한 배지의 차이가 크지 않았다. 그러나 생리활성물질을 생산하는 strains의 비율은 녹조류에 비해 남조류가 높게 조사되었다.

Oh 등(2000)은 남조류의 chemostat 배양 연구를 통하여 *Microcystis*가 생산하는 대표적인 독소이며 생리활성물질로 알려진 microcystin은 인-제한 조건에서 단위 생체량당 함량이 증가하는 것을 보고하였다. 뿐만 아니라 질소와 인을 제한하여 배양한 후 조류의 생화학적 조성을 살펴본 Kilham et al.(1997)의 연구 결과에 의하면 *Ankistrodesmus falcatus*는 질소와 인을 제한하여 배양한 결과 성장률은 최대 15%의 차이를 보였으며 단백질 구성에 차이를 나타내는 것으로 보고되었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 본 실험에서 항암, 항당뇨 및 항생 활성이 배양 조건에 따라 다른 것은 질소와 인을 제한하여 배양함으로써 미세조류의 단백질 구성이 변하여 2차대사산물의 생산에 영향을 준 것으로 사료된다.

미세조류는 식물과 마찬가지로 다양한 종류의 유용물질을 생산하며 총체적으로 2차대사산물로 분류할 수 있으며, 생리활성물질로 불리기도 한다. 이들 대사산물은 일반적으로 1차 생장기(primary growth phase)의 마지막으로부터 정지기(stationary phase)로 들어가는 단계에 합성된다. 조류독소(phyco toxins) 또는 관련 생산물은 유용한 의약품원료물질로 사용될 수 있다. 주요 조류독소는 cyclic peptides, alkaloids, polyethers, glycolipids 등이 있다.

Table 21. Anticancer activity with various medium conditions

Strains	Normal	N-limited	P-limited	NP-limited	total
AG10002	-	-	-	+	1
AG10005	+	-	-	+	2
AG10007	-	+	+	-	2
AG10008	-	+	+	+	3
AG10011	+	-	+	+	3
AG10017	-	+	-	-	1
AG10026	+	-	-	-	1
AG10036	+	-	-	-	1
AG10043	-	-	+	+	2
AG10047	-	-	-	+	1
AG10055	-	-	+	-	1
AG10059	+	-	-	-	1
AG10065	-	-	+	+	2
AG10066	-	+	+	+	3
AG10083	+	+	+	-	3
AG10152	-	+	+	+	3
AG10157	-	+	+	-	2
AG10182	+	+	-	-	2



Table 22. Antidiabetic activity with various medium conditions

Strains	Normal	N-limited	P-limited	NP-limited	total
AG10007	+	+	-	-	2
AG10008	-	+	+	+	3
AG10017	-	+	+	-	2
AG10039	+	+	-	-	2
AG10043	-	-	+	+	2
AG10055	+	-	-	-	1
AG10065	+	-	+	-	2
AG10082	+	-	+	+	3
AG10152	-	-	+	+	2

Table 23. Antibiotics activity with various medium conditions

Strains	Normal	N-limited	P-limited	NP-limited	total
AG10002	+	+	-	-	2
AG10005	+	-	+	-	2
AG10007	-	+	+	+	3
AG10008	+	+	-	+	3
AG10011	+	+	+	+	4
AG10017	+	-	+	+	3
AG10026	+	-	+	+	3
AG10036	+	+	+	+	4
AG10039	+	+	+	-	3
AG10041	+	-	+	+	3
AG10043	+	+	+	-	3
AG10047	+	+	-	+	3
AG10055	+	+	+	-	3
AG10059	+	-	+	+	3
AG10065	+	+	-	-	2
AG10066	+	+	+	+	4
AG10082	+	+	+	+	4
AG10083	+	+	+	+	4
AG10095	+	+	+	+	4
AG10133	-	+	+	+	3
AG10152	+	+	+	+	4
AG10157	+	+	+	+	4
AG10182	+	+	+	+	4

Table 24. Percentage of microalgal strains containing bioactive materials

Class	Anticancer (%)		Antidiabetic (%)		Antibiotic (%)	
	Normal*	Limited**	Normal	Limited	Normal	Limited
	Cyanophyceae	5	18	3	7	15
Chlorophyceae	2	3	2	3	5	5

\* Normal, activity in normal medium

\*\* Limited, activity in N and/or P-limited medium.

남조류인 *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*가 생산하는 신경독(anatoxin)과 *Microcystis aeruginosa*가 생산하는 간장독(microcystin)은 가축에 독으로 작용하고 있다고 알려져 있다(Carmichael, 1992). 따라서 자연계에서 이들의 생산에 대한 기작, 환경조건 등에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Oh et al., 2000).

원핵 또는 진핵 미세조류로부터 수많은 화합물이 분리되고 있으며, 여러 가지 유형의 생리활성이 시험되고 있으나 현재까지는 극히 일부만이 약효가 알려져 있을 뿐이다. 따라서 미세조류로부터 유용물질 생산의 장래는 바이러스성 감염, 암, 항세균, 항균 등의 활성을 갖는 새로운 약물 개발에 최우선 순위가 있다고 할 수 있다. 생리활성물질의 효과 및 그 대표적 예는 Table 25에 나타내었다(Skulberg, 2000).

항종양, 항세균, 항진균, 항바이러스, 신경활성과 같은 다양한 생리활성물질들이 미세조류에 의하여 생산 가능한 것으로 보고되었다(Codd, 1995; Moore, 1996; Sivonen, 1996). 남조류인 *Tolypothrix byssoidea*로부터 추출한 질소화합물인 tubercidin은 P-388 림프성 백혈병에 *in vitro* 활성이 있는 것으로 보고되었고, 녹조류인 *Chlamydomonas*로부터 추출한 L-aspariginase는 쥐의 림프육종의 성장을 억제하는 것으로 알려지고 있다. 미국 국립암연구소(National Cancer Institute, NCI)는 조류로부터 생리활성물질의 탐색에 중요한 역할을 수행하고 있으며, sulfolipids가 HIV virus에 대하여 *in vitro* 활성이 있음을 보고한 바 있다. 또한 최근에는 남조류 *Nostoc ellipsosporum*에서 추출한 저분자의 단백질인 cyanovirin이 숙주세포에 영향을 주지 않고 HIV를 불활성화할 수 있음이 보고되었다.

남조류인 *Spirulina*는 피부 대사를 촉진하며 각질화를 막아주고 상처치유에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Becker, 1994). 이들 효과는 조류가 포함하고 있는 엽록소, carotenoid 색소, vitamin B 등에 의한 것으로 추정되고 있다. 또한 *Spirulina*는 사람이나 동물에 의하여 합성되지 못하는 linolenic acid를 함유하고 있으며, 이 linolenic acid는 prostaglandin의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있어 주목되고 있는 속(genus) 중 하나이다. 남조류인 *Synechococcus*의 추출물은 세포 성장을 촉진하는 것으로 보고되었으며, 이는 phycocyanin, allophycocyanin과 같은 phycobiliproteins에 의한 것으로 알려져 있다(Becker, 1994). 해조류인 *Cystoseira barbata*, *Fucus gardnerii*, *Phyllophora nervosa* 등은 혈장의 cholesterol 농도를 낮추어 고혈압이나 심장병을 예방할 수 있으며, 이는 이들 조류에 포함된 betaine에 의한 것으로 알려져 있다. 또한 담수조류 *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina* 등의 섬유질이 cholesterol 농도를 낮추는데 효과가 있음이 보고되었다.

Table 25. Categories of bioactivity and the range of agents detected

Biological effect	Substance
Inhibitor	papain-, trypsin-, plasmin-, aminopeptidase-, chymotrypsin-, elastase-, protease inhibitor
Antiviral	$\beta$ -carboline, sulfolipids, cyanovirin, indolcarbozole, calcium spirulan
Cytotoxic	lyngbyastatin, fischerellin
Fungicide	fischerellin A, phenolic, phytoalexin
Algicide	glycerolipids
Bactericide	kawaguchipeptin B
Cytostatic	symplostatin

Phycobiliproteins는 남조류, 홍조류 등에 포함된 광합성 보조색소로서 스펙트럼의 특성에 따라 phycoerythrin(PE), phycocyanin(PC) 그리고 allophycocyanin(AP)의 세 가지로 구분된다. 이들 색소는 광에너지에 의하여 여기되면서 흡수된 에너지의 90% 이상을 형광으로 방출할 수 있다. 또한 항체, streptavidin, biotin 등과 안정된 접합체를 형성하는 특징이 있다. 따라서 phycobiliproteins는 세포의 유형과 단백질을 구분하기 위한 고도의 특이성이 있는 탐침자로서 형광표지의 기능이 있다. 실제로 phycobiliproteins는 flow cytometry나 fluorescence-activated cell sorting에 응용되고 있다.

미세조류는 상대적으로 저렴한  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $^{15}\text{NO}_3$ ,  $^2\text{H}_2\text{O}$  등과 같은 무기물로부터  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ 를 함유한 고부가의 유기물을 광합성 작용으로 합성한다. 미세조류는 대사적으로 매우 유연하므로 배양조건을 변화시킴으로서 다양한 종류의 화합물을 대량으로 생산할 수 있다. 흔히 이용되고 있는 조류가 생산하는 방사능으로 표지된 화합물은 glucose와 glycerol이다. 즉, 조류가  $^{13}\text{CO}_2$ 의 존재 하에서 성장하면서 표지된 전분을 생산하고 이들은 가수분해되어 결정형의  $^{13}\text{C}$ -glucose를 생산하는 것이다. 이와 같이 조류가 유도한 안정된 방사능으로 표지된 화합물은 대사경로를 밝히기 위한 대사추적물질로도 사용된다. 이와 같이 미세조류는 생리활성물질을 위한 연구의 대상으로 여러 가지 장점을 갖고 있고, 건강보조식품으로서의 가치뿐만 아니라 의약품 물질로서도 폭넓게 응용되고 있다.

Skulberg(2000)는 남조류로부터 생산되며 생리 활성을 갖는 2차대사산물들을 종합하였는데, 주로 plasmin, thrombin, elastase, papain, trypsin 저해 및 성장 저해 활성물질, 항바이러스, 항균 활성물질 그리고 몇 가지 독소 등이 현재까지 알려진 남조류에서 생성되는 2차대사산물이라고 보고하였다. 현재까지 알려진 남조류 유래 항암물질은 *Microcystis*가 생산하는 독소인 microcystin으로서 protein phosphatase 저해 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Mackintosh et al., 1990). 그러나 microcystin 외 미세조류 유래 항암 및 항당뇨 물질로서 밝혀진 물질은 많지 않다.

따라서 본 연구는 국내에서 채취한 담수산 미세조류로부터 항암, 항당뇨 및 항생물질을 탐색한 결과로서 담수산 미세조류 유래의 고부가가치 생리활성물질 탐색 및 연구의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 결론적으로 녹조류 보다 남조류가 생리활성물질 생산 가능성이 높으며, 인 또는 질소인-제한 배지와 같은 stress 조건이 좀더 유리한 것으로 판단된다. 앞으로 *Anabaena affinis* 등의 남조류를 대량 배양하여 생리활성물질의 구조를 동정한 후 생리·생화학적 특성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## 5. 생리활성물질의 구조 결정

### 가. 미세조류의 대량 배양 및 추출

9-L jar에 Allen medium(Allen, 1968) 8 ℓ를 넣고 멸균한 후 대상 조류를 접종하여 130-150  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 배양하였으며, 온도는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 공기는 air-pump를 이용하여 공급하고 약 20일간 배양하였다.

배양액은 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상정액을 제거하고 pellet을 동결건조하였다. 동결 건조한 시료는 g당 80% methanol 500 ml로 2회 추출한 후 methanol:methylene chloride (1:1) 500 ml로 2회 추출하였다. 추출한 용액은 rotary evaporator를 이용하여 용매를 휘발시킨 후 남은 추출물을 정량하였다.

### 나. 구조동정 미세조류 추출물의 선정

생리활성물질을 생산하는 미세조류 중 활성이 우수한 AG10011, AG10066 등 35 strains를 8 ℓ 배양한 후 추출물을 양성자 자기공명(nuclear magnetic resonance) spectrum을 이용하여 분석하였다. NMR spectrum은 Varian 400 MHz기종을 이용하여  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (1대1) 혼합액을 용매로 사용하여 측정하였다. 화학적 이동상수는 용매내의 잔류 양성자 피크를 기준점( $\text{CDCl}_3$ 의 경우 7.27 ppm)으로 하여 결정하였다. Figure 32 및 Figure 33에 나타낸 것과 같이 NMR spectrum을 분석한 결과 대부분의 추출물에서 1 ppm 전후에서 지방산(fatty acid)고유의 peak가 높게 나타나 추출물이 지방산을 다량 함유하고 있는 것으로 조사되었으며 AG10011 등 6개 strains에서 4-5 ppm에 걸쳐 전후에서 활성 유기화합물이 관찰되었다.

일반적으로 지방산은 생리활성물질의 분리에 장애 화합물로 작용하기 때문에 생리활성물질의 구조동정을 위해서는 지방산을 제거한 후 활성물질의 분리 동정과정을 거쳐야 하는 것으로 판단되었다. 또한 활성물질의 양이 많이 포함되어있지 않으므로 구조동정을 위해서 필요한 추출물 확보가 우선되어야 하는 것으로 나타났다. 따라서 NMR spectrum의 결과를 바탕으로 생리활성 화합물의 양이 상대적으로 많이 함유되어 있는 AG10011 등 6개 strains를 생리활성물질을 생산하는 최종 미생물로 선정하였다.

### 다. 생리활성물질의 구조 결정

생리활성물질의 구조를 결정하기 위한 방법은 Figure 34에 나타내었다. 먼저 대상 조

류를 대량 배양한 후 미세조류 세포를 분리하여 동결건조 한다. 동결건조된 미세조류를 용매 추출하여 얻어진 미세조류 추출물을 TLC 및 column chromatography 등 다양한 chromatography를 통하여 추출물을 다수의 fraction으로 나누고 각각의 fraction의 활성을 측정한다. 활성이 우수한 fraction은 다시 chromatography를 통해 순수한 물질로 정제하고 항생, 항당뇨, 항암 등의 생리활성을 측정한 후 NMR 및 Mass 등의 다양한 spectro-metry를 통하여 구조를 결정한다.

이와 같은 system으로 생리활성 물질의 구조를 동정하기위하여서는 최소 3g 이상의 추출물이 확보되어야 한다. 따라서 NMR spectrum으로 선정된 AG10011 등 6 strains를 200-L대량 배양기에서 배양하였으며 AG10011 및 AG10152의 추출물을 각각 4 g 이상 확보하고 생리활성물질의 구조 동정을 계속적으로 수행하고 있다.



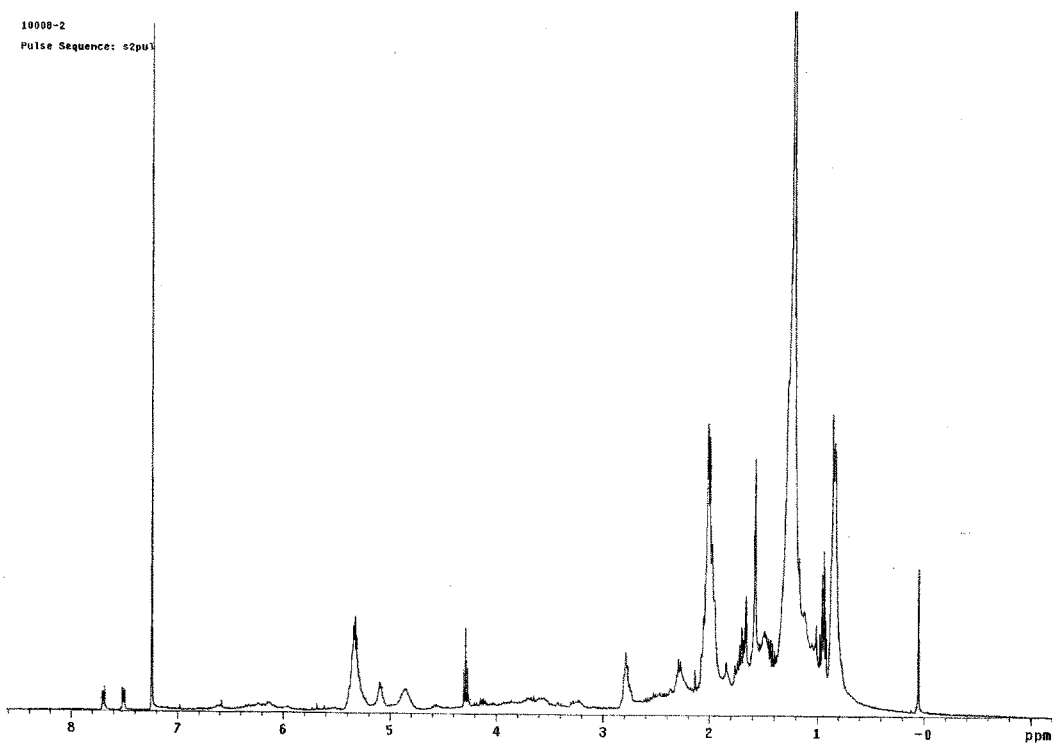


Figure 32. NMR spectrum of extracts from microalgae (AG10011).

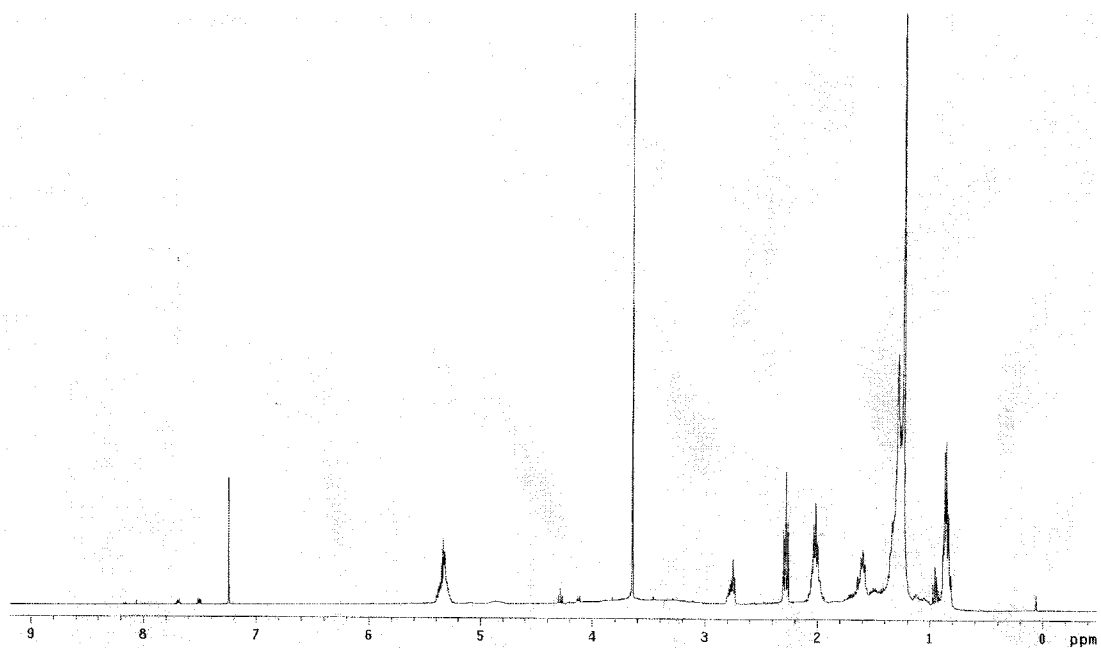


Figure 33. NMR spectrum of extracts from microalgae (AG10152).

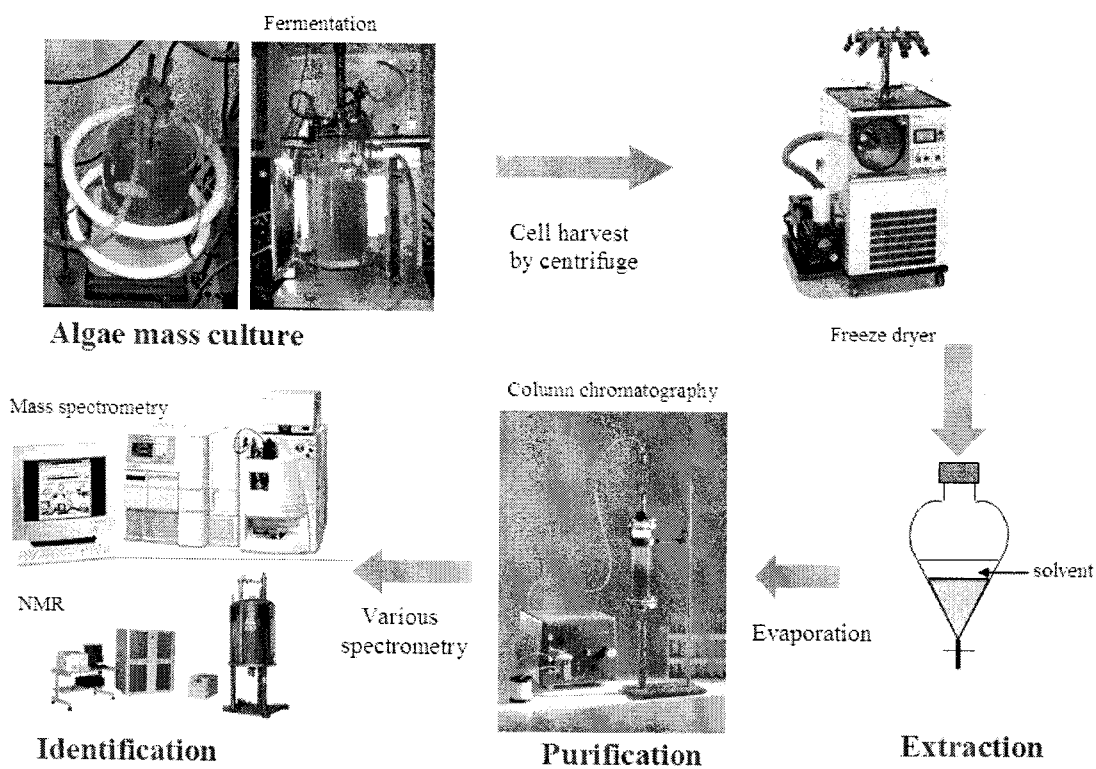


Figure 34. Scheme of identification of bioactive materials.

## 6. 유용물질의 *in vivo*, *in vitro* 생물활성 검정

Unialgal 상태의 cyanobacteria를 포함한 미세조류 77 strains를 일반 Allen, 인-제한 Allen, 질소-제한 Allen 그리고 인·질소-제한 Allen 배지 조건에서 10일간 배양한 후 항암물질 탐색계에서 사용된 것과 동일한 방법으로 조류를 배양하여 배양체를 수확하였다. 10일간 배양된 cyanobacteria 배양체를 3,500 rpm에서 원심 분리한 후 상정액을 제거한 후 침전물에 acetone을 1 : 1의 비율로 첨가하여 초음파분쇄기로 10분간 세포를 파쇄하여 균체 속의 생리활성물질을 추출하였다. 파쇄된 균체를 원심분리하여 제거하고 생리활성물질을 포함한 추출액을 methanol로 재용해하여 총 280점의 생리활성 후보물질을 확보하였다. 이를 농축하여 병원성 세균에 대한 항균력 시험에 사용하였다. 항생물질 탐색을 위하여 *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* KCTC 2441 등 주변에서 흔히 발견되는 13종의 병원성 미생물을 선정하였다(Table 26).

Table 26. Pathogenic microorganisms used to test antibiotic activity of microalgal extracts

번호	병원성 미생물	배양온도(°C)
1	<i>Salmonella typhimurium</i>	37
2	<i>Salmonella gallinarum</i>	37
3	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2441	37
4	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	37
5	<i>Syaphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	37
6	<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	37
7	<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 2361	37
8	<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	37
9	<i>Klebsiella pneumonia</i> KCTC 2208	37
10	<i>Bacillus megaterium</i> KCTC 1096	37
11	<i>Edwardsiella tarda</i>	30
12	<i>Escherichia coli</i>	30
13	<i>Lactococcus garvieae</i>	30

Cyanobacteria를 포함한 미세조류의 biomass 및 상징액 추출물이 13종의 병원성 세균에 대한 항균력 유무를 조사하기 위하여 고체배지 상에서 clear zone의 생성유무를 확인하는 방법에 따라 2회에 걸쳐 실험을 실시하였다. 그 결과, Table 27과 같이 총 21점의 추출물에서 항균력이 나타나, 현재 미세조류로부터 항생능이 있는 물질 21/132(활성물질 수/탐색시료 수)를 확보하였다. 특히, *Scenedesmus* sp. 등은 *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Shigella flexneri* KCTC 2008 병원성 세균에 대하여 강한 항균력을 나타내었으며(Figure 35, 36), 이 외에도 *Sphaerocystis Schroeterii*, *Microcystis aeruginosa* 등을 항균능이 우수한 균주로 선별하였다.

Table 27. Antibiotic activity of microalgal strains to pathogenic organisms (unit: clear zone, mm)

Strains	P1*	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
<i>Sphaerocystis schroeterii</i>	-	10	-	9	-	-	-	-	9	-	-	9	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	10	10	9	-	-	10	10	9	-	11	-	9	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	9	11	12	9	-	9	10	9	-	-	-	9	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	10	-	-	-	9	9	10	-	-	-	-	9	-
<i>Synechocystis</i> sp.	10	9	-	9	-	-	-	-	10	-	-	10	-
<i>Synechocystis</i> sp.	10	10	9	-	10	11	10	-	11	-	-	9	-
<i>Chlorella regularis</i> var. <i>minima</i>	-	9	10	-	-	-	10	9	11	-	-	10	-
<i>Chlorella kessleri</i> Fatt et Novakova 1969	9	-	10	-	-	-	-	-	10	-	-	11	-
<i>Anabaena</i> sp.	10	-	9	-	-	9	9	-	-	9	-	9	-
<i>Anabaena</i> sp.	10	-	9	9	-	9	10	9	10	-	-	9	-
<i>Anabaena</i> sp.	9	-	11	-	9	9	10	-	-	-	-	10	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	11	-	-	10	-	-	-	-	-	9	-	10	-
<i>Aphanothese</i> sp.	10	9	9	-	10	11	10	-	-	9	-	-	-
<i>Aphanothese</i> sp.	-	-	10	10	-	-	10	9	10	-	-	9	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	12	-	-	-	-	-	-	11	9	-	11	-
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijenck 1896	-	13	-	-	-	9	-	-	-	-	9	-	-
<i>Chlorella Fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	-	12	9	9	-	10	10	-	-	-	-	9	-
<i>Microcystis</i> sp.	-	-	11	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	-	-	10	8	-	13	13	-	12	-	-	-	-
<i>Botryococcus braunii</i>	-	-	10	-	-	12	10	-	-	9	-	-	-
<i>Hydrodictyon reticulatym</i>	-	11	10	9	-	9	16	10	-	10	-	-	-

\*, pathogen strains: P1, *Salmonella typhimurium*; P2, *Salmonella gallinarum*; P3, *Escherichia coli* KCTC 2441; P4, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621; P5, *Syaphylococcus epidermidis* KCTC 1917; P6, *Shigella flexneri* KCTC 2008; P7, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361; P8, *Citrobacter freundii* KCTC 2006; P9, *Klebsiella pneumonia* KCTC 2208; P10, *Bacillus megaterium* KCTC 1096; P11, *Edwardsiella tarda*; P12, *Escherichia coli*; P13, *Lactococcus garvieae* .

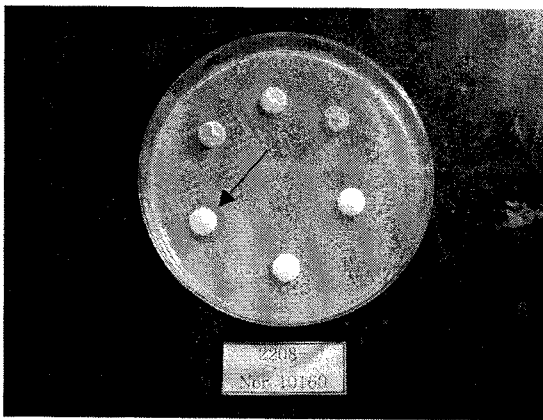


Figure 35. Clear zone indicating antibiotic activity of microalgal extracts to *Scenedesmus* sp. in paper disk methods.

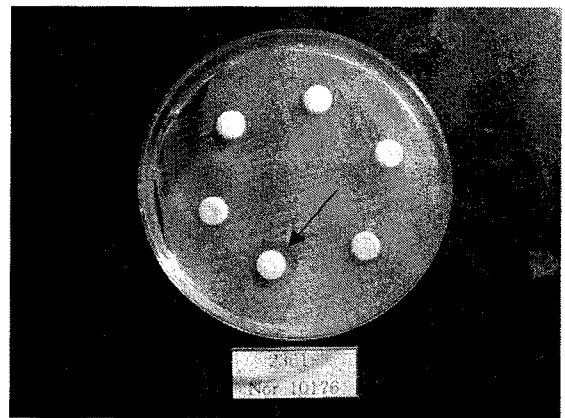


Figure 36. Clear zone indicating antibiotic activity of microalgal extracts to *Hydrodictyon reticulatum* in paper disk methods.

## 제 5 절 유용물질 생산의 실증화

### 1. Cyanobacteria biomass의 사료 적합성 시험

조류의 biomass를 이용한 사료첨가제 개발을 위하여 cyanobacteria 중 단백질 함량이 60-70%인 것으로 알려진 *Spirulina platensis*를 200-L 광생물반응기로 대량배양하였다. 조체를 회수한 후 사료첨가제 후보물질 가능성 여부를 위하여 영양분석 분석을 실시한 결과, 조섬유 0.16%, 조단백 0.27%, 조회분 1.25%, 조지방 0.16%을 함유한 것으로 나타났다. 더불어, 물벼룩(*Daphnia magna*) 및 어류를 이용한 독성시험 장치 및 방법을 구축하여 독성 평가를 실시한 결과, 독성이 없는 것으로 조사되어 사료첨가제로서의 가치 평가를 완료하였다.

### 2. 돈사료 첨가제

회수된 조체를 사료첨가제에 5% 첨가하여 사료첨가제의 제조를 완료하였다. 제조된 사료첨가제는 사료에 0.1% 추가하여 충남 서산시 다운농장에서 돈사료 첨가제로 운용하였으며, 동물 실험을 통한 독성검사는 다음과 같은 방법으로 실시하였다(Table 28, Table 29).

Table 28. Toxicity test of the feed additives by a bioassay

번호	항목	내용
1	농장명	다운농장
2	규모	모돈 600두
3	주소	충남 서산시 부석면 강당리
4	개시두수	약 300두
5	개시일령	약 30일령
6	시험기간	2004. 3. 9 - 2004. 8. 8
7	시험항목	시험 sheet 참조
8	총사료 소요량	120톤, 3월 소요량 13톤
9	총 시료 소요량	120 kg



Table 29. Report sheet of the bioassay on the feed additives

시험 항목
개시일령
출하일령
개시체중
출하체중
총 체중증가량
체중증가량/일
총 사료섭취량
질병발생두수
폐사두수
평가결과

실험의 결과는 Table 30에 나타내었다. 사료요구율은 2.75로 개선되어 사료효율의 개선이 이루었고 출하시기 7일 단축을 통하여 사양비 감소 및 이를 통한 경제적 이윤의 극대화를 가능하게 하였다.

Table 30. Toxicity test and addition effects of the feed additive by a bioassay

시험기간	2004년 3월 9일 ~ 2004년 8월 8일(152일간)
개시일령	26day(생후)
출하일령	178day
개시체중	개체평균 6.2kg, 개시두수 299두, 총 1,853kg
출하체중	31,683kg
총 체중 증가량	29,830kg , 사료요구율 : 2.75
체중증가량/일	0.674kg
총 사료 섭취량	82,221kg
폐사두수	자돈: 2두, 육성: 2두, 비육: 4두 합계: 8두(7,8월 극심한 더위로 인하여 발생)
평가결과	1. 출하시기를 7일 단축시킴 - 사양 비 감소로 인한 경제적 이윤 극대화 효과 2. 사료 요구율 개선효과; - 신 사료 첨가제 사용 전: 2.9~3.0 - 신 사료 첨가제 사용 후: 2.75

### 3. 새우사료 첨가제

양식새우 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 서해안에서 중요한 양식대상 종이다. 통상 대하는 춘계에 종묘를 생산하여 고수온기에 고밀도의 집약적 양식을 행하고 있다. 그러나 병원성 박테리아나 바이러스에 의해 대량폐사가 빈발하고 있어, 최근에는 양어가에 많은 손실을 야기하고 있다. 특히 흰반점바이러스(WSSV)는 국내뿐 아니라 아시아지역의 양식장에서 가장 치명적인 병원성 미생물로 알려져 있고, 국내에서는 1993년 처음 이 바이러스가 보고된 이래로 매년 거듭되는 대하의 대량폐사를 유발하고 있다. 이러한 현상은 새

우와 같은 무척추생물은 면역체계가 발달되어 있지 않기 때문인 것으로 알려지고 있다 (Klein, 1989). 그러나 새우류는 hemocyte 및 humoral factors에 의한 포식활성을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다(Gupta, 1986; Beck et al, 1994). 따라서 포식활성의 증가가 생존율의 증가 및 보다 안정적인 양식의 가능성이 시사되고 있다. Cyanobacteria인 *Spirulina platensis*는 세포당 높은 단백질 함량, 비타민, 필수아미노산, 지방산 및 다양한 색소성분을 함유하고 있어, 건강보조식품으로 사용되고 있다(Belay, 2002). *S. platensis*의 우수한 영양학적, 면역학적 특성으로부터 다양한 어종을 대상으로 한 양식에 사료 첨가제로서 그 유용성이 보고되고 있다. 특히, Lee 등(2003)은 새우의 포식 활성을 증가시키기 위하여 사료 첨가제로 *S. platensis*를 사용하여 새우의 hemocyte의 포식 활성이 향상됨을 보고하기도 하였다. 또한 *S. platensis*는 새우양식장의 수질개선 생물로 유용성이 보고되기도 하였다(Chuntapa et al. 2003). 본 연구는 *S. platensis*를 첨가한 사료가 양식 새우대하의 증체량에 미치는 영향을 조사하였다.

새우의 양식은 전라남도 신안군 안좌면 우목리에 위치한 정수식 못에서 수행하였다. 약 1 톤 용량의 원통형의 fibergalss-reinforced 플라스틱 탱크를 못에 설치하여 35일간 양식하였다. 양식 새우는 평균 체중 8.0 g의 대하를 10마리씩 수용하였다. 사료 첨가제로 사용된 *S. platensis*는 SOT배지로 200-L 광생물반응기에서 지수성장기 후기까지 배양하였다. 배양한 조체는 수확 및 동결건조하여 사료 첨가제로 이용하였다. 실험구는 상업용 새우 사료(T1), 상업용 새우 사료와 미생물재제(T2), 상업용 새우 사료와 *S. platensis*(T3), 상업용 사료와 미생물 재제 및 *S. platensis*(T4) 및 T4의 1/2(T5)로 하였다. 사료는 3 g/d를 3회 나누어 투여하였다. 조사항목은 실험구에 따른 새우의 생존율 및 증체량은 사육 마지막에 측정하였다. DIN 및 DIP의 수질, chlorophyll *a*, 식물플랑크톤의 조성 및 분포 등은 7, 14, 21, 35일 채수하여 실험실로 운반하여 측정하였고, 기타 수온, 염분, pH 등은 현장에서 각각 측정하였다.

수온은 점차로 감소하여 27.3-23.1℃로 대하의 양식에 적절한 온도 범위를 유지하였고, 실험구간 별로는 매우 안정적이었다(Table 31). 염분은 28.5-29.0‰로 매우 안정적이었으나, pH는 8.2-10.6로 양식 초기인 7일과 14일에는 높아서 9.6-10.6이었으나, 양식 후기에는 8.2-8.3의 범위로 안정적인 수치를 보였다(Table 31).

Table 31. Water temperature, salinity and pH estimated in the shrimp rearing tanks during the shrimp culture

Days	7			14			21			35		
Treatment	수온	염분	pH	수온	염분	pH	수온	염분	pH	수온	염분	pH
T1	27.3	28.5	10.8	24.9	28.9	9.6	25.1	28.2	8.3	23.1	29.0	8.2
T2	27.1	28.6	10.6	25.0	28.8	10.2	25.2	28.6	8.2	23.4	28.8	8.2
T3	27.1	28.5	10.6	25.2	28.7	10.6	24.8	28.5	8.3	23.5	28.6	8.3
T4	26.9	28.7	10.6	25.3	28.9	10.4	25.1	28.7	8.3	23.5	28.5	8.2
T5	27.0	28.5	9.7	25.2	28.9	9.7	25.2	28.5	8.2	23.4	28.6	8.2

양식기간 동안 DIP의 변동양상은 Figure 37에 나타내었다. DIP 농도는 7일에는 0.02-0.05 mg/L로 비교적 높았으나, 14일에는 0.08 mg/L의 T2 구간을 제외하고 0.01-0.03 mg/L으로 감소하였다. T2 구간의 경우, 14일에는 급격히 증가하였다가 21일에는 다시 감소하는 특징을 보였다. 전체적인 DIP 농도는 양식일수의 증가와 함께 감소하여 35일에는 0.008-0.015 mg/L의 범위로 안정적인 값을 보였다. DIN은 T2를 제외하고는 전체적으로 1.11-1.49 mg/L의 범위로 낮고 안정적인 값을 나타내었다(Figure 38). T2는 예외적인 구간으로서 21일에는 다른 구간에 비해 5배 높은 0.25 mg/L로 나타났다. Lim 등(2004)은 대하의 양식에서 수질에 대한 미생물재제의 영향을 조사하면서, DIN의 농도는 초기에는 3.55-3.65 mg/L의 범위로 높았으나, 점차 감소하여 0.63-1.93 mg/L과 0.93-6.85 mg/L로 처리구와 비처리구에서 각각 나타남을 보고하였다. 본 연구에서 DIN의 농도는 Lim 등(2004)의 처리구의 결과와 유사하였고, T2에서의 결과는 보다 낮은 농도를 보였다. 이러한 결과는 대하의 낮은 사육 밀도 및 사육 탱크내의 안정적인 식물플랑크톤 상의 형성에 기인하는 것으로 사료된다. Chlorophyll *a*의 농도는 점차로 증가하여 21에 76.5-123.6  $\mu\text{g/L}$ 의 범위로 최고에 이르렀고 35일에는 감소하여 47.3-74.2  $\mu\text{g/L}$ 의 범위였다. T3 구간은 예외적으로 35일에도 증가하여 106.1  $\mu\text{g/L}$ 의 농도를 보였다. Chlorophyll

a의 농도는 식물플랑크톤의 현존량을 반영하지만, 실제적인 현존량은 35일에 최대로 증가하여 153,972-971,412 cells/ml에 달하였다(Figure 39). 이와 같은 현상은 식물플랑크톤 상의 천이 및 변동에 의해 설명될 수 있다. 즉, 양식 초기에는 식물플랑크톤은 급속도로 증식하기 시작하여 종 다양도는 매우 높았으나, 현존량은 낮은 상태였다. 식물플랑크톤의 초기의 급격한 증식은 높은 pH의 원인이 된 것으로 사료된다. 식물플랑크톤은 Bacillariophyceae, Cyanophyceae, Chlorophyceae, Dinophyceae 및 Euglenophyceae의 5개 분류군으로 동정하였다. 양식기간 동안 출현한 식물플랑크톤은 Figure 40에서와 같이 총 85종으로 동정되었고, 7일에는 35종, 14일에는 52종, 21일에는 45종 그리고 35일에는 32종으로 종다양도는 초기에는 증가하였으나 점차 감소하는 것으로 나타났다. 출현한 종수의 우점도에서는 초기에는 규조류가 우점하여 전체의 43.5-64.7%였고, 이들은 점차 남조류 군집으로 식물플랑크톤의 상이 바뀌면서 47.1%이하로 감소하였다. 남조류는 점차 증가하여 35일에 42.1-60.0%로 가장 많은 종수가 출현하였다. 주요 우점종으로는 녹조류에 속하는 *Oocystella radiosa*와 규조류에 속하는 *Thalassiosira eccentrica*가 초기에 우점하였고, 후기에는 *O. radiosa*와 사상형 남조류인 *Oscillatoria* sp. 1이 가장 우점하였다. 35일의 식물플랑크톤의 높은 현존량은 다종의 사상형 남조류와 녹조류인 소형의 *O. radiosa*의 영향인 것으로 사료된다. 양식 초기에 우점하던 규조류가 점차 남조류로의 천이 현상은 Yusoff 등(2002)의 결과와 유사함을 보였다.

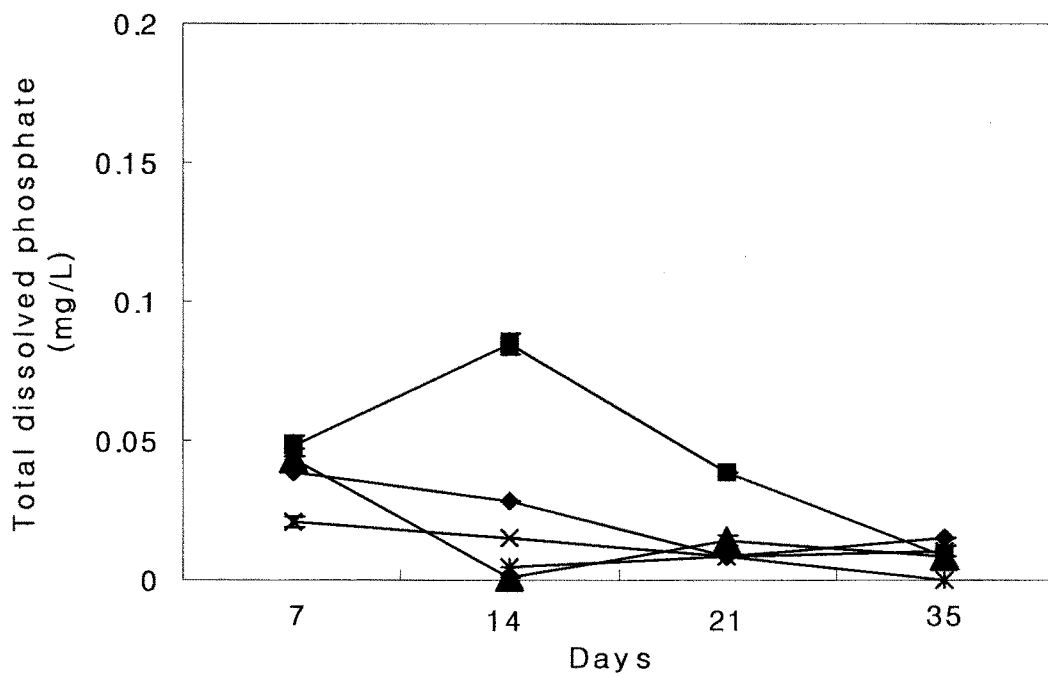


Figure 37. Changes of total dissolved phosphorus in each treatment during the shrimp culture: T1 (◆), T2 (■), T3 (▲), T4 (×), T5 (\*). Bar indicates standard deviation.

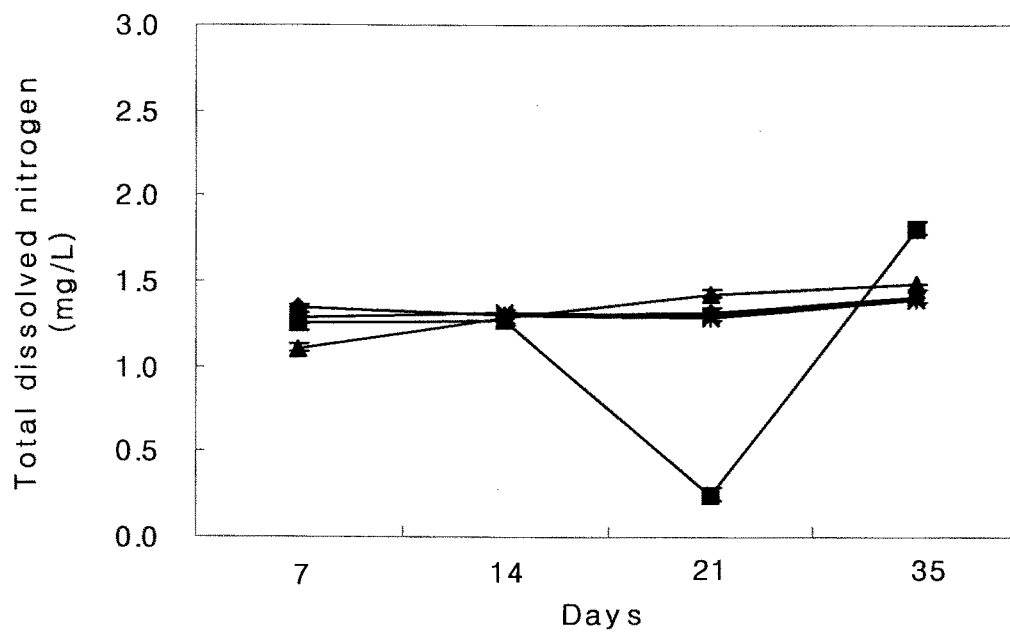


Figure 38. Changes of total dissolved nitrogen concentration in each treatment during the shrimp culture: T1 (◆), T2 (■), T3 (▲), T4 (×), T5 (\*). Bar indicates standard deviation.

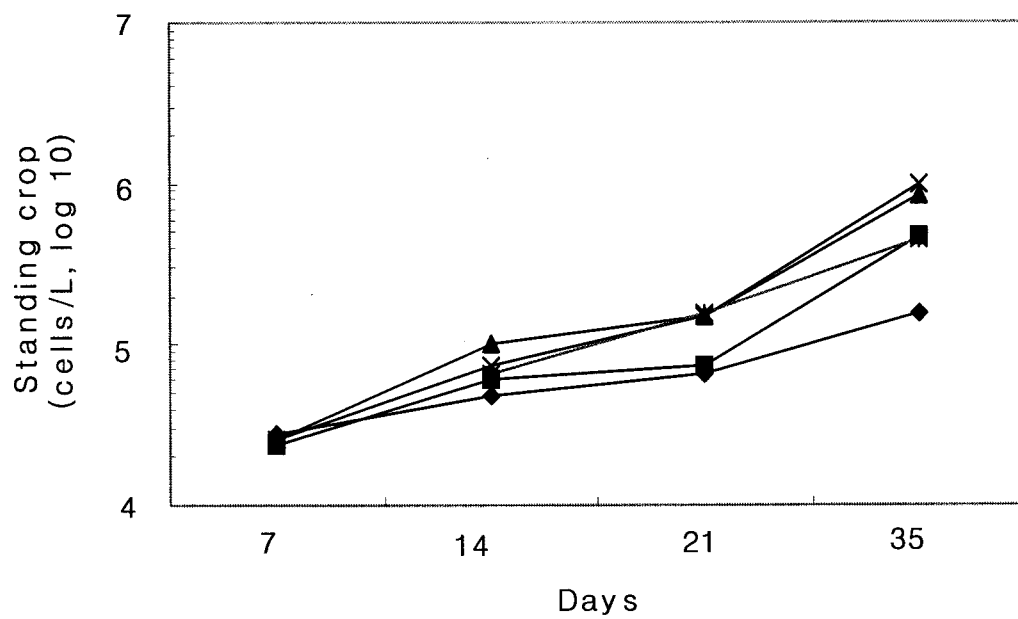


Figure 39. Changes of the phytoplankton standing crop in each treatment during the shrimp culture: T1 (◆), T2 (■), T3 (▲), T4 (×), T5 (\*). Bar indicates standard deviation.



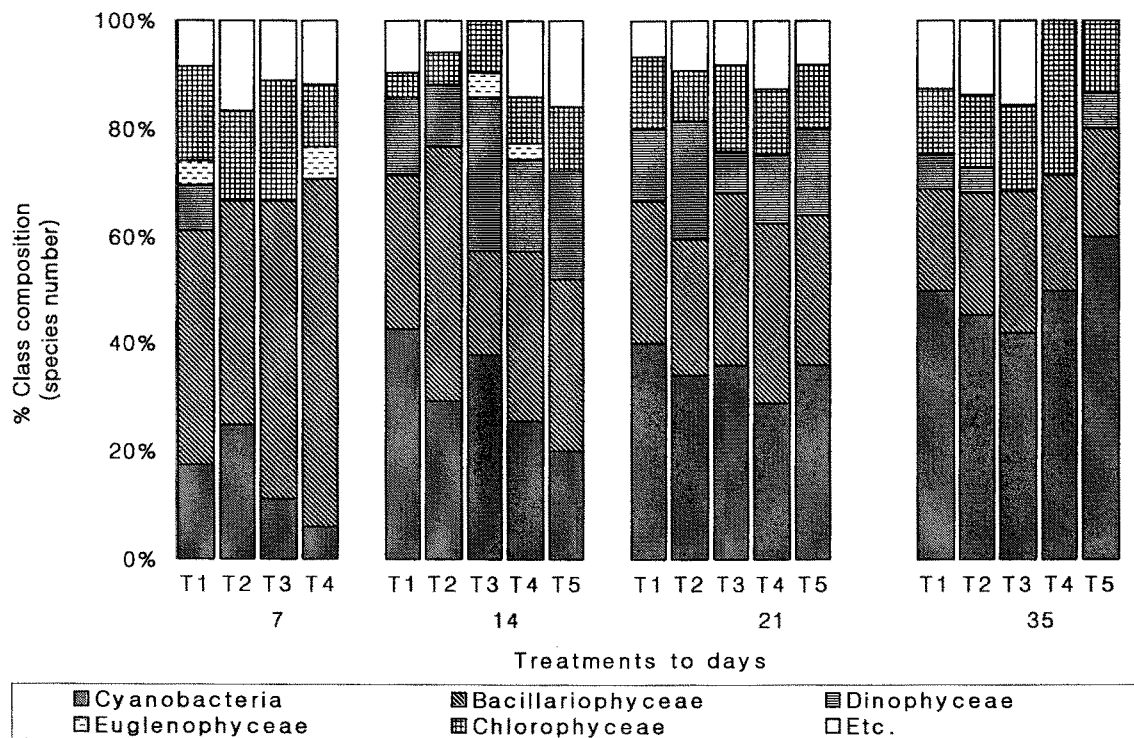


Figure 40. Phytoplankton class composition in respect to species numbers occurred in the treatments during the shrimp culture.

탱크 양식에 있어서 식물플랑크톤의 두드러진 특징 중 하나는 양식일수의 증가와 함께 탱크 내부의 벽면에 부착하여 생물막(biofilm)의 형성이었다. 부유 식물플랑크톤을 대상으로 한 chlorophyll *a* 농도의 감소는 생물막 형성이 활발해지면서 나타난 결과로 사료된다. 이러한 생물막의 형성은 온도의 하강에 의해 가속된 것으로 보인다. 또한 양식조에 있어서 생물필름은 수질에도 긍정적인 요인으로 작용하여, Thompson 등(2002)은 인의 방출을 막고, 양식생물에 유해한 암모니아는 흡수하고 무해한 아질산 및 질산염은 방출한다고 보고하였다. 양식된 새우의 생존율 및 성장에 대한 결과는 Figure 41에 나타내었다. 양식된 새우의 생존율은 전 구간에서 70-80%의 범위로 높고 균일하였다. 이는 낮은 사육 밀도 및 매우 안정적인 식물플랑크톤 군집의 형성에 의해 기인한 것으로 사료된다. 양식된 새우의 평균 체중은 9.3-13.4 g의 범위였다. *S. platensis*를 사료 첨가제로 투여한 구간인 T3에서 가장 우수한 결과를 보여, 전체 평균의 20%이상 이었다( $P < 0.1$ ). 사료의 양을 절반으로 하여 투여한 T5에서 가장 낮은 체중 증가를 보였다. 이러한 결과는 새우 양식을 위한 사료 첨가제로서 *S. platensis*가 대하의 성장에 매우 효과적임을 제안하는 결과였다.

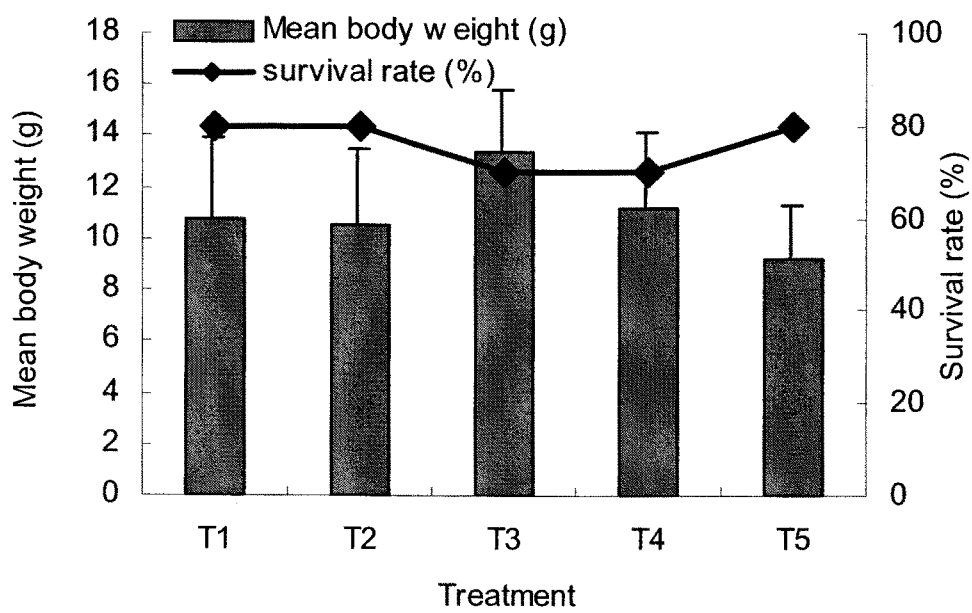


Figure 41. Survival rate (%) and mean body weight (g) of cultured shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in each experiments at the end of the experiment. Bar indicates standard deviation.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	<b>Cyanobacteria의 수집, 분리 및 보존기술 확립</b> - Cyanobacteria의 순수분리(50 strains 이상) - 분리된 cyanobacteria의 동정 및 보존기술 확립	- 500여 strains의 cyanobacteria를 포함한 미세조류 분리 및 계대보존(약 4개월 주기) - 분류학자에 분류 및 동정 - Web site에 등재 및 활용성 증대	120
2	<b>Cyanobacteria의 생리·생태적 특성 연구</b> - Cyanobacteria 배양의 생리·생태적 특성 - 균주개량 및 고정화 효율 증대( <i>Spirulina</i> sp. 1 g dw/L/일)	- 다양한 질소원 공급 하에서 생장률 및 생물량의 변화 조사(논문: Stud. Surf. Sci. Catal. 153: 581-584, 2004) - 우량균주 확보 및 고정화효율 향상( <i>Spirulina</i> sp. 1.14 g dw/L/일, 특허: 2004-65536, 논문: NICE 21, 434-439, 2003 & 유전자분석 논문 준비 중)	100
3	<b>Cyanobacteria의 대량배양 공정 연구</b> - 광생물반응기 개발 - 폐쇄형 및 개방형 배양공정의 최적화 및 cyanobacteria 배양의 모델시스템 정립 - Cyanobacteria 대량배양의 실증화(200-L) - 수확(harvest) 공정 개발	- 5-L, 200-L 광생물반응기 개선 - CO <sub>2</sub> 농도에 따른 배양의 최적화(논문: Stud. Surf. Sci. Catal. 153: 295-298, 2004) - 200-L 광생물반응기의 운전 최적화 및 사료첨가제 생산(1.5 L 농축조체/월) - Cyanobacteria의 부유허성을 이용한 수확법 개발(특허: 2003-66565, 논문: Lett. Appl. Microbiol. 40, 2005)	100

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
4	<b>Cyanobacteria로부터 고부가 유용물질 선정</b> - 유용물질 탐색을 위한 cyanobacteria 추출물 은행 구축(50 추출물 준비) - 항암, 항생물질 탐색계 구축  - 항암, 항생 후보물질 선정  - 항암, 항생물질 구조 규명 - 유용물질의 <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> 생물활성 검정	- Cyanobacteria를 대상으로 인-제한, 인-충분 등의 조건에서 배양하여 600여 추출물 은행 구축 - 항암물질 탐색계로 VHR DS-PTPase 활성 측정, 항생물질 탐색계로 paper disk법 구축, 항당뇨활성물질 추가(논문: <i>Algae</i> 19, 271-276, 2004 & 한국미생물생명공학회지 31, 95-102, 2003) - 생리활성(항암, 항당뇨, 항생 활성)을 갖는 30여 cyanobacteria 선정(특허: 2004-11264, 2004-11265, 출원 준비중 2건) - NMR 구조분석 실시 - 항균성물질 탐색계로 13종의 병원성 세균 검출시스템 구축 - 어류 이용 독성시험	100
5	<b>유용물질 생산의 실증화</b> - 적합성 시험(영양성분 분석, 독성 시험) - 사료첨가제 개발	- Cyanobacteria 조성 조사 및 영양가치 평가(논문: <i>Biotechnol.</i> <i>Bioprocess Eng.</i> 8, 368-372, 2003) - 돈사료, 새우사료에 첨가 하여 효능 조사(논문: 작성 중 1편) - 돈축사, 새우양식장 현장 실험 - 참여기업에 기술이전: "스피루리나를 이용한 이산화탄소 고정화 및 기능성 사료첨가제 제조 기술"(2005. 1. 4.)	120

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

생물학적 CO<sub>2</sub> 고정화의 혁신적 기술은 생명공학기술을 이용한 균주개량으로 광합성 효율을 획기적으로 증대시키는 것이다. 따라서 1단계에서 개발된 광합성 미생물 균주탐색, CO<sub>2</sub> 고정화 기능의 향상, 유전자 구조 및 기능 연구, 배양의 최적화 등을 활용하여 2단계 후속연구에서는 광합성 기능 향상을 위한 분자생물학적 균주개량 및 CO<sub>2</sub> 고정화 시스템 개발이 가능하다고 판단된다.

생물학적 고정화의 결과로 생산되는 biomass의 상품화기술 개발로는 1단계에서 개발하여 기업체에 기술이전한 "스피루리나를 이용한 이산화탄소 저감 및 사료첨가제 제조" 기술을 양식장 현장에서 대규모로 적용하여 이산화탄소의 저감과 동시에 유용물질을 생산하여 상품화하는데 크게 기여하게 된다. 또한 생리활성물질탐색 결과는 2단계의 후속연구를 통하여 고부가 유용물질의 생산 및 상품화에 직접적으로 활용이 예상된다.

끝으로 본 연구를 통하여 확보된 500여 strains의 미세조류 및 600여 점의 미세조류 추출물은 우리나라의 중요한 토착 생물자원으로서 향후 관련 연구자 및 산업체에 유용한 생물자원으로 활용될 수 있다.

# 여 백

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

ISPP 2003 Tokyo로 명명된 제11차 국제원핵광합성생물심포지움(International Symposium on Phototrophic Prokaryotes)은 일본 동경의 구민회관인 Tower Hall Funabori에서 2003년 8월 24-29일에 걸쳐 개최되었다. 학술대회 참석 후 일본의 고도인 Nara 시에 위치하고 있으며, 이산화탄소의 생물학적 고정화 연구로 세계적 명성을 얻고 있는 지구환경산업기술연구기구(Research Institute of Innovative Technology for the Earth, RITE)를 방문하여 연구소 견학 및 식물분자생물학 연구자들과 향후 연구협력에 대해 의견 교환의 기회를 가졌다.

1990년 설립된 RITE는 Kansai Science City에 위치하고 있으며, 우리나라의 대덕연구단지와 흡사하여 조용하고 한적한 도시 외곽에 위치하고 있었다. 연구소 건물은 환경친화적 개념으로 건축되었다고 한다. 태양광을 효과적으로 이용하기 위하여 대형 유리를 많이 사용하였으며, 정원 지하의 차가운 공기를 이용한 자연냉방과 공기순환, 지붕에 설치한 태양전지를 이용한 에너지 활용, 빗물의 이용 등이 대표적 예라고 할 수 있다. 연구소는 2층 건물로, 1층은 주로 연구원의 사무공간으로, 2층은 실험공간으로 활용되고 있었다. 5개의 주요 연구부서 중에서 생물분야로는 미생물연구그룹(Microbiology Research Group)과 식물생리연구그룹(Plant Physiology Research Group)의 2개 그룹이 있었다. 식물생리연구그룹은 Dr. Tomizawa가 책임자로서 23명의 연구원이 일하고 있으며, 대표적 연구과제는 1999-2003년에 걸쳐 수행 중인 Plant Factory Project이었다. 주요 내용은 광합성의 핵심효소인 Rubisco의 기능연구 분야 그리고 산업적으로 유용한 물질 생산 유전자, 재해 내성 유전자 등을 식물체에 이식하여 사막지역에서도 생장이 우수하고 유용물질을 생산할 수 있는 식물의 개발로 대별되었다. 유전자 조작을 통해 기능 강화된 식물을 사막지역에 식재함으로써 대기 중 이산화탄소 농도의 저감과 함께 부수적으로 유용물질을 생산하여 사막녹화를 달성하고자 하는 연구를 수행 중에 있었다.

결론적으로 방문기관인 RITE는 필자의 연구와도 관련되어 그동안 직·간접적으로 많은 이야기를 들었던 기관으로, 이번의 직접 방문은 필자에게 커다란 의미가 있었다. 연구소는 1990년 설립되었으며 규모는 그다지 크지 않았으나, 태양광을 이용하거나 지열을 이용하는 등 많은 부분을 환경친화적으로 고려하여 건축하였음을 한눈에 알 수 있었다. 연



구내용 중에서 가장 인상 깊었던 것은 광합성 능력이 우수한 미세조류의 유전자를 식물체에 주입하여 사막을 녹화하고, 이산화탄소 저감을 동시에 달성하고자 하는 식물체 개발이었다. 지금 당장의 결과보다는 미래 지구환경의 보전을 위하여 장기 투자가 필요한 연구를 수행하고 있음을 느낄 수 있었다.

## 제 7 장 참고문헌

- Ahn, C.-Y., M.-H. Park, S.-H. Joung, H.-S. Kim, K.-Y. Jang, and H.-M. Oh. 2003. Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 3031-3037.
- Allen, M.M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plate. *J. Phycol.*, 4, 1-1.
- Beck, G., E. Cooper, G. Habicht, and J. Marchalonis. 1994. Primordial immunity: foundations for the vertebrate immune system. *Ann. NY Acad. Sci.* p 72.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Belay, A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *JANA* 5, 27-43.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 445-459.
- Cho, S.H., S.B. Hur, and J.Y. Jo. 2001. Effect of enriched live feeds on survival and growth rates in larval Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf. *Aquaculture Res.* 32, 199-208.
- Chuntapa, B., S. Powtongsook, and P. Menasveta. 2003. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture* 220, 355-366.
- Codd, G.A. 1995. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci. Technol.*, 32, 149-156.
- Costa, J.A.V., L.M. Colla, and P.F.D. Filho. 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technol.*, 92, 237-241.
- Danesi, E.D.G., C.O. Rangel-Yagui, J.C.M. Carvalho, and S. Sato. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.*, 26, 329-335.
- Dittmann, E., B.A. Neilan, M. Erhard, H. Dohren, and T. Borner. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin

- production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.*, 26, 779-787.
- Duncan, P.L. and P.H. Klesius. 1996. Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 8, 308-313.
- Enoki, T., H. Sagawa, T. Tominaga, N. Eiji, K. Nobuto, T. Sakai, F.-G. Yu, K. Ikai, and I. Kato. 2002. Drugs, foods or drinks with the use of algae-derived physiologically active substances. US, patent 6475990.
- Fairey, E.R. and J.S. Ramsdell. 1999. Reporter gene assay for algal-derived toxin. *Nat. Toxins* 7, 415-421.
- Gorenbein, D.L., A. Siddiqui, E.R. Ceja, and C.M. Horvath. 2001. Multi-carotenoid product. US, patent 6309677.
- Gudin, C and C. Therpenier. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Advances in Biotechnological Processes* 6, 73-110.
- Gupta, AP. 1986. Arthropod immunocytes. In: Gupta AP, editor. *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*. New York: John Wiley & Sons, p 3-42.
- Javanmardian, M. and B.O. Palsson. 1991. High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 1182-1189.
- Kang, H., E.G. Na, G.S. Sin, and J.H. Jang. 2003. Feasibility test for control of algae by electron beam irradiation in eutrophic lake and coastal water. *J. KSEE.*, 25, 1368-1374.
- Kilham, S.S., D.A. Kreeger, C.E. Goulden, and S.G. Lynn. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constitution of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol.* 38, 591-596.
- Kim, J.-S., Y.-H. Park, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1999 Establishment of axenic cultures of *Anabaena flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (Cyanobacteria) by lysozyme treatment. *J. Phycol.* 35, 865-869.
- Klein, J. 1989. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? *Scand. J. Immunol.* 29, 499-505.

- Kurano, N., H. Ikemoto, H. Miyashita, T. Hasegawa, H. Hata, and S. Miyachi. 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt.* 36, 689-692.
- Laws, E.A. and J.L. Berning. 1991. A study of the energetics and economics of microalgal mass culture with the marine chlorophyte *Tetraselmis suecica*: Implications for use of power plant stack gases. *Biotech. Bioeng.* 37, 936-947.
- Lee, S.J., S.-B. Kim., G.-S. Kwon., B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 14-18.
- Lee, Y.-K., P.-F. Chew, B.-S. Soh, and L.-Y. Tham. 2003. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 15, 279-287.
- Lim, H.J., J.H. Park, and I.K. Jang. 2004. Effect of probiotics on water quality in the shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ponds. *J. Kor. Fish. Soc.* 37, 91-97.
- MacKintosh, C., K.A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen, and G.A. Codd. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plant. *FEBS Lett.* 264, 187-192.
- Matsumoto, H., N. Shioji, A. hamasaki, Y. Ikuta, Y. Fukuda, M. Sato, N. Endo, and T. Tsukamoto. 1995. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Appl. Biochem. Biotech.* 51/52, 681-692.
- Moore, R.E. 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *J. Indust. Microbiol.* 16, 134-143.
- Nandeesh, M.C., B. Gangadhar, T.J. Varghese, and P. Keshavanath. 1998. Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Res.* 29, 305-312.
- Oh, H.-M. and G.-Y. Rhee 1990 Preparation of unialgal cultures from natural waters by a micropipette technique. *Kor. J. Phycol.* 5, 131-136.
- Oh, H.-M., S.J. Lee, M.-H. Jang, and B.-D. Yoon. 2000. Microcystin production by

- Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. Appl. Environ. Microbiol. 66, 176-179.
- Pirt, S.J., Y.K. Lee, M.R. Walach, M.W. Pirt, H.H.M. Balyuzi, and M.J. Bazin. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. J. Chem. Biotechnol. 33B, 35.
- Pringsheim, E.G. 1949. Pure Culture of Algae. Cambridge Univ. Press, London.
- Provasoli, L. 1968. In Watanabe, A. and A. Hattori, ed. Cultures and Collections of Algae. Pro. U.S.-Japan Conf. Hakone, Sept. 1966., Jap. Soc. Pl. Physiol., 63-75.
- Provasoli, L. and I.J. Pintner. 1959. In The Ecology of Algae, Spec. Publ. No. 2, Pymatuning Lab. of Field biology (ed. Tryon, C.A. and Hartmann R.) pp. 84-96, Univ. of Pittsburgh, Pittsburgh.
- Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin, and M.R. Droop. 1957. Arch. F. Mikrobiol. 25, 392-428.
- Radmer, R.J. 1996. Algal diversity and commercial algal products. Bioscience 46, 263-270.
- Radmer, R.J. and B.C. Parker. 1994. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. J. Appl. Phycol., 6, 93-98.
- Rantala, A., D.P. Fewer, M. Hisbergues, L. Rouhiainen, J. Vaitomaa, and T. Borner. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci., 101, 568-573.
- Ratchford, I.A.J. and H.J. Fallowfield. 1992. Performance of a flat plate, air-lift reactor for the growth of high biomass algal cultures. J. Appl. Phycol. 4, 1-9.
- Shimizu, Y. 2003. Microalgal metabolite. Curr. Opin. Microbiol. 6, 236-243.
- Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia 35, 12-24.
- Skulberg, O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyte research. J. Appl. Phycol. 12, 341-348.
- Takano, H., H. Furu-Une, J.G. Burgess, E. Manabe, M. Hirano, M. Okazaki, and T. Matsunaga. 1993. Production of ultrafine calcite particles by coccolithophorid algae grown in a biosolar reactor supplied with sunlight. Appl. Biochem. Biotech. 39/40, 159-167.

- Tonks, N.K., C.D. Diltz, and E.H. Fischer. 1988. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263, 6731-6737.
- Tredici, M.R. and R. Materassi. 1992. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4, 221-231.
- Vilchez, C., I. Garbayo, M.V. Lobato, and J.M. Vega. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 562-572.
- Walsby, A.E. 1994. Gas vesicles. *Microbiological Reviews* 58, 94-144.
- Watanabe, Y. and D.O. Hall. 1995. Photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Energy Convers. Mgmt.* 36, 721-724.

여 백

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	이산화탄소저감및처리기술개발사업단			
과제명		Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가생물제품화 기술 개발			
연구기관		한국생명공학연구원	연구책임자	오희목	
총연구기간		2002년 10월 1일 ~ 2005년 3월 31일 (2년 6개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		409,500	145,167	554,667	
기술분야					
참여기업		(주)프로바이오닉			
공동연구기관					
위탁연구기관		(주)프로바이오닉 기술연구소			
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ( )	2. 기술이전(√)	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용( ) 8. 기타( )
		5. 선행 및 기초연구( )	6. 기타목적활용(교육,연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2005년 3월 31일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 오 희 목 연구기관장 : 양 규 환</p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">과학기술부장관 귀하</p>					





여 백

[첨부1]

## 연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

광합성 미생물인 cyanobacteria의 탐색, 균주개량, 배양공정의 최적화, 고부가 유용물질 탐색 등을 실시하며, 이를 기반으로 cyanobacteria의 대량배양을 통하여 CO<sub>2</sub>의 효율적 고정화 및 생산된 biomass로부터 고부가의 생물제품화 기술을 개발한다.

- Cyanobacteria를 이용한 CO<sub>2</sub>의 저감: 0.2 kg/일 이상(예, *Spirulina* 1 g dry wt/L/일, 200-L 반응기 → 0.2 kg dry wt/일 → 약 0.37 kg CO<sub>2</sub>/일)
- 고부가 유용물질 생산: 100,000원/kg 이상(예, 의료·식품 첨가물, 신규 향암·항생물질 등)

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 총괄 현황

	논문 게재				논문 발표		특허			
	국내		국외		국내	국외	국내		국외	
	SCI	n-SCI	SCI	n-SCI			출원	등록	출원	등록
1차년도		1			2					
2차년도	1	1			1	3	3			
3차년도		1	3		3	4	1			
총계	1	3	3		6	7	4			

나. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록) 일자	발명자 (출원인)	출원 국	비고
부유 조체의 수집장치 및 이를 이용한 조류의 수확방법	2003-66565	2003.9.25.	오희목 등 (한국생명공학연구원)	대한 민국	
항생 활성을 갖는 남세균 오실라토리아 속 W109(KCTC 10592BP)	2004-11264	2004.2.20.	오희목 등 (한국생명공학연구원)	대한 민국	
VHR 저해 활성을 갖는 남세균 아나베나 프로스-아퀴 J08(KCTC 10593BP)	2004-11265	2004.2.20.	오희목 등 (한국생명공학연구원)	대한 민국	
스피롤리나의 성장 최적화 및 최대 수확을 위한 배지 조성물	2004-65536	2004.8.19.	오희목 등 (한국생명공학연구원)	대한 민국	

다. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

라. 노하우 내역

마. 발생품 및 시작품 내역

바. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연 월일	호	발행기관	국 명	SCI게재 여부
한국미생물·생명공학회지	미세조류 유래 고부가 유용물질	2003. 6.	31/2/95-102	한국미생물·생명공학회	한국	X
NICE(화학공학기술정보지)	Post-genome 시대의 환경생명공학기술	2003. 12.	21/4/434-439	한국화학공학회	한국	X
<i>Biotechnol. Bioprocess Eng.</i>	Growth and amino acid contents of <i>Spirulina platensis</i> with different nitrogen sources	2003. 12.	8/4/368-372	한국생물공학회	한국	O
<i>Stud. Surf. Sci. Catal.</i>	Effects of CO <sub>2</sub> concentrations on the growth and photosynthesis of <i>Spirulina platensis</i>	2004. 10.	153/295-298	Elsevier	Netherlands	O
<i>Stud. Surf. Sci. Catal.</i>	Growth and carbon fixation of the cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> under different nitrogen sources	2004. 10.	153/581-584	Elsevier	Netherlands	O
<i>Algae</i>	담수산 미세조류로부터 생리활성물질 탐색	2004. 9.	19/3/271-276	한국조류학회	한국	X
<i>Lett. Appl. Microbiol.</i>	Harvesting of <i>Spirulina platensis</i> by cellular flotation and growth stage determination	2005. 2	40/2/190-194	Society for Applied Microbiology	England	O
계: 7건						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	계재연 월일	호	발행기관	국명
한국미생물학회 국제학술대회	Growth efficiency and carbon fixation of <i>Spirulina platensis</i> under different CO <sub>2</sub> concentrations	2003. 5.2-3		한국미생물학 회	한국
한국조류학회 학술발표대회	Growth and amino acid composition of <i>Spirulina platensis</i> grown under different nitrogen sources	2003.5. 29-30.		한국조류학회	한국
11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes	Growth and photosynthesis of <i>Spirulina platensis</i> under different nitrogen sources and CO <sub>2</sub> concentrations	2003.8. 24.30.		ISPP 2003	Japan
7th International Conference on Carbon Dioxide Utilization	Growth and C-fixation of the cyanobacterium <i>Spirulina platensis</i> under different nitrogen sources	2003.10. 12-16.		ICCDU-VII	Korea
7th International Conference on Carbon Dioxide Utilization	Effects of CO <sub>2</sub> concentrations on the growth and photosynthesis of <i>Spirulina platensis</i>	2003.10. 12-16.		ICCDU-VII	Korea
KRIBB Conference	Cyanobacteria의 자원확보 및 응용연구	2004.1.8.		한국생명공학 연구원	한국
한국미생물학회 국제학술대회	An efficient method for harvesting cyanobacteria by flotation and growth stage monitoring	2004.5. 13-14.		한국미생물학 회	Korea
한국미생물·생명공학 회 학술대회	Screening of bioactive materials from microalgal biomass	2004.6. 21-23		한국미생물· 생명공학회	한국
해양미세조류은행 심포지엄	미세조류로부터 생리활성물질의 탐색	2004.6. 25.		부경대	한국
10th International Congress for Culture Collections	Establishment of microalgal culture collection in the Biological Resource Center, KRIBB	2004.10. 10-15.		World Federation for Culture Collections	Japan
한국환경생물학회 추계학술대회	The BRC-Microalgal Collection: Diversity of microalgal strains	2004.12.3		한국환경생 물학회	한국
1st International Symposium on CO <sub>2</sub> Reduction & Sequestration	Enhanced cultivation of <i>Spirulina platensis</i> and development of harvesting method	2005.1.17 -20.		ISCDRS I	Korea
1st International Symposium on CO <sub>2</sub> Reduction & Sequestration	Effects of <i>Spirulina platensis</i> as a feed additive on phytoplankton flora and growth of the shrimp <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	2005.1.17 -20.		ISCDRS I	Korea
계: 13 건					

### 3. 연구성과

기술 이전  현황	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국 내: 1 건 (기술이전 기업명 : (주)프로바이오닉 )</li> <li>· 국 외:    건 (기술이전 기업명/국가 :                    )</li> <li>· 기술료: 122,850 천원</li> </ul>
기술 이전  협의	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 추진 중 (    )</li> <li style="padding-left: 20px;">- 업체명 :</li> <li style="padding-left: 20px;">- 예상기술료 :</li> <li style="padding-left: 20px;">- 기술료 계약 예상시기 :</li> <li>· 계획없음 (    )</li> <li style="padding-left: 20px;">- 개발기술의 향후 활용방안 :</li> </ul>

### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

#### 가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

1단계에서 개발한 생물학적 CO<sub>2</sub> 고정화의 다양한 요소기술과 실증화 인프라연구는 2단계에서 중점적으로 추진 예정인 CO<sub>2</sub> 고정화 우량균주 개발 및 CO<sub>2</sub> 대량 고정화 시스템 개발에 활용하고자 한다. 또한 참여기업에 기술이전한 “스피루리나를 이용한 CO<sub>2</sub> 고정화 및 기능성 사료첨가제 제조”의 실용화 및 상품화를 위한 대규모 양식장 현장 실험을 수행하며, 1단계에서 집중적으로 수행한 고부가 생리활성물질의 1차 탐색 결과를 바탕으로 더욱 구체적인 2차 탐색을 수행하여 최종적으로 고부가 유용물질의 선정 및 개발에 활용한다.

#### 나. 활용방법

2단계의 계속적 연구수행 및 참여기업을 통한 상품화에 활용한다.

#### 다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

2단계 연구수행은 향후 3년 예정으로 가. 항의 내용으로 활용한다.

### 5. 기대효과

향후 활용에 따른 기술적, 사회·경제적 파급효과

- CO<sub>2</sub> 생물학적 고정화 인프라 구축
- 우리나라의 자발적 CO<sub>2</sub> 감축노력에 의한 국제적 지위 향상에 기여
- 사료첨가제 생산으로 매출증대 예상: 3억원/년
- 고부가 생리활성물질 생산기반 구축: 현재 시장 규모 3,000억원/년 추정

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

없음

# 여 백

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

Cyanobacteria의 대량배양에 의한 CO<sub>2</sub> 고정화 및 유용물질 생산

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	DC1-104			
과제명	Cyanobacteria를 이용한 이산화탄소 고정화 및 고부가 생물제품화 기술 개발			
사업명	21세기 프런티어연구개발사업			
세부사업명	이산화탄소 저감 및 처리기술 개발 사업			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	출연(연)	
참여기관(기업)	(주)프로바이오닉			
총연구기간	2002. 10. 1. ~ 2005. 3. 31.			
총연구비	정부( 409,500)천원    민간( 145,167)천원    합계( 554,667)천원			
연구책임자 1	성명	오 희 목	주민번호	
	근무기관 부서	한국생명공학연구원 환경생명공학연구실	E-mail	heemock@kribb.re.kr
	직위/직급	책임연구원/실장	전화번호	042-860-4321
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	김충재	소속/부서	한국생명공학연구원 환경생명공학연구실
	직위/직급	연수연구원	E-mail	ckim@kribb.re.kr
	전화번호	042-860-4323	FAX	042-860-4594
	주소	(305-333) 대전광역시 유성구 어은동 52번지		



## ■ 기술의 주요내용

### [기술의 개요]

광합성 미생물로서 지구상에서 생물학적 CO<sub>2</sub> 고정화의 약 30%를 담당하는 것으로 알려진 cyanobacteria(남조류, 남세균)를 대량으로 대양하여 CO<sub>2</sub> 저감을 달성하고, 아울러 유용물질 탐색 및 생산기술을 적용하여 cyanobacteria로부터 고부가의 생리활성물질을 생산한다.

### <기술적 특징>

- (1) 자연계 물질순환의 원리를 이용하므로 환경친화적이고 공정이 간단하다.
- (2) CO<sub>2</sub> 고정화와 함께 유용물질의 생산으로 부가가치를 창출한다.
- (3) 최근 급속히 발전하는 생명공학기술을 이용한 우량균주개발 등에 의해 지구온난화 가스의 처리에 크게 기여할 혁신기술로 평가된다.

### [용도·이용분야]

- (1) CO<sub>2</sub> 발생원으로부터 또는 대기중 CO<sub>2</sub>의 고정화에 의한 저감
- (2) 고부가 유용물질(기능성 사료첨가제, 생리활성물질 등)의 생산
- (3) 확보된 광합성 미생물은 국가의 유용 생물자원으로 폭넓은 활용





**[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)**

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적용시킴
√	③ 외국기술의 개선·개발단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

**■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술**

[ 기술개요 ]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호				
과제명				
사업명				
세부사업명				
연구기관		기관유형		
참여기관(기업)				
총연구기간				
총연구비	합계 : (            )백만원 - 정부 : (            )백만원    민간 : (            )백만원			
연구책임자	소속		성명	
	전화번호		E-mail	
연구개발 주요내용				