

*Porphyridium cruentum*의 성장 및 당질 생산에 미치는 배양 조건의 영향

주동식* · 조순영¹한중대학교 외식산업학과, ¹강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

Effect of Culture Conditions on Production of Polysaccharides and Growth Rate of *Porphyridium cruentum*

Dong Sik JOO* and Soon Yeong CHO¹

Dept. of Foodservice Industry, Hanzhong University, Donghae 240-713, Korea

¹East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

The growth of *Porphyridium cruentum* and its porphyrin polysaccharide production were measured as functions of light intensity, temperature, light quality (fluorescent, blue, red, and green) and nitrate concentration. The optimum light intensity, temperature, and nitrate concentration for the growth of *Porphyridium cruentum* and for its polysaccharide production were 1,400 lx, 25 °C, and 0.03%, respectively. The maximum cell concentration and polysaccharide content under the optimum conditions were 1.95 and 0.23 mg/mL, respectively. Light quality did not influence growth or polysaccharide production. The best results for growth and polysaccharide production were obtained using fluorescent light.

Key words: *Porphyridium cruentum*, polysaccharide production, light intensity

서 론

해양 홍조류 (red algae)의 하나인 *Porphyridium cruentum*은 산업적으로 이용 가치가 있는 조류로 분류되는데, 이는 성장 중에 phycobiliproteins나 카로테노이드 계통의 적황색 색소 (Bermejo Román et al., 2002), 고도불포화 지방산으로 구성된 지방질 (Cohen and Cohen, 1991) 및 porphyrin과 같은 다당류 (Percival and Foyle, 1989) 등의 다양한 물질을 생산하기 때문이다 (Richmond, 1986). 한편, *Porphyridium* 속이 생산하는 당류는 강한 점성을 가진 다당으로 대형 조류인 김과 같은 홍조류가 생산하는 당질인 porphyrin과 유사한 3,6-anhydro-L-galactose, D,L-galactose, sulfate 등으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있으며, 구성당의 종류에서는 대형 홍조류에서 유래한 것 보다 더 복잡한 D-xylose, D-glucose, 3-O-methylxylose, 3,4-O-methylgalactose, D-glucuronic acid 등의 조성을 하고 있는 것으로 밝혀져 있다 (Lupescu et al., 1991; Geresh et al., 1992). 이러한 특성을 가진 당질은 이미 다당으로서 연구용이나 일부 산업적 용도로 이용되고 있으며, biopolymer로서 그 용도의 범위를 넓혀가고 있는 추세에 있다 (You and Barnett, 2004). 최근 해조류 다당의 생리활성이 주목을 받으면서 다양한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데 (Joo and Cho, 2007), porphyrin 다당과 관련해서는 대형 홍조류에서 유래하는 porphyrin으로부터 기능성 물질의 생산을 위한 일련의 연구가 이루어지고 있으며 (Osumi et al., 1998), 다당 자체의 기능성뿐

만 아니라 다당을 적절한 효소로 가수분해하여 만든 올리고당의 항암 및 항콜레스테롤 효과에 대해서 연구가 이루어진 바 있다 (Arad et al., 1993; Osumi et al., 1998). 그러나 porphyrin 다당의 활용성에도 불구하고 대형 조류에 함유된 소량의 porphyrin을 추출하여 산업적으로 활용하는 데는 여러 가지 한계를 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 porphyrin 다당을 해양 조류인 *P. cruentum*으로부터 생산하기 위해 배양 조건에 따른 *P. cruentum*의 성장 및 porphyrin 다당 생산량을 측정하였다.

재료 및 방법

사용 조류

본 실험에 사용한 조류는 *Porphyridium cruentum* 13801-C (Gottingen Universitat, Sammlung von Algen kulturen, Germany)로 독일 미세조류은행로부터 분양받아 사용하였다.

배양 배지

P. cruentum 배양에 사용된 배지는 해수로 만든 배지로 해수 905 mL에 soil extract 30 mL, 1% KNO₃ 20 mL, 0.1% MgSO₄·7H₂O 20 mL, 0.1% K₂HPO₄ 20 mL, micronutrient soln. (H₃BO₃ 2.0 g, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g, CuSO₄·5H₂O 0.5 g, NaMoO₄·2H₂O 1.0 g, MnSO₄·4H₂O 2.0 g, Co (NO₃)₃·6H₂O 1.0 g, EDTA 0.4 g, FeSO₄·7H₂O 0.7 g in 1,000 mL D.W.) 5 mL을 혼합한 배지를 사용하였으며, 토양 추출물은 15분간 고온추출 (121 °C, 15 Lb) 하고 동일한 조건에서 15분간 멸균한 것을 사용하였다.

*Corresponding author: dsjoo777@hanzhong.ac.kr

배양 조건

배양 온도, 빛 강도, 광원, nitrate (KNO₃) 농도 등의 배양조건을 달리하면서 pH, 조체량 및 당질의 함량을 측정하였다. 조체 성장 및 당질 생산 조건 규명을 위한 배양 실험은 실린더형 배양 장치를 이용하였는데 (Joo et al., 1998), 공기 주입량은 25 L/min였으며, 온도 및 빛 강도 조절이 가능한 광배양기 (Versatile Environmental Testing Chamber, Sanyo, Japan)를 이용하였다. 빛은 적, 청, 녹색의 셀로판지를 이용하여 빛이 선택적으로 투과되도록 조절하였다.

pH 및 조체량 측정

배양 중 pH 측정은 pH meter를 이용하였으며, 조체량 측정은 건조기에서 건조하여 무게를 측정하여둔 microfilter paper (0.2 μm)로 배양액 5 mL를 여과하고 5 mL의 생리식염수로 수세한 여지를 110 °C로 조절된 건조기에서 3시간 건조 후 건조무게로부터 구하였다. 한편, 미세조류 성장은 배양 시작 시점의 조체량 (x₀)에 대한 각 측정 시점의 조체량 (x)의 비로 상대적인 성장 정도를 비교하였다.

당질 함량 측정

당질 함량은 phenol-sulfuric acid법 (Dubois et al., 1958)의 전당 측정법에 따라 시료 용액 1 mL (필요시 적절한 농도로 희석하여 사용)를 시험관에 취하고 5% phenol 용액 1 mL을 가한 후 혼합하고 진한 황산 5 mL를 반응액에 직하하여 가능한 한 발열시키면서 발색시켰다. 이 반응액을 실온에서 30분간 방치한 후 480 nm에서 흡광도를 측정하여 glucose를 이용하여 구한 표준 검량선으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

빛 강도에 따른 성장 및 당질 함량

배양 온도 25 °C (Jones, 1963)에서 빛 강도를 1,200, 1,400, 1,600 및 1,800 lx로 달리하여 10일간 배양하면서 pH 및 조체량의 변화를 확인하였다 (Fig. 1). 빛 강도 1,200 및 1,400 lx의 조건에서는 배양 6일째까지는 pH가 상승하다가 이후 약간씩 낮아지는 경향이였다. 빛 강도 1,600 lx의 조건에서는 배양 4일째까지 빠르게 증가하여 pH 8.5에 도달한 후 서서히 낮아지는 경향을 보였으며, 1,800 lx의 조건에서는 배양 3일째에 pH 7.4로 약간 증가한 후 급격하게 낮아졌다. 조체량은 1,200 lx에서는 7일째, 1,400 lx에서는 6일째, 1,600 lx에서는 7일째 각각 1.75 mg/mL, 1.95 mg/mL, 2.2 mg/mL로 최대값을 보였고, 이후 배양시간이 경과해도 커다란 변화가 없었다. 반면, 1,800 lx의 빛 강도 조건에서는 배양 3일째 1.1 mg/mL로 최대량에 도달한 후 조체량이 감소하면서 사멸하는 것으로 나타났다. You and Barnetty (2004)는 *P. cruentum*의 배양에서 빛 강도가 조체의 성장에 미치는 영향은 배양시간에 따라 달라진다는 것을 확인한 바 있다. 특히 빛 강도에서 높은 조건에서는 초기 조체 증가가 느렸지만 일정 시간 이후에는 오히려 조체량의 증가가 현저하게 높아지는 것을 관찰하였는데, 본

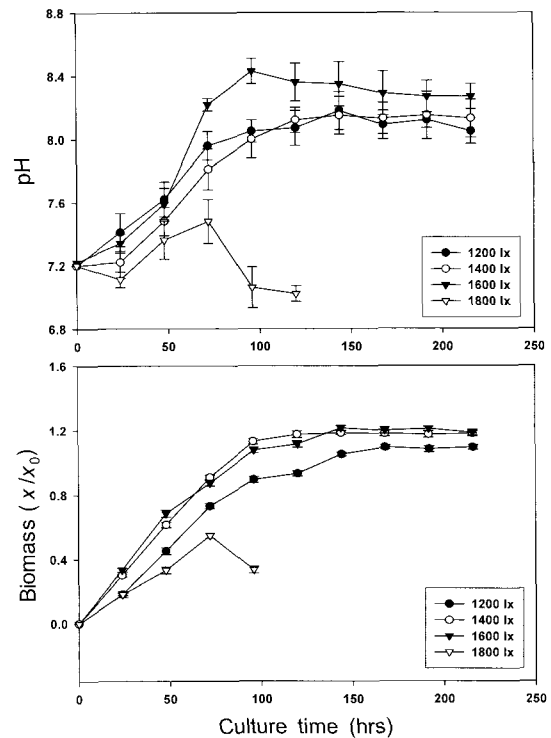


Fig. 1. Effect of light intensity on *Porphyridium cruentum* growth with culture time at 25 °C.

실험에서와는 차이가 있는 것으로 확인되었다. 또한 Arnaud et al. (2003)은 batch형 배양기에서는 배양 30일까지 지속적으로 증가하는 것으로 확인되었다.

한편, 배양 조건에 따른 조체의 전당 함량을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 배양 6일째 최대 조체량을 보였던 1,400 lx 빛 강도 조건의 경우, 배양 6일째까지는 증가하다가 0.23 mg/mL로 최대값을 보인 후 배양 9일째까지 약간 감소하는 경향을 보였다. 1,200 lx 조건에서는 배양 3일째에 0.18 mg/mL에 도달하였고, 1,600 lx 조건에서는 배양 4일째에 0.17 mg/mL에 도달한 다음 감소하거나 큰 변화가 없었다. 이러한 결과는 조체의 성장과 당질 함량은 비례하는 상관관계를 가지는 것으로 확인되었다. You and Barnett (2004)는 조체의 균체 외 당질 생산은 빛 강도가 클수록 당질 함량이 높았고, 특정 빛 강도 이상에서는 오히려 당질 생산량이 떨어지는 것을 확인한 바 있다.

온도 변화에 따른 성장 및 당질 함량

당질 생산이 가장 높았던 1,400 lx로 고정하고 배양 온도를 20, 25 및 30 °C로 달리하면서 pH 및 조체량의 변화를 확인한 결과 (Fig. 3), 20 °C에서는 6일째까지 pH가 급격히 증가하여 8.8 정도에 도달한 다음 급격하게 감소하는 경향을 나타내었으며, 조체량도 배양 6일째에 2.3 mg/mL로 최대값에 도달한 후 큰 변화가 없었다. 25 °C에서는 배양 5일째에 pH 8.1에 도달한 후 배양 9일째까지 큰 변화가 없었으며, 조체량은 배양 4일째에 1.8 mg/mL 정도에 도달한 다음 큰 변화가 없었다.

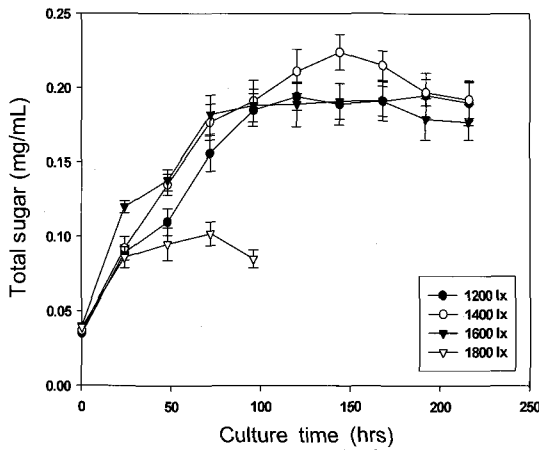


Fig. 2. Changes of total sugar content with culture time on each light intensity at 25°C.

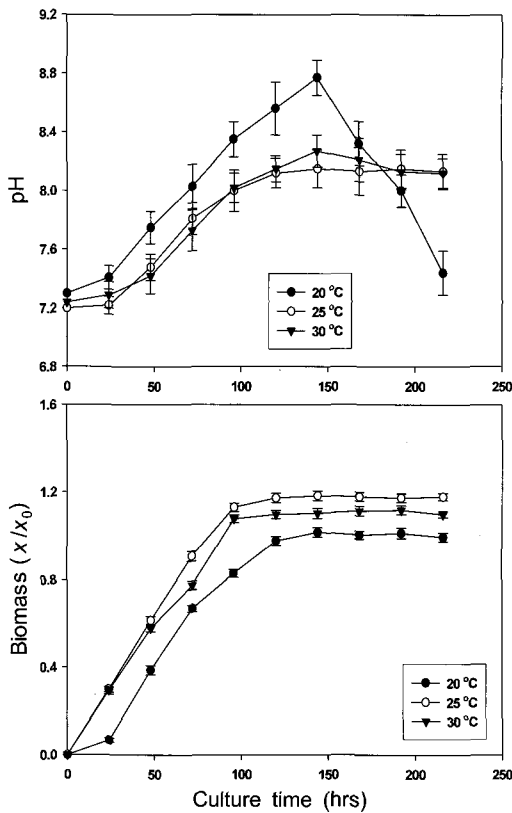


Fig. 3. Effect of temperature on *Porphyridium cruentum* growth with culture time at 1,400 lx.

한편, 30°C 조건에서도 20°C 조건과 마찬가지로 배양 6일째 까지 빠르게 pH가 증가한 후 감소하였는데, 최대 pH는 8.2로 20°C 조건보다는 약간 낮았으며, 조체량의 증가 정도는 25°C 조건과 큰 차이가 없었다. 배양액의 전당 함량은 20 및 30°C 조건에서는 최대 0.14-0.16 mg/mL 정도에 도달한 후 큰 변화가 없었고, 배양 온도 25°C 조건에서는 배양 6일째 최대 0.23 mg/mL에 도달한 후 배양 9일째까지 약간 감소하는 경향을

나타내었다 (Fig. 4). Jorge and Marco (2004)는 *P. cruentum*로부터 phycoerythrin의 생산에 있어서 22-25°C의 온도 조건이 적절하여 이 온도 조건에서 조류를 배양한 바 있으며, 본 실험의 porphyrin 다당 생산 조건과도 일치하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서 실험 조체의 배양 온도 조건은 균체 성장과 당질의 생산량으로 판단해 볼 때 25°C 조건이 적절한 것으로 여겨졌다.

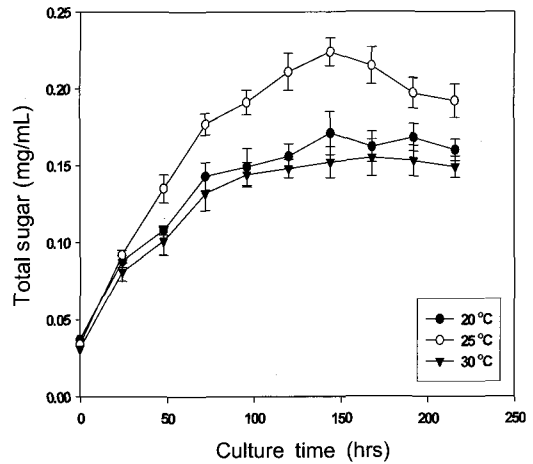


Fig. 4. Changes of total sugar content with culture time on each temperature at 1,400 lx.

광원에 따른 성장 및 당질 함량

광원에 따른 pH 변화 및 조체의 성장을 실험한 결과는 Fig. 5와 같다. 광원은 형광색, 청색, 적색 및 녹색으로 하였고, 조사된 빛의 강도는 각각 1,400, 650, 450 및 620 lx였다. pH 변화는 4종류 빛의 종류에 따른 차이는 별로 없었으며, pH 8.0 정도로 최대값에 도달한 다음 큰 변화가 없었다. 조체량에 있어서는 다소의 차이를 보여주고 있는데, 형광빛의 경우 배양 5일째에 1.9 mg/mL로 최대에 도달한 다음 배양 9일까지 큰 변화가 없었다. 그러나 청색광의 경우 배양 9일째까지 지속적으로 증가하여 배양 9일째 1.4 mg/mL 도달하였고, 녹색은 1.2 mg/mL, 적색은 1.0 mg/mL로 조체의 성장이 저조한 것으로 확인되었다. Fig. 6은 빛의 종류에 따른 당질 함량을 비교한 결과로 형광빛 조건은 배양 시간에 따라 서서히 증가하여 배양 6일째 0.23 mg/mL로 최대값에 도달한 후 배양 9일째까지 약간 감소하는 경향을 보였으며, 그 외 청색, 적색 및 녹색은 배양 5일째 0.13 mg/mL 정도에 도달한 다음 배양 9일째까지 큰 변화가 없었다. 한편, 광원을 조절하면서 빛 강도가 낮아진 것이 배양에 영향을 미칠 것으로 여겨져 빛 강도를 1,400 lx로 조절하면서 광원을 달리하였을 때의 조체의 성장을 확인한 결과 (Fig. 7), pH는 배양 5일째까지 모두 지속적으로 증가하였고, 형광색이 pH 8.1이었고 그 외 광원도 pH 8.0 정도로 형광색과 큰 차이를 보이지 않았다. 아울러 조체량에서는 형광색의 경우 초기농도에 대한 비가 배양 4일째에 1.2 정도였고, 배양

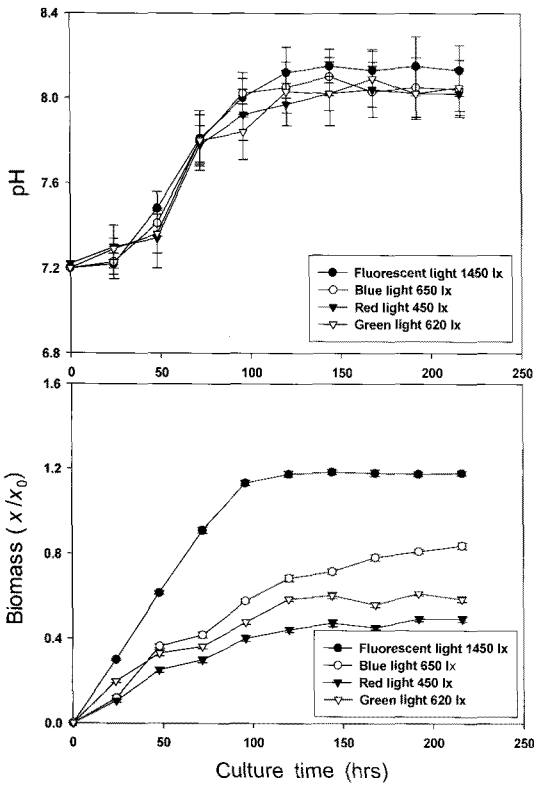


Fig. 5. Effect of light quality on *Porphyridium cruentum* growth with culture time on each light intensity at 25°C.

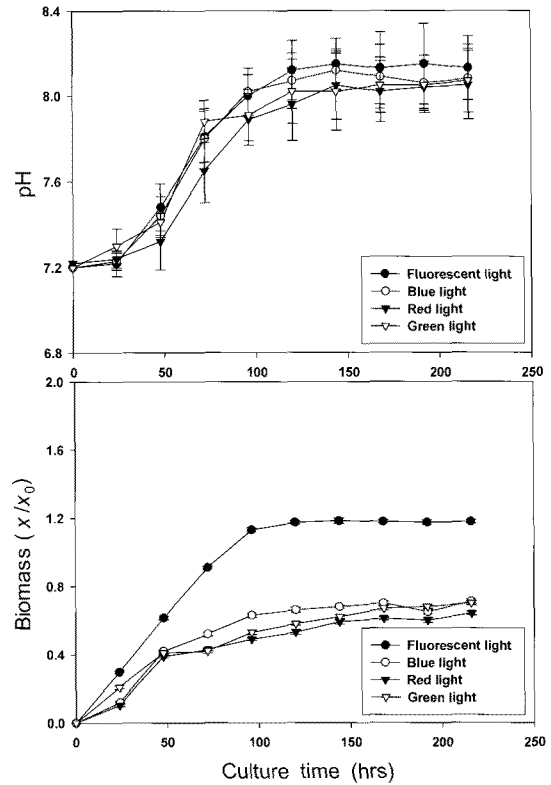


Fig. 7. Effect of light quality on *Porphyridium cruentum* growth with culture time at 1,400 lx and 25°C.

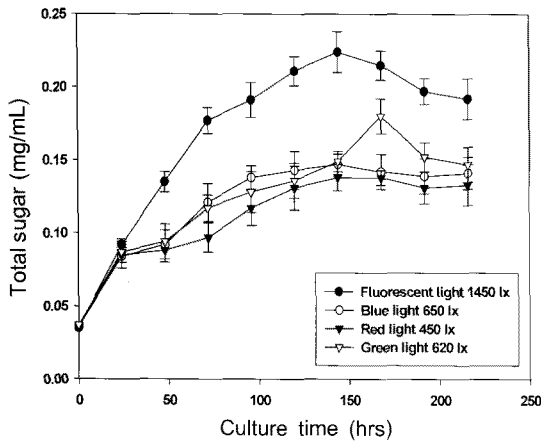


Fig. 6. Changes of total sugar content with culture time on each light quality at 25°C.

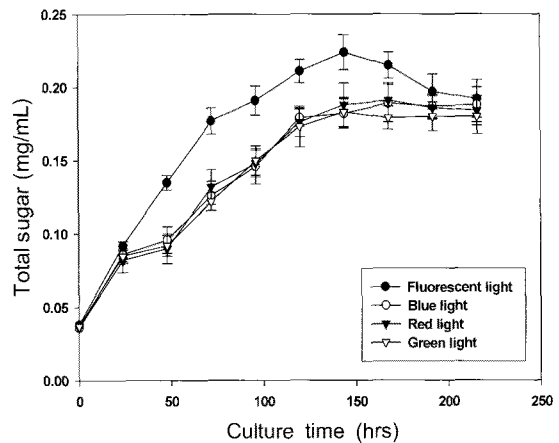


Fig. 8. Changes of total sugar content with culture time on each light quality at 1,400 lx and 25°C.

9일째까지 큰 변화가 없었으며, 그 외의 광원은 5일째에 초기농도에 대한 비가 0.5 정도에 도달한 후 배양 9일째까지 큰 변화가 없었다. 이러한 결과는 빛 강도를 조절하지 않은 조건에 비해서는 약간 증가한 값을 나타내었으나 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있었다. 당질 함량에서는 형광색을 제외한 청, 적 및 녹색의 빛 종류에 따른 최대값이 0.17 mg/mL로 빛 강도를 조절하지 않은 것과 비교하면 높은 값을 나타내었으나 형광색 조건의 0.23 mg/mL에는 미치지 못

하였다 (Fig. 8). 한편, You and Barnett (2004)은 적색, 청색 및 형광색을 광원으로 하여 *P. cruentum*의 성장 및 다당 생산을 실험한 결과, 광합성 과정에서의 특성으로 인해 청색에서 가장 높은 당질 생산을 보였지만 유의성이 있는 결과는 아니었다고 보고한 바 있다. 그러나 본 연구와는 상이한 결과였으며, 빛 강도를 달리한 것에서도 상이한 결과를 보여주고 있다.

이상의 결과로부터 광원에 따른 조체 성장 및 당질 생

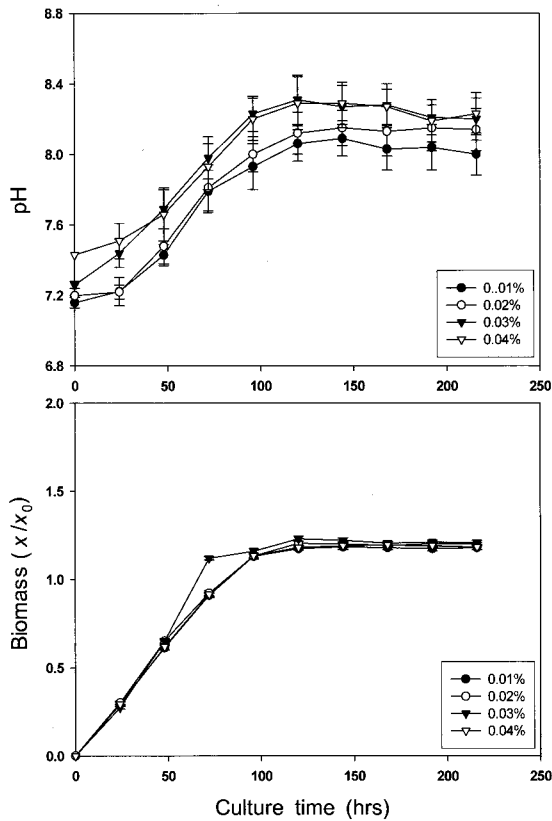


Fig. 9. Effect of nitrate concentration on *P. cruentum* growth with culture time at 1,400 lx fluorescent light and 25 °C.

산에는 차이가 있는 것으로 나타났으나, 형광색을 제외하
 청, 적 및 녹색광원의 종류에 따른 조체의 성장이나 당질
 생산에는 결정적인 역할을 하지는 못하는 것으로 확인되
 였다.

질소원 농도에 따른 성장 및 당질 함량

질소원으로 nitrate (KNO_3)의 최종 농도를 달리하여 배양
 하면서 pH 및 조체량의 변화를 확인한 결과 (Fig. 9), 초기
 pH는 nitrate의 농도가 높을수록 높게 나타났고, 배양 5일째
 에 최대에 도달한 후 약간 감소하며 전체적인 경향은 nitrate
 의 농도가 높을 수록 pH는 높게 나타났다. 한편, nitrate의 농
 도가 높아질수록 조체량도 높아졌고, 배양 6일째 이후에는
 큰 변화가 없었으나 0.01% 농도에 비해 전체적으로 높은 값
 을 나타내었고 0.03% nitrate 농도에서 최대 조체량을 나타내
 었다. 당질의 함량은 0.01% nitrate 농도를 제외하고는 비슷
 한 당질 함량의 변화를 나타내었고, 6일째에 최대값에 도달
 한 후 큰 변화를 나타내지 않았으며 0.03% nitrate 농도에서
 가장 높은 값을 나타내었다 (Fig. 10). 이는 Arad et al. (1988)
 은 *Porphyridium* sp.의 성장과 다당의 생산에 질소원이 중요
 한 역할을 하는 것으로 지적하고 있는데, 본 실험에서도
 nitrate가 조체의 성장이나 당질 생산에 약간의 영향을 주는
 것으로 확인되었다.

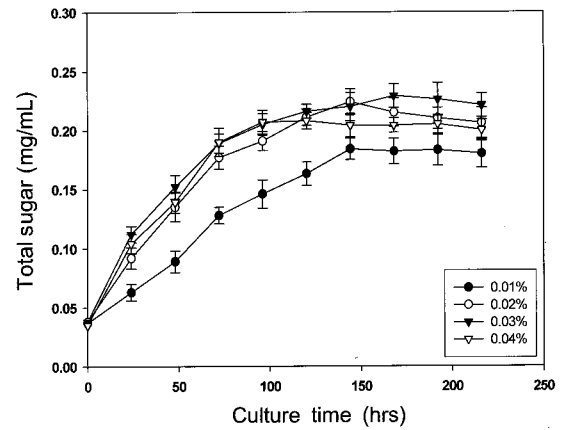


Fig. 10. Changes of total sugar content with culture time on each nitrate concentration at 1,400 lx fluorescent light and 25 °C.

사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물
 자원연구센터 (RIC)의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

- Arad, S.G., G. Keristovesky, B. Simon, Z. Barak and S. Geresh. 1993. Biodegradation of the sulfated polysaccharide of *Porphyridium* by soil bacteria. *Phytochem.*, 32, 287-290.
- Arad, S.G., O. Friedman and A. Rotem. 1988. Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyridium* sp. *App. Environ. Microbiol.*, 54, 2411-2414.
- Arnaud, M.F., G. Roland and P. Jérémy. 2003. Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. *J. Biotech.*, 103, 153-163.
- Bermejo Román, R., J.M. Álvarez-Pez, F.G. Fernández and E. Molina Grima. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotech.*, 93, 73-85.
- Cohen, Z. and S. Cohen. 1991. Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *JAOCS*, 68, 16-19.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1958. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Aal. Chem.*, 28, 350-356.
- Geresh, S., N. Lupescu and S. Arad. 1992. Fractionation and partial characterization of the sulfated polysaccharide of *Porphyridium* sp. *Phytochem.*, 31, 4184-4186.

- Jones, R.E., H.L. Speer and W. Kury. 1963. Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Physiol. Plant*, 16, 636-643.
- Joo, D.S. and S.Y. Cho. 2007. Physiochemical properties of carrageenan hydrolysates by organic acids. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36, 262-268.
- Joo, D.S., M.G. Cho, R. Buchholz and E.H. Lee. 1998. Growth and fatty acid composition with growth conditions for *Spirulina platensis*. *J. Korean Fish. Soc.*, 31, 409-416.
- Jorge, B. and R.P. Marco. 2004. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J. Chrom.*, 807, 33-38.
- Lupescu, N., S. Arad, S. Geresh, M.A. Bernstein and R. Glaser. 1991. Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. *Carbohy. Res.*, 210, 349-352.
- Osumi, Y., M. Kawai, H. Amano and H. Noda. 1997. Purification and characterization of porphyran-decomposing enzymes from *Arthrobacter* sp. S-22. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 63, 757-764.
- Percival, E. and R.A.J. Foyle. 1989. The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aeruginium*. *Carbohy. Res.*, 72, 165-172.
- Richmond, A. 1986. Microalgae of economic potential. In *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A., ed. CRC Press, Florida, USA., 199-243.
- You, T. and S.M. Barnett. 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.*, 19, 251-258.

2008년 10월 2일 접수
2008년 12월 22일 수리