

*Chlorella miniata*의 고농도 배양을 위한 배양조건의 통계학적 최적화

염서희¹, 김소희¹, 박하영¹, 김지훈², 남현주³, 이창수⁴, 김진우^{156*}
¹선문대학교 식품과학과, ²휴에버그린팜, ³국립호남권생물자원관, ⁴국립낙동강생물자원관,
⁵선문대학교 차세대 반도체기술연구소, ⁶프렉스프로FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

Optimization of Culture Conditions for High Cell Density Culture of *Chlorella miniata* Using Statistically-based

Suh Hee Yeom¹, So Hee Kim¹, Ha Young Park¹, Z-hun Kim²,
Hyun Ju Nam³, Chang Soo Lee⁴, Jin Woo Kim^{156*}

¹Department of Food Science, Sunmoon University

²BioJarham, Hu evergreen Pharm Inc.

³Honam National Institute of Biological Resources

⁴Nakdonggang National Institute of Biological Resources

⁵Center for Next-Generation Semiconductor Technology

⁶FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

요약 본 연구는 국립낙동강생물자원관 생물자원은행에서 분양받은 담수 미세조류인 *Chlorella miniata*의 세포 성장과 루테인 생성 증진을 위해 배양 조건을 반응 표면 분석법을 이용하여 통계학적 최적화를 수행하였다. 배양 조건의 주요 독립변수는 폭기(0.03 ~ 0.18 v.v.m.), 광도(0.0 ~ 800.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)와 온도(18.0 ~ 28.0°C)로 설정하였으며 배양 조건이 세포 성장에 미치는 영향을 예측하기 위해 17개 실험조건을 설계하고 실험 결과를 바탕으로 2차 회귀 모델을 도출하였다. 배양 최적 조건은 0.13 v.v.m., 595.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 25.8 °C로 확인되었으며 최적 조건에서 42시간 배양 시 3.29 (OD₆₈₀)로 세포가 최대 성장하였다. 배양 최적 조건 도출 후 최적 배양 조건에서 성장된 *C. miniata*의 루테인 함량을 HPLC를 이용하여 평가하였을 때 세포 농도 증가와 함께 루테인 생산성이 25 % 이상 증가함이 확인되어 통계학적 최적화를 통해 세포성장이 효과적으로 증가되고 결과적으로 루테인 생산 증가에 기여하였다.

Abstract In this study, culture conditions were optimized using response surface analysis to enhance the cell growth and lutein production of *Chlorella miniata*, a freshwater microalgae received at the freshwater bioresources culture collection of the Nakdonggang National Institute of Biological Resources. The main independent variables selected for the culture conditions were aeration (0.03 ~ 0.18 v.v.m.), light intensity (0.0 ~ 800.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), and temperature (18.0 ~ 28.0 °C). To predict the effect of culture conditions on cell growth, second-order regression models were derived based on the results of 17 experimental sets. The maximum cell growth of 3.29 (OD₆₈₀) was obtained at 42hr under 0.13 v.v.m., 595.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, and 25.8°C. *C. miniata* was subsequently cultured under the optimal culture conditions and the lutein content was evaluated using HPLC. Increased cell growth was observed under optimal culture conditions, and lutein productivity was determined to increase by more than 25 %. Our results indicate that statistical-based optimization of culture conditions effectively increases the cell mass and subsequently contributes to increased lutein production.

Keywords : Microalgae, *Chlorella Miniata*, Optimization, Cultivation, Cell Growth

본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 다부처 국가생명연구지원 선진화사업의 지원을 받아 연구되었습니다.(2021003420004)

*Corresponding Author : Jin Woo Kim(Sunmoon Univ.)

email: Kimjw1028@sunmoon.ac.kr

Received February 17, 2023

Revised March 28, 2023

Accepted April 7, 2023

Published April 30, 2023

1. 서론

미세조류는 강, 바다와 호수 등의 수서 환경에서 서식하는 식물성 플랑크톤으로 전 세계에 50여 만종이 존재하여 높은 종 다양성이 보고되고 있으며 높은 광합성 효율로 육상식물 대비 최대 10배 이상의 탄소 고정능과 바이오매스 생산성으로 탄소 순화 및 바이오매스 생산자로 중요한 역할을 하고 있다[1]. 또한, 미세조류는 수생태계의 부영양화 및 수질 오염 원인이 되는 질소와 인 등의 영양염류 제거에 활용되며 최근 차세대 바이오디젤을 고생산이 가능한 생물자원으로 주목받고 있다[2]. 이러한 미세조류는 광합성 작용과 대기 중의 이산화탄소 및 수중 유기물 활용을 통해 1차 대사산물인 단백질, 지질 및 당질뿐만 아니라 2차 대사산물인 생리활성물질을 생산하며 그 중 카로티노이드는 루테인, 베타카로틴과 아스타잔틴 등을 포함하며 항산화, 항암, 심장병 예방과 노인성 황반 변성 억제 등의 다양한 가능성이 보고되어 고부가가치 생물 소재로서 가치가 높아지고 있다[3,4].

미세조류 배양을 통한 바이오매스 및 유용물질 생산에 있어 광도, 온도, 이산화탄소 농도, 영양 조건 및 폭기 등이 주요 배양 인자로 인식되고 있어 미세조류로부터 생리활성물질을 효과적으로 생산하기 위해서는 배양 인자 최적화가 선행되어야 한다[5,6]. 미세조류 대량 배양을 위한 배양조건 최적화에 있어 단일 변수 기반 최적화는 독립변수 간 상호작용 파악이 어렵고 많은 수의 실험군이 필요하여 인력과 시간을 포함한 비용 증가의 단점이 존재한다[7]. 이와 같은 문제점 해결을 위해 독립변수 간 교호작용 확인이 가능한 통계학적 최적화의 일종인 반응표면분석법(response surface methodology)이 최적화에 널리 활용되고 있다[8]. 반응표면분석법은 다수의 공정변수가 독립 또는 교호작용을 통해 종속변수에 영향을 주었을 때, 최소의 실험 횟수로부터 공정변수 예측을 위한 정보를 효과적으로 얻을 수 있는 실험계획법으로 최적 조건을 효과적으로 예측하는 도구로 생물공학 분야에서 공정 개발에 널리 사용되고 있다[9].

본 연구에 사용된 담수 미세조류인 *Chlorella miniata*는 *Chlorella* 종으로 녹조식물문에 속하며 직경이 2.0~10.0 μm 인 단세포 구형 식물로 광합성 효율이 우수하다고 알려져 있고 특히 2차 대사산물인 루테인, 알파카로틴과 베타카로틴이 다량 함유되어 바이오매스 산업분야에 활용된다[10]. 또한 기존 연구결과에 따르면 *C. miniata*의 베타카로틴, 루테인 등의 2차 대사산물을 기반으로 항산화 및 항염증 효능이 알려져 있다[11]. 하지

만 *C. miniata*의 2차 대사산물 생산간의 상관성 및 세포 농도 증대를 위한 공정 조건 탐색 관련 연구는 진행되지 않는 실태이다. 따라서 본 연구에서는 담수 미세조류인 *C. miniata* 세포농도 증대에 따른 2차 대사산물 증가를 목적으로 배양의 주요 독립변수인 광도, 폭기 및 온도를 반응표면분석법을 이용하여 최적화를 수행하였으며 이를 대량 배양을 위한 기초자료를 제공함과 함께 고부가가치 유용물질 생산 가능성을 평가하여 식품, 화장품 및 의약품 소재로 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

연구에 사용된 균주인 *C. miniata* (FBCCA1186)는 국립낙동강생물자원관 생물자원은행(Freshwater Bioresources Culture Collection; FBCC)에서 분양받아 사용하였다. *C. miniata*의 배양을 위한 배지 선정을 위해 사용된 BG11과 Bold's basal medium은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구매하였다. 또한, 루테인 함량 분석을 위한 표준물질과 HPLC 이동상인 methanol, ammonium acetate와 acetate buffer는 Sigma-Aldrich의 제품을 사용하였다.

2.2 미세조류 종균배양

*C. miniata*의 종균배양을 위해 BG11을 사용하였으며, 배양은 250 mL 기포탑 원통형 광생물반응기(bubble column photobioreactor)를 이용하여 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하며 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광량을 조사하며 진행하였으며, 폭기를 위해 공기와 이산화탄소를 혼합하여 5 % 이산화탄소를 배양기 하단부로부터 0.1 v.v.m.로 연속 공급하고 미세조류의 계대배양은 10일 간격으로 진행하였다.

2.3 미세조류의 배양조건 최적화

C. miniata 배양의 최적 폭기, 광도와 온도를 탐색하고자 초소형 광생물반응기(photobiobox, Shinhwa science, Daejeon, Korea)를 이용하여 배양조건 최적화를 수행하였다. 앞선 종균배양에서 대수 성장기인 48 시간에서 확보된 *C. miniata*를 초소형 광생물반응기에서 배양을 위해 0.4 ~ 0.5 (OD_{680})로 세포농도를 조정하고 BG11를 기본 배지하여 96-well plate (Corning

Inc., Corning, USA)에 각 200 μL 분주하여 17 개 배양조건에서 세포 성장을 비교하였다. 중심합성계획(central composite design)에 따라 초소형 광생물반응기의 온도와 광도를 10.0 ~ 35.0°C, 100.0 ~ 700.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 0.03 ~ 0.18 v.v.m.로 각 well의 조건을 유지하였다. 초소형 광생물반응기의 배양부피가 200 μL 한정되어 건조세포증량 측정이 불가하여 미세조류의 세포 성장은 마이크로 플레이트 리더기(Multiskan GO, Thermo Sci., Waltham, USA)를 이용하여 각 시료채취 시간에서 흡광도(OD₆₈₀)를 측정하여 비교하였다.

2.4 루테인 추출 및 함량 분석

*C. miniata*의 루테인 함량 분석을 위해 미세조류 배양액을 2,000 g에서 20분간 원심분리를 한 뒤 상등액을 제거하고 미세조류를 회수하였다. 수확된 균체는 잔류 배지 성분과 세포 조각(cell debris)을 제거하기 위해 증류수로 세척한 후 원심분리하고 동결건조기(FD8512, Ilshinbiobase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 수거된 미세조류를 건조하여 분석 시료로 사용하였다. 시료 건조체 0.2 g과 10 mL의 90 % 아세톤을 혼합 후 초음파추출기(Powersonic 410, Hwashin tech, Daegu, Korea)로 30분간 추출하였다.

미세조류 추출물의 루테인 함량은 high performance liquid chromatograph (HPLC; Agilent, Santa clara, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석을 위해 Luna 3 μm C8 analytical column (100 Å 150 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA)이 사용되었고 컬럼의 온도는 45°C로 설정하고 10 μL 의 시료를 HPLC에 주입하여 55분간 물질분리를 진행하였다. 이동상으로 아세토니트릴(A)과 메탄올(B)를 사용하여 혼합비를 5 % B→35 % B (15분), 35 % B (5분), 35 % B→60 % B (15분), 60 % B→100 % B (10분), 100 % B (10분)로 설정하였다.

2.5 실험 계획법

미세조류 배양조건이 세포 성장에 미치는 영향을 회귀함수를 이용하여 예측하기 위해 Design expert 9.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA)으로 중심합성계획(central composite design)을 적용시켜 17 개 조건에서 실험을 진행하였다. 독립변수(X_n)로 폭기(X_1 , 0.03 ~ 0.18 v.v.m), 광도(X_2 , 50.0 ~ 800.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)와 온도(X_3 , 18.0 ~ 28.0 °C)를 선정하였으며 각 독립변수를 5단계(-1.68, -1.00, 0, +1.00, +1.68) 수준으로 부

호화된 17 가지 조건으로 실험을 진행하여 조건과 실험값의 상관관계를 2차 회귀함수를 통해 도출하였다 (Table 1). 2차 회귀함수의 독립변수와 종속변수의 상호관계에 따라 반응표면분석법에 기반한 모델, 1차항, 2차항, 교차항 및 적합성의 유의성(p value)에 대한 ($p < 0.05$) 여부를 확인하였고, 결정계수(R^2)를 확인하여 예측치와 실험값의 합치도에 기반한 회귀함수의 적합성을 판정하여 최적 조건을 예측하였다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_1^2X_1X_2 + b_1^3X_1X_3 + b_2^3X_2X_3 + b_1^1X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^3X_3^2$$

-Eq. (1)

각 실험의 회귀분석 결과는 아래의 2차 회귀함수로 나타내어 독립변수(X_n : 폭기, 광도, 온도) 및 종속변수(Y_n : 시간별 미세조류 세포 농도)의 적합성은 종속변수에 대한 최댓값을 설정하여 분석하였으며 회귀함수는 아래와 같이 나타내었고 X_n^2 은 독립변수의 이차항, b_0 는 y 절편과 b_n 은 회귀계수를 나타낸다.

Table 1. Main independent variables and levels for optimization of *C. miniata* growth based on coded and actual values of central composite design

X_n	Independent variables	Coded levels				
		-1.68	-0.84	0	0.84	1.68
X_1	Aeration (v.v.m.)	0.03	0.06	0.11	0.15	0.18
X_2	Intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	50.0	202.0	425.0	648.0	800.0
X_3	Temperature (°C)	18.0	20.0	23.0	26.0	28.0

3. 결과 및 고찰

3.1 배양조건에 따른 세포 성장

통계학적 최적화를 이용한 세포 성장 최대화에 앞서 광생물배양기에서 *C. miniata* 배양 특성을 확인하고자 미세조류 배양의 기본배양 조건인 0.05 v.v.m., 200.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 25.0°C에서 세포 성장 경향을 확인하였다(Fig. 1). 초기 세포집중 농도는 0.49 (OD₆₈₀)로 접종하였으며, 세포성장은 배양 18시간까지 적응기를 거치며 24시간에 대수 성장기에 접어들어 48시간까지 비례적으로 증가하였으며 48시간에 최고 세포 성장에 도달한 후 다시 감소하는 경향을 보였다. 이는 *C. vulgaris*가 24시간 배양 시 대수성장기가 시작됐다는 연구 결과와 동일

하며 *chlorella* 중 일부의 대수성장 도입기가 24시간 배양시 시작되는 것으로 사료된다[12]. 따라서 *C. miniata* 세포 성장곡선을 기반으로 할 때, 향후 최적화 실험에 있어 대수 성장기 도입기와 말기인 24시간과 42시간을 기준으로 중심합성계획법을 이용한 최적화를 수행함이 적절할 것으로 판단되었다.

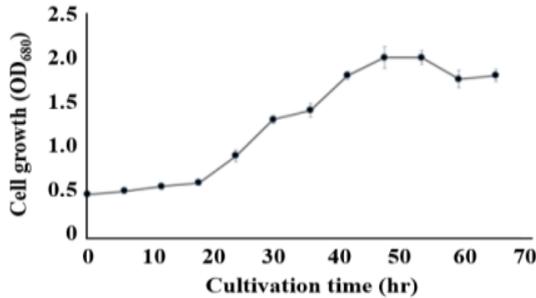


Fig. 1. Cell growth profile of *C. miniata* under 0.05 v.v.m., 200.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, and 25.0 $^{\circ}\text{C}$ in photobiobox with 200 μL culture volume.

3.2 세포량 증대를 위한 실험 계획법

앞선 *C. miniata*의 세포 성장특성에 기반하여 대수 성장 초기 및 말기의 2 개의 성장 단계를 최적화 대상으로 선정하여 중심합성계획법의 17 개 배양조건에 따라 최적화를 수행하였다. 이때, 42시간에서 최대 세포 농도인 3.09 (OD₆₈₀)가 14번 배양조건에서 확인된 반면 최소 세포 농도인 0.38 (OD₆₈₀)이 11번 조건에서 나타남에 따라 온도와 광도가 세포 성장에 영향을 미침이 확인되었다(Table 2). 특히, 14번(0.11 v.v.m., 425.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 28.0 $^{\circ}\text{C}$) 조건의 24시간과 42시간의 세포 농도가 각각 2.09 (OD₆₈₀)와 3.09 (OD₆₈₀)로 최대값이 나타나 중간수준의 폭기 및 광도와 높은 온도가 세포 성장을 증진함이 확인되었다.

배양조건에 따른 17 개의 실험값을 기반으로 시간별 세포 성장을 예측하기 위해 2차 회귀함수를 도출하고 예측된 회귀함수의 적합성 평가를 위해 결정계수인 R²값을 확인하였다. R²값이 1에 가까울수록 2차 회귀함수에 대한 예측값이 실험값과 유사하다고 평가되는데 24시간과 42시간에 대한 2차 회귀함수의 R²값은 각각 0.9029와 0.8981로 각각 90.3 %와 89.8 % 예측이 유효함이 확인되었다(Table 3). 또한, 분산분석 결과 24시간과 42시간의 p값은 각각 0.0081과 0.0094로 종속변수와 독립변수의 상관관계가 유의한 것으로 나타나 독립변수의 변화가 결과값에 영향을 미침이 판명되었다($p < 0.05$). 각 모

델, 독립변수 및 교호작용의 유의성 평가를 ANOVA를 통해 수행했을 때 24시간에서는 독립변수 3 개(폭기, 광도와 온도)의 p값이 0.05 이하로 나타나 모두 유의한 독립변수였으며, 42시간 또한 폭기, 광도와 온도의 p값이 0.05 이하로 모든 독립변수가 세포 성장에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되어 세포 성장에 있어 폭기, 온도와 광도 제어의 중요성이 확인되어 미세조류 대량 배양시, 해당 조건에 대해 최적화가 성장에 주요한 영향을 미칠 것으로 판단된다(Table 4).

Table 2. Independent variables and responses generated by 17 experiments at 24hr and 42hr of *C. miniata* cultured in photobiobox

Run No.	Culture conditions			Cell growth	Cell growth
	X ₁	X ₂	X ₃	OD ₆₈₀ (24hr)	OD ₆₈₀ (42hr)
1	0.06	202.0	20.0	0.58	1.13
2	0.15	202.0	20.0	1.20	2.11
3	0.06	648.0	20.0	0.72	1.27
4	0.15	648.0	20.0	1.27	2.12
5	0.06	202.0	26.0	0.72	1.77
6	0.15	202.0	26.0	1.26	2.40
7	0.06	648.0	26.0	1.21	2.70
8	0.15	648.0	26.0	2.06	2.94
9	0.03	425.0	23.0	0.35	1.07
10	0.18	425.0	23.0	1.49	2.78
11	0.11	50.0	23.0	0.44	0.38
12	0.11	800.0	23.0	1.37	2.78
13	0.11	425.0	18.0	0.75	1.86
14	0.11	425.0	28.0	2.63	3.09
15	0.11	425.0	23.0	1.36	2.70
16	0.11	425.0	23.0	1.38	2.83
17	0.11	425.0	23.0	1.31	2.68

X₁: aeration, X₂: intensity, X₃: temperature.

Table 3. Second-order regression equations generated by CCD for the optimization of the culture conditions of *C. miniata* at 24hr and 42hr of culture.

Responses	Regression models (Y)	R ²	p value
Cell growth (24hr)	$5.28182 + 17.64911X_1 - 1.11933 \times 10^3X_2 - 0.56641X_3 + 2.87718 \times 10^3X_1X_2 + 0.21613X_1X_3 + 2.02784 \times 10^4X_1X_3 - 78.79770X_1^2 - 3.34351 \times 10^6X_2^2 + 0.012406X_3^2$	0.9029	0.0081
Cell growth (42hr)	$8.82693 + 59.45209X_1 + 3.48865 \times 10^3X_2 + 0.46531X_3 - 6.37195 \times 10^3X_1X_2 - 0.89420X_1X_3 + 2.44249 \times 10^4X_1X_3 - 129.20902X_1^2 - 7.73888 \times 10^6X_2^2 - 7.55114 \times 10^3X_3^2$	0.8981	0.0094

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for effects of *C. miniata* culture variables on 24hr and 42hr using a second-order regression equations.

	24hr			42hr		
	Sum of squares	F value	P value	Sum of squares	F value	P value
Mod-el	4.80	7.24	0.0081	9.00	6.86	0.0094
X ₁	1.47	19.95	0.0029	2.26	15.50	0.0056
X ₂	0.69	9.30	0.0186	2.35	16.09	0.0051
X ₃	1.57	21.32	0.0024	2.01	13.78	0.0075
X ₁ X ₂	6.669×10 ⁻³	0.090	0.7724	0.33	0.22	0.6503
X ₁ X ₃	6.811×10 ⁻³	0.092	0.7701	0.12	0.80	0.4010
X ₂ X ₃	0.15	2.00	0.2006	0.21	1.46	0.2655
X ₁ ²	0.29	3.89	0.0891	0.77	5.29	0.0550
X ₂ ²	0.31	4.23	0.0789	1.67	11.45	0.0117
X ₃ ²	0.14	1.91	0.2100	0.052	0.36	0.5690

ANOVA: analysis of variance, X₁: aeration, X₂: intensity, X₃: temperature.

3.3 대수 성장 초기에서 배양조건 최적화

대수 성장의 초기인 배양 24시간에서 단일 독립변수가 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 일변수 조건 변경을 변경하여 초소형 광생물반응기에서 배양 실험을 수행하였다. 광도와 폭기를 중간값에 고정하고 온도가 세포 성장에 미치는 영향을 평가하였을 때 온도가 증가함에 따라 세포 성장이 증가하며 특히 23.0 °C 이후 급격하게 증가하는 경향이 확인되었다(Fig. 2A). 또한, 광도와 폭기의 영향을 확인하였을 때 각 변량이 증가함에 따라 세포 성장이 증가하다가 다시 감소하는 상향포물선 형태가 확인되었다. 결과적으로 배양 24시간에서 독립변수 3 개 모두 미세조류 성장에 유의한 인자로 확인되었으며 특히 온도가 미세조류 성장에 가장 유의한 영향을 미침을 분산분석 결과($p = 0.0024$)를 통해 재확인되었다(Table 4).

미세조류 성장에 미치는 독립변수 간의 상호영향 평가를 위해 하나의 독립변수를 중간값에 고정하여 두 변수를 동시에 변화시켜 변수 간의 교호작용을 반응표면곡선을 통해 시각화하였다. 온도를 23.0 °C에 고정하였을 때 광도와 폭기가 증가함에 따라 세포 성장이 증가하였으며 425.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 0.11 v.v.m.에서 최대 성장이 확인되었다(Fig. 3A). 또한, 광도를 425.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에 고정 시, 0.11 v.v.m.와 28.0 °C에서 최대값 2.63 (OD₆₈₀)이 확인되었으며 온도가 증가함에 따라 세포 성

장이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3B). 미세조류 배양에 있어 온도는 개방형 노지 또는 폐쇄형 배양기에서 배양 시 세포 성장에 가장 유의한 영향인자로 알려져 있다. 미세조류 종에 따라 매우 다양한 최적 온도 범위가 존재하나 최적 성장 온도는 일반적으로 15.0 ~ 26.0°C이며, 그중 많은 미세조류에서 23.0°C가 최대 세포 성장 확보가 가능한 최적 배양온도로 보고되고 있다[13]. 본 연구에서 확인된 *C. miniata*의 최적 배양 온도는 25.8°C과 26.0°C로 일반 미세조류에 비해 높은 것으로 이는 *Mychonastes homosphaera* 배양조건 연구에서 최적 온도가 26.0°C로 보고된 사례와 유사하게 *C. miniata*가 25.0°C 이상에서 최대 성장을 하는 미세조류 종으로 분류됨이 예상된다[14].

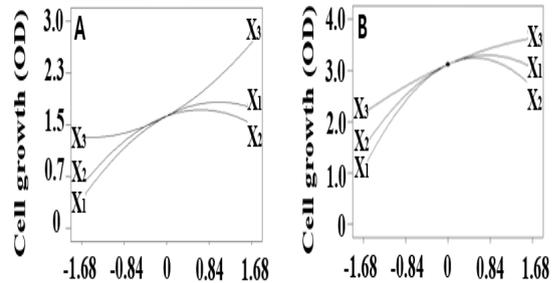


Fig. 2. Perturbation plots for the evaluation of the effect of three independent variables, including the aeration (X₁), light intensity (X₂), and temperature (X₃) on cell growth of *C. miniata* at 24hr (A) and 42hr (B).

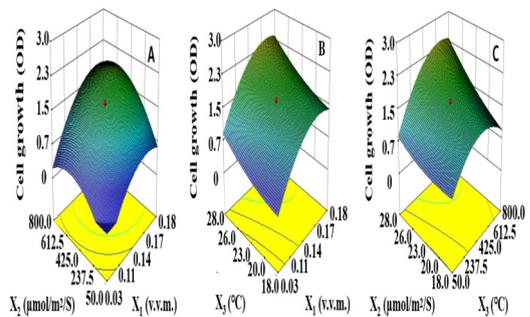


Fig. 3. Response surface plots represent the effect of two variables on cell growth of *C. miniata* at 24hr. The effect of changes on cell growth by function of light intensity and aeration (A), temperature and aeration (B), and temperature and light intensity (C). X₁: aeration, X₂: intensity, X₃: temperature.

3.4 대수 성장 말기에서 배양조건 최적화

초소형 광생물반응기에서 대수 성장 말기인 42시간의 세포 성장에 미치는 영향을 일변수 곡선을 통해 확인하였으며 광도와 폭기가 중간값에 고정되었을 때 온도가 증가함에 따라 세포 성장이 증가함을 보였으며 이는 24시간 배양 시, 세포 성장과 유사한 결과이다(Fig. 2B). 또한, 모든 독립변수가 42시간 배양 성장에 유의하게 영향을 미치며 특히 광도의 증가에 따라 미세조류 성장의 변화폭이 큰 것으로 나타나 앞선 분산분석과 동일하게 광도가 미세조류 성장에 가장 유의한 영향을 미친 것으로 예측되었다.

독립변수의 상호작용에 따른 세포 성장을 평가하기 위해 하나의 독립변수를 고정하고 나머지 두 독립변수의 범위를 변경하여 반응표면곡선을 확인하였다. 온도를 23.0°C에 고정하고 폭기와 광도의 상호작용 효과를 확인하였을 때, 폭기와 광도가 증가함에 따라 세포 성장이 비례하게 증가하다가 0.11 v.v.m.과 425.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 최대 성장값 2.83 (OD₆₈₀)을 보이는 상향포물선 형태가 확인되었다(Fig. 4A). 또한, 광도를 425.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에 고정하였을 때, 온도와 폭기가 증가함에 따라 세포 성장이 0.11 v.v.m.과 26.0 °C에서 최대로 증가한 후 감소하는 경향을 보여 온도와 폭기가 세포 성장에 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Fig. 4B). 결론적으로 42시간 배양에 있어 3 개의 독립변수가 세포 성장에 모두 유의하게 영향을 미치나 광도의 변화가 미세조류 성장을 조절하는 가장 중요한 독립변수로 확인되었는데 이는 Choi 등의 *C. vulgaris* 최적 배양연구에서 온도가 증가함에 따라 세포 성장이 증가하다가 400.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이상의 과량의 광량 공급에 따른 스트레스에 의해 세포 성장이 감소한다는 보고와 일치하는 결과로 광량의 최적화가 세포배양에 중요 인자임을 확인할 수 있었다[15].

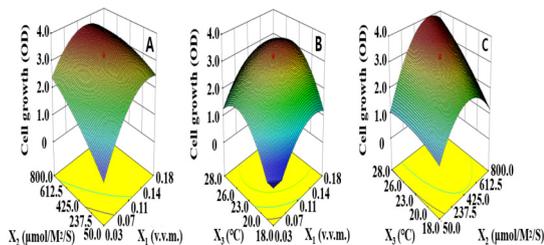


Fig. 4. Response surface plots represent the effect of two variables on cell growth of *C. miniata* at 42hr. The effect of changes on cell growth by function of light intensity and aeration (A), temperature and aeration (B), and temperature and light intensity (C). X₁: aeration, X₂: intensity, X₃: temperature.

3.5 배양조건 최적화

미세조류 세포량 최대화를 위해 대수성장 도입과 말기인 24시간과 42시간에서 개별 최적조건을 중첩하여 최적 배양조건 예측 결과를 Table 5에 나타냈다. 최적화를 위해 대수 성장 말기에서 배양조건 주요 변수로 확인된 광도를 우선적으로 최적화하고 상업규모 운전을 위해 운전 비용 절감에 중요한 요소인 배양온도가 최소가 되는 제한 조건을 적용하였을 때 0.13 v.v.m., 507.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 24.9 °C가 예측되었으며 세포농도는 42시간 기준으로 3.17 (OD₆₈₀)이 확인되었다. 중첩합성계획법을 통한 세포 성장 조건 최적화에서 도출된 조건을 기반으로 한 재현성 실험을 진행하였을 때, 24시간 및 42시간과 최적 조건에서 각각 2.14 ± 0.14 (OD₆₈₀)과 3.41 ± 0.17 (OD₆₈₀)의 세포 농도를 보여 예측치와 유의한 차이가 없음을 확인되어 통계학적 최적화를 이용한 배양조건 예측 및 세포 성장 최대화가 유효함을 재확인할 수 있었다.

Table 5. The prediction of optimized culture conditions of the 24hr and 42hr from three independent variables, including the aeration, intensity, and temperature

	Optimization		Superimposing with restrictions
	24hr	42hr	
Aeration (v.v.m.)	0.15	0.13	0.13
Intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	648.0	595.1	507.0
Temperature (°C)	26.0	25.8	24.9
Predicted by CCD (OD ₆₈₀)	2.23 ^a	3.29 ^b	3.17 ^c
Validation (OD ₆₈₀)	2.14 ± 0.14 ^a	3.41 ± 0.17 ^b	3.20 ± 0.18 ^c

An experiment to confirm reproducibility was conducted based on the conditions predicted through statistically-based optimization. The predicted value by CCD and the test verification result were compared at the significance level of $p < 0.05$. *optimization with minimum light intensity and minimum temperature.

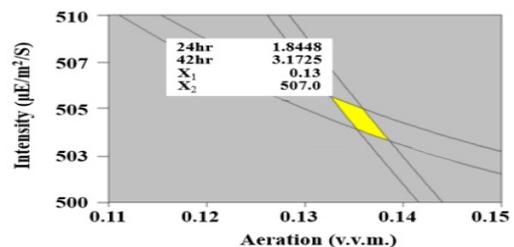


Fig. 5. Superimposing contour plot for the simultaneous optimization of two variables for the maximization cell growth. Temperature was fixed at the optimum level of 24.9 °C. X₁: aeration, X₂: intensity.

3.6 최적 배양조건에 대한 성장성 및 루테인 생산성 평가

초소형 광생물반응기에서 통계학적 방법을 이용한 최적 조건을 도출하였으며 이를 검증하기 위하여 0.5 L 광생물반응기를 이용하여 7일간 배양하였다. 최적화 조건 (0.13 v.v.m., 507.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 24.9°C)과 대조군 (0.05 v.v.m., 200.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 25.0°C)의 세포성장상을 비교하였을 때, 두 실험군 모두 배양 2일에서 대수 성장기에 진입하여 빠르게 성장한 뒤 배양 5일 부근에서 성장이 저하되는 경향을 보였다(Fig. 4). 대수 성장기 이후에는 두 그룹 간 성장 속도 차이를 보였으며, 7일 배양 후 최종 바이오매스 농도는 대조군에서 1.73 ± 0.15 g/L과 최적 조건에서 2.23 ± 0.14 g/L로 25 % 가량 증가함이 확인되었다. 배양 7일차의 루테인 생산성은 최적 조건이 대조군 대비 약 25 % 유의하게 증가하여 세포농도 증가와 상관관계가 있는 것으로 예상되었다. 이를 확인하기 위해 루테인 생산을 세포량 기준으로 비교했을 때, 단위 세포당 루테인 생산량에 있어 유의적인 차이($p > 0.05$)를 보이지 않아 루테인 생산량은 세포농도에 의존적으로 증가하여 미세조류로부터 루테인을 포함한 2차 대사산물 생산에 있어 세포 성장의 최적화가 중요한 공정 목적변수임이 확인되었다.

루테인은 2차 대사산물로 세포의 성장이 둔화된 정체기 또는 스트레스 상황에서 생산이 증대된다고 알려져 있는데 루테인의 생산량 증대를 위해서는 영양소 결핍, 고염과 고광도 등의 스트레스를 제공함이 효과적인 전략으로 보고되고 있다[16]. 따라서 세포성장 조건 최적화를 통한 대수기에서 세포농도를 최대화하고 대수기 말기 또는 정체기 초기에 광도, 염분, 온도 등의 인위적인 스트레스를 제공하여 루테인의 생산성을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다[17].

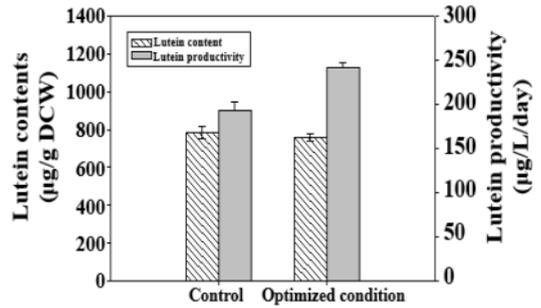
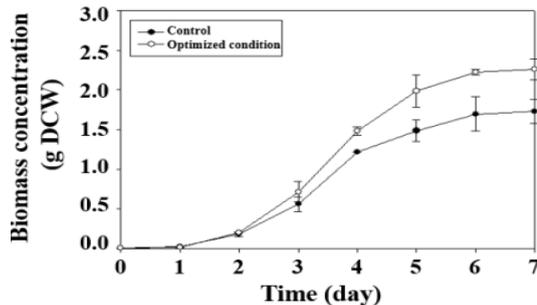


Fig. 6. Comparisons of lutein content based on dried cell mass and lutein productivity obtained under control and optimized conditions.

4. 결론

본 연구는 담수 미세조류인 *C. miniata* 배양조건 최적화를 통한 고농도 배양과 효과적인 루테인 생산을 위해 통계학적 최적화를 이용한 최적 배양조건 탐색을 수행하였다. 통계학적 최적화 기법의 일종인 중심합성계획법을 이용하여 초소형 광생물반응기에서 미세조류 성장 증대를 위해 미세조류 배양의 주요조건으로 알려진 폭기, 온도와 광도를 예측하여 세포 성장을 증대시켰다. 미세조류 성장의 대수 성장 초기와 말기인 24시간과 42시간 각각 배양한 후 측정된 실험값을 확인하였을 때, 폭기, 광도와 온도가 세포 성장 증가에 유의적인 영향인자로 확인되었다. 중심합성 계획법을 사용하여 도출된 최적 배양조건은 42시간에서 0.13 v.v.m., 507.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 24.9°C이었으며 이를 최적화 이전 대조군 (0.05 v.v.m., 200.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 와 25.0°C)과 비교하였을 때 44.2 % 증가한 것으로 통계학적 최적화를 통한 배양조건 예측이 효과적임이 확인되었다.

또한 도출된 최적화 조건에서 루테인 생산성을 비교했을 때, 최적화 이전 조건에 비해 25.0 % 증가하여 세포농도 증가에 따른 루테인 생산 증대 비례함이 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 배양조건의 영향 인자인 폭기, 광도와 온도 최적화를 통해 *C. miniata* 성장과 유용물질 생산을 증대시킬 수 있었으며 통계학적 최적화에 기반한 토착 담수생물자원인 *C. miniata*의 고농도 배양을 통해 고부가가치 생물소재의 대량생산에 활용할 수 있는 배양조건의 기초를 마련했다는 점에서 연구의 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

References

- [1] L. Wendie, P. Patrick, P. Victor, "A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification", *Biotechnology advances*. Vol.41, No.4, pp.107-545, Apr. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- [2] H. W. Park, C. G. Lee, "Theoretical calculations on the feasibility of microalgal biofuels: utilization of marine resources could help realizing the potential of microalgae", *Biotechnology journal*. Vol.11, No.11, pp.1461-1470, Nov. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201600041>
- [3] F. M. Seyedeh, H. Sebastian, W. Nicholas, A. Adebayo, G. Tony, "Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review" *Science of the Total Environment*. Vol.752, No.15, pp.142-168, Jan. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>
- [4] I. Barkia, N. Saari, S. R. Manning, "Microalgae for high-value products towards human health and nutrition". *Marine drugs*, Vol.17, No.5, pp.304, May. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.3390/md17050304>
- [5] B. H. Jo, H. J. Cha, "Biodiesel Production Using Microalgal Marine Biomass". *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. Vol.25, No.2, pp.109-115, Apr. 2010.
<https://koreascience.kr/article/JAKO201023064628874.do>
- [6] H. W. Park, S. M. Kang, J. H. Min, J. H. Kim, Y. H. Cho, K. H. Kim, Y. S. Jin, S. J. Hong, C. K. Lee, "A Study on the Effect of Initial Cell Density on Biomass Productivity of a Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* dZL in Large-scale Cultivation Using 100 L Flat-Panel Photobioreactors". *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. Vol.35, No.1, pp.78-83, Mar. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2020.35.1.78>
- [7] I. Muge, G. I. Murt, "Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red". *Biochemical engineering journal*. Vol.61, No.15, pp.11-19, Feb. 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.12.001>
- [8] M. Ahmadi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, E. Mofarrah, M. Mehranian, "Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation" *Journal of Hazardous Materials*. Vol.123, No.3, pp.187-195, Aug. 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.042>
- [9] D. S. Kim, Y. S. Park, "Disinfection of *E. coli* using electro-UV complex process: disinfection characteristics and optimization by the design of experiment based on the box-behnken technique" *Journal of Environmental Science International*, Vol.19, No.7, pp.889-900, July. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.5668/JEHS.2010.36.4.313>
- [10] J. Liu, F. Chen, "Biology and industrial applications of *Chlorella*: advances and prospects. Microalgae biotechnology." *Microalgae Biotechnology*. Vol.153, pp.1-35, DEC. 2014
DOI: https://doi.org/10.1007/10_2014_286
- [11] A. B. Sozmen, E. Canbay, E. Y. Sozmen, B. Ovez, "The effect of temperature and light intensity during cultivation of *Chlorella miniata* on antioxidant, anti-inflammatory potentials and phenolic compound accumulation." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol.14, pp.366-374, Apr. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.023>
- [12] L. J. Hazeem, M. Bououdina, E. Dewailly, C. Slomianny, A. Barras, Y. Coffinier, S. Szunerits, R. Boukherroub, "Toxicity effect of graphene oxide on growth and photosynthetic pigment of the marine alga *Picochlorum* sp. during different growth stages." *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 24, pp. 4144-4152. Dec. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8174-z>
- [13] M. G. Morais, J. A. V. Costa, "Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide." *Energy Conversion and Management*, Vol.48, No.7, pp.2169-2173, July 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.12.011>
- [14] C. Y. Shin, Y. J. Noh, S. Y. Jeong, T. G. Kim, "Characterization of Cellular Growth, CO₂ Assimilation and Neutral Lipid Production for 4 Different Algal Species". *Microbiology and Biotechnology Letters*. Vol.48, No.4, pp.547-555, DEC. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.48022/mbl.2008.08017>
- [15] H. J. Hwang, S. J. Hwang, "Effects of light irradiation interval on the metabolism of nitrogen, phosphorus and growth rate of *Chlorella vulgaris*" *Journal Korean Soc. Water Wastewater*. Vol.31, No.5, pp.441-445, Oct. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.11001/jksww.2017.31.5.441>
- [16] J. A. Del Campo, J. Moreno, H. Rodríguez, M. A. Vargas, J. Rivas, M. G. Guerrero, "Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta)". *Journal of Biotechnology*. Vol.76, No.1, pp.51-59, Jan. 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00178-9)
- [17] M. Gong, A. Bassi, "Investigation of *Chlorella vulgaris* UTEX 265 cultivation under light and low temperature stressed conditions for lutein production in flasks and the coiled tree photo-bioreactor (CTPBR)". *Applied biochemistry and biotechnology*, Vol.183, No.17, pp.652-671, Jun. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2537-x>

염 서 희(Suh Hee Yeom)

[준회원]



- 2021년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물학과와 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 천연물

김 지 훈(Z-Hun Kim)

[정회원]



- 2013년 8월 : 인하대학교 생물공학과 (생물공학박사)
- 2017년 5월 ~ 2022년 12월 : 국립낙동강생물자원관 선임연구원
- 2022년 12월 ~ 현재 : 휴에버그린 팜 바이오자람사업부 팀장

<관심분야>

생물공정, 바이오소재 개발, 미세조류 대량배양

김 소 희(So Hee Kim)

[준회원]



- 2022년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물학과와 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 항암, 유전

남 현 주(Hyeon Ju Nam)

[정회원]



- 2022년 8월 : 경북대학교 과학기술대학원 산림환경자원학과 (산림환경자원학석사)
- 2023년 11월 ~ 현재 : 국립호남권 생물자원관 연구원

<관심분야>

미세조류, 계통분류

박 하 영(Ha Young Park)

[준회원]



- 2022년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물학과와 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 식품

이 창 수(Chang Soo Lee)

[정회원]



- 2007년 8월 : 한국과학기술원 생명과학과 (이학박사)
- 2015년 12월 ~ 현재 : 국립낙동강 생물자원관 선임연구원

<관심분야>

담수 미생물(미세조류, 남세균, 세균, 바이러스) 기초, 생태, 응용 연구

김 진 우(Jin Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 2월 : 인하대학교 생물공학과 (공학석사)
- 2000년 5월 : Colorado State Univ.(美) 화학공학과 (공학석사)
- 2004년 10 : McGill Univ. (캐) Biosystems Engineering (박사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 식품과학과 교수

〈관심분야〉
생물, 바이오