

미세조류 *Dunaliella bardawil*에서 오존과 과산화수소에 의한 β -carotene의 축적과 식용기름을 이용한 추출

유경원 · 정옥진¹ · 정병철*

명지대학교 생명과학과 생명공학센터, ¹화학공학과 청정기술원

*Dunaliella bardawil*의 적절한 생장과 β -carotene의 효과적인 축적 조건을 확립하기 위하여 염 농도, pH, 광량, 교반속도, 오존처리, 과산화수소 첨가 등의 영향을 비교하였고, 식용 식물성 기름을 이용한 β -carotene의 추출조건을 비교하였다. *D. bardawil*의 비생장 속도는 1 N NaCl, pH 8.0, 광량 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 70 rpm으로 배양 시에 0.168/hr로 최대를 나타냈다. 흰색 형광등을 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조사한 경우 β -carotene isomer 축적은 cis isomer가 trans isomer에 비해 높은 증가율을 보였다. β -carotene의 축적을 위하여 50 μM 과산화수소를 배양 2일 경과 후에 첨가한 경우 대조군의 축적율이 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인데 비해 324 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 200 ppb로 2시간 오존 처리했을 때 약 1.8배 증가한 270 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 식용기름에 의한 37°C에서의 추출효율은 올리브유, 참기름, 미강유, 옥수수유, 대두유의 순서로 나타났으며, 올리브유를 수층 부피의 9배로 첨가하고 50°C에서 1시간 동안 sonication 한 결과 96.9%의 추출효율을 나타냈다.

Key words □ β -carotene, *Dunaliella bardawil*, extraction using vegetable oil, induction by ozone and hydrogen peroxide

대개 조류의 생육속도는 느리며(*Spirulina* sp.의 배가시간은 약 4~7일), 다른 미생물이나 조류와 동시 생육할 가능성이 높다. 또한 일차 및 이차산물의 생산에 따른 생육조건이 다른 경우가 많으며, 무엇보다도 광량은 조류의 생육에 가장 결정적으로 작용하기 때문에 발효조에 의한 대량 배양 시에 균일한 광량을 공급해야 효과적이다(20). 그 외 조류의 생장은 염 농도, 질소와 인산의 비율, 수온, 그리고 pH 등의 다양한 환경요인에 의하여 지배된다(1). 미세조류 *Dunaliella bardawil*은 단단한 세포벽이 결여된 절대 광독립영양체이며(2, 3), 높은 염 농도(0.1~5.5 N NaCl)에서도 생장이 가능한 내염성 조류로서 과도한 빛의 조사(1650 $\text{mE}/\text{m}^2/\text{s}$)에 의해 β -carotene을 과대 축적할 수 있는 것으로 알려져 연구가 활발히 진행되고 있다(3, 5~9, 14). 이 조류주의 축적메커니즘은 엽록체내부의 lipid globules내에 β -carotene이 축적되면서 강한 빛으로부터 세포를 보호하기 위해 globule들은 세포의 바깥쪽에 집중적으로 분포한다(5). *Dunaliella*는 세포벽이 없기 때문에 각종 외부환경의 변화에 민감한 반응을 보이며 특히 hyperosmotic shock에 따라 lipid reordering(11), membrane infolding(12, 15), 투과성 변화(22), 나트륨 이온 유입의 일시적인 활성화(23), hyperpolarization(17), 칼슘 이온 flux의 변화와 뒤를 이어 나타나는 글리세롤의 합성(13) 등의 다양한 생리적 변화가 진행된다. 즉 높은 광량 등의 외부 스트레스를 가할 경우 *D. bardawil*은 스스로를 보호하기 위해서 β -carotene을 축적하는 광필터로써 작용하며, 또한 높은 염 농도 스트레스에 대항하기 위해서 스트레스 전보다 많은 글

리세롤을 합성한다.

식물 및 동물 그리고 미생물 모두는 외부로부터 끊임없는 환경스트레스를 받고 있으며, 외부스트레스 인자들(오존, 자외선, 질소산화물, 아황산 가스, 수분 스트레스)에 대해 저항 및 적응하는 기작을 생물들은 갖는다(4). 생물들이 갖고있는 스트레스 저항성 항산화물질들은 크게 고분자인 superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD), catalase, 그리고 ascorbate peroxidase 등이 있으며 또한 ascorbate, glutathione, 토코페롤, 그리고 카로티노이드 등의 저분자 항산화물질로 나눌 수 있다. 최근까지도 스트레스에 대한 생체의 저항기작에 대한 연구는 주로 식물에서 연구되어 왔으며 *Arabidopsis thaliana*는 자외선 또는 오존 등의 대기오염물질에 대항하여 항산화 효소의 합성이 촉진된다(18). 특히 식물에서 오존은 기공을 거쳐서 엽육세포로 들어가며, 그 후에 오존은 superoxide anion, hydroxyl radicals, 그리고 과산화수소 등으로 전환된다(16).

식품의 보조색소 및 산화방지제, 그리고 노화방지제로써 β -carotene은 최근 합성 항산화제의 부작용에 따른 사용규제 등으로 천연 항산화제의 수요가 급증하는 추세에 따라 수요가 급격히 증가하는 추세이다. 이와 같은 천연물의 수요증가에 발맞춰 기존의 동물, 식물, 그리고 미생물에 의한 생산 외에 단위생산성이 높은 미세조류의 연구가 이스라엘과 일본 등지에서 활발히 진행중이다. 그러나 이들 미세조류를 통한 천연 β -carotene의 생산과 상품화에는 아직 산적한 문제들이 있으며, 특히 조류는 박테리아에 비해서 성장속도가 느리고, 목적물질 생산을 위한 배양조건의 미확립과 순수배양의 문제 그리고 대량 배양시 빛의 공급과 온도유지 등의 문제점이 있기 때문에 이런 문제들을 극복해야만 목적산물인 β -carotene을 원활히 생산할 수 있다. 또

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 0335-330-6196, Fax : 0335-335-8249
E-mail : bcjeong@bioserver.myongji.ac.kr

한 *D. bardawil* and *salina*, *H. phuvialis* 등을 화학적으로 처리하여 야생형보다 β -carotene 축적률이 월등히 향상된 조류주의 획득과 함께 대량배양법에 대한 연구가 상당히 진척되는 추세이다. β -carotene은 단일결합과 이중결합이 반복되어 이루어진 고도로 불포화된 구조를 갖기 때문에 빛이나 열 그리고 공기 등과 접촉할 경우에 매우 불안정하다. 즉 빛에 노출됐을 때 광학이성질체 반응이 일어나서 cis form과 trans form으로 분리되며, 결국 이런 광학이성질화 현상은 β -carotene의 bio-availability를 감소시킨다(10, 19). 또한 60°C 이상의 고온에 매우 약하며 공기중에 노출됐을 때 산소에 의해 쉽게 산화반응이 일어난다. 결국 이런 현상은 β -carotene의 특이적인 구조적 불안정성 때문으로 추출 및 보관 그리고 정제과정의 주의를 필요로 한다.

본 연구에서는 과도한 빛의 요구를 줄이기 위하여 유리라디칼 발생제로써 작용하는 오존과 과산화수소를 이용하여 β -carotene의 과대축적을 유도하고 기존의 유기용매 추출법 대신에 식용기름을 이용하여 축적된 β -carotene의 추출을 시도하였다.

재료 및 방법

조류주 및 배양조건

미세조류인 *Dunaliella bardawil* (ATCC 30861)을 사용하였다. 조류주의 배양을 위해서는 Ben-Amotz 등(7)이 사용한 배지 성분을 변형한 다음의 DA-2 배지를 사용하였다 (NaCl 58.45 g, FeCl₃·6H₂O 0.62 mg, Tris-HCl 6.402 g, H₃BO₄ 12.0 mg, NaHCO₃ 3.36 g, MnCl₂·4H₂O 0.198 mg, KH₂PO₄ 0.014 g, ZnCl₂ 28.0 µg, KNO₃ 0.505 g, CoCl₂·6H₂O 9.52 µg, MgSO₄·7H₂O 1.232 g, CuCl₂·2H₂O 68 mg, CaCl₂·2H₂O 0.033 g, EDTA 0.93 mg, pH 7.5, 증류수 1 l). 조류주의 배양은 28°C에서 실시하였으며, 순수 배양한 조류를 5분간 3,500 rpm으로 원심분리한 후에 멸균된 1 N NaCl 용액으로 두 번 씻고 세포를 회수하여 -70°C 초저온 냉동고에서 보관 후 계대배양, 본 배양, 그리고 β -carotene 축적실험에 이용했다. 배양은 대수증식기 중기의 세포를 배지에 5%씩 첨가했으며, 각 배양은 200 ml의 배지가 들어있는 500 ml culture bottle에서 실시하였다. *D. bardawil*의 생장률을 측정하기 위하여 배양액 1 ml을 3,500 rpm으로 5분간 원심분리하여(Hanil Co. Micro 17R) 세포를 회수한 후에, 1 N NaCl 용액으로 세척했다. 진공건조기(Napco Co.)에서 80°C로 24시간 건조하여 무게를 측정하여 이를 건조생체량으로 하였다. 조류수의 간접측정을 위해서는 조류세포들을 적당량 희석한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 액체 배양한 세포를 1 N NaCl 용액으로 적당량 희석한 후에 혈구계수기를 이용하여 위상차현미경(Olympus Co.)으로 직접 계수했다. *D. bardawil*의 생장 속도를 비교하기 위해서는 염농도, pH, 광량, 교반속도를 달리한 실험을 2세트씩 2회 실시하여 평균 비생장 속도를 계산하였다.

β -carotene 축적 유도

대수증식기 중기의 배양액을 실온에서 원심분리(3,500 rpm, 5분)하여 세포를 회수하고 약 10⁶ cells/ml이 되도록 DA-2 배지에 세포를 재현탁한 후에 각각 다른 광원과 광량, 염 농도(1~3 N NaCl), pH (7.0~9.5) 등의 조건하에서 β -carotene의 축적률을 비교하였다. 실험은 2세트씩 2회 실시하여 4개의 데이터를 평균하였다. 유리라디칼에 의한 β -carotene의 축적률을 비교하기 위하여는 과산화수소와 오존을 첨가하여 화학적으로 β -carotene 축적을 유도하였다. 오존발생기에 의해 발생된 오존은 오존분석기를 이용하여 200 ppb로 chamber 내에 일정하게 주입했다. 이때 세포배양액이 들어있는 chamber 내부를 250 µE/m²/s의 광량으로 조사했다. 또한 *D. bardawil*의 생장과 β -carotene 축적을 위한 효과적인 광원과 광량을 알기 위해서는 할로겐 및 청색형광등 그리고 흰색형광등을 이용했으며, quantum sensor (Licor 6000)로 광량을 측정했다. 이때 고열에 따른 복사열을 차단하기 위해 방열판과 팬을 이용하여 27~29°C의 온도를 유지하였다.

β -carotene 추출 및 분석

물에 대한 유기용매간 친수성과 소수성의 차이를 이용해서 배양액으로부터 소수성인 β -carotene을 추출하였다. 배양액 1 ml을 3,500 rpm으로 원심분리하여 세포를 회수한 후에, 동일 부피의 에탄올과 해산을 섞은 용액을 각각의 튜브에 1 ml 첨가하고 3분간 vortex 했으며, 그 후 증류수를 0.3 ml 첨가하고 다시 5분간 vortex 했다. 이때 vortex 중에 발생하는 과도한 열에 의한 카로틴 성분의 파괴를 막기 위해서 시료를 3~4회 얼음 속에 넣어두었다. Speed vacuum (Heto VR-1)에서 15분간 건조시킨 후에 -20°C에 보관했다. 추출은 항상 약한 빛 하에서 실시하여 빛에 의한 β -carotene의 분해를 최소화시켰다. 식용기름에 의한 추출은 올리브유, 참기름, 미강유, 옥수수유, 대두유를 이용하여 2세트씩 3회 반복하여 실험을 실시하였다. 배양액 100 ml로부터 세포를 회수하고 1 N NaCl 용액 10 ml에 현탁시킨 후, 기름 60 ml을 첨가하고 37°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 1시간 동안 150 rpm으로 섞은 후 원심분리하여 기름층만을 획득하였다. 초음파 처리 효과는 세포현탁액 10 ml에 올리브유 또는 대두유 10, 30, 60, 90 ml을 첨가한 후 50°C sonic bath (화신 기계)에서 1시간 동안 처리하였다. 시료는 5 µg/ml ~ 500 mg/ml 이 되도록 methylene chloride에 녹인 후 0.45 µm 필터로 여과하여 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, model P-2000, TSP Co.)로 분석하였다. 역상칼럼 (Vydac 201 TP, 15×0.46 cm)을 이용하였고, 용출 용매를 (메탄올: 아세토나이트릴 9:1, v/v) 일정한 속도(1 ml/min)로 흘려주면서 photodiode array detector (TSP, model FOCUS)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정했다. 결과 분석은 PC1000 프로그램 (TSP Co.)을 이용하였다. 각각의 표준시료는 Sigma사로부터 구입하였고 α -carotene, trans β -carotene, cis β -carotene의 머무름 시간은 각각 9.491분, 10.826분, 12.583분 이었다. 크로마토그램의 peak이 α -carotene, trans β -carotene, 그리고 cis β -carotene인지를 확인하기 위해서 각각의 표준시료를 시료에 첨가해서 peak의 증가를 확인하였다.

Table 1. Specific growth rates of *D. bardawil* at various culture conditions

NaCl (N)	Culture pH	Light intensity (mE/m ² /s)	Agitation (rpm)	Specific growth rate (/hr)
1	7.5	50	20	0.003
2	7.5	50	20	0.0023
3	7.5	50	20	0.0016
1	7.5	80	70	0.027
1	8	80	70	0.168
1	8.5	80	70	0.116
1	9	80	70	0.1
1	9.5	80	70	0.088

결과 및 고찰

*D. bardawil*의 생장조건.

배양시 NaCl의 농도와 pH, 광량에 따라 *D. bardawil*의 생장은 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다 (Table 1). 고농도 NaCl 배지의 경우에는 지속적인 생장의 저해로 낮은 생장속도를 보였다. 배양시 염 농도에 따라 세포의 비생장 속도(m)는 1 N NaCl에서 배양한 결과 0.003/hr이었으며, 2 N의 경우 0.0023/hr, 그리고 3 N은 0.0016/hr로 감소했다. 높은 염 농도에서 배양된 *D. bardawil*은 염에 의한 스트레스에 대항하기 위해 저농도에서 배양한 세포보다 많은 에너지를 소모해서 세포의 비생장 속도와 세포량이 감소하는 것으로 생각된다. 배양배지의 pH를 각각 7.5-9.5로 조정하면서 세포 생장을 측정한 결과, 세포의 비생장 속도는 pH 7.5에서 0.027로 가장 낮았으며 pH 8.0에서 최대인 0.168 이었고, 그 이상의 배양 pH에서는 생장 속도가 둔화되었다. 이러한 결과는 pH 8.0에서 비생장 속도와 최종 세포 농도가 최대인 해양 미세조류 *Isochrysis galbana* Parke와 유사하였다(1). 동일한 pH 7.5에서 광량과 교반속도의 증가 시에 비생장 속도가 급격하게 증가한 것으로 보아 *D. bardawil*은 단위 면적당 세포가 받는 광량이 생장의 율속으로 작용하는 것으로 보인다. 광량에 의한 생장 속도의 변화는 다른 해양조류인 *Dunaliella tertiolecta*에서도 제시되었는데 700 mmol quanta/m²/s의 빛을 조사한 경우에는 24시간 동안에 1.1회 분열하였으나 70 mmol quanta/m²/s에서는 0.4회로 감소하였다고 보고되었다(21). 한편 본 연구에서는 빛과 영양물질의 전달속도를 증가시키기 위하여 교반속도를 150 rpm 이상으로 높여준 경우에는 세포의 파괴 정도가 심하여 비생장 속도의 측정이 불가능하였는데, 이는 *D. bardawil*에 단단한 세포벽이 없어서 기계적 교반에 취약하기 때문으로 보인다(5).

*D. bardawil*에서 β -carotene의 축적유도

β -carotene의 축적을 위하여 *D. bardawil*을 1 N NaCl 배지에서 배양하여 이 염 농도로 세포를 적응시켰다. *D. bardawil*은 단단한 세포벽이 없기 때문에 1 N NaCl 이외의 다른 염 농도의 배지에서는 salt-stress에 대한 세포 스스로의 조절 또는 적응

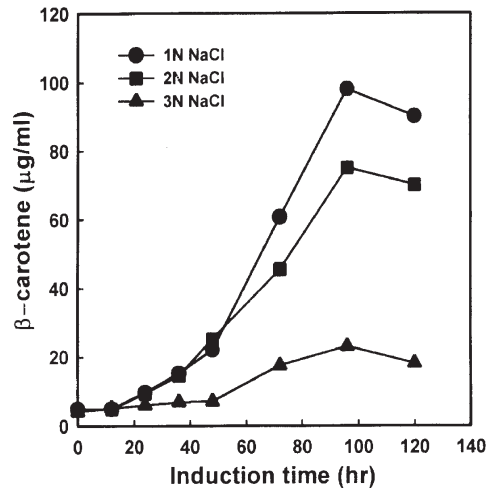


Fig. 1. The effect of NaCl concentration on the β -carotene accumulation. White fluorescent lamp with light intensity of 150 mE/m²/s was used. The induction pH was maintained at 8.0.

과정으로 현미경 관찰 시에 *D. salina*의 경우와 마찬가지로(22) 세포크기가 작아지는 현상을 확인할 수 있었다. 이 기간은 배지에 첨가되는 NaCl 농도에 따라 차이를 보여, 이미 적응된 1 N NaCl 배지에서는 부피감소 현상이 없었지만 높은 농도로 옮겨준 세포의 경우에는 바로 세포의 크기가 감소한 후, 2 N의 경우 약 50-60시간, 3 N은 약 70-75시간이 경과한 후에야 원래의 세포형태로 돌아왔다. 이 시기에 세포생장은 거의 정지했지만 세포당 β -carotene의 축적량은 증가했다. 특히 이런 적응기 이후에는 세포수가 증가하여 β -carotene의 축적은 세포수의 증가에 비례하는 것으로 나타났다. 염 농도에 따른 β -carotene의 축적을 알기 위해서 축적실험 초기 NaCl의 농도를 각각 1-3 N로 다르게 조절한 결과 축적유도 배지에서 NaCl 농도에 따른 β -carotene 축적량은 1 N NaCl에서 96시간 경과후 최대 98 mg/ml로 증가했으며, 2 N NaCl, 3 N NaCl의 경우는 각각 75 mg/ml과 23 mg/ml에 그쳤다(Fig. 1). NaCl 농도가 가장 높은 3 N의 경우 세포의 생장은 거의 일어나지 않았으며, 따라서 축적유도 배지의 초기 NaCl 농도가 높을수록 *D. bardawil*이 받는 스트레스의 정도는 큰 것으로 판단된다. 한편 영양분에 의한 β -carotene의 축적량을 비교한 결과 실험의 초기에 첨가되는 phosphate, carbonate 그리고 nitrate 등을 각각 대조군에 비해 0.5배씩 축적유도 배지에 더 많이 첨가한 경우에도 β -carotene의 축적에 큰 변화가 없었으며, 이런 결과로 볼 때 영양분의 결핍에 의한 β -carotene의 축적효과는 없는 것으로 생각되었다 (Data not shown).

강한 빛의 조사가 *D. bardawil*에서 β -carotene을 과다 축적시킴이 보고되었으나(6, 7) 본 연구에서는 광원으로 2 KW 할로겐등 (800-850 mE/m²/s)을 사용한 경우 과도한 열로 인해서 photobleaching되는 현상이 종종 나타나는 등 carotene 축적을 위한 광원으로써 매우 불안정하였다. 흰색 및 청색 형광등을 광

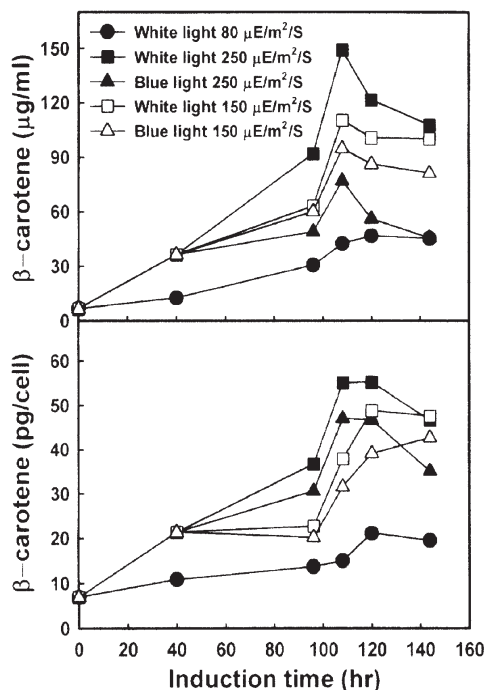


Fig. 2. Effects of light source and light intensity on the β -carotene accumulation. Cells were irradiated with different light intensities and the induction pH was maintained at 8.0.

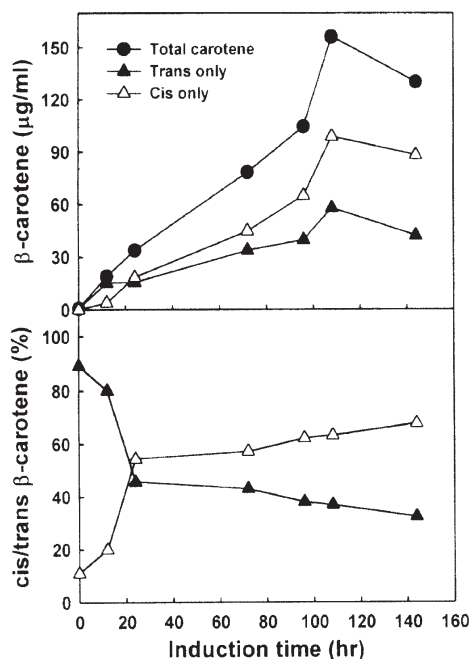


Fig. 3. The time course of the cis- and trans- β -carotene ratio when irradiated with white fluorescent light. Light intensity was 250 $\text{mE/m}^2/\text{s}$ and pH of media were adjusted to 8.0.

원으로 (80, 150, 250 $\text{mE/m}^2/\text{s}$) 이용한 결과 β -carotene의 축적량은 특히 250 $\text{mE/m}^2/\text{s}$ 흰색 형광등에서 induction time 108시간 경과 후에 최대 150 mg/ml 로 가장 높은 축적량을 보였다 (Fig. 2). 그러나 ml 당 축적량과 세포당 축적량이 반드시 일치하지는 않았으며 오히려 정지기의 세포로 생장 속도가 감소했을 경우 ml 당 축적율은 감소하는데 비해서 세포당 축적율은 일부 증가하였다. 1 N NaCl 배지에서 흰색 형광등을 250 $\text{mE/m}^2/\text{s}$ 의 광량으로 조사하여 β -carotene을 축적시킨 후 β -carotene isomer (trans, cis) 함량 비의 변화를 분석했다 (Fig. 3). 배양초기 trans/cis isomer의 함량 비는 약 9/1이었지만, 24시간 경과후 약 1/1로 변했으며, 144시간 후에는 1/1.5로 변했다. 이와 같은 함량 비의 변화로 trans isomer의 축적속도보다 cis isomer의 축적속도가 훨씬 높은 것을 알 수 있었다. 축적유도배지의 pH를 각각 7.0-9.5로 일정하게 유지하면서 pH에 따른 β -carotene의 축적률을 비교한 결과 (Fig. 4) pH 7.0에서 β -carotene의 축적은 거의 이루어지지 않은 것으로 보아 배지의 pH가 중성 이하로 내려갈 경우 억제되는 것으로 생각된다. 7.0-9.0의 pH 범위에서는 배지의 pH가 증가할수록 β -carotene의 축적량이 증가하여 배양 96

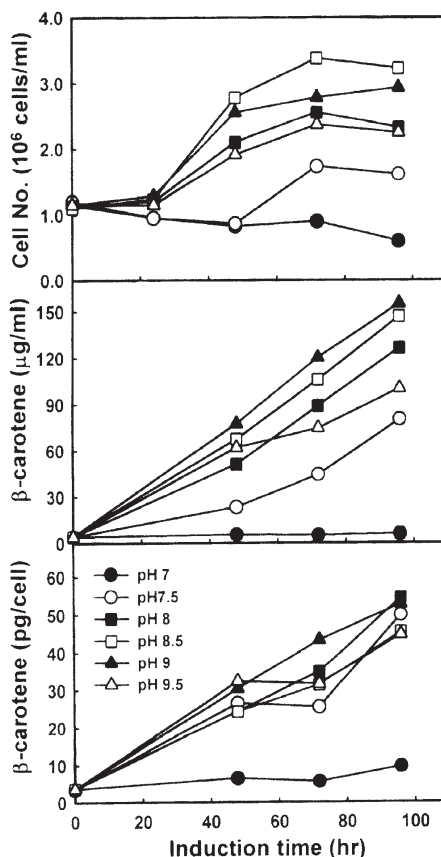


Fig. 4. Influence of pH on the cell growth and β -carotene accumulation. Light intensity was 250 $\text{mE/m}^2/\text{s}$. Salt concentration was 1 N NaCl.

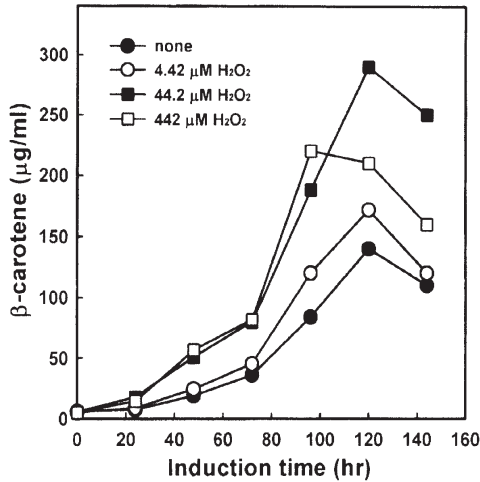


Fig. 5. The effect of hydrogen peroxide on the β -carotene accumulation. Cells were harvested at mid-log phase then resuspended in 1 N NaCl media containing hydrogen peroxide. Light intensity was 250 mE/m²/s. pH was 8.5.

시간 경과시 pH 8.5, 9.0 에서 높은 축적량(145-155 μ g/ml)을 보였으나, pH 9.5 에서는 오히려 축적량이 감소했다.

β -carotene의 축적에 대한 유리 라디칼 발생제의 영향과 첨가 농도를 알기 위해 강력한 유리 라디칼 발생제인 과산화수소를 각각 다른 농도(4.42, 44.2, 442 mM)로 배지에 첨가했으며, 또한 오존을 배양액에 200 ppb로 각각 30분, 60분, 그리고 120분씩 처리한 후에 약 250 mE/m²/s의 광량을 공급하면서 β -carotene의 축적을 유도하였다. 과산화수소를 각각 44.2 mM과 442 mM의 농도로 첨가한 결과, 축적유도 120시간 경과시 대조구에 비해서 각각 2.1배와 1.5배로 증가했다(Fig. 5). 또한 유리

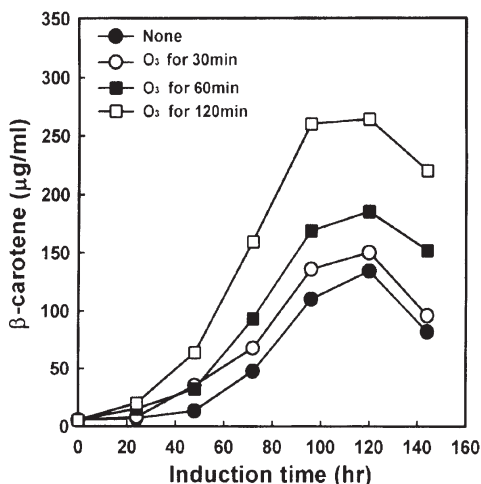


Fig. 6. Accumulation of β -carotene in *D. bardawil* by ozone fumigation. Light intensity was 250 mE/m²/s. pH was 8.5. Ozone (200 ppb) was fumigated at 0 hr of induction.

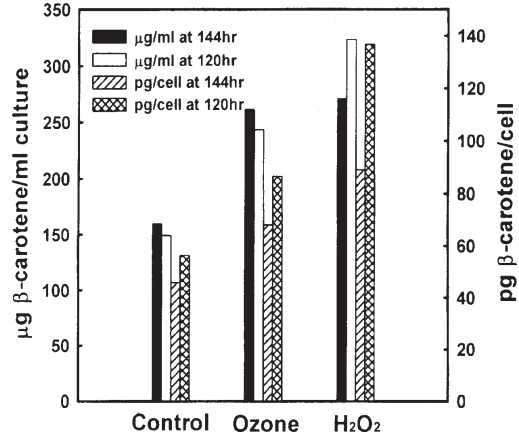


Fig. 7. The effects of free radical generators on the β -carotene accumulation. Ozone and hydrogen peroxide were added to induction media after 48 hr of induction. 1 N NaCl, Initial pH 8.5, Light intensity 250 mE/m²/s.

라디칼 발생제로써 오존을 30분, 60분, 그리고 120분간 200 ppb의 농도로 처리한 결과, 배양 후 120시간 경과시 대조구에 비해서 β -carotene의 축적량은 각각 1.1배, 1.4배 그리고 2배로 증가했다(Fig. 6). 이와 같은 결과로 볼 때 β -carotene의 축적시 오존과 과산화수소는 positive effector로 작용했음을 확인할 수 있었다. 오존과 과산화수소의 첨가효과는 축적실험 초기에 첨가한 경우 뿐만 아니라 축적실험 중간에 첨가한 경우도 유사하게 나타났다(Fig. 7). 배양액당 축적율은 대조군의 경우 약 150 mg/ml이었으나, 50 mM 과산화수소를 첨가한 결과 최대 약 324 mg/ml로 증가했으며, 200 ppb의 농도로 2시간 동안 chamber 내에서 오존을 처리한 결과 최대 약 270 mg/ml로 증가했다. 또한 세포당 축적율은 대조군의 경우 최대 55 pg/cell이었으나 과산화수소를 첨가한 결과 최대 136 pg/cell로 증가했으며, 오존을 처리한 결과 90 pg/cell로 증가했다.

Ben-Amotz 등(6)은 강한 빛을 조사한 경우에 높은 농도의 β -carotene을 축적하고 있는 *D. bardawil* 세포가 낮은 농도의 β -carotene을 축적하고있는 세포에 비해 생존율이 높으며, β -carotene의 분해정도가 엽록소의 파괴정도에 비해 빠르게 나타나고, cis isomer가 빛에 빠른 속도로 반응하여 trans isomer에 비하여 빠르게 분해된다고 보고하였다. 한편 과산화수소 처리 등의 산화적 스트레스 환경에서는 cis β -carotene > trans β -carotene > 엽록소의 순서로 분해가 잘되었다(9). 따라서 스트레스 환경 하에서 *D. bardawil*은 엽록소보다는 스트레스에 빠르게 반응하는 β -carotene의 축적을 선호하며, 특히 cis isomer의 과다축적을 통하여 스트레스를 초기에 극복하려는 시스템을 작동시키는 것으로 판단된다.

식용기름을 이용한 β -carotene의 추출

식용기름에 의한 37°C에서의 추출효율은 올리브유, 참기름, 미강유, 옥수수유, 대두유의 순서였으나 hexan에 의한 추출에 비

Table 2. Effects of temperature on the extraction of β -carotene by vegetable oils

Extraction material	37°C	50°C	60°C	70°C
Hexane	100			
Sesame oil	19.9±3.7	33.7±6.8	32.1±6.8	33.6±7.0
Olive oil	31.7±4.6	47.7±3.8	52.1±9.0	56.7±5.2
Rice bran oil	17.4±4.5	18.9±1.1	22.1±3.4	22.3±5.1
Soy bean oil	7.0±0.9	8.9±2.7	9.9±2.5	9.8±3.7
Corn oil	11.7±4.3	10.2±1.0	17.5±0.8	14.3±1.1

¹ β -carotene extracted by oil \times 100/ β -carotene extracted by hexane at 37°C
²mean \pm S.D. (3 separate experiments)

³The ratio of cell resuspension to extraction material was 1: 6 (v/v)

해 저조하게 나타났으며(Table 2) 이는 기름의 높은 점도로 인하여 수층의 세포와의 접촉이 원활하지 못하였기 때문으로 판단되었다. 그러나 70°C까지의 고온에서 접촉시킨 경우에도 추출 효율이 60%를 상회하지 못하였고 고온에서는 β -carotene의 파괴가능성도 무시할 수 없는 것으로 보인다. 한편 수층 대 기름 층의 비율이 높아질수록 추출효율이 증가하였으며 특히 올리브유를 수층부피의 9배로 첨가하고 50°C에서 초음파 처리한 결과 96.9% 이상의 추출효율을 나타내었다(Table 3).

본 실험결과 *D. bardawil*에서 유리라디칼 발생제인 오존과 과산화수소의 첨가에 의한 β -carotene의 축적효과는 기존 광축적에 필요한 과도한 빛의 조사(약 1,650 mE/m²/s) 보다 약한 250 mE/m²/s의 광량만으로도 효과적인 축적이 가능했다. 그러나 *D. bardawil*에서 oxidative stress의 정확한 기작을 밝히기 위해서는 유전자 단계 또는 단백질 단계의 연구가 선행되어야 할 것이다. 결론적으로 배양중에 오존과 과산화수소의 첨가는 광축적만으로 유도한 것 보다 β -carotene의 축적효과가 우수했으며, 과도한 빛의 공급을 해결해줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한 유기용매 대신에 식용기름을 이용한 β -carotene의 효율적 추출이 가능하였으므로 이를 이용한 안전한 기능성 식용기름의 획득에도 유용할 것으로 보인다.

Table 3. Increase of β -carotene extraction by sonication

Extraction material	Cell resuspension to extraction material ratio		
	(v/v)	50°C	50°C & sonication
Olive oil	1 : 1	29.5±5.4	38 ± 3.6
	1 : 3	33.0±3.3	48.7± 0.3
	1 : 6	48.3±6.2	67.9±13.0
	1 : 9	48.0±4.1	96.9± 8.6
Soy bean oil	1 : 1	4.1±0.8	10.1± 4.3
	1 : 3	5.5±0.9	17.6± 3.8
	1 : 6	8.0±2.2	17.7± 3.6
	1 : 9	9.3±1.2	20.6± 1.8

¹ β -carotene extracted by oil \times 100/ β -carotene extracted by hexane at 37°C
²mean \pm S.D. (3 separate experiments)

감사의 말

본 연구는 1997년도 학술연구조성비(자유공모과제)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 오유관, 박성훈. 1996. 해양미세조류 *Isochrysis galbana* Parke 성장에 대한 환경 및 영양조건의 영향. 한국생물공학회지 **11**, 303-310.
2. Adrian M.Z., S. Aviv, and U. Pick. 1995. Plasma membrane sterols are essential for sensing osmotic changes in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **109**, 1395-1403.
3. Adriana K., J. Carlos., and U. Pick. 1995. Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **108**, 1657-1664.
4. Ashima S.G., G.A. Ruth, and M. Delbert. 1991. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in populus leaves. *Plant Physiol.* **96**, 650-655.
5. Ben-Amotz A., A. Katz, and M. Avron. 1982. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (*Chlorophyceae*). *J. Phycol.* **18**, 529-537.
6. Ben-Amotz A., A. Katz, and M. Avron. 1989. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.* **91**, 1040-1043.
7. Ben-Amotz A., and M. Avron. 1983. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **72**, 593-597.
8. Ben-Amotz A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil*. *J. Plant Physiol.* **131**, 479-487.
9. Carlos J., and U. Pick. 1993. Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiol.* **101**, 385-390.
10. Chandler L.A., and S.J. Schwartz. 1987. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* **22**, 669-672.
11. Curtain C.D., D. Looney, D.L. Reran, and N.M. Ivanicic. 1983. Changes in the ordering of lipids in response to osmotic pressure changes. *Biochem. J.* **213**, 131-138.
12. Einspahr K.J., M. Maeda, G.A. Thompson. 1988. Concurrent changes in *Dunaliella salina* ultrastructure and membrane phospholipid metabolism following hyperosmotic shock. *J. Cell Biol.* **107**, 529-535.
13. Ko J.H., and S.H. Lee. 1995. Role of calcium in the osmoregulation under salt stress in *Dunaliella salina*. *J. Plant Biol.* **38**, 243-250.
14. Lers A., Y. Biener, and A. Zamir. 1990. Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol.* **93**, 389-395.
15. Maeda M., and G.A. Thompson. 1986. On the mechanism of rapid plasma membrane and chloroplast envelope expansion in *Dunaliella salina* exposed to hypoosmotic shock. *J. Cell Biol.* **102**, 289-295.
16. Makio K., T. Kakizono, and S. Nagai. 1993. Enhanced caro-

- tenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus plubialis*. *Appl. & Environ. Microbiol.* **12**, 867-873.
17. Oren-Shamir M., U. Pick, and M. Avron. 1990. Plasma membrane potential of the alga *Dunaliella*, and its relation to osmoregulation. *Plant Physiol.* **93**, 403-408.
 18. Rao M.V., A.H. Beverley, and P.O. Douglas. 1996. Ultraviolet- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 125-136.
 19. Sadaka A., M. Avron, and A. Ben-Amotz. 1990. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil*. *Plant Cell Physiol.* **31**, 689-696.
 20. Santillan C. 1982. Mass production of *Spirulina*. *Experientia* **38**, 40-42.
 21. Sukenik A., J. Bennett, A. Mortain-Bertrand, and P.G. Falkowski. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol.* **92**, 891-898.
 22. Weiss M., M. Bental, and U. Pick. 1991. Hydrolysis of polyphosphates and permeability changes in response to osmotic shocks in cells of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **97**, 1241-1248.
 23. Weiss M., and U. Pick. 1991. Uptake of the fluorescent indicator atebrin into acidic vacuoles in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Planta* **185**, 494-501.

(Received August 30, 1999/Accepted November 19, 1999)

ABSTRACT : Induction of β -carotene by Ozone and Hydrogen Peroxide and Extraction Using Vegetable Oil from Microalga *Dunaliella bardawil*

Kyung W. Yoo, Wook J. Jung¹, and Byeong C. Jeong* (*Department of Biological Sciences and Biotechnology Center, and ¹Department of Chemical Engineering and Research Institute for Clean Technology, MyongJi University, YongIn, KyungKi Do 449-728, Korea)

Halotolerant microalga *Dunaliella bardawil* was reported to massively accumulate the β -carotene, which protects cells from excess light intensity. Maximum specific growth rate of 0.168/hr was achieved when cells were cultivated at 1 N NaCl, pH 8.0, light intensity 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, agitation 70 rpm. For the effective accumulation of β -carotene, ozone or hydrogen peroxide was added to media which was irradiated with white fluorescent lamps with moderate light intensity of 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. As a result, maximum volumetric content of β -carotene was 324 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The β -carotene extraction efficiency of vegetable oils was in the order of olive oil, sesame oil, rice bran oil, corn oil, and soy bean oil. Sonication and warming was effective in β -carotene extraction and finally 96.9% of β -carotene could be extracted using olive oil.