

미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의
생산공정 개발 및 실용화
(Process Development for Astaxanthin
production by Microalgae)

연구기관
인하대학교

해양수산부



제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 '미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정 개발 및 실용화' 과제의 제1차년도 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 인 하 대 학 교
주관연구책임자 : 이 철 균
연 구 원 : 윤 현 식
 : 임 건 빈
 : 하 성 진
 : 김 재 환
 : 김 유 진
 : 김 흥 수
연 구 조 원 : 박은경/이정훈
 : 서문원/김선형
 : 이 광 용
 : 최 수 림
 : 남 보 림
 : 김 한 옥

요 약 문

I. 제목

미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정개발 및 실용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Astaxanthin은 연어, 송어, 갑각류의 양식에 필수적인 carotenoid이다. 현재는 전량 수입에 의존하며, 연어 사료로만 1,000억의 시장을 형성하고 있다. 더불어 사람에게도 면역기능활성화, 암예방, 비타민 A 전구체 등 중요한 대사적 역할을 하는 것으로 알려졌다.

Astaxanthin은 우수한 항암 및 항산화 효과로 많은 연구가 되고 있다. 현재 yeast(*Phaffia rhodozyma*)에 의한 생산이나 갑각류껍질로부터의 추출이 시도되고 있으나 yeast는 세포당 astaxanthin 축적이 낮고, 추출은 비싼 효소 등의 문제가 있다. 특히 의약품 및 화장품에 사용될 수 있는 고순도의 astaxanthin의 필요성에 따라 본 연구진의 microalgae의 고농도 대량배양기술을 이용한 실용화가 시급한 실정이라 할 수 있겠다. Astaxanthin은 많은 수입대체효과와 수출이 기대되는 해양신물질로서 의약품, 화장품, 건강식품, 사료 등으로 2000년에만 3억 5천만 달러의 시장을 형성할 정도로 급속한 성장을 하고 있다. 앞으로도 매년 30%의 성장이 기대되며, 이중 생물공학적인 방법이 더욱 각광을 받고 있다. 따라서 astaxanthin의 생산공정의 개발은 장기적으로 1000억원이상의 수입대체효과와 앞으로 성장할 세계시장의 선점이라는 무한한 가능성과 시장성을 가진 사업으로 반드시 수행되어야 할 과제이다.

또한, 이 과정 중에 얻어지는 미세조류의 대량배양기술은 앞으로 미세조류에서 발견되는 무궁무진한 신물질의 생산 및 실용화에 커다란 공헌을 할 것이며, 기술 및 know-how가 자원이 되는 21세기에 해양한국을 이끌어 가는 데 큰 도움이 될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- i. Astaxanthin 생산균주의 고농도 대량배양 공정의 확립
 - *Haematococcus pluvialis*의 고농도 대량배양에 적합한 최적조건 확립
 - 실용화를 위한 미세조류의 고농도 대량배양용 광생물반응기의 개발
 - 목표치는 세계최고 수준인 10^7 cell/mL 이상
- ii. 생산된 astaxanthin의 분리정제기술의 확립
 - 고농도 대량배양된 *H. pluvialis*에서 astaxanthin을 고순도로 분리정제
 - 목표치는 현재 시판되고 있는 8-10% 수준¹⁾보다 훨씬 높은 30% 이상
- iii. 수입대체효과와 대외 경쟁력을 갖춘 astaxanthin의 생산공정의 확립
 - 현재 시판되는 astaxanthin보다 고순도를 같은 가격수준에서 판매
 - 목표치는 현재 최고치 50 mg/L보다 매우 높은 2000 mg/L 이상

IV. 연구개발결과

- i. *Haematococcus*균주의 최적 성장조건 및 배지의 선택

세포농도 면에서는 MBBM, CM 등이 유리하고, astaxanthin 생산면에서는 MBBM, BG-11, CM 등이 유리하다고 판단 됨. 현재 MBBM이 가장 유리.

→ 다양한 배지에서의 실험을 통하여 최적 배지를 찾는 연구가 계속 진행 중이며, 최적 배지 내의 C와 N의 비율 등의 조성을 바꿔가면서 최적배지 조성을 확립하는 연구를 수행하고 있음.

→ MBBM 배지에서 Fe와 Mg를 두 배로 넣었을 때 두 배 정도 생장이 증가하였음
- ii. 세포내 astaxanthin 축적량이 최대가 되는 광량/광원/온도/pH등의 조건확립

광도 - 세포생장을 위한 최적의 광도는 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 판단됨.

1) 현재 시판되고 있는 8% 순도의 astaxanthin은 합성으로 제조한 것으로, 광학활성이 없고 체내의 활성도 떨어지는 racemic mixture이고, 안정성이 떨어지는 free acid형태이며 kg당 \$2,000수준에 판매되고 있음. 갑각류에서 추출한 (3R, 3'R)형태의 10% 순도의 astaxanthin은 kg당 \$8,000수준에 판매되며, 본 연구에서 개발하고자하는 astaxanthin은 활성이 가장 우수하다고 알려진 (3S, 3'S)의 enantiomer이며, 안정성도 가장 우수한 diester 형태임. 이러한 형태의 astaxanthin은 2.5%이하의 낮은 순도에서도 kg당 10,000 이상의 고가로 판매되고 있음.

온도 - 20℃, 25℃에서 배양하다가 30℃에서 배양하여 heating 효과를 주면 astaxanthin 생산량 증가

pH - 단위 세포 당 색소의 생산이 pH 7.5 에서 가장 우수하다고 판단됨.

- iii. 목표치는 flask 실험에서 현재 보고된 astaxanthin 농도 100 mg/L 이상
현재 MBBM 배지의 조성 변화 실험을 통해 astaxanthin 생산량이 45mg/L 이상으로 향상됨. (Fe 와 Mg의 양을 두 배로 넣어 준 것) → 계속 연구중.
Flask 내부에 세포 부착으로 인한 세포 농도 감소와 astaxanthin 감소 문제 발생 → Flask 내부 coating 등으로 문제 해결 시도. 지속적인 연구 진행 중

iv. Astaxanthin의 정성 및정량분석기술 확립

- 총 카로티노이드 양 분석방법

엽록소 a와 b는 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 자체 제작한 homogenizer를 이용, 세포를 균질화한 후 3,000 rpm에서 10 분간 원심 분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계를 이용하여 663 nm, 645 nm 파장에서 측정하여 다음 식에 의하여 계산.

$$\text{chlorophyll } a = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$$

$$\text{chlorophyll } b = (22.9 \times A_{645}) - (4.64 \times A_{663})$$

- Astaxanthin 정량분석기술 개발

Carotenoids와 astaxanthin을 측정하기 위하여 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 자체 제작한 homogenizer를 이용, 세포가 흰색의 잔여물이 될 때까지 균질화 한 후 3000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계를 이용하여 475nm 파장에서 측정.

v. *Haematococcus* 세포로부터 Astaxanthin 추출기술 개발

- 용매사용법

메탄올, 아세톤 등의 용매를 사용한 추출기술 시도 (세포벽의 파괴를 위한 homogenization이 필요함을 확인)

아세톤의 추출성이 우수

- 효소사용법

효소 사용법은 실시 예정

V. 연구개발결과의 활용계획

현재 Astaxanthin의 생산에 관한 기본적인 연구 결과들을 바탕으로 미세조류를 이용한 astaxanthin의 생산 조건을 찾고 최적의 광도, 배지의 조성 및 광생물반응기의 운전법 등을 확립 중에 있으며, 대량생산후 제제화에 필요한 분리정제 기술을 정립하는 중이다. 또한 astaxanthin을 수입판매하는 경험도 축적되어 있는 기업체와 공동연구를 통하여 사업화의 진행을 추진할 예정이다.

- 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산은 세포당 astaxanthin의 축적이 높은 데다, 의학적으로 가장 역가가 높은 (3S, 3'S)의 enantiomer를 생산할 수 있는 유일한 균주이며, 생산시 제제화에 유리한 ester형태로 축적할 수 있어, astaxanthin의 생산에 가장 유리한 방법이다.
- 현재까지 연구된 100여종의 미세조류에서만 여러 종류의 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강 식품; carotenoids, biliprotein등의 염료; bioflocculant, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 이르기까지 광범위한 물질이 생산될 수 있다.
- 또한, 본 연구를 수행함에 있어서 축적될 새로운 2단계 배양방법, 고농도 대량배양용 광생물반응기 등은, 현재 알려진 2만 6천종의 해양미세조류가 가지고 있을 고부가가치의 해양신물질의 사업화에 필수불가결한 귀중한 자료로서, 3면의 바다를 이용한 해양한국의 발전에 직·간접적으로 크게 이바지 할 것이다.
- 또한 미세조류의 고농도 대량배양 기술은 오염 토양의 정화, 생물학적 폐수처리, 지구 온난화의 주범인 이산화탄소의 제거, 생물학적 비료로서의 사용 등 응용 영역을 넓어 본 사업에서 축적될 기술은 매우 귀중한 기술이며, 우리나라의 생물산업발전에 크게 이바지 할 것으로 기대된다.

Summary

Optimal conditions, such as media composition, temperature, pH, and light intensity for the growth of *Haematococcus pluvialis* were examined. After a series of experiments, modified MBBM was selected as an optimal medium for high concentration culture of *Haematococcus pluvialis*, and optimal culture conditions for temperature, pH, and light intensity were found to be 25°C, 7.5, and 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, respectively. Maximum cell concentration under the optimal condition was 1.86 g/L and maximum astaxanthin accumulation in the cell was over 45 mg/L. In this process the the composition of MBBM medium such as Ca, Fe, Mg, Na, K, and trace elements were modified. The concentrations of Fe and Mg were found to be more important than other medium components. Astaxanthin accumulation and chlorophyll concentration under at 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ were higher than those under light intensities of 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ or 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Photobioreactors were applied to high-density *Haematococcus pluvialis* cultures for scale-up and process development. However, microalgal cells were relatively sensitive to the shear stress generated by impeller. As a result, faster cell growth were observed under low agitation speed (150 rpm) than high agitation speed (200 rpm). On the contrary, astaxanthin accumulation of the latter was higher than the former. The supplement of monochromatic lights from LEDs(light-emitting diodes) did not show any significant effect on cell growth, however, astaxanthin accumulation seemed to be affected by colored lights. The observed change might have been minimal because the light intensities of LEDs were very low. Further experimental research is required to clarify the effect of colored lights on cell growth and astaxanthin formation rate. One of the major problem observed was cell attachment to the glass surface of flasks and photobioreactors. Solving this problem will be the major objectives for the second year of the research.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

CHAPTER 1. Introduction

- (1) Research Objectives and Detailed Goals
- (2) Research Overview

CHAPTER 2. Trends in Astaxanthin R&D

- (1) Astaxanthin Research in Korea and in World
- (2) Industrial Application of Astaxanthin
- (3) Future Prospect

CHAPTER 3. Research Topics and Results

- (1) Research Topics for the First Year
- (2) Results from the First Year Research
- (3) Future Plans for Coming Research Years

CHAPTER 4. Degree of Achievement and Contribution

- (1) Degree of Achievement
- (2) Contribution of the Results from This Year

CHAPTER 5. Application Plan

CHAPTER 6. Reference

목 차

제 1 장. 서 론

제 1 절. 연구 목적 및 내용

제 2 절. 연구의 착안점

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 현황

제 2 절. 상업적 이용성

제 3 절. 전 망

제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 개발 수행 내용

1. *Haematococcus pluvialis* 균주의 최적생산배지의 선택
2. 세포생장과 astaxanthin 생산량이 최대가 되는 조건의 선별
3. 최적 배지에 필요한 원소의 최소화
4. 배지 최적화
5. 낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin 생산량 비교
6. Scale up을 위한 Photobioreactor 실험 (lab-scale)
7. LED를 이용한 파장별 *H. pluvialis*의 성장에 대한 영향
8. 균주의 성장시 flask 내부의 coating 효과
9. Astaxanthin의 정성 및 정량분석기술 확립

제 2 절. 연구 결과

1. 여러 가지 배지에서의 세포농도 및 astaxanthin 생산성 측정
2. 세포생장과 astaxanthin 생산량이 최대가 되는 조건의 선별
 - 2-1. 다양한 광도의 영향
 - 2-2. 배양 온도의 영향
 - 2-3. 초기 pH의 영향
3. 최적 배지에 필요한 원소의 최소화
4. 배지 최적화

5. 낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin 생산량 비교
6. Scale up을 위한 Photobioreactor 실험 (lab-scale)
7. LED를 이용한 파장별 *H. pluvialis*의 성장에 대한 영향
8. 균주의 성장시 flask 내부의 coating 효과
9. 세포 부착에 따른 세포 농도와 astaxanthin의 차이 비교

제 3 절. 향후 계획 및 추진 전략

1. 제1단계 연구개발 목표 및 내용
2. 제2차년도 연구개발 목표 (2001년 3월-2002년 2월)
3. 제3차년도 연구개발 목표 (2002년 3월-2003년 2월)
4. 제2단계 장기계획 (2004년 3월-2007년 2월)
5. 추진전략 및 방법

제 4 장. 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절. 연구 개발 목표 달성도

제 2 절. 대외 기여도

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

제 6 장. 참고문헌

제 1 장. 서 론

제 1 절. 연구 목적 및 내용

Astaxanthin은 연어, 송어, 갑각류의 양식에 필수적인 carotenoid이다. 현재 우리나라에서는 전량 수입에 의존하며, 연어 사료로만 1,000억의 시장을 형성하고 있다. 사람에게도 면역기능활성화, 비타민 A 전구체 등 중요한 대사적 역할을 수행하여 주며, astaxanthin은 우수한 항암 및 항산화 효과로 많은 연구가 되고 있다.

Astaxanthin은 현재의 사료의 사용에서 벗어나 우수한 항산화제, 면역증강제, 항암제 등의 효과로 인해, 화장품 및 의약품으로서의 새로운 용도로의 시장을 개척해 갈 전망이다. 전술한 바와 같이 astaxanthin의 유용성이 꾸준히 증가하고 있음에 따라 의약품, 화장품, 건강식품, 사료 등으로 높은 시장경제성을 보이고 있다.

Astaxanthin은 엄격한 의미의 신물질은 아니지만, 이제까지의 사료 등의 저부가가치 용도에서 항암, 항산화 효과를 가진 고부가가치의 새로운 용도로 발전하고 있는 carotenoid이며, 따라서 이제까지의 순도보다 훨씬 높은 순도의 astaxanthin의 생산방법이 요구되는 바, 신물질이라 분류할 수 있다.

Astaxanthin의 생산공정의 개발은 장기적으로 1000억원 이상의 수입대체효과와 앞으로 성장할 세계시장의 선점이라는 무한한 가능성과 시장성을 가진 사업으로 반드시 수행되어야 할 과제이다.

따라서 본 연구는 이제까지의 astaxanthin의 생산 방법이었던 낮은 경제성을 지닌 yeast에 의한 생산이나 갑각류 껍질로부터의 추출이 아닌 해양 미세조류를 이용하여 astaxanthin의 생산을 유도하고자 한다. 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도배양 기술의 개발을 시도하여 astaxanthin을 생물공정을 이용한 기능성 화장품 소재 및 의약품의 원료로 실용화할 예정이다.

또한, 이 과정 중에 얻어지는 미세조류의 대량배양기술은 앞으로 미세조류에서 발견되는 무궁무진한 신물질의 생산 및 실용화에 커다란 공헌을 할 것이며, 기술 및 know-how가 자원이 되는 21세기에 해양한국을 이끌어 가는 데

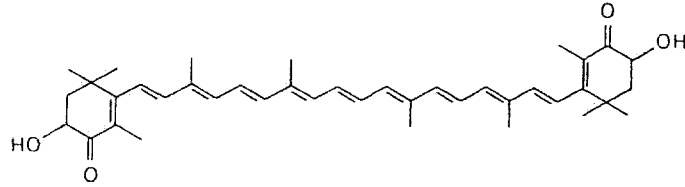
큰 도움이 될 것이다.

제 2 절. 연구의 착안점

- 현재 Astaxanthin이 생산되는 방법은 크게 붉은 yeast인 *Phaffia rhodozyma*를 이용한 방법, 게나 새우 등의 갑각류 껍질에서 추출하는 방법, 화학적인 합성법 등이 이용되고 있다.
- 그러나 효모를 이용하는 경우는 단위부피당 세포의 농도는 높으나, 세포당 astaxanthin의 함량이 낮아, 생산성이 200 mg/L을 넘지 않을 전망이다, 탄소원을 포함한 고가의 배지가 사용되어, 경제성이 불리하고 역가가 낮은 (3*R*, 3*R'*)의 enantiomer를 생산하여 부가가치가 낮다. 이는 이제까지 많은 투자를 하였음에도 효모를 이용한 astaxanthin의 생산공정이 전혀 실용화 되지 않았음을 보면 알 수 있다.
- 갑각류 껍질에서 추출하는 방법은 고가의 효소를 필요로 하며, 원료의 공급이 연속성이 없어, 역시 상업적으로 불리하다.
- 화학적으로 합성하는 방법은 astaxanthin의 구조가 복잡하고, 선택도가 낮아 시장점유율이 줄어들고 있다. 또한 astaxanthin은 chiral center가 2개나 있어서, 화학적 합성으로는 racemic mixture가 생산되는 관계로 사료를 제외한 고부가가치의 용도로는 사용할 수 없다.
- 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산은 세포당 astaxanthin의 축적이 높은 데다, 의학적으로 가장 역가가 높은 (3*S*, 3'*S*)의 enantiomer를 생산할 수 있는 유일한 균주이며, 생산시 제제화에 유리한 ester형태로 축적할 수 있어, astaxanthin의 생산에 가장 유리한 방법이다.
- 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산이 많이 시도되지 않은 이유는, 미세조류를 경제성이 있을 정도의 고농도로 배양하기가 어려웠기 때문이다. 그러나, 본 연구진은 국내에서는 유일하게, 세계최고 농도의 광생물반응기를 개발한 경험과 분리정제 및 사업화에 대한 많은 know-how가 축적되어 있어, 성공가능성이 매우 높다고 평가된다.
- 본 실험에서는 진핵세포이며 단세포 녹조류의 일종인 *Haematococcus pluvialis*를 사용한다

1. Astaxanthin이란?

- chiral center를 두 개 가지는 carotenoid
- (3*S*, 3'*S*)와 (3*R*, 3'*R*)의 enantiomer와 (3*S*, 3'*R*)의 meso form을 가짐
- 이 중, (3*S*, 3'*S*)의 enantiomer의 효과가 가장 뛰어난 것으로 보고되어짐



2. Astaxanthin의 활용도

- 연어, 송어, 갑각류의 양식에 필수적인 사료임
- 면역기능활성화, 비타민 A 전구체 등 중요한 대사적 역할을 수행
- 우수한 항산화제, 면역증강제, 항암제 등의 효과를 지님
- 화장품 및 의약품으로서의 새로운 용도로 개발되고 있음

3. Astaxanthin의 생산

- 사료가 아닌, 의약품, 화장품, 건강식품 등으로 사용되려면 고순도가 필요
- 고농도의 미세조류에 의한 생산은 더욱 고부가가치인 고순도 생산에 유리함
- 현재 사용되는 미세조류 배양에 의한 생산은 세포농도가 10^4 - 10^5 정도 수준이나 본 연구진의 기술은 이보다 10^2 - 10^3 배의 고농도 가능 (생산성 100배이상 증가)

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 현황

미세조류의 상업적 이용은 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강식품; carotenoids, biliprotein 등의 염료; bioflocculant, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 오염 토양의 정화 및 생물학적 비료로서의 사용 등 농업 분야까지 영역을 넓히고 있다. 이러한 연구는 해양자원에 많은 관심을 가지고 투자를 진행중인 미국, 유럽, 일본, 이스라엘, 노르웨이, 독일 등 선진국에서 수행되어 오고 있고, 중국, 동남아시아 등 나라에서도 관심을 가지고 있다.

본 연구에서는 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 해양 미생물을 이용한 신물질 개발 중 37 % 이상을 생산하는 미세조류의 개발 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용 산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도배양 신기술의 개발을 시도하기 위해 astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione)을 생산하여 실용화하고자 한다. Astaxanthin은 자연계에 널리 분포되어 있는 keto-carotenoid로 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합체이다. 주황색 또는 붉은 색을 띠며 연어, 송어 또는 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 있어서 주요 색소 물질이며, 인류와 동물의 대사 기능을 향상시키고, virus, bacteria, fungi에 의한 감염을 감소시키고, cytokine 유도 활성화로 인하여 면역기능을 활성화시키고, T-helper cell의 기능을 향상시키고, oxygen radical의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암과 간암 등 암의 예방과 지방 조직을 peroxidation으로부터 보호하여 노화 방지의 효과가 있으며, 비타민 A의 전구체로 건강한 눈의 유지에 필수이며, 요즘 화장품에서 주름 제거에 효과가 있다는 retinol의 전구체이기도 하다. 수산업이나 농축산업에서는 사료로 쓰여져 pigmentation, 제품 내 항산화 효과 (Terao 1989), 면역기능 등을 향상시킨다. 특히 astaxanthin은 종전에 항산화제로 쓰였던 수용성에서 불안정한 상태인 비타민 C나 지용성 비타민 E인 α -tocopherol보다 500-1000배의 항산화 효과가 입증되어 의약적 또는 식품첨가물로서도 상당한 가치가 있다.

g이와 같이 많은 장점들을 가진 astaxanthin을 생산하는 방법은 화학적 합성법, 추출법, 붉은 yeast(*Phaffia rhodozyma*), 미세조류를 이용한 생물공학적인 방법 등이 있다. 화학적 합성법은 비싼 단가와 낮은 생체 이용률과 안정성에 대한 문제가 있고, 새우나 게 등의 갑각류에서 유기용매 또는 초임계 유체를 이용해서 추출하는 방법은 비싼 효소의 비용, 불안정한 원료의 공급, 그리고 폐기물의 처리 등이 문제가 된다. *Phaffia rhodozyma*는 성장 속도는 빠르지만, 세포 당 astaxanthin의 함유량이 적고 (3R, 3'R) form만을 생산하므로 산업적 이용이 제한되고 있다. 반면에 *Haematococcus pluvialis*는 세포 내 astaxanthin이 높은 농도로 존재함으로써 불필요한 성분의 과량제공이나 회분의 공급이 줄어들고, 같은 양을 공급했을 때 10배 정도의 효과가 가능하며, 1999년 8월에는 FDA에서 식품 첨가물, 기능성 화장품, 의약품 및 건강 보조물질로의 안정성을 승인 받아 그 이용이 더욱 확대될 것이라고 기대되고 있다. 태양광과 같은 값싼 에너지를 이용, 생체 이용성이 높은 (3S, 3'S) isomer를 생산하므로 고농도 미세조류 배양 기술의 확립은 astaxanthin의 상업화가 가능하다. 본 연구에서는 astaxanthin 생산에 가장 우수한 *Haematococcus pluvialis*의 배양 조건의 최적화를 수립, 고농도 배양을 수행하고자 한다. 1.5% astaxanthin을 현재 사료용으로 시판하고 있는 Cyanotech사의 경우, 연구를 시작한 지, 현재까지 4년이 경과하였다. 이는 astaxanthin을 고농도 대량배양하는 기술이 그 만큼 첨단 기술이 필요하다는 것을 반증하는 자료이다. 전술한 바와 같이 astaxanthin의 유용성이 꾸준히 증가하여, 기능성 화장품 및 의약품으로 사용될 전망임을 감안할 때, 본 연구는 적어도 4년 이상 꾸준히 진행되어야 할 것으로 판단된다. 많은 연구비를 투자하고 회사의 사활을 걸고 있는 미국의 AquaSearch사도 현재 생물공학적으로 생산한 약 2.5% 순도의 astaxanthin을 건강보조식품으로 판매하는 데 불과한 수준이다. 현재 이 건강보조식품(상품명 AstaFactor)는 5 mg짜리 60정을 \$30에 팔고 있다 (kg당 \$100,000 수준의 고가임). 다른 방법으로 생산된 astaxanthin의 가격도 생물공학적 방법에 의해 생산된 astaxanthin보다는 싸게 팔리지만, 상당의 고가에 팔리고 있다. Hoffmann-LaRoche사는 8%(w/w)의 합성 astaxanthin(상품명 Carophyll)을 \$2,000/kg에 팔고 있으며, 일본의 Itano사는 갑각류에서 추출한 10%(w/w)의 astaxanthin을 \$8,000/kg에 시판하고 있다. 국내의 미세조류를 이용한 신물질 연구는 국내에 거의 존재하지 않았다. 그러나, 최근 10년간 발견된 해양생물유래의 신물질 중 절대다수인 35%가 미세조

류 유래였던 것을 감안하면, 미세조류는 미래의 산업자원으로서 잠재력이 매우 크다. 그러므로, 현재는 매우 미진한 미세조류 유래의 신 기능성 물질의 탐색, 개발 및 자원화에 관한 연구는 많은 연구가 진행되어야 할 분야이다.

또한 생물다양성 협약이 발효된 이후 세계 각국은 자국 고유의 생물자원을 미래의 자원보고로 생각하고, 이에 대한 보전과 특히 유전자관리 분야로의 정책을 새로이 펴고 있고 이를 이용한 개발을 추진하려 하고 있다. 특히 생물다양성 문제는 일반적으로 육상의 동·식물을 주로 다루고 있고 해양 생물에까지는 아직도 많은 연구가 이루어져있지 않다. 앞으로 개발될 미세조류 유래의 신물질의 개발에도 본 과제를 수행하면서 축적될 첨단기술은 반드시 필요하다.

미세조류에 대한 연구는 1940년대에 시작되었으나, 적당한 공정의 개발이 되지 않아 그동안 사업화로 진행되지 못하였다. 미세조류의 고농도 대량배양에 대한 연구는 전 세계적으로 다시 시작되고 있는 분야이므로 국내에서 빠르게 대처, 유기적인 관리를 하면서 집중투자를 할 경우 적어도 해양 미세조류 분야에 대한 국제적인 경쟁력을 높일 수 있다고 판단된다. 본 연구에서와 같이 경쟁력 있는 미세 조류로부터 신 기능성 물질의 탐색과 응용성에 대한 분야는 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다고 생각되며 특히 광생물반응기의 해양신물질분야로의 적용이야말로 매우 획기적인 결과로 기록될 것이다.

결과적으로, 생물공학적으로 생산된 astaxanthin의 가격이 kg당 10배 이상의 고가에 팔리고 있음을 알 수 있으며, 또한 순도가 높아질수록 기하급수적으로 고가의 가격에 판매됨을 알 수 있다. 따라서, 본 연구에서 추구하고 있는 생물공학적 고농도 대량배양에 의한 astaxanthin의 생산에 가능하게 될 경우, 해양유래의 고부가가치의 산업을 이끌 전망이며, 해양산업에 대한 산업적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

제 2 절. 상업적 이용성

미세조류의 상업적 이용은 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강식품; carotenoids, biliprotein 등의 염료; bioflocculant, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 오염 토양의 정화 및 생물학적 비료로서의 사용 등 농업 분야까지

영역을 넓히고 있다. 이러한 연구는 해양자원에 많은 관심을 가지고 투자를 진행중인 미국, 유럽, 일본, 이스라엘, 노르웨이, 독일 등 선진국에서 수행되어 오고 있고, 중국, 동남아시아 등 나라에서도 관심을 가지고 있다.

특히 astaxanthin은 자연계에 널리 분포되어 있는 keto-carotenoid로 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합체이다. 주황색 또는 붉은 색을 띠는 연어, 송어 또는 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 있어서 주요 색소 물질이다. 효능으로는 인류와 동물의 대사 기능을 향상시키고, virus, bacteria, fungi에 의한 감염을 감소시키고, cytokine 유도 활성으로 인하여 면역기능을 활성화시키고, T-helper cell의 기능을 향상시키고, oxygen radical의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암과 간암 등 암의 예방과 지방 조직을 peroxidation으로부터 보호하여 노화 방지의 효과가 있으며, 비타민 A의 전구체로 건강한 눈의 유지에 필수이며, 요즘 화장품에서 주름 제거에 효과가 있다는 레티놀의 전구체이기도 하며, 자외선으로 인한 유해활성산소의 발생과 산화를 방지하는 효과가 있어, 앞으로 많은 수요가 예측되는 물질이다. 수산업이나 농축산업에서는 사료로 쓰여져 pigmentation, 제품 내 항산화 효과, 면역기능 등을 향상시킨다. 특히 astaxanthin은 종전에 항산화제로 쓰였던 수용성에서 불안정한 상태인 비타민 C나 지용성 비타민 E인 α -tocopherol보다 500-1000배의 항산화 효과가 입증되어 의약적 또는 식품첨가물로서도 상당한 가치가 있다.

1. 사료첨가제

산란 양계 사료에 astaxanthin을 2~4% 첨가한 후 닭에게 투여하고 최적의 산란 환경을 갖추어 주면, 사료 식이 후 10일부터 아스타산틴 함유 계란이 생산된다. 일본에서는 현재 일반 계란보다 3~5배 높은 가격으로 팔리고 있다. 또한 astaxanthin을 먹인 닭은 육질의 탄력성이 높고, 지방층에 astaxanthin이 함유되어, 건강식으로 쓰일 수 있다.

새우, 연어 등의 양식용 사료에 astaxanthin을 섞어주면, 상품의 착색이 우수하여, 상품가치를 높일 수 있으며, 전술한 astaxanthin의 활성으로 인해, 양식 새우 및 연어 등이 병충해에 영향을 덜 받는 등 많은 장점이 있다.

그러나, 사료첨가제는 일반적으로 단가가 매우 낮기 때문에 우리나라와 같이 토지의 면적이 넓지 못하고, 태양광이 적도지방보다 상대적으로 약한 기후에서는 적당하지 않다고 사료된다.

2. 화장품분야

Astaxanthin은 자외선 및 각종 스트레스에 의한 피부노화와 피부trouble의 원인이 되는 유해활성산소를 제거하는 하는 항산화능력이 vitamin E의 약 500-1000배라는 사실이 확인되었다. 이러한 astaxanthin의 강력한 항산화능력과 provitamin A로서의 작용에 착안하여, astaxanthin은 탄력있는 피부를 만드는 피부케어의 유효성분으로서 화장품에 응용될 수 있다. 다른 항산화제와 혼합하여 화장품에 사용함으로써, 빛과 열에 약한 carotenoid 색소의 특징을 개선하고, 화장품 원료로서의 안정성을 높이는데 성공하게 되어, 일본의 3대 화장품회사중 하나인 KOSE사에서 1999년부터 립스틱, 화운데이션, 스킨케어 로션등을 발매하여 현재 인기리에 판매되고 있습니다.

Astaxanthin의 피부에 대한 입증된 효과는 산화장애로부터 섬유아세포를 보호해주며, 콜라겐과 엘라스틴의 약화를 방지시켜, 탄력있는 피부 유지하도록 도와주며, 자외선에 의한 홍반형성을 억제하는 작용, 멜라닌생성을 억제하는 작용, 노화에 의한 주름생성을 방지하는 작용 등이 있으며, 미백작용을 하여, 깨끗하고 흰 피부를 유지하도록 도와준다.

따라서, 본 연구에서는 astaxanthin의 FDA 공인이 나기 전에 2000년부터 우리나라에서도 발효된 기능성화장품법에 의한 기능성 화장품의 원료로 상품화할 예정이다.

3. 식품 및 의약품

그 동안 이 물질은 대량 생산되지 않아 실용화되지 않았으나, 앞으로는 식품, 화장품, 의약소재로 사용되기 시작할 것으로 예상된다.

Astaxanthin의 높은 항산화효과로 식품첨가물·건강보조식품 등으로 사용될 수 있으며, 현재 통조림 등의 식품에 들어가는 방부제(항산화제)를 단 몇 %만 대체한 경우에도 매우 큰 시장을 형성할 것으로 예상된다. 게다가 astaxanthin은 단순한 항산화작용이외에도 전술한 많은 효과가 입증된 상태이므로, 시장 점유율이 매년 증가할 것으로 전망된다.

인류와 동물의 대사 기능을 향상시키고, virus, bacteria, fungi에 의한 감염을 감소시키고, cytokine 유도 활성으로 인하여 면역기능을 활성화시키고, T-helper cell의 기능을 향상시키고, oxygen radical의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암과 간암 등 암의 예방과 지방 조직을 peroxidation으로부터 보호하여 노화 방지의 효과와 산화방지제로

혈관벽을 파괴하는 화학물질을 제거, 세포 손상에 따른 기억력 감퇴를 예방하므로 미 식품안전청(FDA)의 허가가 날 경우, 역시 새롭고 거대한 시장을 형성할 것이다.

제 3 절. 전 망

바로 앞의 2절의 상업적 응용에서 전술한 바와 같이 astaxanthin의 다양한 활용성은 특히 화장품, 식품, 의약품 분야에서 거대한 새 시장을 형성할 것으로 기대된다.

Astaxanthin은 현재의 사료의 사용에서 벗어나 우수한 항산화제, 면역증강제, 항암제 등의 효과로 인해, 화장품 및 의약품으로서의 새로운 용도로의 시장을 개척해 나갈 전망이다. 2000년 현재의 시장은 생물공학적 방법으로 생산된 astaxanthin만 3억 5천만 달러(약 4조원)에 이를 것으로 전망되며, 매년 30% 이상의 시장성장이 예상되고 있다. 따라서 astaxanthin의 생산공정의 개발은 장기적으로 1000억원이상의 수입대체효과와 앞으로 성장할 세계시장의 선점이라는 무한한 가능성과 시장성을 가진 사업으로 반드시 수행되어야 할 과제라고 사료된다.

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 개발 수행 내용

1. *Haematococcus pluvialis* 균주의 최적생산배지의 선택

1-1. 여러 가지 배지에서의 세포농도 및 astaxanthin 생산성 측정

*H. pluvialis*의 고농도 배양을 수행하기 위하여 최적 배지의 조성 확립이 필요하므로, 기존의 astaxanthin 생산을 위한 미세 조류 배양에 쓰여졌던 Hong Kong Medium (HKM), Modified Bold's Basal Medium (MBBM), Modified Bristol's Medium (MBM), Proteose-Peptone Medium (PPM), BG-11 Medium (BG-11), Chen Medium (CM), Optimal Haematococcus Medium (OHM) 등의 다양한 배지를 사용하여 그 결과를 비교함으로써 배지 내 탄소원, 질소원과 미량원소 등이 세포의 성장과 astaxanthin 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 세포생장과 astaxanthin 생산량이 최대가 되는 조건의 선별

2-1. 다양한 광도의 영향(Various Light Intensity)

*H. pluvialis*의 성장과 carotenoid 형성에 영향을 주는 인자 중의 하나인 광도가 세포의 고농도 배양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 형광등의 수와 거리, 반사체의 유무 등을 조절하여 15, 30, 60, 75, 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 를 얻었다. 세포의 고농도 배양을 위한 세포의 농도에 미치는 영향을 고찰하였다.

2-2. 배양 온도의 영향

*H. pluvialis*의 최적 배양 온도를 선정하기 위하여 Kobayashi, Fang 등의 연구 결과와 문헌을 조사하여 20°C, 25°C, 30°C 온도의 배양 조건을 수립하였으며, 온도에 따른 세포 성장 및 색소 형성에 미치는 결과에 대하여 관찰하였다.

2-3. 초기 pH의 영향

배양 배지의 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 UTEX에서 분양 받은 균주의 배지인 proteose-peptone 배지의 초기 pH 6.3을 기초로 하여 pH 4.5, 6.0,

7.5의 범위의 조건에서 실험을 수행하였다.

3. 최적 배지에 필요한 원소의 최소화

배지에 들어가는 성분 원소를 최소화하면서 최적의 배지조성을 찾는 연구를 수행하였다. 미세조류 배양시 대부분의 배지에 들어 있지만 독성이 있는 원소로 알려져 있는 Zn, B 등의 원소가 세포 성장과 astaxanthin 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 배지로는 BG, CHEN, MBBM, OHM을 사용하였고 Zn과 B 두 원소를 첨가한 배지와((+)로 표시) 첨가하지 않은 배지((-)로 표시)로 나누어 그 영향을 조사하였다. 초기 pH는 7.5, 광도는 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 실험 온도는 25°C 로 설정하였고 교반 속도는 175 rpm에서 실험을 수행하였다.

4. 배지 최적화

기존의 배지실험에서 *H. pluvialis*의 성장에 가장 적합하다고 여겨진 MBBM 배지의 최적화를 위해 실험을 수행하였다. MBBM 배지에 첨가되는 원소 중에서 Ca, Fe, Mg, Na, K, trace 등의 원소 조성비를 변화시켜 세포 성장과 astaxanthin 축적량을 조사하였다. 먼저 Ca, Fe, Mg, Na, K, trace의 양을 각각 두 배씩 넣고 실험하였다. 온도는 25°C 로 설정하고 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 각각 실험하였다.

5. 낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin 생산량 비교

이전에 수행하였던 광도 실험에서 낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin의 생산량을 비교하기 위하여 광도를 세분화 시켜 실험을 수행하였다. 배지는 MBBM 배지를 사용하였고 온도는 25°C 로 설정하고 30, 40, $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 실험하였다.

6. Scale up을 위한 Photobioreactor 실험 (lab-scale)

Microalgae의 상업적 이용을 위한 생산방법으로는 현재 pond, tanks, tubes, photobioreactors 등을 이용한 방법이 있으며 최근에는 flat panel type, tubular type, flume type 등 응용된 photobioreactor가 연구 중에 있다.

Photobioreactor는 크게 open-air system과 closed system의 형태로 나눌 수 있다. 4계절의 기후변화를 갖는 우리 나라에서는 큰 기후변화와 일조량의 차이 등으로 scale up을 하기 위해서는 closed system을 지향할 수밖에 없다.

scale up에 있어서 중요한 것은 photoreactor type 뿐만 아니라 media, 온도, pH, agitation, light source, light intensity, cost 등이 고려 되어야 하며 이에 맞는 최적화된 photobioreactor를 설계 및 공정화시키는 일이 중요한 과제라 할 수 있겠다. *H.pluvialis*의 대량배양을 실행하기 위한 첫 번째 photobioreactor 실험을 수행하였다. 두 대의 photobioreactor를 이용해 실험을 수행하였는데, total volume이 7L인 photobioreactor에 working volume를 5L로 설정하여 실험을 수행하였다 (1차년도 사업예산이 대폭삭감되면서, 시작품제작비가 거의 없어져서, 다른 형태의 photobioreactor는 실험하지 못하였음). 실험조건은, MBBM 배지를 사용하였고 배양온도는 25℃으로 설정하였다.

먼저 *H.pluvialis*가 shear stress에 민감한 종의 특성이 있으므로 우선 최적 agitation speed를 찾기 위한 실험을 수행하였다. 첫 번째 photobioreactor (F-1)는 200 rpm, 그리고 나머지 하나의 photobioreactor (F-2)는 150 rpm으로 교반속도를 설정하였다. 그리고 나머지 조건들은 flask 실험을 통해 얻은 결과를 동일하게 적용하였다.

7. LED를 이용한 파장별 *H. pluvialis*의 성장에 대한 영향

Microalgae는 광합성작용을 하여 대기중의 이산화탄소를 유기물로 전환시킨다. 일정 파장의 빛을 흡수하여 전자전달반응을 수행하게 되는데 이는 엽록소 a, b, carotenoid에서 흡수하게 된다. 이에 따라 실험실에서는 470 nm, 560 nm, 580 nm, 605 nm, 660 nm, 680 nm의 각각 하나의 일정한 파장을 내는 LED(Light Emitting Diode)를 이용하여 *H.pluvialis*의 성장시 미치는 영향에 대해 조사하는 실험을 하였다. 배지로는 MBBM media을 사용하였고 온도는 20℃ 광도는 35~40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 정해졌으며 LED 광도는 0.6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 하였다. 이것은 LED에서 나오는 열에 대한 *H.pluvialis*의 피해를 최소화하기 위해 정해졌다.

8. 균주의 성장시 flask 내부의 coating 효과

세포 성장 시 배양 시간이 길어짐에 따라 많은 양의 세포가 flask의 안 쪽 벽과 바닥에 부착 되게 된다. 따라서 세포의 손실과 그에 따른 astaxanthin 생산량의 감소 등의 문제가 발생하게 된다. 그래서 이 문제를 해결하기 위한 방법의 하나로 flask 내부를 coating 하는 실험을 수행하였다. 먼저 flask 내부에 이물질이 없도록 깨끗이 닦아낸 다음 묽은 황산 희석액에 담가 24 시간 동안

놓아두어 flask 내부에 남아있을지도 모르는 이물질은 완전히 제거하였다. 그런 다음 증류수로 씻어내고 건조시켜 flask 내부를 sigmacoat로 coating 하였다. 그리고 12 시간 drying oven에서 건조시킨 다음 12 시간 동안 100°C vacuum oven에서 건조시켰다. 그리고 이 coating 된 flask와 그렇지 않은 flask에서의 배양실험을 통하여 세포 부착의 정도를 비교하였고 세포농도와 astaxanthin의 생산량의 차이를 비교해 보았다. 배지로는 MBBM과 CHEN 배지를 사용하였고 실험 온도는 25°C, 교반속도는 175 rpm으로 설정하였고 광도는 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 하였다.

9. Astaxanthin의 정성 및 정량분석기술 확립

9-1. 총 카로티노이드 양 분석방법

엽록소 *a*와 *b*는 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 자체 제작한 homogenizer를 이용하여, 세포를 균질화한 후 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계를 이용하여 663 nm, 645 nm 파장에서 측정하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{chlorophyll } a = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$$

$$\text{chlorophyll } b = (22.9 \times A_{645}) - (4.64 \times A_{663})$$

9-2. Astaxanthin 정량 분석기술 개발

Carotenoids와 astaxanthin을 측정하기 위하여 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 자체 제작한 homogenizer를 이용하여, 세포가 흰색의 잔여물이 될 때까지 균질화 한 후 3000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계를 이용하여 475nm 파장에서 측정하였다.

제 2 절. 연구 결과

1. 여러 가지 배지에서의 세포농도 및 astaxanthin 생산성 측정

기존의 astaxanthin 생산을 위한 미세 조류 배양에 쓰여졌던 Hong Kong Medium (HKM), Modified Bold's Basal Medium (MBBM), Modified Bristol's Medium (MBM), Proteose-Peptide Medium (PPM), BG-11

Medium (BG-11), Chen Medium (CM), Optimal Haematococcus Medium (OHM) 등의 다양한 배지를 사용하여 *Haematococcus pluvialis* 균주의 최적 배지를 찾아내는 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 배지의 조성은 표 1에 나타내었다.

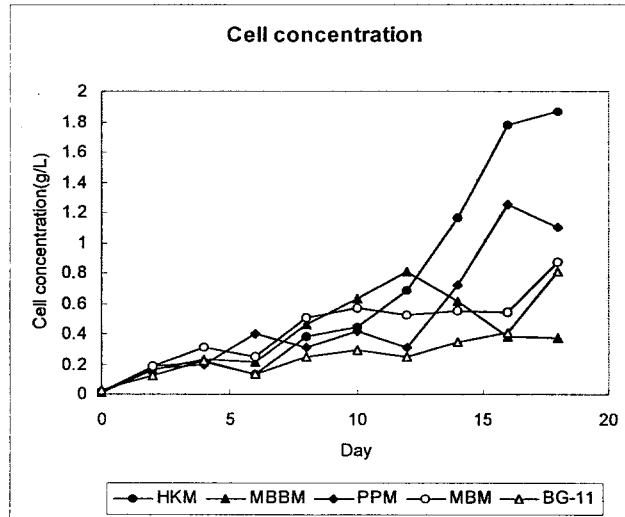
Table 1. Composition of Various Media for *Haematococcus pluvialis*.

	HKM	PPM	BG-11M	CM	OHM	MBBM	MBM
Major	mg/l						
CaCl ₂ · 2H ₂ O	73.00	25.00	36.00	1838.00	110.00	24.99	30.00
FeSO ₄ · 7H ₂ O				20.90		4.98	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.60	75.00	75.00	61.60	246.00	73.95	80.00
NaH ₂ PO ₄				195.00			
Na ₂ HPO ₄			1500.00		30.00		
NaNO ₃	220.00	25.00	1500.00			246.5	
NaHCO ₃	1000.00						
K ₂ HPO ₄	45.00	75.00	40.00			74.9	80.00
KH ₂ PO ₄	40.00	175.00				175.57	180.00
NaCl	8.30	25.00				25.13	30.00
CH ₃ COONa				1500.00			1000.00
KNO ₃				500.00	41.00		300.00
EDTA	6.70			18.60		49.68	30.00
C ₆ H ₈ O ₇			6.00				
FeC ₆ H ₉ O ₇ N			6.00				
Na ₂ -EDTA			1.00				
Na ₂ CO ₃			20.00				
Trace	mg/l						
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.016			0.85			1.00
ZnSO ₄				0.72			
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.012		0.079	0.62	0.012	1.57	1.00
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.001		0.39	0.07	0.12	1.18	1.00
CoCl ₂ · 2H ₂ O				0.05			
CoCl ₂ · 6H ₂ O					0.011		
H ₃ BO ₃	0.003		2.86			11.13	2.00
MnCl ₂ · 4H ₂ O			1.81		0.98	1.44	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.025		0.22			8.82	1.00
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.88×10 ⁻²		0.05			0.49	1.00
FeC ₆ H ₅ O ₇ · H ₂ O					2.62		
Cr ₂ O ₃					0.08		
SeO ₂					0.01		
MoO ₃						6.06	
KOH						30.86	
H ₂ SO ₄						0.98	
H ₃ PO ₄				0.12			

첫 번째 실험으로, HKM, MBBM, MBM, PPM, BG-11 medium 등에서의 배

양을 통하여 *Haematococcus pluvialis* 균주의 고농도 배양을 위한 세포생장과 그에 따르는 astaxanthin 생산량에 대해 조사하였다.

(a)



(b)

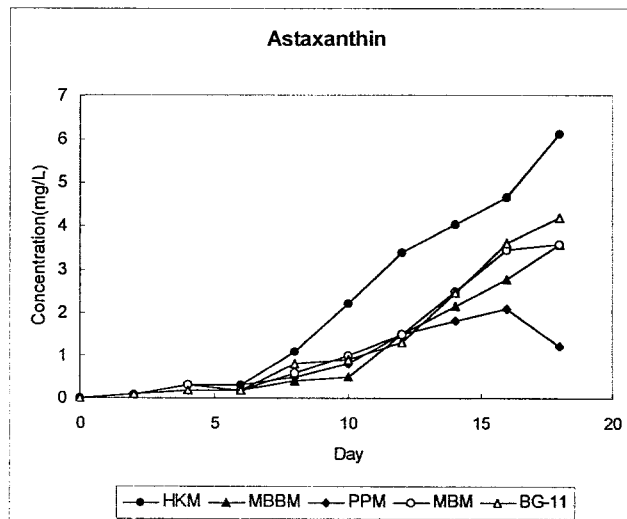


Figure 1. Cell Growth of *H. pluvialis* in Various Media.

(a) cell concentration (g/L);

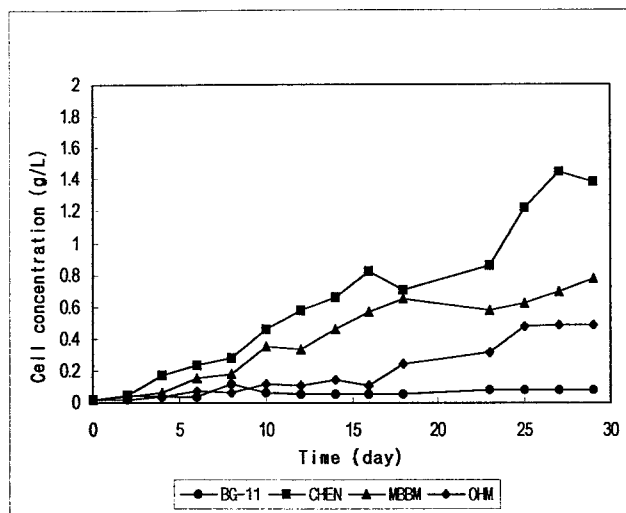
(b) astaxanthin concentration (mg/L)

Fig. 1에서 알 수 있듯이 배지에 따라서 세포의 농도가 최고조에 이르는 시간이 다양하게 나타났고 astaxanthin의 축적량은 배양 시작 8 - 10일 후부터 급

격히 증가하는 것을 알 수 있었다. 세포 농도는 HKM, PPM, MBM, BG-11, MBBM의 순으로 많았으며 (Fig. 1(a)), 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 MBBM, BG-11, MBM, HKM, PPM의 순으로 나왔다(Fig. 1(b)). 이 때 최고 세포농도는 1.86 g/L, 최고 astaxanthin 농도는 6.14 mg/L 이었다. 따라서 세포 농도와 astaxanthin 축적량을 고려하여 배지들을 비교하였을 때 *Haematococcus pluvialis* 균주에 유리한 배지로는 MBBM, BG-11 Medium으로 생각된다.

두 번째 실험은 첫 번째 실험에서 *Haematococcus pluvialis* 균주의 배양에 유리하다고 판단된 MBBM, BG-11 Medium과 CM, OHM 등의 새로운 배지와 비교실험을 통하여 최적의 배지를 찾아내는 연구를 수행하였다. Fig. 2에서 보듯이 세포 농도는 CM, MBBM, OHM, BG-11 순이고 (Fig. 2(a)), astaxanthin 농도는 CM, MBBM, BG-11, OHM의 순으로 나타났다 (Fig. 2(b)). 이 때 최고 세포농도는 1.45 g/L, 최고 astaxanthin 농도는 34.54 mg/L 이었다. 따라서 세포 성장과 astaxanthin 축적량을 비교하였을 때 *Haematococcus pluvialis* 균주의 배양시 적당한 배지로는 CM과 MBBM으로 생각된다. 그러나 CM 배지는 제조과정에서 침전물이 잘 생기고 다른 배지와는 다르게 C source인 CH_3COONa 가 들어가므로, 별도의 C source를 생각하지 않고 나머지 다른 원소의 조성으로만 이루어진 배지 중에 최적의 배지를 찾으려는 실험목적에는 부합되지 않다고 생각된다. 그러므로 추후에 배지 내 원소의 조성을 다르게 하며 배지를 최적화 시킬 때 다시 연구를 수행하여 MBBM 배지와 비교 실험을 수행 할 예정이고 앞으로도 계속해서 새로운 배지를 검색하여 이번 실험결과와 비교하여 최적의 배지를 찾는 연구를 계속 수행할 계획이다. 결과적으로 본 실험에서 얻은 최종 결론은 *Haematococcus pluvialis* 균주를 배양할 때에는 세포 성장과 astaxanthin 생산량을 고려하여 MBBM 배지가 적당함을 알 수 있었다.

(a)



(b)

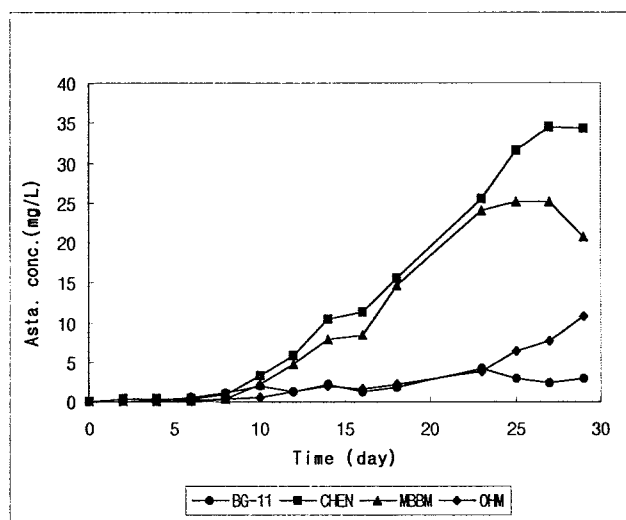


Figure 2. Cell Growth of *H. pluvialis* in Various Media.

(a) cell concentration (g/L);

(b) astaxanthin concentration (mg/L)

2. 세포생장과 astaxanthin 생산량이 최대가 되는 조건의 선별

2-1. 다양한 광도의 영향(Various Light Intensity)

본 실험실에서 자체 제작한 광생물반응기를 토대로 형광등의 수와 거리, 반사체의 유무 등을 조절하여 광도를 15, 30, 60, 75, 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 설정하고 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 광도가 세포의 고농도 배양을 위한 세포의 농도에 미치는 영향을 고찰하였다.

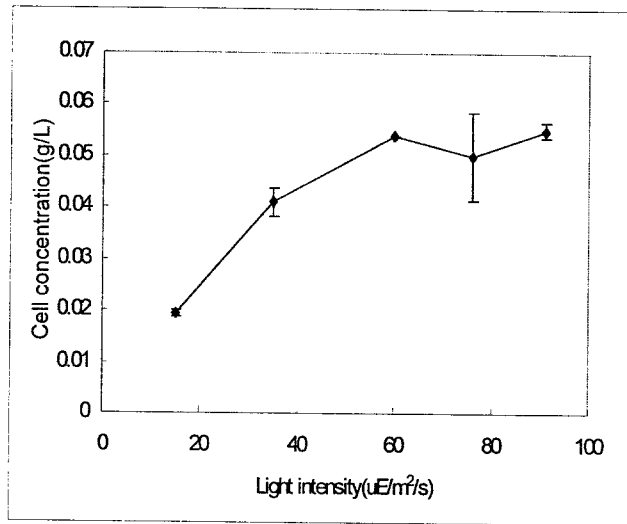


Figure 3. Effect of Light Intensity in Cell Concentration

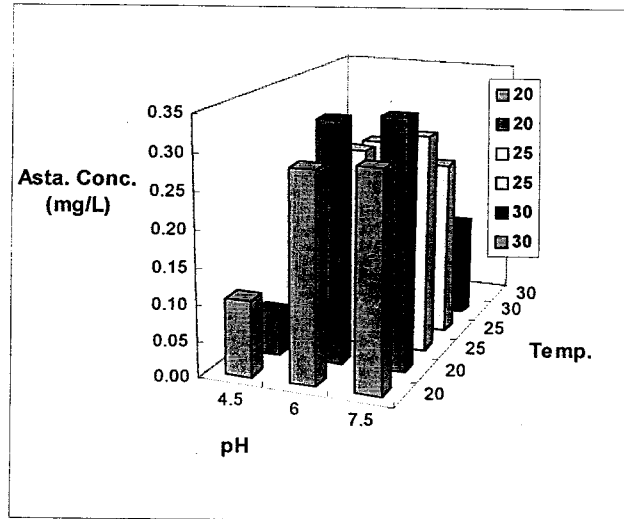
Fig. 3에서 세포의 농도를 증가시키는 1단계에서 6일 배양하였을 때, 다양한 광도를 공급한 결과 세포의 농도는 각각 0.0195 g/L, 0.041 g/L, 0.054 g/L, 0.05 g/L, 0.055 g/L로 나왔다. 이는 15, 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 낮은 광도에서 보다는 60, 75, 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 세포가 더 잘 자라는 결과를 보여주고 있고, 60, 75, 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 세포 농도가 거의 비슷하므로 세포 성장을 위한 최적의 광도는 60 - 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 이며, 광효율적인 면에서는 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도가 최적임을 알 수 있었다.

2-2. 배양 온도의 영향

*H. pluvialis*의 최적 배양 온도를 선정하기 위하여 Kobayashi, Fang 등의 연구 결과와 문헌을 조사하여 20 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 온도의 배양 조건을 수립하였으

며, 온도에 따른 세포 성장 및 색소 형성에 미치는 결과에 대하여 관찰하였다 (Fig. 4(a)).

(a)



(b)

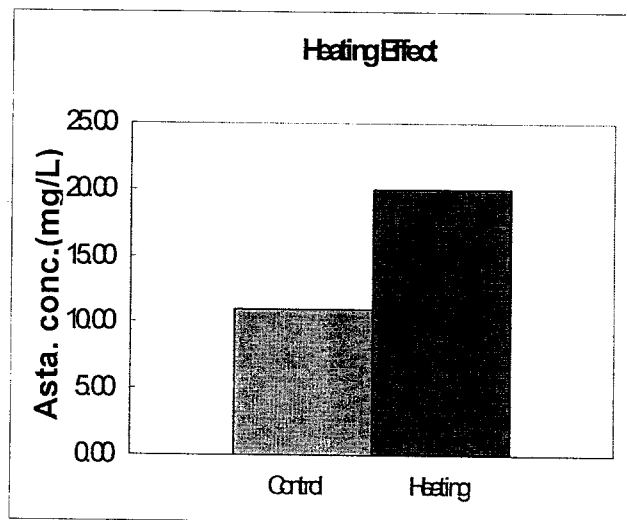


Figure 4. Cell Growth in Combination of Temperature and pH.

(a) effect of temperature and pH; (b) heating effect

30°C에서는 aplanospore의 형성은 촉진되나 세포의 생장이 매우 어렵고, 20°C와 25°C에서는 세포 성장과 색소 형성이 거의 비슷하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 초기에는 세포생장에 적당한 20°C, 25°C에서 배양하다가, 세포

의 생장이 어느 정도 이루어진 후 30℃로 24시간 배양하여 heating 효과를 주면 astaxanthin 생산에 효과적임을 알 수 있었다 (Fig. 4(b)).

2-3. 초기 pH의 영향

배양 배지의 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 UTEX에서 분양 받은 균주의 배지인 proteose-peptone 배지의 초기 pH 6.3을 기초로 하여 pH 4.5, 6.0, 7.5의 범위의 조건에서 실험을 수행하였다.

Fig. 4(a)에서와 같이 pH 4.5의 범위에서는 세포의 성장과 색소의 생산이 저조하였고, pH 6.0과 7.5의 범위에서는 세포의 생장은 거의 비슷하나 단위 세포당 색소의 생산이 pH 7.5에서 가장 우수하였기 때문에 이 조건을 최적의 초기 pH 조건으로 결정하였다.

3. 최적 배지에 필요한 원소의 최소화

미세조류 배양시 대부분의 배지에 들어 있지만 독성이 있는 원소로 알려져 있는 Zn, B 등의 원소가 실제로 세포 성장과 astaxanthin 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 이 두 원소를 첨가한 배지와 (Figs. 5 and 6에 (+)로 표시) 그렇지 않은 배지(Figs. 5 and 6에 (-)로 표시)로 나누어 그 영향을 조사하였다. 배지로는 BG-11, CM, MBBM, OHM 등의 배지를 사용하였고 광도와 온도 등의 실험조건은 앞에서 얻은 결과와 동일하게 적용하였다.

세포 성장에서는 CM 배지에서 가장 높게 나타났고 (Fig. 5), astaxanthin의 생산량에서도 CM과 MBBM이 많은 양을 축적하는 것을 알 수 있었다. 그리고 결과에서도 알 수 있듯이 조사한 결과 Zn, B의 원소를 첨가한 배지가 그렇지 않은 것 보다 세포 성장과 astaxanthin 축적량에서 모든 배지에서 높게 나타났다 (Figs. 5 and 6). 특히 MBBM 배지에서는 그 차이가 다른 배지에서 보다 많음을 알 수 있었다. 이와같은 결과로 Zn, B 등은 이제까지 알려진 바와는 달리, 세포의 성장과 astaxanthin의 생산을 방해하는 독성 물질이기보다는 오히려 유용한 원소임을 알 수 있다.

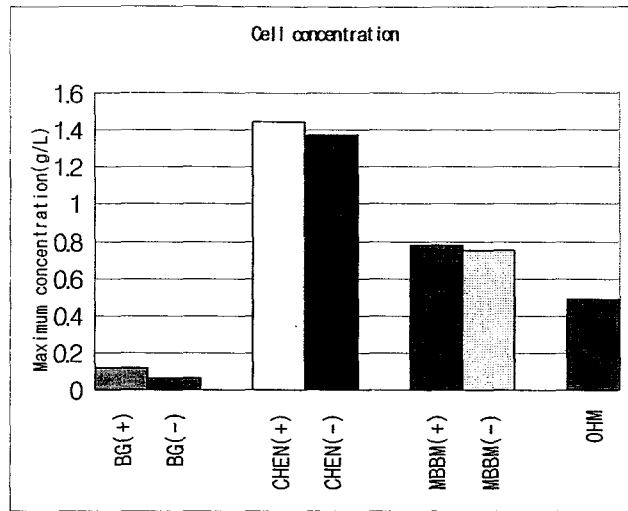


Figure 5. Cell Growth of *H. pluvialis* in Zn, B deficient Media.
 - cell concentration (g/L)

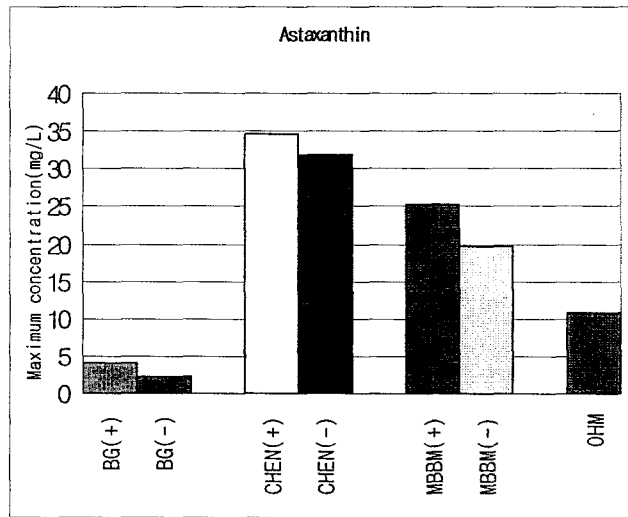


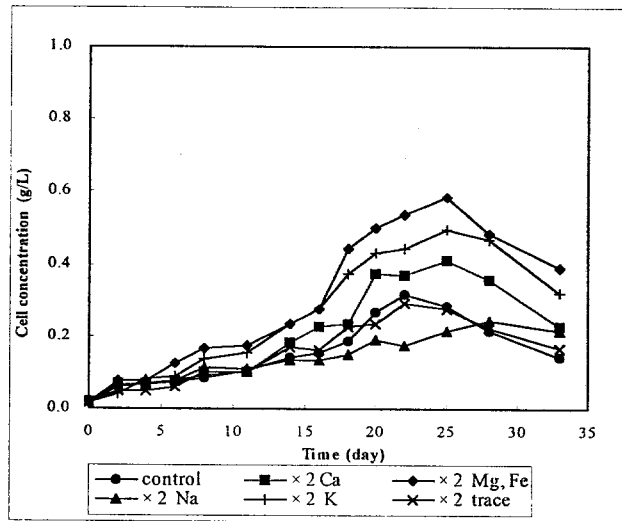
Figure 6. Cell Growth of *H. pluvialis* in Zn, B deficient Media.
 - astaxanthin concentration (mg/L)

4. 배지의 최적화

기존의 배지실험에서 선택된 MBBM 배지의 최적화를 위해, 배지에 첨가되는 원소 중에서 고농도 배양을 위해 세포의 성장에 영향을 미치는 원소들에 대하

여 각각 그 조성을 변화시켜 연구를 수행하였다. 우선적으로 MBBM 배지 조성 중 Ca, Fe, Mg, Na, K, trace 등의 원소 조성비를 변화시켜 세포 성장과 astaxanthin 축적량을 조사하였다. Ca, Fe, Mg, Na, K, trace의 양을 각각 두 배씩 넣은 것과 원래의 MBBM 배지 조성비와 비교 실험하였다.

(a)



(b)

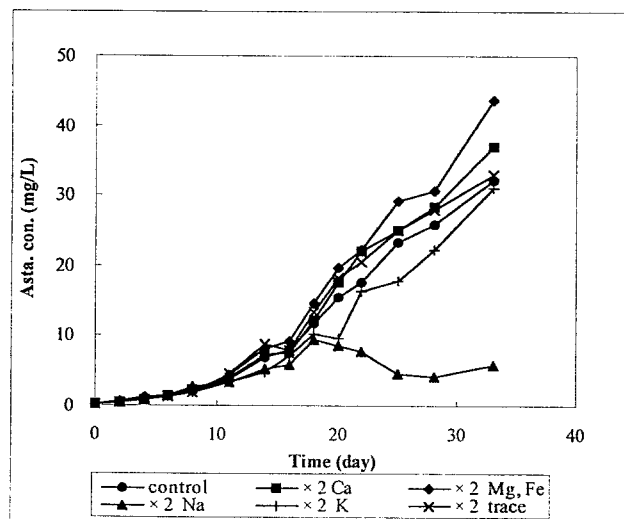


Figure 7. Cell Growth of *H. pluvialis* in various modified MBBM

(a) cell concentration (g/L);

(b) astaxanthin concentration (mg/L)

Legends: control (standard MBBM), 2배의 Ca, 2배의 Fe/Mg, 2배의 Na, 2배의 K, trace: 2배의 trace element

Fig. 7에서 세포 농도는 기본배지에 Fe, Mg을 2배 첨가한 것과 2배의 K을 첨가한 modified MBBM배지에서 기존의 MBBM배지보다 2배정도 높게 나타났고 (Fig. 7(a)), chlorophyll의 양도 다른 modified 된 배지 보다 높게 나타났다. 이것은 Fe과 Mg가 세포가 성장 할 때 질소의 대사와, 광합성을 할 때 필요한 chlorophyll을 생성할 때 중요하게 작용하는 원소이기 때문이다.

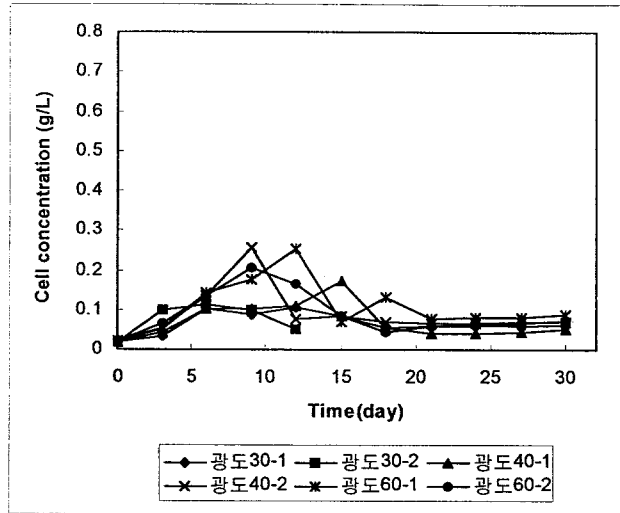
또 astaxanthin 축적량은 Fe와 Mg을 2배 넣어준 MBBM배지에서 가장 많이 축적된 것으로 나타났다 (Fig. 7(b)). 이것은 세포 농도 높을수록 생산되는 astaxanthin의 양은 많아지기 때문이다. 그러나 Na을 두 배로 넣어준 배지에서는 세포의 성장과 astaxanthin의 생산량이 다른 조건에서 보다 낮게 나타났는데 (Fig. 7((a),(b)), Na이 세포 성장에 꼭 필요한 원소이지만 과량으로 존재할 때 오히려 세포 성장과 astaxanthin의 생산을 방해하는 것임을 알 수 있다.

5. 낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin 생산량 비교

낮은 광도에서의 세포 성장과 astaxanthin의 생산량을 비교하기 위하여 MBBM 배지를 사용하여 30, 40, 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 실험하였다.

세포 농도는 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 0.26 g/l 로 다른 광도에서 보다 약간 높게 나왔으나 큰 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 8(a)). Astaxanthin의 축적량은 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 26.31 mg/l 로 최대였다. 다른 광도에서 보다 2.19 - 13.77 mg/l 이상 많이 축적 됨을 알 수 있었다 (Fig. 8(b)). 그러므로 Astaxanthin의 축적량은 광도 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 다른 광도에서 보다 약간 유리하다고 볼 수 있다. 세포의 성장 시 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 배양 시작 15일 후부터 색깔이 초록색에서 빨간색으로 변하기 시작했고 30과 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 그 보다 3일 정도 늦게 빨간색으로 변하기 시작하였다. 고농도 배양을 위해서는 세포의 색깔이 초록색으로 오래 유지되는 것이 유리하므로 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 배지 조성의 변화 등 다른 조건을 변화시켜 더 많은 실험이 필요하다고 사료된다. 그리고 낮은 광도에서는 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 보다 chlorophyll의 양이 더 많은 것으로 나타났다. 이것은 세포 성장에 필요한 광합성을 위해 낮은 광도에서는 더 많은 빛을 이용하기 위해 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 보다 상대적으로 더 많은 chlorophyll이 필요하기 때문이라고 사료된다.

(a)



(b)

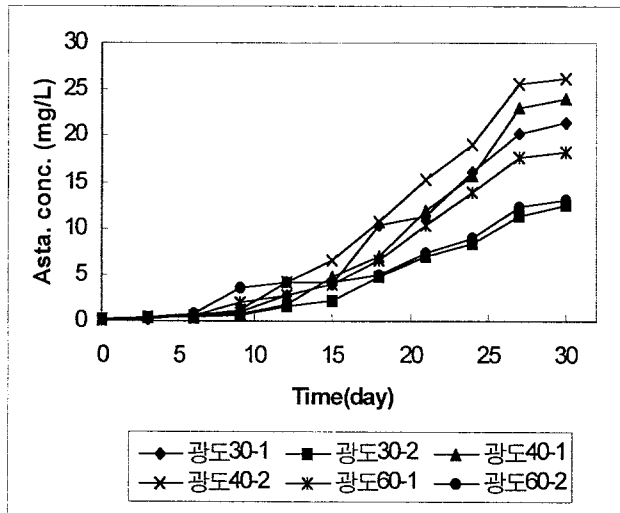


Figure 8. Cell Growth of *H. pluvialis* in various light intensity

(a) cell concentration (g/L);

(b) Astaxanthin concentration (mg/L)

6. Scale up을 위한 Photobioreactor 실험 (lab-scale)

두 대의 photobioreactor (7L)을 사용하였고 Fig. 9에 모형을 그림으로 나타내었다. 실험환경은 flask 실험에서 얻은 값 (MBBM media, 25°C)으로 정해졌으며 우선 최적 agitation speed를 찾기 위한 실험을 수행하였다.

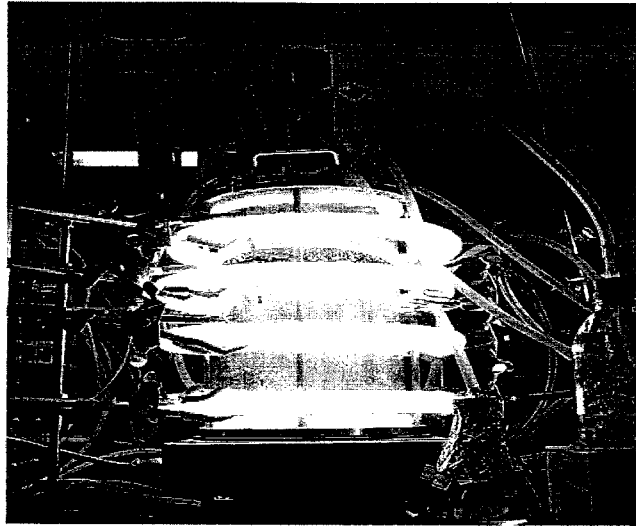


Figure 9. Photobioreactor

첫 번째 광생물반응기 (F-1)는 200 rpm, 그리고 나머지 하나 (F-2)는 150 rpm으로 agitation speed를 설정하여 그 영향을 살펴 보았다.

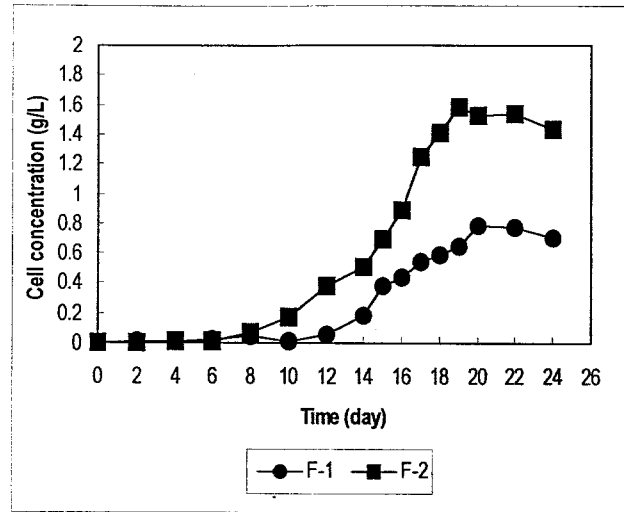
실험결과 최고 세포 농도가 F-1은 최고 1.58g/L, F-2는 최고 0.78g/L로 약 두 배의 차이를 보였다 (Fig. 10 (a)).

이것은 agitation speed가 150 rpm 일 때가 200 rpm 일 때 보다 shear stress를 덜 받아 세포 성장에 유리한 것임을 알 수 있었다. Astaxanthin의 생산량은 F-1과 F-2에서 비슷한 값을 나타내었다 (Fig, 10 (b)).

이것은 세포들이 200 rpm에서 shear stress로 인하여 150 rpm에서 보다 더 많은 astaxanthin을 축적하였다고 생각되어 진다.

앞으로도 photobioreactor를 이용한 더 많은 실험들을 수행하여 media, 온도, pH, agitation, light source, light intensity, cost 등 scale-up에 따른 여러 가지 조건들을 찾는 연구를 진행할 계획이다.

(a)



(b)

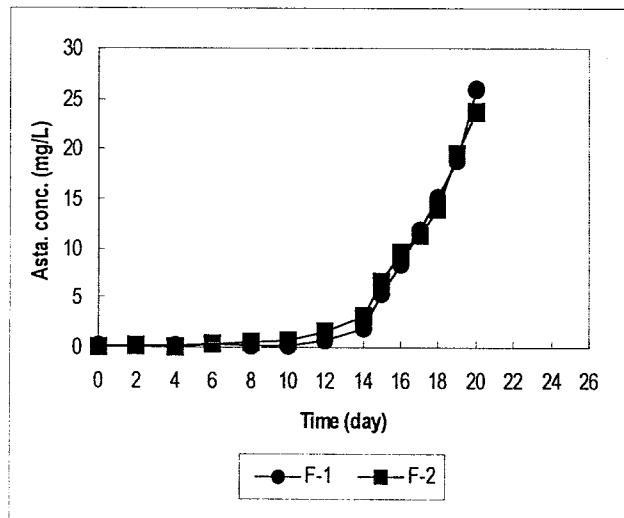


Figure 10. Agitation effect in photobioreactors

F-1: 200 rpm, F-2: 150 rpm

(a) cell concentration (g/L),

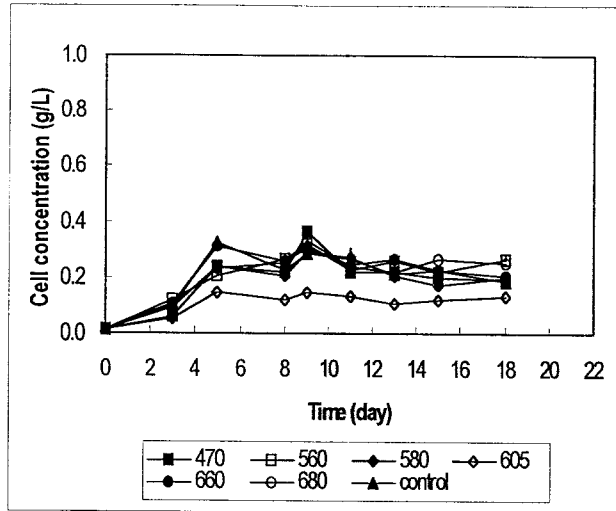
(b) Astaxanthin concentration (mg/L)

7. LED를 이용한 파장별 *H.pluvialis*의 생장에 대한 영향

실험에 사용된 LED는 470 nm, 560 nm, 580 nm, 605 nm, 660 nm, 680 nm로, 각각 하나의 파장을 공급하도록 설정하였다. 배지로는 MBBM media을 사용

하였다.

(a)



(b)

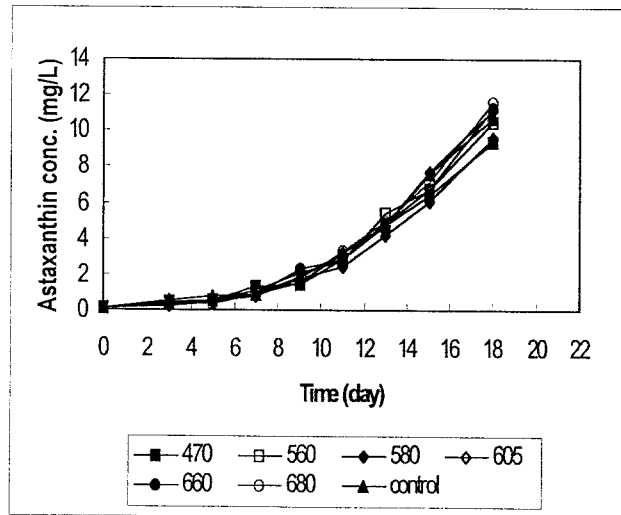
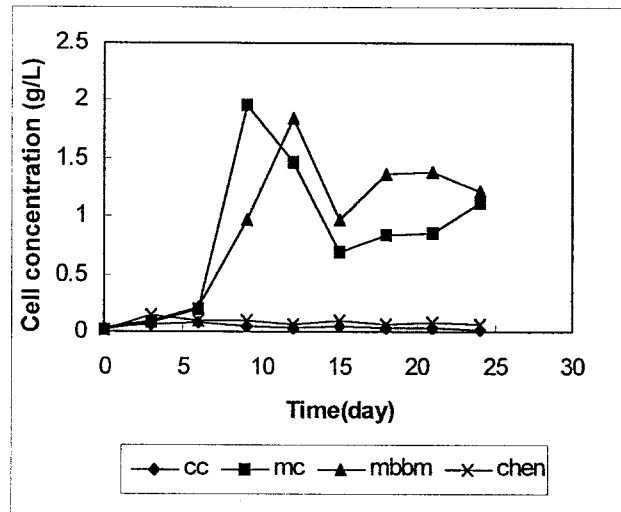


Figure 11. LED effect (a) cell concentration (g/L),
(b) Astaxanthin concentration (mg/L)

Fig. 11에서 보는 바와 같이 605 nm의 성장이 저하된 것을 제외하고는 세포 성장과 astaxanthin 생성량에서 다른 파장에서와 별 차이를 보이지 않았다. 이는 LED가 열에 대해 민감해서 LED 광도를 $0.6 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 설정한 것 때문에 광도가 너무 낮아 성장에 별 차이를 주지 못한 것이 아닌가 생각되어진

다. 따라서 이 문제를 해결하기 위하여 cellophane 등을 이용하여 광도를 높이고, 다양한 파장에서 연구가 가능하도록 여러 방법을 계속 연구 중이다.

(a)



(b)

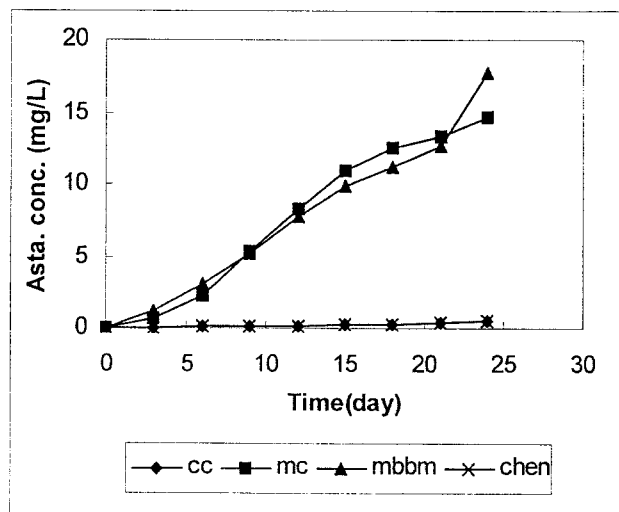


Figure 12. Coating effect (cc-coated CM, mc-coated MBBM, c-CM, m-MBBM) (a) cell concentration (g/L); (b) Astaxanthin concentration (mg/L)

8. 균주의 생장시 flask 내부의 coating 효과

세포가 flask의 안 쪽 벽과 바닥에 부착되는 문제를 해결하기 위하여 flask 내부를 coating 하는 실험을 수행하였다. 미리 coating 된 flask와 그렇지 않은 flask에서 세포가 flask 내부에 부착되는 정도와 coating제가 생장에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 12에 실험 결과를 나타내었다. 세포 농도와 astaxanthin 생산량은 CM 배지에서 보다 MBBM 배지에서 높게 나왔다 (Fig. 12 (a),(b)). 배양 초기에는 coating 된 flask에서 세포의 부착이 덜 진행되었으나 12일 이후에는 coating 되지 않은 flask와 거의 같은 양의 세포 부착이 관찰되었다. 이것은 coating 된 flask에서도 일단 미량의 세포가 flask 내부에 부착되기 시작하면 그 세포 위에 계속해서 다른 세포들이 부착되기 때문에 배양시간이 길어질수록 coating 된 flask와 그렇지 않은 flask와의 차이가 점점 줄어드는 것으로 사료된다. 따라서 배양시간이 얼마 되지 않았을 때에는 coating 된 flask의 세포농도와 astaxanthin의 생산량이 그렇지 않은 flask 보다 많았지만 시간이 지날수록 거의 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 이것으로 미루어 Flask 내부의 coating 효과는 없다고 생각되고 Sigmacoat가 세포 생장과 astaxanthin 생산량의 증감에 영향을 미치지 않는 것으로, 독성이나 생장에 긍정적인 영향은 미치지 못 했다고 생각된다.

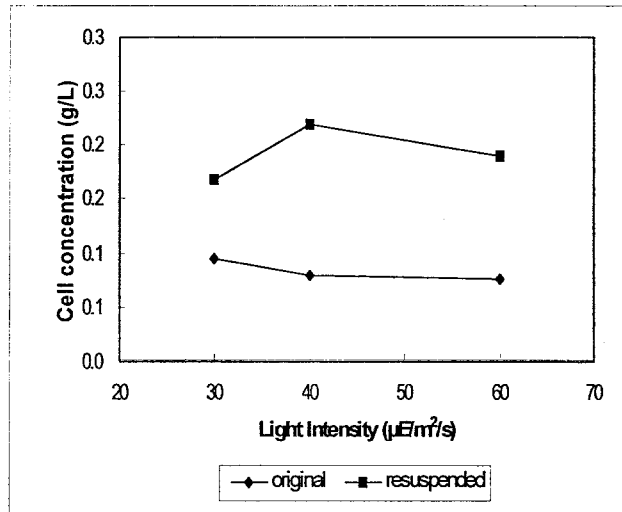
9. 세포 부착에 따른 세포 농도와 astaxanthin의 차이 비교

*H. pluvialis*는 flask나 photobioreactor 등 반응기에서 배양 시 반응기 내부에 잘 부착되는 성질을 가지고 있다. 그래서 flask 내부의 세포 부착에 따른 세포 농도와 astaxanthin의 차이를 비교해 보기 위해 실험이 완료된 flask를 이용해 실험을 수행하였다. 먼저 실험이 완료된 flask에서 일정 양을 취하여 세포 농도와 astaxanthin 생산량을 측정하였고, 그 후에는 flask 내부에 부착되어 있는 모든 세포들을 채취하여 resuspension 시킨 후에 다시 일정 양을 취하여 세포 농도와 astaxanthin 생산량을 측정하였다 (Fig. 13 (a),(b)).

Fig. 13에서 알 수 있듯이 세포 농도는 $40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 resuspension 한 것이 그렇지 않은 것 보다 3배 정도 차이가 났고, 나머지 광도에서도 2배 이상 차이가 난 것으로 나타났다. Astaxanthin 생산량에서도 마찬가지로 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 2배 이상 차이가 났고 다른 광도에서도 거의 2배 가까운 양의 차이를 보였다. 이와 같이 flask 내부의 세포 부착은 시급히 해결해야 할 과제라

고 생각된다. 따라서 앞서도 기술했듯이 flask 내부의 세포 부착을 해결하기 위해서 지속적인 연구가 진행되고 있고 또 앞으로도 이 문제를 해결하기 위한 여러 방법들을 모색해 나갈 계획이다.

(a)



(b)

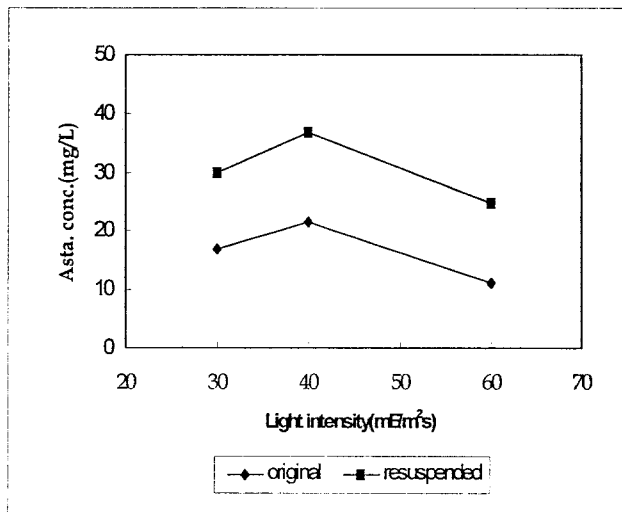


Figure 13. Effect of cell attaching in the flask.

(a) cell concentration (g/L);

(b) Astaxanthin concentration (mg/L)

제 3 절. 향후 계획 및 추진 전략

1. 제1단계 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	
제 1 단 계	1차 년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ <i>Haematococcus</i>균주의 대량배양을 위한 조건의 검색 ◦ Astaxanthin 생산을 위한 조건의 검색 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ <i>Haematococcus</i>균주의 최적 성장조건 및 배지의 선택 ◦ 세포내 astaxanthin 축적량이 최대가 되는 광량/광원/온도/pH 등의 조건 확립 ◦ 목표치는 flask 실험에서, 현재 보고된 astaxanthin 농도 100 mg/L 이상
		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Astaxanthin의 분석 기술 확립 ◦ <i>Haematococcus</i>세포로부터 astaxanthin추출 기술확립 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Astaxanthin의 정성 및 정량분석기술 확립 - 총 카로티노이드 량 분석방법 - Astaxanthin 정량 분석기술 개발 ◦ <i>Haematococcus</i>세포로부터 Astaxanthin 추출 기술 개발 - 용매사용법 - 효소사용법
	2차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Astaxanthin 생산성 향상을 위한 연구 ◦ Lab scale 광생물반응기의 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 얻어진 조건에서의 실험실 규모(lab-scale)의 광생물반응기의 시운전 ◦ 돌연변이 등의 방법을 이용한 생산성의 향상을 도모 ◦ 목표치는 실험실규모에서, astaxanthin 농도 500 mg/L 이상
		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Astaxanthin의 분리, 농축 기술 개발(Lab scale) ◦ Astaxanthin의 안정화 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 세포로부터 추출된 astaxanthin의 분리 및 농축 공정 개발(Lab scale) ◦ Astaxanthin의 안정성을 향상시키는 특정 지질의 조사, 첨가제 선별등의 안정화기술 개발
	3차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 2단계 배양을 위한 연구 및 최적화 ◦ Lab scale 광생물반응기의 설계 및 제작 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 세포의 성장과 astaxanthin의 생산만을 각각 극대화하는 2단계 반응기 설계 ◦ 2단계 광생물반응기의 장점을 최대한 이용한 Pilot scale의 연속식 배양의 도입 ◦ 목표치는 2단계의 실험실규모에서, astaxanthin 농도 1000 mg/L 이상
		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Astaxanthin의 추출, 분리 및 농축 공정의 scale-up ◦ 저순도품의 pilot scale 에서의 생산 및 시험판매 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 세포의 파쇄, 추출, 분리, 농축 등의 downstream공정의 scale-up 연구 ◦ Pilot scale에서 사료용 저순도품의 생산 및 시험판매 추진(국내 및 일본)

2. 제2차년도 연구개발 목표 (2001년 3월-2002년 2월)

Astaxanthin 생산성 향상을 위한 연구

- 얻어진 조건에서의 실험실 규모(lab-scale)의 광생물반응기의 시운전
- 26,000종이나 존재하는 다른 해양미세조류에 대한 연구
- 돌연변이 등의 방법을 이용한 생산성의 향상을 도모
- 목표치는 실험실규모에서, astaxanthin 농도 500 mg/L 이상

3. 제3차년도 연구개발 목표 (2002년 3월-2003년 2월)

2단계 배양을 위한 연구 및 최적화

- 세포의 성장과 astaxanthin의 생산을 각각 극대화하는 2단계 반응기설계
- 2단계 광생물반응기의 장점을 최대한 이용한 연속식 배양의 도입
- 목표치는 2단계의 실험실규모에서, astaxanthin 농도 1000 mg/L 이상

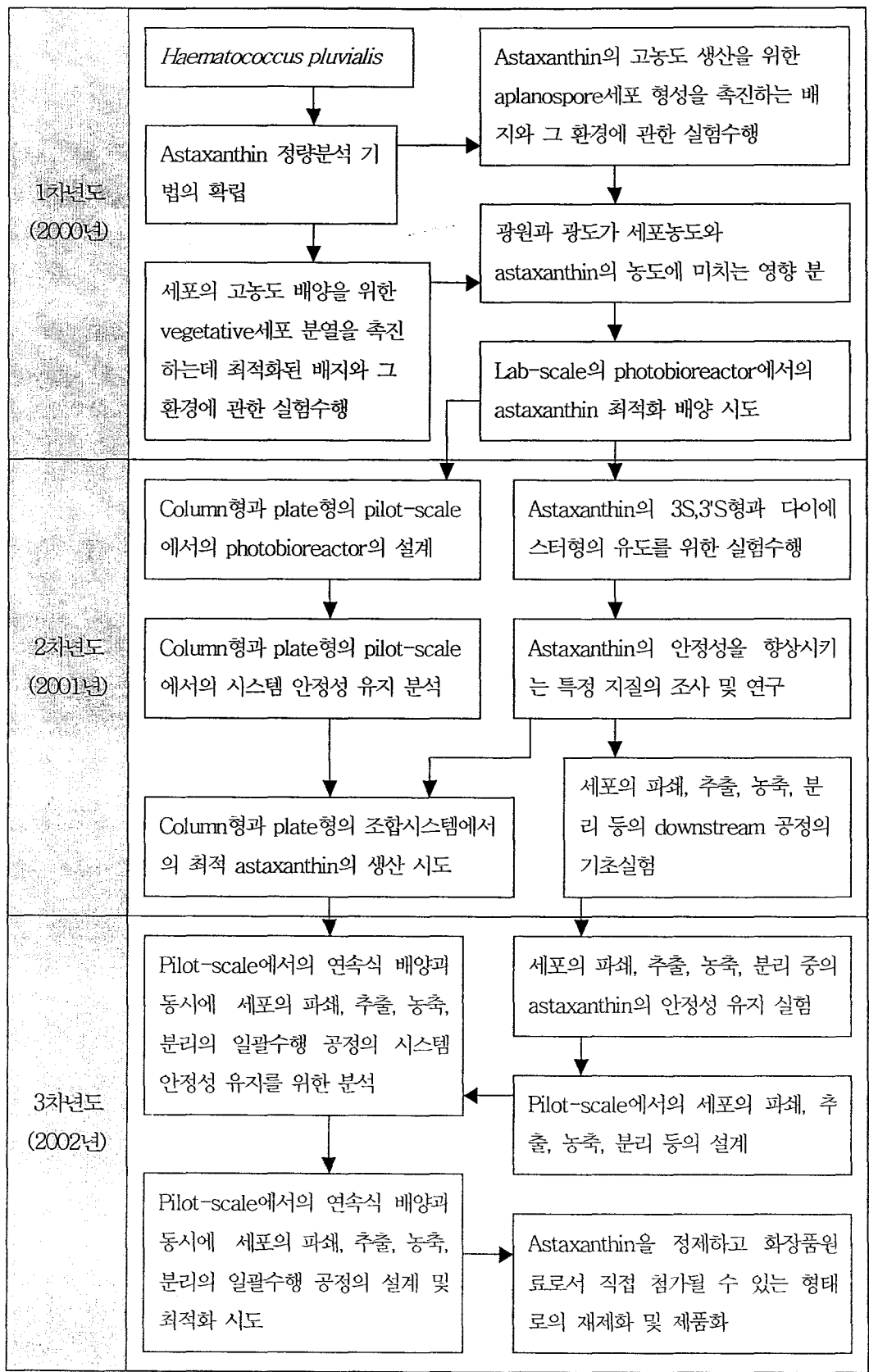
4. 제2단계 장기계획 (2004년 3월-2007년 2월)

- astaxanthin 분리정제 기술의 확립
- 고농도 대량배양을 위한 규모확대(scale-up)
- 수입대체효과와 대외경쟁력을 갖춘 astaxanthin의 생산공정의 확립

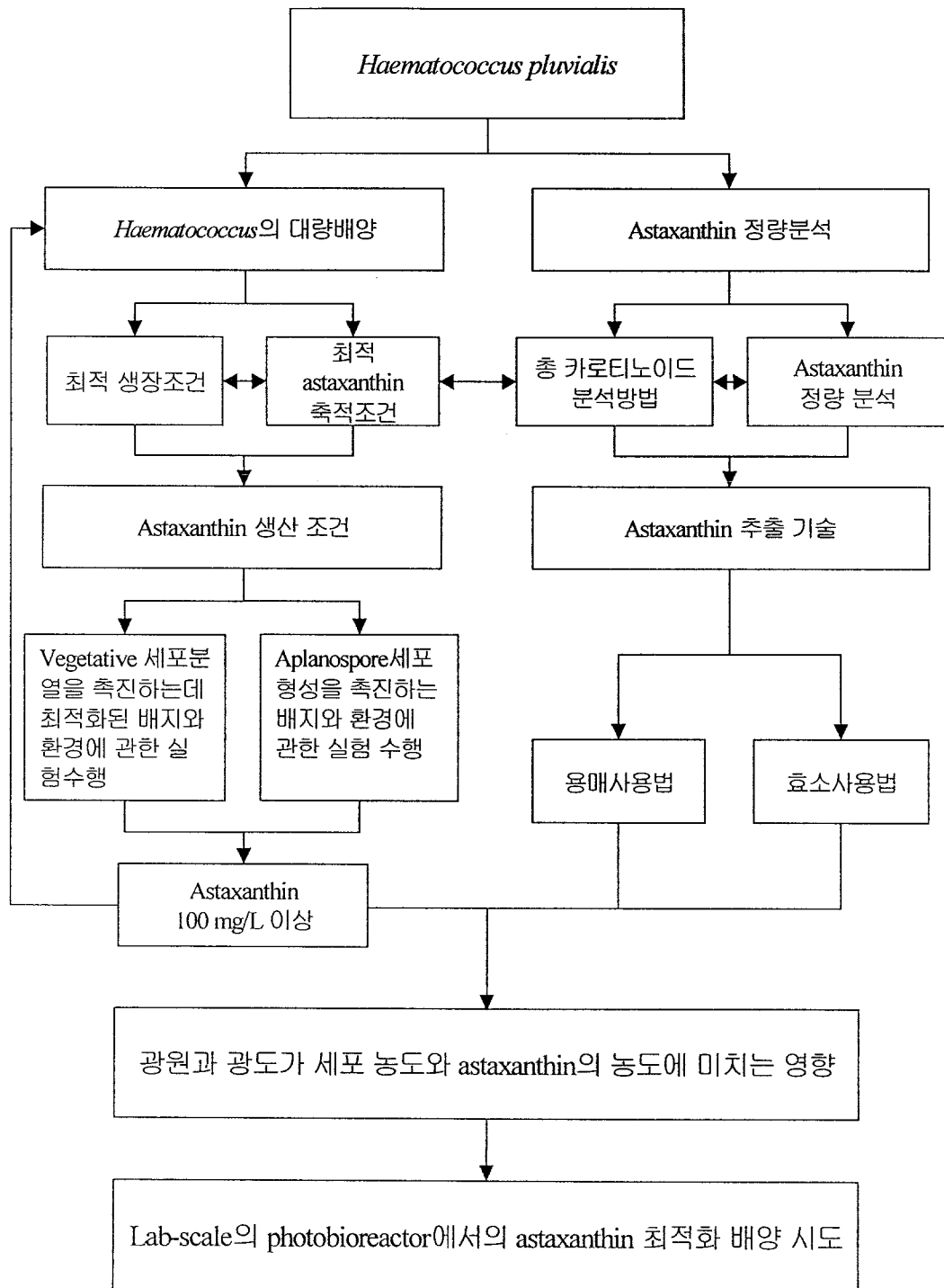
5. 추진전략 및 방법

- 연구를 추진하기 위한 기술정보 및 문헌의 이용은 국내외 도서관 및 internet을 통한 전자도서관 등의 DB를 이용하고, 현재 교류가 있는 미국, 일본 및 다른 산업체 및 대학기관과의 직접적인 교류를 통하여 수행한다.
- 단기적인 목적은 미세조류의 선택과 배양조건의 최적화에 의한 단위부피당의 astaxanthin 생산성을 최대화하며, 이때, 본 연구진이 보유한 첨단 광생물반응기(PBR) 및 분석기기(Coulter counter, Micro-oxymax, atomic analyzer, HPLC 등)들을 최대한 활용하여 추진한다.
- 생산된 astaxanthin을 안정화시키기 위한 연구를 동시에 수행하여, 생산된 astaxanthin이 파괴하지 않고, 최대의 수율을 올릴 수 있는 방법을 선택한다.
- 이러한 과정에서 얻어진 결과를 참고로 하여, astaxanthin의 최적생산성을 얻을 수 있는 pilot scale의 2단계 광생물반응기와 생산용 광생물반응기를 설계/제작한다. 이 때 제작되는 광생물반응기는 사업화에 바로 이용될 수 있는 형태로 제작한다.

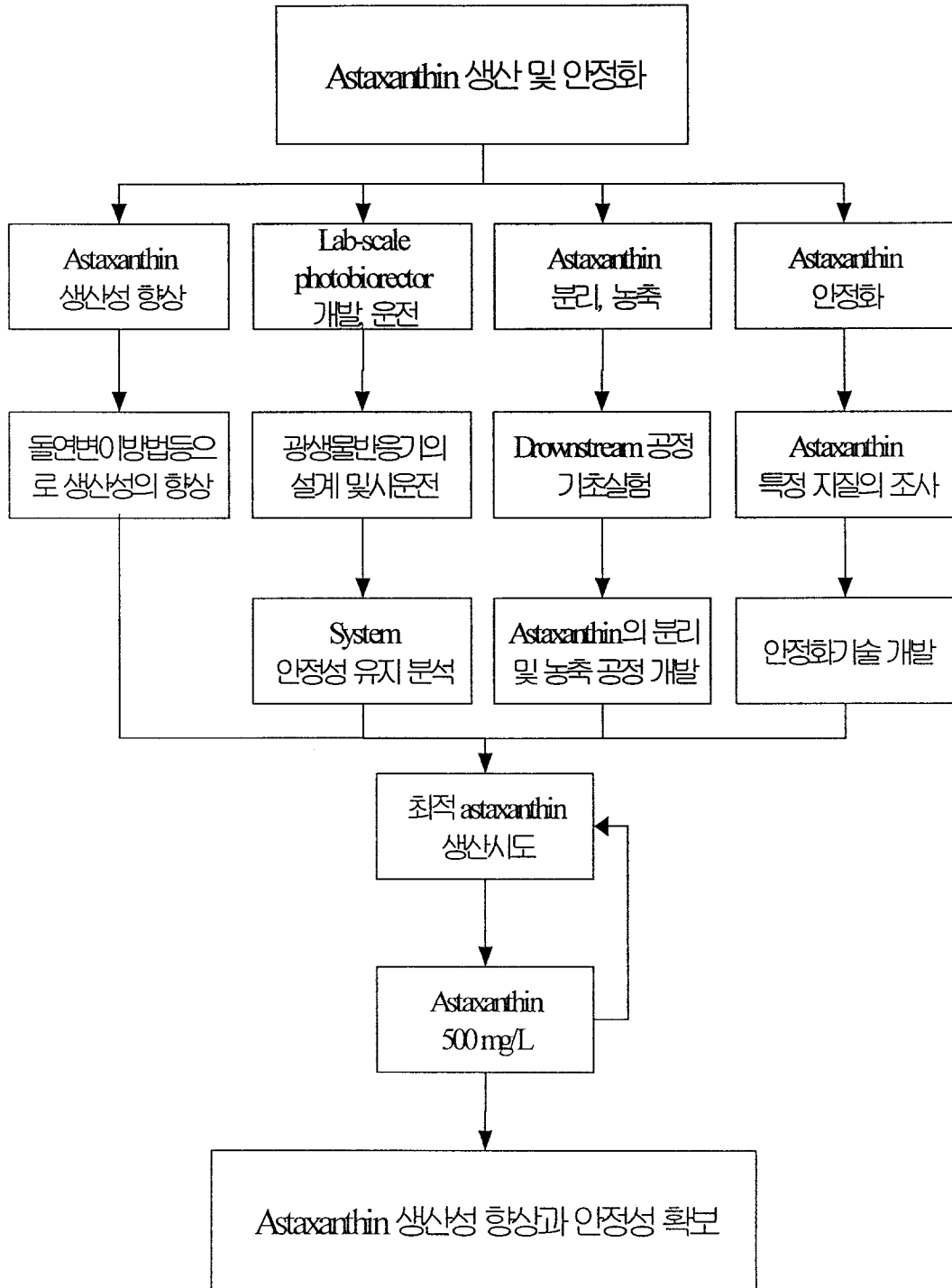
- 고농도 대량배양에 의한 astaxanthin의 생산과 이를 분리정제하는 방법을 확립하여, 본 사업이 종료되기 전이라도 사료나 기능성 화장품의 원료로 시판하며, 본 사업이 끝나는 시점에서 바로 고부가가치 상품으로 상업화가 되도록 추진한다.
- Astaxanthin의 정량분석법은 astaxanthin이 공기중에서 극도로 산화되기 쉽고, 아직 세계적으로 재현성이 있게 분석할 수 있는 곳이 매우 드문 실정이다. 일본의 경우도 새우로부터 astaxanthin을 추출하여 생산하고 있는 ITANO사만이 신뢰성이 높은 분석방법이 확립되어 있으며, 일본의 공인기관인 “일본 식품분석센터”에서도 ITANO사로부터 현재 그 분석방법을 습득하여 set-up하고 있는 실정이다.
- 본 연구과제에 참여할 예정인 화인코(주)는 현재 ITANO사의 새우추출 Astaxanthin제품을 국내 및 동남아등지에서 판매 및 용도개발하는 역할을 수행하고 있어 본과제가 개시되면 화인코(주)에서 Astaxanthin의 정성 및 정량 분석법을 일본 ITANO사의 협력으로 빠른 시일내에 set-up하여 재현성이 높고 안정적으로 분석 가능토록 할 예정이다.
- *Haematococcus*로부터 astaxanthin의 추출 및 분리, 정제방법의 개발은 제품의 안전성과 경제성, 수율등을 종합적으로 고려하여 산업적인 관점에서 최적의 방법을 최종 결정할 예정이나, 1차년도에서는 lab scale에서 가능한 모든 방법을 시도하여 기존에 보고되지 않은 새로운 방법의 고안을 통하여, 외국회사와의 경쟁에서 우위를 확보할 수 있는 기술개발을 목표로 추진코자 하며, 제1단계에서 개발되는 저순도 품은 pilot scale에서 생산하여 우선적으로 사료첨가제로 시험판매 함으로써, 현장적용에 있어서의 문제점등을 파악하여 제품개선을 하고, 사업타당성을 평가하여 2 단계의 개발방향에 대한 보완 및 수정을 할 예정이다.



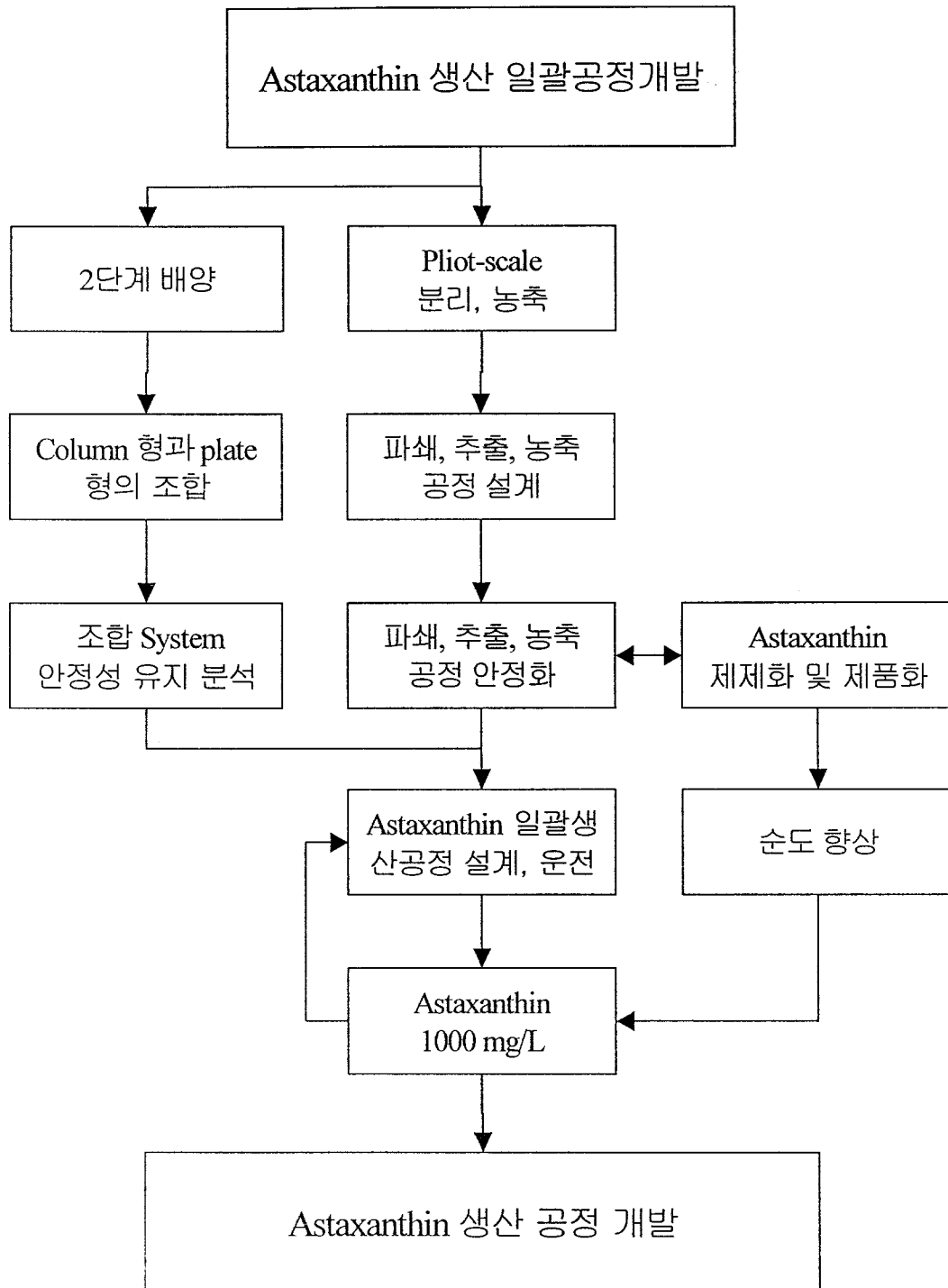
1차년도 (2000년) 추진체계



2차년도 (2001년) 추진 체계



3차년도 (2002년) 추진 체계



제 4 장. 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절. 연구 개발 목표 달성도

연구 내용	연구 분담	추진 일정 (개월)									비고	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Lab-scale 광생물반응기의 설계/제작	이철균	←	—	—	—	—	—	—	—	—	→	
<i>Haematococcus</i> 고농도 배양을 위한 기초연구	윤현식			←	—	—	→					
Vegetative cell 농도의 최적화	이광용	←	—	—	—	→						
Astaxanthin 축적의 최적화	박은경 / 이정훈	←	—	—	—	—	—	—	—	—	→	
2단계 배양의 기초실험	서문원 / 김선형				←	—	—	—	—	—	→	
Cyst의 분리법	남보현						←	—	—	—	→	
Astaxanthin 분석기법/추출	임건빈	←	—	—	→							
Astaxanthin 분리/정제	하성진		←	—	—	→						
Astaxanthin 활성/안정화	김재환				←	—	—	—	—	—	→	
Astaxanthin 농축	김유진						←	—	—	—	→	
Astaxanthin 제제화	김홍수							←	—	—	→	
사업진도 (%)			25		25		25		25			

제 2 절. 대외 기여도

1. 기술적 측면

생물다양성 협약이 발효된 이후 세계 각국은 자국 고유의 생물자원을 미래의 자원보고로 생각하고, 이에 대한 보전과 특히 유전자관리 분야로의 정책을 새로이 펴고 있으며 이를 이용한 개발을 추진하려 하고 있다. 특히 생물다양성 문제는 일반적으로 육상의 동·식물을 주로 다루고 있으나 해양 생물은 아직도 많은 연구가 이루어져있지 않다.

해양미세조류는 현재 약 2만 6천 여종 정도가 지구상에 존재하는 것으로 알려져 있으나 실제 연구가 진행되는 종은 수백 종에 불과하다. 우리나라는 풍부한 해양자원을 가지고 있으므로 그 개발 가능성이 무궁무진하다고 볼 수 있으나 미세조류를 이용한 신물질연구는 국내에 거의 존재하지 않았다. 최근 10년간 발견된 해양생물유래의 신물질 중 절대다수인 35%가 미세조류 유래였던 것을 감안하면, 미세조류는 미래의 산업자원으로서 잠재력이 매우 크다. 미세조류에 대한 연구는 1940년대에 시작되었으나, 적당한 공정의 개발이 되지 않아 그동안 사업화로 진행되지 못하였다. 미세조류의 고농도 대량배양에 대한 연구는 전 세계적으로 다시 시작되고 있는 분야이므로 국내에서 빠르게 대처, 유기적인 관리를 하면서 집중투자를 할 경우 적어도 해양 미세조류 분야에 대한 국제적인 경쟁력을 높일 수 있다고 판단된다. 본 연구에서와 같이 경쟁력 있는 미세조류로부터 신 기능성 물질의 탐색과 응용성에 대한 분야는 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다고 생각되며 특히 광생물반응기의 해양신물질분야로의 적용이야말로 매우 획기적인 결과로 기록될 것이며 이에 대한 산업적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

이런 점에서, 본 과제를 수행하여 얻을 수 있는 미세조류배양기술과 고농도 대량배양기술, 분리정제기술을 이용하여 국제 경쟁력 있는 미세조류생산기술을 축적하여 현재 알려진 2만 6천 종의 해양미세조류가 가지고 있을 고부가가치의 해양신물질의 사업화에 필수 불가결한 귀중한 자료로서, 3면의 바다를 이용한 해양한국의 발전에 직·간접적으로 크게 이바지 할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

Astaxanthin은 현재의 사료의 사용에서 벗어나 우수한 항산화제, 면역증강제, 항암제 등의 효과로 인해, 화장품 및 의약품으로서의 새로운 용도로의 시장을

개척해 갈 전망이다. 따라서 astaxanthin의 생산공정의 개발은 장기적으로 1000억원 이상의 수입대체효과와 앞으로 성장할 세계시장의 선점이라는 무한한 가능성과 시장성을 가진 사업이다. 현재 astaxanthin은 매년 30%이상의 시장성장을 보이고 있으며, 2000년의 시장은 생물공학적인 방법으로 생산된 astaxanthin만 3억 5천만 달러(약 4조원)에 이를 것으로 전망된다.

구 분	현재의 시장규모	예상되는 시장규모
세 계 시 장 규 모	350 백만\$	(2004년) 1,000 백만\$
한 국 시 장 규 모	500 백만원	(2004년) 5,000 백만원

본 연구는 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용 산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도배양 기술의 개발을 시도하여 astaxanthin을 생물공정을 이용한 기능성 화장품 소재 및 의약품의 원료로 실용화하고자 하는 것이다. 현재 미세조류에서 생산되는 많은 고부가가치의 물질들은 수입에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 본 사업에서 개발될 고농도 대량배양 기술 및 분리정제 기술은 국내시장의 수입대체효과는 물론, 세계시장의 점유에도 유리한 입장을 선점하리라 기대된다.

또한 미세조류의 고농도 대량배양 기술은 생물산업관련분야인 의·약학 분야, 식품, 일상 생활필수품 관련 산업 미치는 파급효과가 클 것이고, 오염 토양의 정화, 생물학적 폐수처리, 지구 온난화의 주범인 이산화탄소의 제거, 생물학적 비료로서의 사용 등 응용 영역을 넓혀 우리나라의 생물산업발전에 크게 이바지 할 것이다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

- Astaxanthin은 대표적인 carotenoid로서 vitamin C, vitamin E 와 함께 항산화의 역할을 수행한다. astaxanthin의 다양한 기능으로 볼 때 산업화를 이루었을 때는 여러 분야의 광대한 시장성을 갖게 되며 아직은 이에 대한 개발이 미비하나 본 연구진의 고농도 실험에 의해 산업화의 기반을 다진다면 경제성뿐만 아니라 세계적인 경쟁력을 갖는 상품이 될 것으로 예상된다.
- 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산은 세포당 astaxanthin의 축적이 높은데다, 의학적으로 가장 역가가 높은 (3S, 3'S)의 enantiomer를 생산할 수 있는 유일한 균주이며, 생산시 제제화에 유리한 ester형태로 축적할 수 있어, astaxanthin의 생산에 가장 유리한 방법이다.
- 현재까지 연구된 100여종의 미세조류에서만 여러 종류의 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강 식품; carotenoids, biliprotein등의 염료; bioflocculant, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 이르기까지 광범위한 물질이 생산될 수 있다.
- 미세조류에 의한 생산물질의 경우 색소 및 단백질의 동물 섭취는 이미 잘 알려진 바 천연물질로서 인체에 해가 없는 물질이며 환경친화적 물질이므로 산업화에 쉽게 응용되리라 기대된다.
- 또한, 본 연구를 수행함에 있어서 축적될 새로운 2단계 배양방법, 고농도 대량배양용 광생물반응기 등은, 현재 알려진 2만 6천종의 해양미세조류가 가지고 있을 고부가가치의 해양신물질의 사업화에 필수 불가결한 귀중한 자료로서, 3면의 바다를 이용한 해양한국의 발전에 직·간접적으로 크게 이바지 할 것이다.
- 또한 미세조류의 고농도 대량배양 기술은 오염 토양의 정화, 생물학적 폐수처리, 지구 온난화의 주범인 이산화탄소의 제거, 생물학적 비료로서의

사용 등 응용 영역을 넓어 본 사업에서 축적될 기술은 매우 귀중한 기술이며, 우리나라의 생물산업발전에 크게 이바지 할 것으로 기대된다.

- 광생물반응기에 의한 고농도 대량배양 기술이 산업화되었을 때는 그 활용범위는 무궁하며 세계적으로 국가 경쟁력의 향상을 도모할 수가 있을 것이다. 또한 BT산업에서 중요한 downstream의 체계를 정립할 수 있는 기회가 될 수 있을 것으로 기대된다.

- 유용한 생리활성물질을 생산하는 새로운 미세조류의 동정과 생태학적 변화, 생리적 반응성, 유전자 조작에 의한 돌연변이로의 응용성 등 미세조류에 대한 체계화된 정보는 하나의 자원으로서 인정되고 있으므로 미세조류에 대한 앞으로의 연구 개발이 필요한 것으로 사료된다.

제 6 장. 참고 문헌

1. Astorg, P., S. Gradelet, J. Leclerc, and N.-H. Siess. 1997. Effects of Provitamin A or Non-provitamin A Carotenoids on Liver Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice. *Nutrition and Cancer*. 27:245-249.
2. Becker, E. W. 1994. *Microalgae; Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 59
3. Bendich, A. 1990. Carotenoids and the Immune System. *In: Carotenoids Chemistry and Biology*. (ed.) N. I. Krinsky, Plenum Press, New York.
4. Bon, J. A., T. D. Leathers and R. K. Jayaswal. 1997. Isolation of Astaxanthin-Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 19:109-112.
5. Borowitzka, M. A., and L. J. Browitzka. 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
6. Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70:313-321
7. Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.P., Zarka, A., Chen, F. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters* 21:60-64
8. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, T. Handa, and N. Nishio. 1997a. Isolation and Characterization of Compactin Resistant Mutants of an Astaxanthin Synthesizing Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* 19:299-302.
9. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, S. Nagai, and N. Nishio. 1997b. Increased Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Mutants Isolated as Resistant to Diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng.* 83:429-434.
10. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, H. Ishii, and N. Nishio. 1997c. Enzymatic Conversion of β -Carotene to Astaxanthin by Cell-Extracts of a Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*

- 19:443-446.8.
11. Cordero, B., Otero, A., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different conditions. *Biotechnology Letters* **18**:213-218
 12. Cornet, J. F., Dussap, C. G., Gros, J. B. 1994. Conversion of radiant light energy in photobioreactors. *AIChE Journal* **40**:1055-1066
 13. Fabregas, J., Dominguez, A., Alvarez, D.G., Lamela, T., Otero, A., 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis* *Biology Letters* **20**:623-626
 14. Fan, L., Vonshak, A., Roussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) *Journal of Phycology* **30**:829-833
 15. Fan, L., A. Vonshak, R. Gabbay, J. Hirshberg, Z. Cohen, and S. Boussiba. 1995. The Biosynthetic Pathway of Astaxanthin in a Green Alga *Haematococcus pluvialis* as Indicated by Inhibition with Diphenylamine. *Plant Cell Physiol.* **36**:1519-1524.
 16. Fang, T. J. and T. Y. Chiou. 1996. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. *J. Ind. Microbiol.* **16**:175-181.
 17. Fontana, J. D., B. Czczuga, T. M., Bonfim, M. B. Chociai, B. H. Oliveira, M. F. Guimaraes, and M. Baron. 1996. Bioproduction of Carotenoids: The Comparative Use of Raw Sugarcane Juice and Depolymerized Bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Bioresource Technol.* **58**: 121-125.6.
 18. Gong, X. and F. Chen. 1998. Influence of Medium Components on Astaxanthin Content and Production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochem.* **33**:385-391.
 19. Grima, E. M., J. A. S. Prez, F. G. Camacho, J. L. G. Sanchez, and D. L. Alonso. 1990. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:599-605.
 20. Gradelet, S., A.-M. Le Bon, R. Berges, M. Suschetet and P. Astorg. 1998. Dietary Carotenoids Inhibit Aflatoxin B₁-induced Liver

- Preneoplastic Foci and DNA Damage in the Rat: Role of the Modulation of Aflatoxin B₁ Metabolism. *Carcinogenesis*. **19**:403-411.
21. Harker, M., A. J. Tsavalos and A. J. Young. 1996a. Factors Response for Astaxanthin Formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technol.* **55**:207-214.
 22. Harker, M., A. J. Tsavalos, and A. J. Young. 1996b. Autotrophic Growth and Carotenoid Production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 Liter Air-Lift Photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **82**:113-118.
 23. Jinno, K., Lin, Y. 1995. Separation of Carotenoids by High-Performance Liquid Chromatography with Polymeric and Monomeric Octadecylsilica Stationary Phases *Chromatographia* **41**:311-317
 24. Kakizono, T., Kobayashi, M., Nagai, S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on Encystment accompanied with Astaxanthin formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74** :403-405
 25. Kobayashi, M., T. Kakizono, and S. Nagai. 1991. Astaxanthin Production by a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media. *J. Ferment. Bioeng.* **71**:335-339.
 26. Kobayashi, M., T. Kakizono, Y. Kazuya, N. Nishio, and S. Nagai 1992a. Growth and Astaxanthin Formation of *Haematococcus pluvialis* in Heterotrophic and Mixotrophic Conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:17-20.
 27. Kobayashi, M., T. Kakizono, N. Nishio, and S. Nagai. 1992b. Effects of Light intensity, Light Quality, and Illumination Cycle on Astaxanthin Formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**:61-63.
 28. Kobayashi, M., Y. Kurimura, and Y. Tsuji. 1997a. Light-independent, Astaxanthin Production by the Green Microalga *Haematococcus pluvialis* under Salt Stress. *Biotechnol. Lett.* **19**:507-509.
 29. Kobayashi, M., Y. Kurimura, T. Kakizono, N. Nishio, and Y. Tsuji.

- 1997b. Morphological Changes in the Life Cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**:94-97.
30. Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. 1997c. Morphological Changes in the Life cycle of the Green Alga *Haematococcus pluvialis* *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**, 94-97
31. Kobayashi, M., T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimura and Y. Tsuji 1997d. Antioxidant Role of Astaxanthin in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:351-356
32. Kobayashi, M., Y. Todoroki, N. Hirai, Y. Kurimura, H. Ohgashi, and Y. Tsuji. 1998. Biological Activities of Abscisic Acid Analogs in the Morphological Change of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**:529-531.
33. Kobayashi, M., Okada, T. 2000. Protective role of astaxanthin against u.v.-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis* *Biotechnology Letters* **22**:177-181
34. Lee, C.-G. and B. O. Palsson 1994. High-Density Algal Photobioreactors Using Light-Emitting Diodes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**:1161-1167.
35. Lee, C.-G. and B. O. Palsson. 1995a. Continuous Medium Perfusion Leads to Long-Term Cell Viability and Oxygen Production in High-Density Photobioreactors. *Biotechnol. Lett.* **17**:1149-1154.
36. Lee, C.-G. and B. O. Palsson. 1995b. Light Emitting Diode-Based Algal Photobioreactor with External Gas Exchange. *J. Ferment. Bioeng.* **79**:257-263.
37. Lee, C.-G. and B. O. Palsson. 1996. Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to Red Light from Light-Emitting Diodes Leads to Autospore Release Following Each Cellular Division. *Biotechnol. Prog.* **12**:249-256.
38. Lee, C.-G. 1999. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**:78-81.
39. Lorenz, R. T. and G. R. Cysewski. 2000. Commercial Potential for

- Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnol.* , 18:160-167
40. Margalith, P. Z. 1999. Production of Ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:431-438.
 41. Okai, Y. and K. Higashi-Okai. 1996. Possible Immunomodulating Activities of Carotenoids *in vitro* Cell Culture Experiment. *Int. J. Immunopharmacol.* 18:753-758.
 42. Richmond, A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view *Journal of Applied Phycology* 12:441-451
 43. Terao, J. 1989. Antioxidant Activity of β -carotene-related Carotenoids in Solution. *Lipids*, 24:659-661.
 44. Vilchez, C., I. Garbayo, M. V. Lobato, and J. M. Vega. 1997. *Enzyme Micro. Technol.* 20:562-572.
 45. Wang, C.-W., M.-K. Oh, and J. C. Liao. 1999. Engineered Isoprenoid Pathway Enhances Astaxanthin Production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62:235-241.
 46. Xylander M., Ch. Hagen and W. Braune. 1996. Mercury Increases Light Susceptibility in the Green Alga *Haematococcus lacustris*. *Bot. Acta.* 109:222-228.
 47. Yuan, J. P., Chen, F. 2000. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis* *Food chemistry* 68:443-448
 48. Zhang, D. H., Y. K. Lee, M. L. Ng, and S. M. Phang. 1997. Composition and Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 9:147-155.
 49. Zhang, XW., Gong, X-D., Chen, F. 1999. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalgae *Haematococcus pluvialis* *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 23:691-696
 50. 안길환 1996. 붉은 Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)로부터 Astaxanthin의 생산. *The Microorganisms &*

Industry. 22:128-136.