

584.3  
2-11  
V.3

GOVP1200513934

01077655

## 제 3 차 년 도 최 종 보 고 서

# 미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정 개발 및 실용화

Process Development for Astaxanthin  
Production by Microalgae

연 구 기 관  
인 하 대 학 교

해 양 수 산 부



# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 ‘미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정 개발 및 실용화’ 과제의 보고서로 제출합니다.

2003. 2. .

주관연구기관명 : 인 하 대 학 교

주관연구책임자 : 이 철 균

연 구 원 : 윤 현 식

임 건 빈

서 인 수

하 성 진

김 재 환

김 유 진

김 홍 수

연 구 조 원 : 이 정 훈

서 문 원

최 수 림

김 선 형

김 한 욱

주 현 나

엄 현 숙

이 우 성

박 복 준

남 보 현

## 최종(단계)보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2002. 3. - 2003. 2.	단계 구분	3/6
연구사업명	해양생물로부터 유용신물질 연구개발				
연구과제명	미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정개발 및 실용화				
연구책임자	이철균	해당단계 참여연구원수	총 : 15명 내부 : 9명 외부 : 6명	해당단계 연구비	정부: 170,000 천원 기업: 15,000 천원 계: 185,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	인하대학교 생물공학과		참여기업명	화인코(주)	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	86
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 균주개량 및 최적화 기술을 통한 생산성 향상             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자 조작 또는 돌연변이에 의한 균주 개량</li> <li>- 인자요인실험을 통한 균체성장 극대화 및 astaxanthin의 축적량의 극대화</li> <li>- 배양량의 배양액에서 세포내 astaxanthin의 고농도 축적방법의 연구</li> </ul> </li> <li>○ 생물공정의 설계 운전 및 최적화 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lab scale 광생물반응기의 최적 운전조건의 확립</li> <li>- 2단계 배양을 위한 연구 및 최적화 기법 개발</li> <li>- Pilot scale의 생물공정 개발을 위한 설계 및 운전기법 개발</li> </ul> </li> <li>○ Astaxanthin 상품화 기술 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포의 파쇄, 추출, 분리, 농축을 포함한 downstream 공정 개발</li> <li>- Astaxanthin의 안정성을 향상시키기 위한 첨가제의 선별 및 가공방법 개발</li> <li>- 저순도의 시작품 생산</li> </ul> </li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	아스타산틴, 미세조류, 광생물반응기, 돌연변이, 2단계배양			
	영 어	astaxanthin, microalgae, photobioreactor, mutant, 2 stage culture			

# 요 약 문

## I. 제 목

(국문) 미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정개발 및 실용화

(영문) Process development for astaxanthin production by microalgae

## II. 연구개발의 목표 및 필요성

### (1) 최종 목표

- Astaxanthin 생산균체의 고농도 대량배양 공정의 개발
- 생산된 astaxanthin의 고순도 분리정제기술의 확립
- 수입대체효과와 대외 경쟁력을 갖춘 astaxanthin의 생산공정의 상용화

### (2) 당해연도 연구개발 목표

- Astaxanthin 농도 > 500 mg/L
- 최종 세포농도 >  $10^6$  cell/mL
- 생물반응기 배양크기 = 10 L 규모, 3기
- 1종류 이상의 시제품 개발

### (3) 연구개발의 필요성

- Astaxanthin는 항산화 효과가 큰 물질로서 세계적으로 연구중인 물질임
- 고부가 물질인 astaxanthin의 활용성이 증대되고 있음
- 해양 유용생물을 통한 상품화의 가능성이 높은 물질임
- 미세조류는 유용물질생산 및 환경분야로의 적용성이 높은 종임
- 국내 미세조류를 통한 astaxanthin 생산 기술 미비
- Photobioreactor를 이용한 미세조류의 생산은 astaxanthin의 생산성을 높일 수 있음
- 미세조류를 통한 고농도 배양기술의 응용성 높음

### III. 연구개발의 내용 및 범위

연구 범위	연구 수행 방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
돌연변이에 의한 균주 개량	Colchicine과 EMS (ethyl methanesulfonate)의 처리 및 U.V. 조사	다양한 종류의 돌연변이 균주 확보
균체성장 및 astaxanthin 축적의 극대화	통계적 방법인 factorial design과 central composite design을 이용	과도한 빛조사, 질소원 고갈, 인성분 불충분, 아세테이트 첨가, 염 스트레스, 고온 등의 인자에 대해서 실험
Astaxanthin 고농도 축적방법연구	빛조사량, light quality, 점멸광의 영향 연구	다양한 표면평균광도 25~900 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 에서 실험을 진행, 파장에 대한 영향, flashing light에 대한 영향 연구
Lab. 규모의 반응기 최적 배양	기포탑 광생물반응기의 제작, 운전, 최적 배양조건 확립	10 L 용량의 기포탑 광생물반응기를 이용한 lumostatic operation 방법의 최적화
2단계 배양을 위한 연구	2단계 배양을 위한 최적 induction 시점의 결정	1단계에서 2단계로 전환하는 시점을 균체농도가 최대인 지점과 이 시점 이후 일정한 시간 간격을 두고 induction 한 경우에 대하여 비교 연구
생물공정의 설계기술 개발	Pilot 규모의 대용량 생물공정 개발에 필요한 설계 및 운전 기법의 연구	Open system에서의 배양시 오염정도 및 항생제 투입 가능성 검토 Light distribution model을 이용한 광생물 반응기 설계기술 개발
Downstream 공정 개발	다양한 초미세분쇄기로 세포벽 파쇄, 다양한 용매로 추출, 추출시간 결정	Attrition mill, dyno mill등 초미세 분쇄기로 파쇄 후 현미경관찰, 추출용매 및 추출시간 결정
	선택적 carotenoid 분리	HPLC 분석을 통해 carotenoid 분리
제품내 astaxanthin 안정성 향상 연구	Astaxanthin 유액제조 하여 안정성 연구	오일을 대조군으로 하고, 다양한 첨가제를 첨가한 astaxanthin 유액 제조하여 carotenoid 함량 측정
저순도 시작품 생산	농축 oil 제조	0.5, 2.5, 5, 10% 농축 오일
	건강식품개발	분말, tablet, soft capsule 형태의 시작품 개발
	기능성 화장품 및 비누 생산	에센스, 아이크림 및 비누 제작

#### IV. 연구개발결과

연구 내용	연구 결과
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Colchicine의 처리</li> <li>○ EMS의 처리</li> <li>○ U.V. 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 돌연변이 균주의 확보</li> <li>- 현재 astaxanthin의 생산성 screening 중</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 통계적 방법인 factorial design과 central composite design을 이용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고농도 astaxanthin의 최적 환경: 광도 1040 <math>\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})</math>, nitrate 0.04 g/L, phosphate 0.31 g/L, acetate 0.05 g/L</li> <li>두가지 주요인자: 과도한 빛, 질소원 고갈</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 빛조사량의 영향 연구</li> <li>○ Light quality의 영향 연구</li> <li>○ 점멸광의 영향 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 900 <math>\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})</math>에서 astaxanthin 농도 700 mg/L을 얻음.</li> <li>- 적색 파장에서 astaxanthin 축적율이 높음</li> <li>- 일정한 조사보다는 점멸광으로 인한 축적을 향상</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 10 L 규모의 기포탑 광생물반응기의 설계 및 제작</li> <li>○ Lumostatic operation 도입</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 배양부피 10 L 크기의 기포탑광생물 반응기 4기 제작</li> <li>- 세포당 광량을 일정하게 유지시켜주기 위한 Lumostatic operation 방법을 도입 100% 이상 세포증대 효과</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2단계 배양을 위한 최적 induction 시점의 결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1단계 배양에서는 세포의 고농도 배양을 진행</li> <li>- 2단계에서는 세포의 induction을 진행</li> <li>- Stationary 초기에 2단계로 진행하는 것이 배양시간을 줄일 수 있어 생산성 효과적임</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대용량 생물공정 개발에 필요한 설계 및 운전 기법의 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Open system으로 배양시 항생제 투입으로 인한 오염율의 감소를 확인함</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고압력세포파쇄기 및 Attriton mill로 세포벽 파쇄</li> <li>○ 균체로부터 carotenoid 선택적으로 분리함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Scale-up을 고려하여 고압력 파쇄기와 attrition mill로 세포벽을 분쇄한 결과 60~80%이상이 분쇄됨</li> <li>- 추출 용매는 아세톤과 에탄올이 적절하고, 추출시간은 30분이 적당함</li> <li>- HPLC 분석을 통해 선택적으로 carotenoid 분리함</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제품내 astaxanthin 안정성 향상을 위하여 astaxanthin 유액의 제조방법 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 오일을 대조군으로 하고, 천연 다당체 및 알긴산등을 첨가제로 한 Astaxanthin 유액 제조하여 carotenoid 함량을 한달 동안 측정한 결과 대조군에 비해 잔재율이 40%이상 높게 나타남</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기능성화장품 및 비누 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Astaxanthin 함유한 essence와 eye cream 및 비누 제작</li> </ul>

## V. 연구개발결과의 활용계획

- 당해연도에 개발된 신규 다중 광생물반응기(multiple photobioreactor)는 종래의 2단계 생물공정에 비해 기술적으로 월등한 수준으로 판단되며, 차기년도의 연구를 통하여 기존의 특허화된 생물공정을 피해갈 수 있는 신규 생산공정을 구현, 상용화를 추진함.
- 현재 astaxanthin의 용도는 순도가 낮은 경우에서 높은 경우까지 다양하며, 당해연도에 완료되는 1단계 연구성파로 astaxanthin이 포함된 essence와 eye cream류의 화장품과 비누의 시제품을 제작할 수 있었다. 추후 2단계 사업이 종료되는 시점에는 30% 정도의 astaxanthin을 포함한 생산품을 향암, 항산화 효과를 이용한 기능성 화장품의 원료로 시판하는 것이 가능할 것으로 기대되며, 한가지 목적만을 가진 단일 의약품의 개발에 비해 높은 가능성과 경제적 가치를 가질 것으로 판단됨.
- 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성에도 불구하고, 사업화가 되지 못한 이유는 고농도 미세조류의 배양기술이 축적되지 않았기 때문이다. 따라서 본 연구를 통하여 확보된 국제 경쟁력을 갖춘 미세조류의 고농도 대량배양기술을 활용하여 현재 지속적으로 개발되고 있는 해양 미세조류 유래의 여러 고부가산물을 단기간에 실용화할 수 있으며, 추후 이 기술은 해양생물자원을 활용하는 벤처기업으로의 기술이전이나 실험실창업을 추진함.



# Summary

Microalgae are the major primary producers of organic matters in aquatic environments through their photosynthetic activities. Dozens of microalgal species are produced commercially for single-cell proteins, polysaccharides, healthy food compounds such as polyunsaturated fatty acids, and vitamins in the pharmaceutical and the dietetic industries. Recently *Haematococcus pluvialis* is widely studied as one of the best sources of astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-dione), a ketocarotenoid pigment with potential effects of cancer prevention, enhancer of immune response, and a free radical quencher.

In order to accomplish high growth rate and high yield of astaxanthin production, wild type cells of *Haematococcus pluvialis* UTEX 16 were mutated and screened by using the treatment of colchicine and EMS (ethyl methanesulfonate) under UV irradiation.

The statistical approach was introduced to find the optimal process conditions. Several induction methods for massive production of astaxanthin were also investigated in photoautotrophic batch cultivations. As preliminary experiments, a sequential methodology based on the application of two types of statistical designs was used to optimize the astaxanthin production in shake flask cultures. The first design employed was a fractional factorial design  $2^{6-3}$  with resolution of III, in which the factors studied were: excessive irradiance and nitrate starvation, phosphate deficiency, acetate supplementation, salt stress, and elevated temperature. The experimental results indicate that the amount of astaxanthin accumulation in the cells can be enhanced by excessive irradiance and nitrate starvation rather than the other factors tested. Central composite design was then applied with four variables at five levels each: light intensity, nitrate, phosphate, acetate. The optimal conditions for the highest astaxanthin production found to be 1040  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  light intensity, 0.04 g/L nitrate, 0.31 g/L phosphate, 0.05 g/L acetate concentration. The effect of the two major induction factors, excessive irradiance

and nitrate starvation, found in statistical methodology were introduced to the cultivation of *H. pluvialis* in bubble column photobioreactors. The cells were inoculated at  $6.5 \times 10^5$  cell/mL and the experiments for astaxanthin production were conducted under six different light conditions and nitrate limiting condition. The surface light intensity was varied from 25 to 900  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  by changing the number of fluorescent lamps. Nitrate concentration was sharply decreased to nitrate deficient conditions after 2 days. Under excessive light condition of 900  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , the maximal productivity could be obtained as astaxanthin concentration of over 700 mg/L, which is higher than any published values and 7 times higher than that under 25  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Spectral quality is also investigated for astaxanthin production. Astaxanthin formation is enhanced under red light than other wavelengths tested. Astaxanthin formation per cell was more efficient under red light than that under wavelengths tested. The cells accumulated more astaxanthin under flashing light than those under continuous light. The results clearly showed that the efficient astaxanthin production in bubble column photobioreactors can be accomplished by supplying excessive light energy (preferably flashing red light) under nitrate deficient condition.

The operating methods of the bubble-column photobioreactors (400 mL, 2 L, 10 L, and 30 L working vol.) were also developed including nutrient feeding in fed-batch cultivation and lumostatic operation for efficient supply of light energy. Results showed two levels of the specific rate of light uptake ( $q_e = 4.5 \times 10^{-8}$  and  $3.0 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ ) resulted higher productivity than that of the control experiment ( $I_0 = 90$   $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ). But the culture with specific light uptake rate of  $q_e = 1.5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  showed low productivity. In the culture with  $q_e = 4.5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ , the cell concentration and the astaxanthin production enhanced over 200% than the control. For the culture under  $3.0 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ , the cell concentration and the astaxanthin production increased almost 100% compared than the control. Therefore cultivations with the lumostatic operation were a desirable operation method for the cultivation of phototropic microorganisms.

The downstream process for astaxanthin production was investigated for efficient cell disruption and extraction of carotenoids from cells. The extracts was proceeded through enzymatic hydrolysis reaction in order to transfer the mono- and di-ester forms of astaxanthin to free forms of astaxanthin. Then the astaxantin content in the extracted carotenoids was analyzed quantitatively by using HPLC. The astaxanthin stability was also improved by the usage of silk protein.

The experimental results in this year indicate that more study for strain development are required and lab-scale bubble-column type photobioreactors can be a good choice for high-density cultivation of *H. pluvialis*. As a goal of first stage in this research, three types of low-cost trial products were manufactured: cosmetics (essence and eye cream) and soap. In order to commercialize the proposed bioprocess, more study is required on up-scaling strategy and effective inducing method. At present, we are testing a two-stage system and scaling-up strategy.

# C O N T E N T S

<b>CHAPTER 1. Introduction</b>	<b>1</b>
1. Research Overview	1
2. Research Objectives and Detailed Goals	3
<b>CHAPTER 2. Current R&amp;D Status</b>	<b>5</b>
1. Microalgal Biotechnology	5
2. What Is Astaxanthin ?	5
3. Commercial Application of Astaxanthin	6
4. Industrial Process for Astaxanthin Production	8
5. Astaxanthin Production by Microalgae	9
6. Future Prospect	10
<b>CHAPTER 3. Research Topics and Results</b>	<b>12</b>
<b>Section 1. Strain Development and Productivity Improvement</b>	<b>12</b>
1. Derivation and selection of powerful mutants	12
2. Statistical approach for establishing optimal process conditions	18
3. Induction method for higher astaxanthin accumulation	26
<b>Section 2. Process Optimization of Lab.-scale Photobioreactors</b>	<b>34</b>
1. Efficient operation of lab.-scale photobioreactors	34
2. Process development for two-stage cultivations	41
3. Methods for operating and designing the pilot-scale photobioreactors	44
4. Tools for scale-up to pilot-scale photobioreactor system	48

<b>Section 3. Commercialization Study for Astaxanthin Products</b>	<b>51</b>
1. Optimization of cell disrupting processes	51
2. Method development for extracting carotenoids from cells	55
3. Quantitative analysis of astaxanthin content in the extracted carotenoids	60
4. Study on astaxanthin stability	61
5. Production of low-cost trial products	65
<b>CHAPTER 4. Degree of Achievement and Contribution</b>	<b>66</b>
1. Degree of Achievement	66
2. Contribution of the Results from This Year	68
3. Future Plans and Research Strategy	72
<b>CHAPTER 5. Future Applications</b>	<b>76</b>
<b>CHAPTER 6. References</b>	<b>77</b>

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구 배경	1
제 2 절	당해연도 연구의 착안점	3
제 2 장	국내외 기술개발 현황	5
제 1 절	미세조류의 응용기술	5
제 2 절	아스타산틴이란?	5
제 3 절	아스타산틴의 상업적 이용	6
제 4 절	아스타산틴 생산기술	8
제 5 절	미세조류를 이용한 아스타산틴의 생산	9
제 6 절	연구동향 및 전망	10
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	12
제 1 절	균주 개량 및 생산성 향상 연구	12
1.	유전자 조작 또는 돌연변이에 의한 균주 개량	12
1.1.	Colchicine 처리	12
1.2.	EMS (ethyl methanesulfonate ) 처리	14
1.3.	UV 조사	14
2.	통계적 방법을 이용한 astaxanthin의 축적의 극대화	18
2.1.	Astaxanthin 축적 유도를 위한 인자의 선정	18
2.2.	반응 표면 실험 설계 (Central Composite Design)	21
3.	세포내 astaxanthin의 고농도 축적 방법의 연구	26
3.1.	영양성분의 feeding 방법에 따른 astaxanthin 축적 유도	26
3.2.	빛 조사량에 따른 astaxanthin 축적 연구	28

3.3. Light Quality를 이용한 Astaxanthin 축적 유도	28
3.4. 다양한 광원을 이용한 astaxanthin 축적 유도	31
<b>제 2 절 Astaxanthin 생산 생물공정의 최적화 연구</b>	<b>34</b>
1. Lab scale 광생물 반응기의 최적 조건의 확립	34
1.1. 10 L 광생물반응기에서 최적 표면광도( $I_0$ )에 대한 실험	34
1.2. 10 L 광생물반응기에서 lumostate 배양기법의 도입	35
2. 2 단계 배양을 위한 연구 및 최적화 기법 개발	41
2.1. 2 단계 배양을 위한 inducition point에 대한 실험	41
2.2. 균체성장과 astaxanthin 축적이 동시에 가능한 신규공정의 개발	43
3. Pilot scale의 생물공정 개발을 위한 설계 운전기법 개발	44
3.1. Open system에서의 배양시 오염에 대한 영향 조사	44
3.2. Open system에서 항생제의 효과 및 세포의 성장시 오염의 영향 조사	45
4. 광생물반응기의 설계기술 개발	48
<b>제 3 절 Astaxanthin의 상품화기술 개발</b>	<b>51</b>
1. 배양된 균체의 세포벽 파쇄 방법의 개발	51
1.1. 세포벽 파쇄 방법의 결정	51
1.2. 건조된 <i>Haematococcus</i> 균체의 세포벽 파쇄	51
1.3. 건조한 균체의 위상차 현미경 관찰	51
1.4. Slurry 균체의 세포벽 파쇄	52
1.5. Slurry 균체의 위상차 현미경 관찰	52
2. <i>Haematococcus</i> 균체로부터 최적의 carotenoid 추출 방법 결정	55
2.1 추출 용매 및 추출시간 결정	55
2.2. 배양된 균체의 oil 함량 분석	55
2.3 Oil 내 carotenoid 함량 분석	56
3. Carotenoid로부터 astaxanthin의 선택적인 정량분석	59

3.1. Enzyme을 이용한 Hydrolysis 반응	60
3.2. 균체로부터 carotenoid의 HPLC 분석	60
4. Astaxanthin의 안정성 연구	61
4.1. Astaxanthin 유액 제조	61
4.2. 안정성 연구	62
5. 저순도의 시작용 개발	65
<b>제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도</b>	<b>66</b>
제 1 절 연구 개발 목표 달성도	66
제 2 절 대외 기여도	68
제 3 절 향후 계획 및 추진 전략	72
<b>제 5 장 연구개발 결과의 활용계획</b>	<b>76</b>
<b>제 6 장 참고문헌</b>	<b>77</b>



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구 배경

미세조류의 상업적 이용은 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강 식품; 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 미생물에서 발견된 신물질 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- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione)을 생산하여 실용화하고자 한다.

Astaxanthin은 red ketocarotenoid의 일종으로 물고기와 동물의 음식물 속에 들어있는 색소의 원료일 뿐만 아니라  $\beta$ -catotene,  $\alpha$ -tocopherol 보다도 높은 항산화의 활성을 가진 잠재력이 많은 물질로서 연어, 송어, 갑각류의 양식에 필수적인 carotenoid이다. 현재는 전량 수입에 의존하며, 연어 사료로만 1.5억달러의 시장을 형성하고 있다. 더불어 사람에게도 면역기능 활성화, 암예방, 비타민 A 전구체 등 중요한 대사적 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며, 최근에는 항암, 항산화 효과를 가진 고부가가치의 새로운 용도가 지속적으로 개발되고 있다.

현재 astaxanthin의 활용범위가 이제까지의 사료 등의 저부가가치 용도에서, 이제까지의 순도보다 훨씬 높은 순도를 요구하는 기능성화장품, 식품첨가제, 의약품 등의 활용이 개발되면서 2000년의 3억5천만 달러의 시장에서 매

년 30%이상 급속히 성장할 것으로 예상된다. 현재 10% 정도의 낮은 순도가 kg당 2,000-4,000달러의 고가에 매매 되고 있으며 사료가 아닌, 의약품, 화장품, 건강식품 등으로 사용되려면 10%이상의 고순도의 astaxanthin의 생산이 필수적이다. 따라서 고순도의 고부가 astaxanthin의 생산에 유리한 생물공학적 방법이 더욱 각광을 받고 있으며, 전세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다.

Astaxanthin을 생산하는 방법은 5가지가 있으며 현재 Hoffman LaRoche사에서 사용하고 있는 화학적 합성법은 산업적으로 응용, 생산되고 있다. 그러나 astaxanthin의 구조가 복잡하고, 화학 합성법에 의한 astaxanthin의 선택도가 낮아 시장점유율이 줄어들고 있다. 또한 astaxanthin은 chiral center가 2개나 있어서, 화학적 합성으로는 racemic mixture가 생산이 되고 대부분 free acid form이 생산되는 관계로 안정성, 활성이 떨어진다. 아직 FDA 공인이 되지 않아 사료를 제외한 고부가가치의 용도로는 사용할 수 없다. 게나 새우 등 갑각류의 껍질로부터 생산하는 방법은 높은 회분과 키틴 함량으로 사용의 제한을 받고 있으며 공해유발의 단점을 지니고 있다. 다음으로는 미생물을 이용하여 astaxanthin을 추출하는 방법이 있는데 *Phaffia rhodozyma*, *Agrobacterium*, *Haematococcus pluvialis*으로부터의 생산이 연구되고 있다. 붉은 효모 *Phaffia rhodozyma*는 성장속도가 빠르고 색소의 추출이 필요없는 장점이 있으나 astaxanthin의 함유량(0.03%)이 적고 (3R, 3'R) form만을 생산하여 산업적으로 사용이 제한되었다. 현재 유전자조작을 통한 생산성향상 연구가 시도되고 있으나 유전자 조작된 yeast의 경우 생장율이 떨어지는 단점을 극복하기 어려울 것으로 보인다. 해양미생물 *Agrobacterium*를 통한 astaxanthin 생산은 자체미생물로부터의 생산보다는 이의 유전자를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 색소를 생산하는 방식이 시도되고 있다. 하지만 이 방법은 색소함량이 저조한 문제가 남아 있다. 미세조류 *Haematococcus pluvialis*는 astaxanthin의 함유량이 높고(6-8%) 태양광과 같은 값싼 에너지원을 이용, 생체 이용성이 높은 (3S, 3'S) isomer를 생산하므로 상업화 가능성이 높은 미생물이다. 그러나 *Haematococcus pluvialis*를 이용하는 방법은 배양기간이 길고 색소의 추출과정이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 현재 생물공학적인 방법을 통한 *Haematococcus pluvialis*의 고농도 배양과 색소추출방법에 관한 연구가 국내외적으로 활발히 진행되고 있다. 특히 구미 선진국의 Cyanotech Co. (<http://www>.

cyanotech.com/), Aquasearch Inc. (<http://www.aquasearch.com>), Micro Gaia Inc. (<http://www.microgaia.com/>) 등을 중심으로 사료 및 건강보조식품이 개발되어 있으며, 현재 의약품 및 화장품에 사용될 수 있는 고순도의 astaxanthin의 생산을 위한 기술개발이 활발하다. 이 분야의 핵심기술은 미세조류의 고농도 대량배양기술의 개발이며, 현재의 배양방법은 태양광을 이용한 옥외배양조를 사용함으로써 고농도 배양이 힘들고 다른 미생물에 의한 오염이 쉬운 문제가 있어 고순도의 astaxanthin 생산의 경제성이 떨어진다.

따라서 본 연구에서는 해양미세조류를 이용한 경제성 높은 astaxanthin의 생산공정을 유도하기 위하여, 국내 여건에 적합한 새로운 형태의 광생물반응기 및 고효율의 신생물공정을 개발하여 해양미세조류의 고농도 대량배양기술을 확립하고, 이를 산업적 규모까지 scale-up한 상용 공정을 개발함으로써, 최종적으로는 astaxanthin을 생물공정을 이용한 기능성 화장품 소재 및 의약품의 원료로 실용화할 예정이다. 이 연구는 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용 산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 생물공정기술을 개발하기 위한 것으로, 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 당해연도 연구의 착안점

본 과제의 기본적인 추진 전략은 먼저, astaxanthin의 생산이 없이 *H. pluvialis*의 농도를 최적화시키고, 고농도 배양된 균체를 induction시켜, 고농도의 astaxanthin을 축적되도록하는 2단계 배양을 실시하기 위하여, 각각의 조건을 잡고, 그 조건으로부터 최적의 광생물반응기를 설계, 제작한다. 2차년도 연구를 통하여 lab. 규모의 광생물반응기를 기포탑 형태로 설계 제작할 수 있었으며, 시운전을 통하여 고농도 대량배양의 가능성을 확인할 수 있었다. 또

한 영양성분의 유가식배양 및 루모스택 운전방법을 개발하여 고농도 배양을 달성할 수 있었다.

2차년도의 연구 중 미흡한 부분인 세포내 astaxanthin의 고농도 측정 방법에 관한 기술개발과 astaxanthin의 상품화에 관한 연구가 미흡하여 당해년도에는 이를 추가적으로 보완할 필요가 있으며, 또한 3기의 lab scale 기포탑 광생물반응기의 최적 운전조건에 대한 연구를 수행하고, 이때 생산되는 균체 바이오매스를 이용하여 저순도의 시제품 개발을 추진할 예정이다.

당해연도 개발하고자 하는 lab-scale의 2단계 생물공정은 균체의 고농도 대량배양이 가능한 생산용 광생물반응기와 astaxanthin의 고농도 축적을 위한 상품생산용 광생물반응기로 구성되며, 이의 설계, 제작기법을 확립하고 운전조건을 개발하고자 한다. 이때 제작되는 광생물반응기는 사업화에 바로 이용될 수 있는 형태로 제작하고자 한다.

동시에 생산된 astaxanthin을 안정화시키기 위한 연구를 수행하여, 생산된 astaxanthin이 파괴하지 않고, 최대의 수율을 올릴 수 있는 방법을 선택한다. 또한 배양된 균체로부터 astaxanthin의 추출 및 분리, 정제방법의 개발은 제품의 안전성과 경제성, 수율 등을 종합적으로 고려하여 산업적인 관점에서 최적의 방법을 최종 결정할 예정이나, 당해년도에서는 lab scale에서 가능한 모든 방법을 시도하여 기존에 보고되지 않은 새로운 방법의 고안을 통하여, 외국회사와의 경쟁에서 우위를 확보할 수 있는 기술개발을 목표로 추진코자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 미세조류의 응용기술

최근 국내외적으로 microalgal biotechnology에 관한 관심이 높아지고 있으며 여러 고부가 유용산물이 미세조류에서 분리됨에 따라 생명공학의 새로운 개척분야로 인식되고 있다. 현재 미세조류의 상업적 이용은 고부가가치의 향생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강식품; carotenoids, biliproteins 등의 염료; bioflocculants, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 수산양식용 사료 및 생물학적 비료로서의 사용 등으로 그 대상이 점차 확대되고 있다.

특히 미국, 유럽, 일본, 이스라엘, 노르웨이, 독일 등 선진국을 중심으로 해양자원에 많은 관심을 가지고 투자를 진행 중이며, 최근에는 중국, 동남아시아 등의 나라에서도 산업화를 진행하고 있다. 이 중 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 해양 미생물에서 발견된 신물질 중 37 % 이상을 생산하는 미세조류의 개발 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도배양을 위한 신기술을 개발하고 있다. 본 고에서는 미세조류에서 유래된 고부가 유용산물 중에서 최근에 산업화를 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 astaxanthin의 특성 및 활용범위 및 국내외적인 연구동향에 대하여 요약하였다.

### 제 2 절 아스타산틴이란?

아스타산틴(3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione)은 자연계에 널리 분포되어 있는 keto-carotenoid로 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합체이다. 자연상태에서 아스타산틴은 주황색 또는 붉은 색을 띠며 연어, 송어 또는 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 있어서 주요 색

소 물질로서, 인류와 동물의 대사 기능을 향상시키고, virus, bacteria, fungi에 의한 감염을 감소시키고, cytokine 유도 활성으로 인하여 면역기능을 활성화시키며, T-helper cell의 기능을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 활성 산소(oxygen radical)의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암과 간암 등 암의 예방과 지방 조직을 peroxidation으로부터 보호하여 노화 방지에 효과가 있다. 게다가 아스타산틴은 비타민 A의 전구체로서 건강한 눈의 유지에 필수적이며, 화장품에서 주름 제거에 효과가 있다고 알려진 retinol의 전구체이기도 하다. 최근의 연구를 통하여 아스타산틴은 종전에 항산화제로 쓰였던 수용성에서 불안정한 상태인 비타민 C나 지용성 비타민 E인  $\alpha$ -tocopherol에 비하여 500-1,000배에 해당하는 항산화 효과가 입증되어 의약적 또는 식품첨가물로서의 활용이 가능할 것으로 기대된다. 특히 1999년 8월에는 미국 식품안전청(FDA)에서 식품 첨가물, 기능성 화장품, 의약품 및 건강 보조 물질로의 안정성을 승인 받아 그 활용범위가 더욱 확대될 것으로 기대되고 있다.

### 제 3 절 아스타산틴의 상업적 이용

아스타산틴은 종래의 사료 등의 저부가가치 용도에서, 최근에는 높은 순도를 요구하는 기능성화장품, 식품첨가제, 의약품 등으로의 활용이 개발되고 있다. 현재 10% 정도의 낮은 순도가 kg당 2,000-4,000달러의 고가에 매매 되고 있으며 사료가 아닌, 의약품, 화장품, 건강식품 등으로 사용되려면 10%이상의 고순도의 astaxanthin의 생산이 필수적이다.

#### ○ 사료 첨가제

아스타산틴은 새우나 가재의 갑각류, 송어, 연어의 주요색소이나, 이들은 astaxanthin을 생합성할 수 없고, 먹이사슬에 의하여 섭취하게 된다. 따라서 이들을 양식하는 경우 양식용 사료에 astaxanthin을 섞어주면, 상품의 착색이 우수해짐으로써 상품가치를 높일 수 있으며, 전술한 astaxanthin의 활성으로 인해, 양식 새우 및 연어 등이 병충해에 영향을 덜 받는 등 많은 장점이 있다.

현재는 사료용으로 사용되는 astaxanthin은 전량 수입에 의존하며, 연어 사료로만 1.5억달러의 시장을 형성하고 있다.

Astaxanthin을 가축에 급여할 경우 T-cell과 B-cell 등의 면역세포를 활성화시켜 백혈구 및 항체 생성능력을 키워줌으로 면역기능이 탁월하게 증진되어, 노화방지, 면역 및 생식능력 증대, 스트레스 방지효과가 매우 탁월하다. 현재 일본에서는 산란 양계 사료에 astaxanthin을 2~4% 첨가한 후 닭에게 투여하는 방법으로, 사료 식이 후 10일부터 astaxanthin 함유 계란이 생산되어 일반 계란보다 3~5배 높은 가격으로 팔리고 있다. 또한 생산되는 닭의 육질이 탄력성이 높아지고, 지방층에 astaxanthin이 함유하게 되어, 건강식으로의 판매가 가능하다. 그러나, 사료첨가제로서의 활용은 일반적으로 단가가 매우 낮기 때문에 국내의 경우와 같이 토지의 면적이 넓지 못하고, 태양광이 적도지방보다 상대적으로 약한 기후에서는 적당하지 않다고 사료된다.

#### ○ 화장품 분야

Astaxanthin의 피부에 대한 입증된 효과는 산화장애로부터 섬유아세포를 보호해주며, 콜라겐과 에라스틴의 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 도와주는 것으로 알려져 있다. 또한 astaxanthin은 자외선 및 각종 스트레스에 의한 피부노화와 피부 trouble의 원인이 되는 유해활성산소를 제거하는 하는 항산화능력이 비타민 E의 약 500-1000배라는 사실이 확인되었다.

따라서 astaxanthin의 강력한 항산화능력과 provitamin A로서의 작용에 착안하여, astaxanthin을 탄력있는 피부를 만드는 피부케어의 유효성분으로서 화장품에 응용하고 있다. 또한 다른 항산화제와 혼합하여 화장품에 사용함으로써, 빛과 열에 약한 carotenoid 색소의 특징을 개선하고, 화장품 원료로서의 안정성을 높이는데 성공하여, 일본의 3대 화장품회사중 하나인 코즈(KOSE)사에서 1999년부터 립스틱, 화운데이션, 스킨케어로션등을 발매하여 현재 인기리에 판매되고 있다.

## ○ 식품 및 의약품

아스타산틴의 강한 항산화의 활성을 이용하여 식품첨가물·건강보조식품 등으로 사용되고 있으며, 현재 통조림 등의 식품에 들어가는 방부제(항산화제)를 단 몇 %만 대체한 경우에도 매우 큰 시장을 형성할 것으로 예상된다. 게다가 astaxanthin은 단순한 항산화작용 이외에도 인간의 면역기능 활성화, 암 예방, 비타민 A 전구체 등 중요한 대사적 역할을 하는 것으로 밝혀짐에 따라 항암, 항산화 효과를 가진 고부가 고순도의 astaxanthin의 새로운 용도가 활발히 개발되고 있다.

현재 1.5% astaxanthin을 현재 사료용으로 시판하고 있는 미국의 시아노텍(Cyanotech)사의 경우, 고부가 상품으로의 astaxanthin의 생산연구를 수행한 지 4년이 경과하였고, 아쿠아서치(AquaSearch)사도 현재 생물공학적으로 생산한 약 2.5% 순도의 astaxanthin을 건강보조식품으로 판매하는 데 불과한 수준이다. 현재 이 상품(상품명 AstaFactor)은 5 mg짜리 아스타산틴을 60정당 \$30에 팔고 있으며, 이는 kg 당 \$100,000 수준에 해당하는 가격이다. 또한 화학적 합성법이나 갑각류의 껍질에서 추출한 astaxanthin의 가격도 생물공학적 방법에 의해 생산된 astaxanthin보다는 저렴한 편으로, 호프만-라로슈(Hoffmann-LaRoche)사는 8%(w/w)의 합성 아스타산틴(상품명 Carophyll)을 \$2,000/kg에 팔고 있으며, 일본의 이타노(Itano)사는 갑각류에서 추출한 10%(w/w)의 astaxanthin을 \$8,000/kg에 시판하고 있다.

## 제 4 절 아스타산틴 생산기술

아스타산틴을 생산하는 방법은 현재 5가지 정도가 사용되거나 연구되고 있으며 현재 호프만-라로슈사에서 사용하고 있는 화학적 합성법은 산업적으로 응용, 생산되고 있다. 그러나 astaxanthin의 구조가 복잡하고, 화학 합성법에 의한 astaxanthin의 선택도가 낮아 시장점유율이 줄어들고 있다. 또한 astaxanthin은 chiral center가 2개나 있어서, 화학적 합성으로는 racemic mixture가 생산이 되고 있고 대부분 free acid form이 생산되는 관계로 안정성, 활성이 떨어져 아직 미국 FDA 공인이 되지 않아 사료용으로만 활용되고 있다. 또한



게나 새우 등 갑각류의 껍질로부터 생산하는 방법은 높은 회분과 키틴 함량으로 사용의 제한을 받고 있으며 공해유발의 단점을 지니고 있다.

다른 방법으로는 미생물을 이용하여 astaxanthin을 추출하는 방법이 있는데 *Phaffia rhodozyma*, *Agrobacterium*, *Haematococcus pluviialis*으로부터의 생산이 연구되고 있다. 이중 붉은 효모 *Phaffia rhodozyma*는 성장속도가 빠르고 색소의 추출이 필요없는 장점이 있으나, 아스타산틴의 함유량(0.03%)이 적고 (3R, 3'R) form만을 생산하여 산업적으로 사용이 제한되었다. 현재 유전자조작을 통한 생산성향상 연구가 시도되고 있으나, 유전자 조작된 효모의 경우 생장율이 떨어지는 단점을 극복하기 어려울 것으로 보인다. 또한 해양미생물인 *Agrobacterium*를 통한 astaxanthin 생산은 자체 미생물로부터의 생산보다는 미생물에서 유래한 유전자를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 색소를 생산하는 방식이 시도되고 있으나, 이 방법은 색소함량이 저조한 문제가 남아 있다. 반면에 미세조류인 *Haematococcus pluviialis*는 아스타산틴의 함유량이 높고(6-8%) 태양광과 같은 값싼 에너지원을 이용, 생체 이용성이 높은 (3S, 3'S) isomer를 생산하므로 상업화 가능성이 높은 미생물이지만, 배양기간이 길고 색소의 추출과정이 필요하다는 단점을 가지고 있어 이를 해결하기 위한 활발한 연구가 진행되고 있다.

## 제 5 절 미세조류를 이용한 아스타산틴의 생산

최근 astaxanthin을 상업적으로 생산하는 기술들로서 *Haematococcus pluviialis* 균주를 고농도 대량배양하는 방법에 관한 연구가 활발하다. 현재 전 세계 시장을 선도하는 기업으로는 미국의 시아노텍(Cyanotech)사와 아쿠아서치(Aquasearch)사, 일본의 후지(Fuji)사와 이타노(Itano)사가 있으며, 현재 사료 및 건강 보조식품이 개발되어 있다. 이 분야의 핵심기술은 미세조류의 고농도 대량배양기술의 개발이며, 현재의 배양방법은 태양광을 이용한 옥외배양조를 사용함으로써 고농도 배양이 힘들고 다른 미생물에 의한 오염이 쉬운 문제가 있어 고순도의 아스타산틴 생산에는 경제성이 떨어지는 것으로 알려져 있다.

현재 상용화되어 있는 기술은 태양광을 이용할 수 있는 개방형 옥외

배양조(open pond)에서 대량배양된 바이오매스를 이용하여 저순도의 아스타산틴 상품을 생산하는 공정이 개발되어 있다. 미국 시아노텍사에서 상용화한 생물공정은 기후조건이 좋은 하와이에 대규모의 생물공정을 설치하여 astaxanthin을 생산하고 있다. 이 공정은 2단계로 구성되며, 1단계에는 외륜(paddle wheel)으로 배지를 순환시키는 수로(raceway) 형태의 배양조나 튜브 형태의 광생물반응기(tubular photobioreactor)에서 고농도로 균체배양하고, 2단계에는 태양광을 이용할 수 있는 옥외 배양조에서 astaxanthin을 축적하게 된다. 특히 1단계에서는 vegetative cell이 성장하기에 최적인 상태로 pH, 온도, 영양분의 조건을 유지하고 있으며, 이때 pH는 이산화탄소의 주입에 의해 조절하고, 온도는 14℃의 깊은 심해수를 열교환기에 활용하는 방법으로 배양온도를 제어한다. 고농도의 vegetative cell이 생산된 후에는 2단계로 옥외배양조에서 영양소 고갈, 염도, 배양온도 등을 조절하는 방법으로 astaxanthin의 세포내로 축적을 유도하여, 전체 공정의 생산성을 증가시키게 된다. 또한 미국의 아쿠아서치사에서 활용하는 생물공정은 25,000 L의 튜브 형태의 광생물반응기(tubular photobioreactor)에서 *Haematococcus* 균주를 배양하여, 최대 건조 균체농도 약 0.36 g/L에 아스타산틴은 9 mg/L을 생산하고 있다. 그러나 오염이 심하고, grazing에 의한 세포의 손실이 심해 현재 대량생산에는 경제성이 거의 없으며, 소량으로 건강식품으로만 상용화되고 있는 수준이다.

## 제 6 절 연구동향 및 전망

최근의 연구동향은 의약품 및 화장품과 같은 고부가 상품의 판매를 목표로 고순도의 astaxanthin을 생산하기 위한 고농도 순수배양기술을 개발하고 있다. 특히 미국, 스웨덴, 스페인 등 유럽에서는 인공광을 이용한 고효율의 광생물반응기를 이용하여 astaxanthin을 생산하는 방법을 연구하고 있으며, 일본, 이스라엘, 싱가포르에서도 *Haematococcus*를 이용한 astaxanthin 생산 연구가 진행 중이다(Table 1). 현재 논문으로 확인할 수 있는 고효율 밀폐형 광생물반응기를 이용한 배양결과는 영국의 Young 연구팀의 성과로 30 L 수준에서 최종 건조균체농도 약 1.5 g/L까지 배양할 수 있었으며, 이때 astaxanthin의 농도는

최대 37.5 mg/L까지 생산할 수 있었다.

국내의 연구는 본 연구팀이 세계수준의 연구성과를 확보하고 있으며, 그 외 몇몇 대학 및 산업체에서 기초 연구를 수행하고 있다. 국내의 연구 동향은 국내 기후여건과 고가의 토지부대비용을 고려하여 주로 인공광을 이용하고 효율의 광생물반응기를 개발에 주력하고 있다. 또한 응용기술로서 유전자 조작 및 돌연변이를 이용한 균주개량, astaxanthin의 고농도 축적기술, astaxanthin의 분리 정제 상품화 기술에 관한 기초 연구를 진행하고 있다.

아스타산틴의 활용범위는 종래의 사료의 사용에서 벗어나 우수한 항산화제, 면역증강제, 항암제 등의 효과로 인해, 화장품 및 의약품으로서의 새로운 용도로의 시장을 개척해 나갈 전망이다. 2000년도 시장규모는 생물공학적인 방법으로 생산된 astaxanthin만 3억 5천만 달러(약 4조원)에 이르렀으며, 매년 30%이상의 시장성장이 예상되고 있다. 따라서 astaxanthin의 생산공정의 개발은 장기적으로 1,000억원 이상의 수입대체효과와 함께 앞으로 성장할 세계시장의 선점이라는 무한한 가능성과 시장성을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 1. Astaxanthin yields obtained by various researchers

Authors	Yield			Working Vol.(L)	Remarks
	(pg/cell)	(mg/L)	(mg/g dry wt.)		
Lee and Soh 1991	-	-	40-43	2.5	Chemostat
Yong and Lee 1991	-	7-8	-	-	
Boussiba and Vonshak 1991	60-100	-	17-19	-	
Kobayashi <i>et al.</i> 1992	-	7.5	10-15	0.1	
Grung <i>et al.</i> 1992	-	-	7	-	
Kobayashi <i>et al.</i> 1993	40-50	-	-	0.1	
Zlotnik <i>et al.</i> 1993	77	-	-	0.1	30 days
Tjahjono <i>et al.</i> 1994	200-250	-	-	-	Elevated temperature
Lee and Ding 1995	30.6	3.9	7.3	-	
Fan <i>et al.</i> 1995	-	-	32	-	
Chaumont and Thepenier 1995	-	-	13.8	-	Tubular photobioreactor
Harker <i>et al.</i> 1996	-	27.5-40	-	30	Photoioreactor, 80days
Chumpolkulwong <i>et al.</i> 1997	100	-	-	1.8	Compactin mutants
Kobayashi <i>et al.</i> 1997	30	9	-	0.1	Light independence
Grünwald <i>et al.</i> 1997	40-70	-	-	-	In flagellates

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 균주 개량 및 생산성 향상 연구

#### 1. 유전자 조작 또는 돌연변이에 의한 균주 개량

최근의 연구를 통하여 미생물, 식물, 동물 등으로부터 유래한 유용 유전자가 유전자 조작에 의해 도입되어 유용물질을 대량 생산하게 되었고, 미세조류의 경우도 광합성 기작 연구나 고부가 유용산물의 생산을 위한 여러형태의 유전자 조작기술이 개발되고 있다. 일반적으로 돌연변이는 유전자 자체의 변화에 의하여 일어나는 경우와, 염색체 일부가 잘려 없어지거나, 여분으로 늘어나서 유전자가 새로이 추가되거나 결실로 인하여 발생하는 유전적인 변화로 천연적으로도 일어나지만 인위적으로 방사선이나 화학물질등의 영향으로 일어나는 경우도 있다. 돌연변이 유발원으로서는 X선과 같은 이온화 방사선이나 자외선 등의 물리적 돌연변이 유도물과 마스터드가스, 알킬화제, 과산화물, 퓨린유도체, 발암물질, 콜히친 (colchicine) 등의 화학적 돌연변이 유도물이 있다.

본 연구는 astaxanthin의 생산량 향상을 위하여 물리적방법인 UV 방사선 조사와 화학적 방법으로 돌연변이 유발물질인 ethyl methanesulfonate (EMS)와 콜히친을 이용하여 돌연변이를 유도하여 다양한 종류의 돌연변이를 확보하고, 그 균주들의 특성을 분석하여 최종적으로는 균체성장이 빠르고 astaxanthin 축적효율이 우수한 돌연변이균주를 개발하는데 목적이 있다.

#### 1.1. Colchicine 처리

백합과 식물인 샤프란의 인경에서 분리한 알칼로이드 물질인 colchicine은 분열주기에 있는 세포에 처리하면 이 콜히친이 방추사를 이루는 미세관을 파괴함으로써 방추사의 형성을 막아 염색체 분리를 못하게 하여 배수체를 발생하게 한다. 이러한 돌연변이 유발물질인 colchicine을 이용하여

wide type 세포에 처리하여 배가된 세포를 획득함으로써 astaxanthin 축적효율이 우수한 세포를 취하고자 한다.

*H. pluvialis*의 돌연변이를 개발하는데 있어서 최적의 배지를 결정하기 위하여 기존의 astaxanthin 생산을 위한 미세조류 배양에 쓰였던 Proteose-Peptide Medium (PPM), Yeast Basal Medium (YBM), Modified Bold's Basal Medium (MBBM)등 배지를 사용하여 세포의 성장에 미치는 결과를 비교 검토 하였다.

이들 배지를 사용하여 세포에 미치는 영향을 비교해 본 결과를 Figure 1에 나타내었다. PPM의 경우 MBBM에 비해 세포의 성장은 약간 빠르나, 세포가 성장함에 따라 배지의 오염도가 높아지면서 세포가 사멸하기 시작했다. 또한 PPM배지를 이용하여 세포를 빛이 있는 상태와 없는 상태에서 배양시켰을 경우, 빛이 있는 상태가 빛이 없는 상태보다 세포의 성장속도가 높은 것을 확인하였다. YBM의 경우 3일후부터 세포의 성장은 멈추고 점차 사멸하기 시작했다. 반면에 MBBM배지의 경우 세포를 건강한 상태로 유지시키고, 지속적으로 세포를 성장시키는 것으로 보아 본 연구실에서 개발한 MBBM 배지가 균주개량에도 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

*H. pluvialis* 세포는 몇 단계의 시기를 거쳐 성장하고 사멸하는 life cycle을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 시기들에 colchicine이라는 화학물질을 사용하여 돌연변이가 유도되는 시기를 결정하기 위하여 vegetative 시기와 immature cyst 시기의 세포에 colchicine처리를 하여 그 결과를 고찰하였다. 본 연구에서는 vegetative 시기의 세포와 immature cyst 시기의 세포에 colchicine을 처리하여 돌연변이가 유발되는 정도를 비교한 결과를 Figure 2에 표시하였다. Vegetative 시기에 콜히친을 처리하였을 때 변이된 세포를 관찰할 수 있었고, 이와 달리 immature cyst 시기에 처리한 세포에는 변화를 확인할 수 없었다.

또한 colchicine을 처리하여 돌연변이를 유발시키는데 있어서 가장 효과적인 처리기간을 결정하기 위하여 1일, 2일, 3일 각각 다른 기간동안 처리하여 세포의 상태를 control과 비교해봄으로써 가장 효과적인 처리기간을 결정하고자 연구를 진행하였다. Colchicine을 사용한 돌연변이 유발에 최적의 처리기간을 확립하기 위하여 wide type의 vegetative 세포에 1일, 2일, 3일 동안 각각

colchicine을 처리한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 1일 처리한 것은 control에 비교하여 세포의 크기에 변화를 관찰할 수 없었으나 2일과 3일 처리한 세포는 control보다 커져있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여 2일, 3일 처리한 세포 양쪽 모두 변화되었기 때문에, 3일 처리는 2일 처리에 비해 많은 시간이 요구되므로 비경제적이라 할 수 있으므로 최적의 처리기간을 2일로 결정하였다.

## 1.2. EMS (ethyl methanesulfonate ) 처리

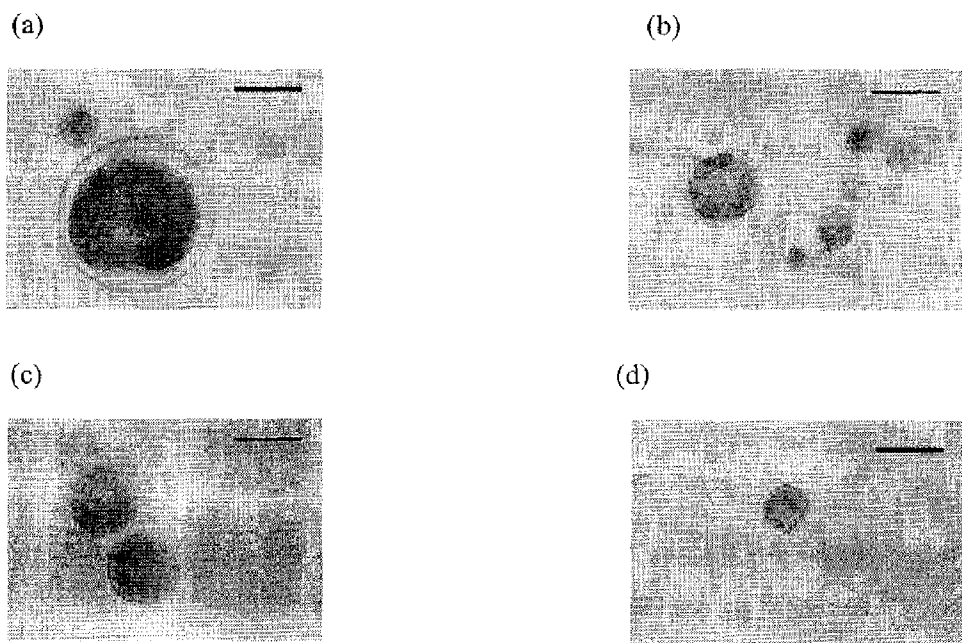
돌연변이체를 제조하기 위하여 alkylating agent로서 sulfonate그룹에 하나인 EMS를 *H. pluvialis*의 wide type에 처리한 후, 세포의 성장과 astaxanthin 축적효율이 높은 돌연변이 세포를 선별하기 위해 세포의 상태를 관찰하여 wide type과 비교해 보았다. 그 결과 EMS처리에 의해 거의 대부분의 세포가 사멸(85% data에 나타내지 않음)하였으며, 아래의 Figure 4과 같이 세포상태를 보았을 때 생존한 세포가 거의 발견되지 않았으며 control과 명확하게 다르다는 것을 알 수 있었다. 현재 이렇게 변이된 세포는 선별작업이 진행 중에 있다.

## 1.3. UV 조사

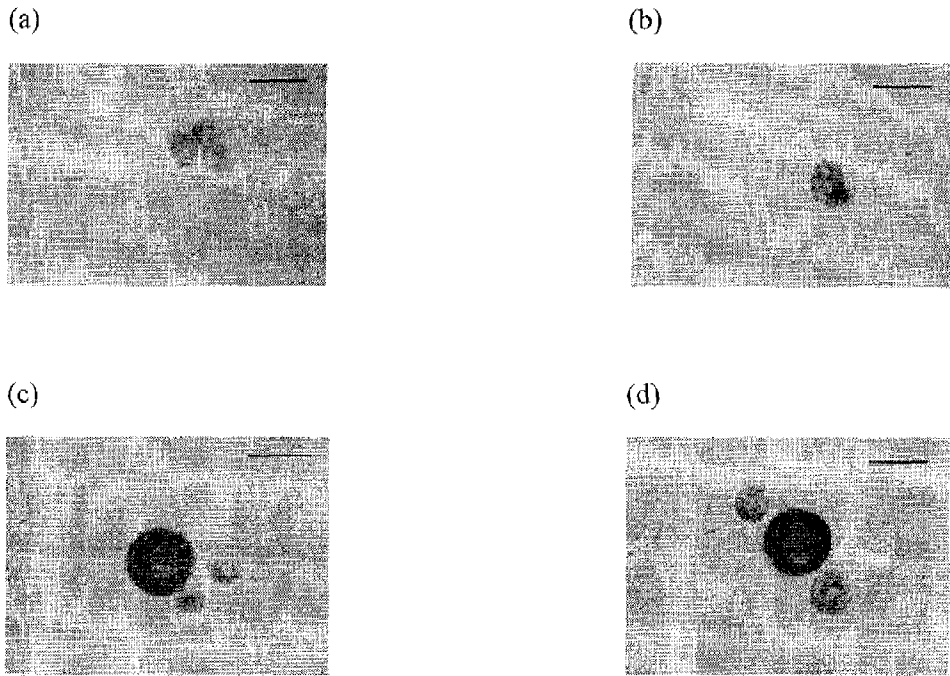
균주개량에 있어서 물리적인 방법으로 X-ray, gamma ray, cosmic ray와 같은 이온화 방사선과 UV와 같은 비이온화 방사선이 활용되고 있다. 본 연구에서는 가장 많이 이용되는 UV 방사선원을 사용하여 돌연변이 세포를 유도하고자 한다.

물리적인 방법의 하나로서 가장 빈번하게 돌연변이 유발에 사용되는 UV 방사선원의 유형은 260 nm 부근에서 많은 양의 UV방사선을 발하는 살균 등이다. 따라서 본 연구에서는 세포생장과 astaxanthin 축적이 보다 나은 세포를 선택하기 위하여 UV (254 nm, 15W) 방사선을 이용하여 *H. pluvialis*의 wide type 세포에 UV를 조사 함으로서 돌연변이 제조를 시도해 보았다. UV 방사선을 이용하여 돌연변이를 제조하는데 있어 가장 효과적인 UV 방사선 조사정도를 결정하기 위하여, 15분, 30분, 45분, 60분 동안 세포에 UV를 조사시켜 세포

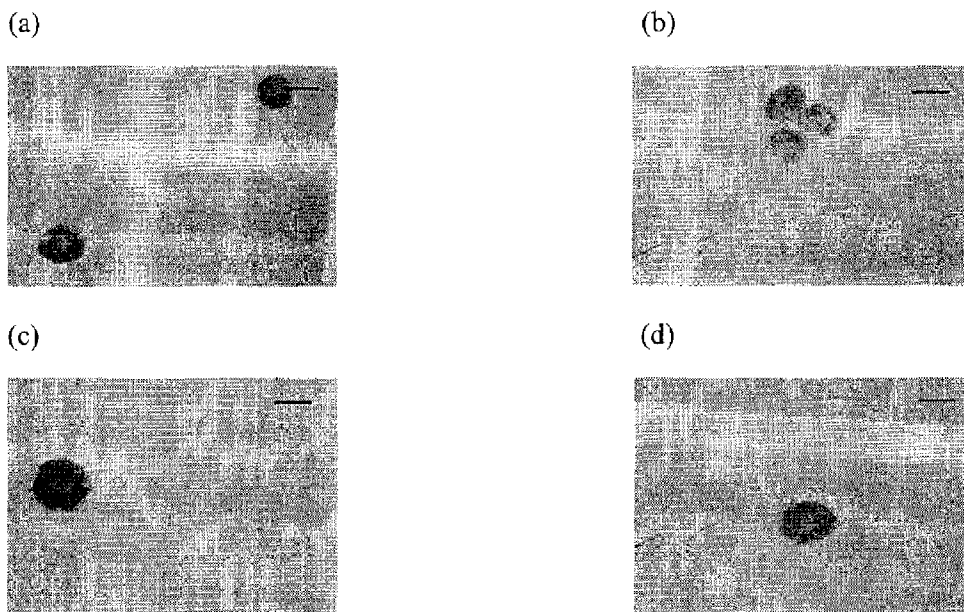
의 상태를 비교·검토하였다. Figure 5는 UV 방사선 조사 정도에 따라 세포에 미치는 영향을 관찰하기 위해 15분, 30분, 45분, 60분 각각 다른 시간동안 UV 방사선을 조사한 결과로, 돌연변이를 유도하는데 있어서 UV 방사선을 30분을 조사하는 것이 가장 효율적인 돌연변이 유도가 가능함을 확인하였고, 현재 이와 같은 방법으로 유도된 돌연변이 세포를 선별 중이다.



**Figure 1.** Micrographs of *H. pluvialis* cultivated using the PPM under (a) light condition and (b) dark condition, (c) the YBM, and (d) the MBBM. The bar indicates 37.5  $\mu\text{m}$ .

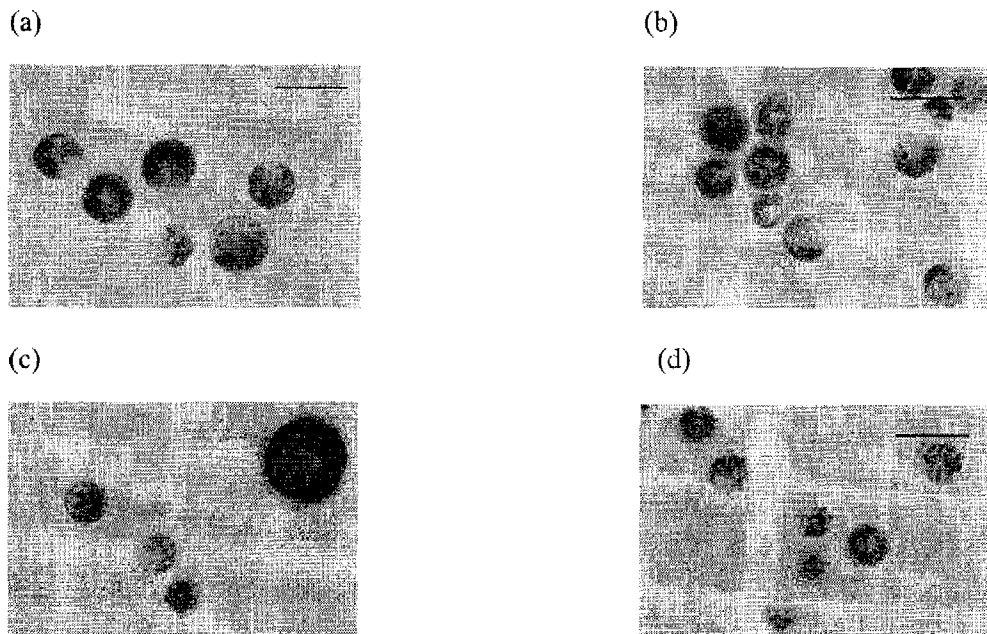


**Figure 2.** Micrographs of the wild type and mutant cells of *H. pluvialis*: (a) vegetative cells, wild type, (b) vegetative cells, colchicine treatment, (c) immature cyst cells, wild type, (d) immature cyst cells, colchicine treatment.

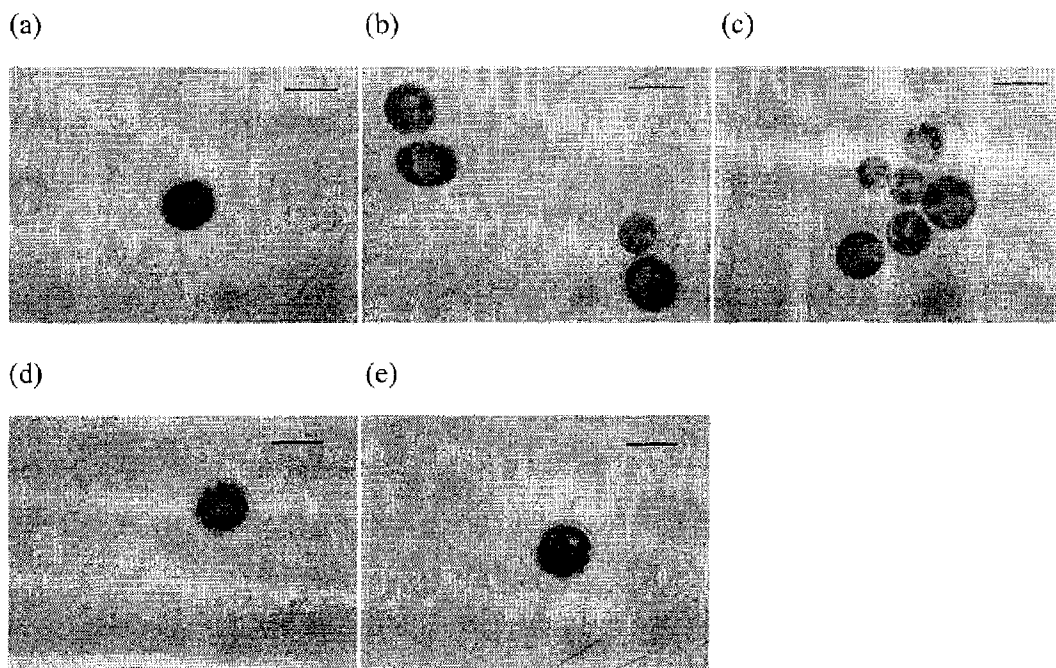


**Figure 3.** Micrographs of the wild type and mutant cells of *H. pluvialis*: (a) wild type, vegetative cells, (b) 1 day colchicine treatment, (c) 2 day colchicine treatment, (d) 3 day colchicine treatment. The bar indicates 25  $\mu\text{m}$ .





**Figure 4.** Micrographs of the wild type and mutant cells of *H. pluvialis*: (a) and (b): wild type, (c) and (d): EMS treatment. The bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5.** Micrographs of the wild type and mutant cells of *H. pluvialis*: (a) wild type, (b) 15 min U.V. irradiation, (c) 30 min U.V. irradiation, (d) 45 min U.V. irradiation, (e) 60 min U.V. irradiation. The bar indicates 32  $\mu\text{m}$ .

## 2. 통계적 방법을 이용한 astaxanthin의 축적의 극대화

### 2.1. Astaxanthin 축적 유도를 위한 인자의 선정

본 연구에서는 *H. pluvialis*의 세포내부로 astaxanthin 축적을 유도할 수 있는 여러 인자 중 가장 효과적인 인자를 선별하기 위해 요인배치법(factorial design)을 활용한 통계적 방법을 수행하였다. 즉 astaxanthin의 축적에 영향을 미치는 중요변수로 6개 인자(① 고광도(high light intensity), ② nitrate deficiency, ③ phosphate deficiency, ④ acetate effect, ⑤ salt stress, ⑥ 온도)들을 2수준에 대하여 실험방법을 설계하여 실험을 수행하였다(Table 1). 실험방법으로는 여러 가지 환경조건을 조합하여 플라스크 수준(100 mL working vol.)에서 수행하였고, 실험결과는 MINITAB® (version 13, MINITAB Inc.) 프로그램을 사용하여 분석하였다. 이때 실험결과는 fresh cell weight당 astaxanthin 농도의 값을 기본으로 계산하였다.

**Table 1.** Factorial design.

Factor	(-)	(+)
Light intensity	Low = 40 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	High = 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$
Nitrate deficiency	0.246 g/L	0 g/L
Phosphate deficiency	0.25 g/L	0 g/L
Acetate + pH	Acetate=0 g/L, initial pH 6.5	Acetate=0.1 g/L, initial pH 7.5
Salt(NaCl) stress	0.025 g/L	0.225 g/L
Temperature	25°C	30°C

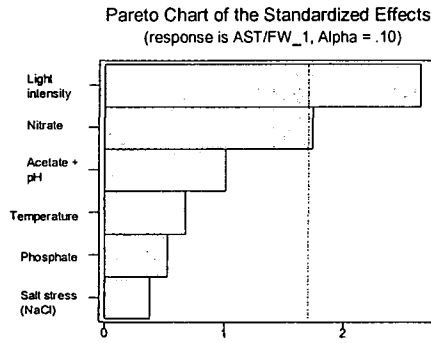
Figure 6(a)에 도시한 Pareto chart는 astaxanthin 축적을 유도하는 효과적인 인자들 각각에 대한 효과 절대치 값을 나타낸 것으로,  $\alpha = 0.10$ 의 참조선과 비교하여 표시하였다. 이 결과를 통하여 참조선에서 벗어난 효과는 잠재적

으로 중요하다고 판단되며, astaxanthin의 축적을 유도하는 인자 중 고광도(high light intensity), nitrate deficiency 조건 순으로 중요함을 확인하였다.

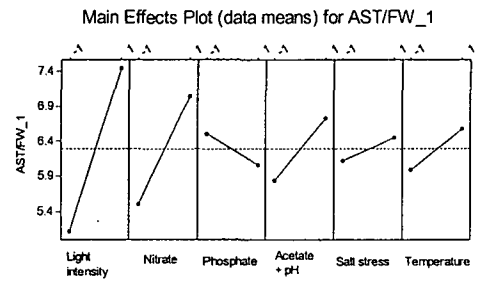
Figure 6(b)의 주효과 그림(main effect plot)은 인자 각 수준에서의 반응치 실험 데이터를 가지고 평균을 그린 것으로, 점선으로 나타나 있는 것은 총 평균값이며, 각각의 인자에 따라 인자의 수준을 -1에서 1로 변화를 시켰을 때 평균값이 많이 변화할 경우 그 인자가 중요한 요인임을 의미하게 된다. 실험 결과를 분석해 보면 Figure 6(b)의 결과에 나타난 바와 같이 고광도(high light intensity), nitrate deficiency, acetate와 pH의 동시 효과, 고온(high temperature)의 순으로 astaxanthin의 축적에 영향을 미침을 알 수 있다. 또한 phosphate deficiency 조건은 다른 인자들의 효과와 다른 경향을 보이는데, 이것은 phosphate의 결여로 인해 buffering 효과가 감소하여 pH가 많이 변화하면서 astaxanthin 축적을 유도해 주지 못한 것으로 추정된다.

Figure 6(c)의 교호작용 그림(interaction plot)은 각각 2개의 인자들 간에 영향을 미치는 정도를 나타낸 것으로, 광도의 경우에는 nitrate, acetate, salt와 nitrate의 경우에는 phosphate, acetate, 온도와 각각 교호작용이 있음을 알 수 있다. 본 인자요인 실험을 통하여 고광도(high light intensity)와 nitrate deficiency의 조건이 astaxanthin 축적을 유도하는데 가장 효과적인 인자임을 확인할 수 있었다.

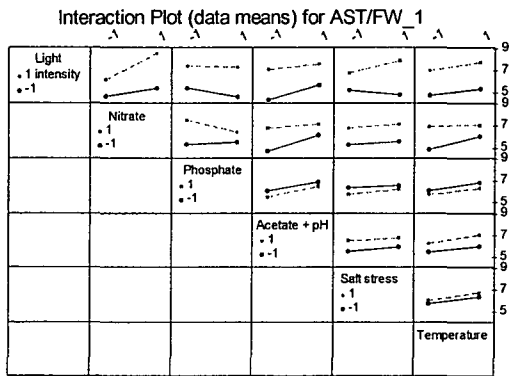
(a)



(b)



(c)



**Figure 6.** Experimental results using factorial design: (a) Pareto chart, (b) main effect plot, (c) interaction plot.

## 2.2. 반응 표면 실험 설계 (Central Composite Design)

인자요인실험을 통하여 규명된 주요 astaxanthin 축적 유도 인자들의 최적 조건을 찾기 위하여, 반응 표면 설계법(Central Composite Design)을 이용한 실험을 수행하였다. 우선 요인배치법을 통하여 astaxanthin의 축적을 유도하는데 중요하다고 판단된 광도, 배지 요소 중 nitrate, phosphate, acetate의 농도에 대하여 5가지 다른 수준에 대하여 flask에서 실험을 진행하였으며(Table 2), 그 결과는 MINITAB®(Version 13, MINITAB Inc.) 프로그램을 사용하여 분석하였다. 고풍도의 빛에너지를 공급하기 위하여 할로겐 램프(hallogen lamp)을 활용하여 astaxanthin의 축적을 유도하였고, 실험결과는 전술한 요인인자 실험과 동일한 방법으로 처리하였다.

Table 3은 반응 표면 실험 결과를 처리한 도표로 이 도표에서 각항은 사용된 1, 2차 계수와  $t$ 값,  $p$ -value을 나타내고 있으며  $p$ -value이 각 인자에 대한 중요도를 판단할 수 있는 기준이 된다.  $p$ -value과  $\alpha$ -level( $\alpha = 0.05$ )을 비교하여  $\alpha$ -level보다 낮거나 같으면 중요한 인자로 판단하는 근거가 된다. Table 3에서  $p$ -value 값이 0.0인 광도와 nitrate, acetate의 농도는 중요한 인자로 판단되며, phosphate는 영향을 미치지 않는 인자로 판단된다.

Figure 7~9 까지의 각각의 반응 표면 그림에서 광도가 증가할수록 ( $1040 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) astaxanthin 농도가 증가하는 반면, nitrate 농도가 감소할수록 astaxanthin 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한 nitrate 농도가 낮은 조건하에서 광도가 높아질수록 astaxanthin 축적에 크게 영향을 미침을 알 수 있다(Figure 7 (a)). 그리고 광도는 phosphate 농도가 약 0.3 g/L, acetate 농도는 0.1 g/L에서 가장 영향을 많이 주었음을 알 수 있다 (Figure 7 (b), Figure 8 (a)). 또한 각각의 최적의 농도는 nitrate는 0 g/L, phosphate는 0.31 g/L acetate는 0.05 g/L임을 규명하였다.

각 인자에 대한 최적화를 위하여 프로그램을 사용하여 astaxanthin 축적 유도인자의 최적값을 도출하였다. 도출된 최적값은 광도  $1040 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , nitrate 농도 0.04 g/L, phosphate 0.31 g/L ; acetate 0.05 g/L이다.

이러한 통계적 연구방법을 통하여 5가지 인자들에 대한 체계적인 최적화가 가능하였다.

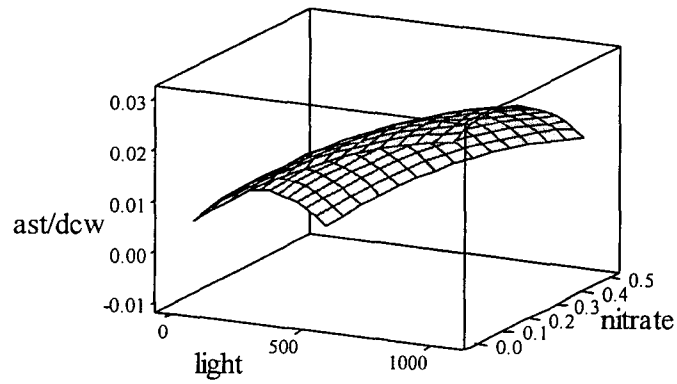
**Table 2.** Central composite design for astaxanthin accumulation.

Factor	-2	-1	0	+1	+2
Light intensity (mmol/(m <sup>2</sup> · s))	40	290	540	790	1040
Nitrate (g/L)	0	0.123	0.246	0.369	0.492
Phosphate (g/L)	0	0.125	0.25	0.375	0.5
Acetate (g/L)	0	1	2	3	4

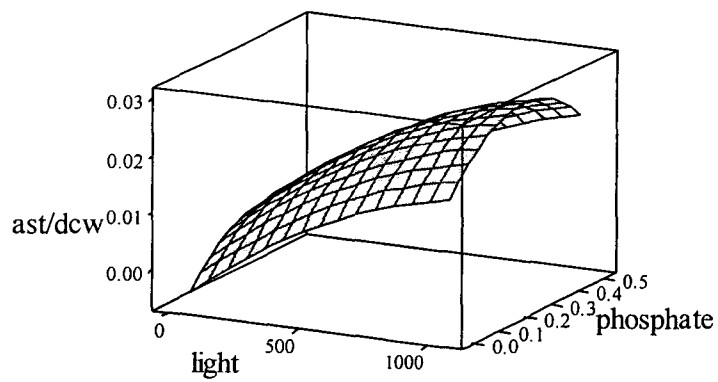
**Table 3.** The coefficients of variables in CCD on astaxanthin concentration per dry cell weight (g/g).

<i>Variables</i>	<b>Coef</b>	<b>SE Coef</b>	<b>t-value</b>	<b>p-level</b>
Constant	0.020000	0.001201	16.648	0.000
light	0.005667	0.000601	9.434	0.000
nitrate	-0.003333	0.000601	-5.549	0.000
phosphate	0.000667	0.000601	1.110	0.287
acetate	-0.001500	0.000601	-2.497	0.027
light*light	-0.000917	0.000562	-1.631	0.127
nitrate*nitrate	-0.001667	0.000562	-2.966	0.011
Phosphate*phosphate	-0.002167	0.000562	-3.856	0.002
acetate*acetate	-0.001542	0.000562	-2.744	0.017
light*nitrate	0.000125	0.000736	0.170	0.868
light*phosphate	0.000125	0.000736	0.170	0.868
light*acetate	0.000000	0.000736	0.000	1.000
nitrate*phosphate	-0.000625	0.000736	-0.850	0.411
nitrate*acetate	0.001500	0.000736	2.039	0.062
phosphate*acetate	-0.000500	0.000736	-0.680	0.509

(a)

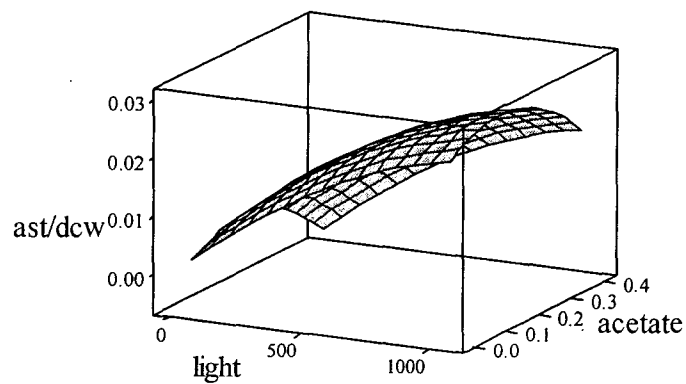


(b)

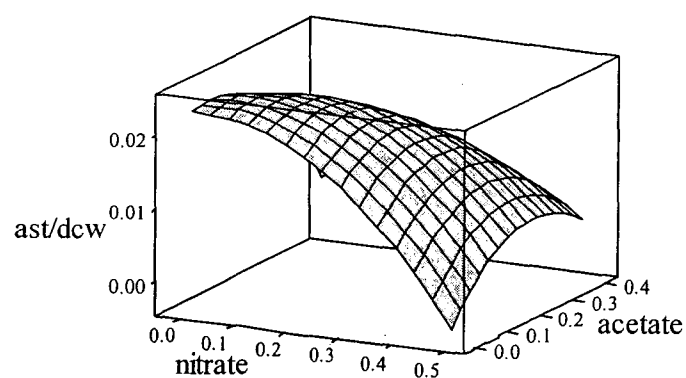


**Figure 7.** Response surface plot of astaxanthin accumulation: (a) light intensity ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) versus nitrate (g/L) under constant concentration of phosphate (0.25 g/L) and acetate (0.2 g/L) and (b) light intensity ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) versus phosphate (g/L) with constant concentrations of the nitrate, 0.246 g/L; acetate, 0.2 g/L.

(a)



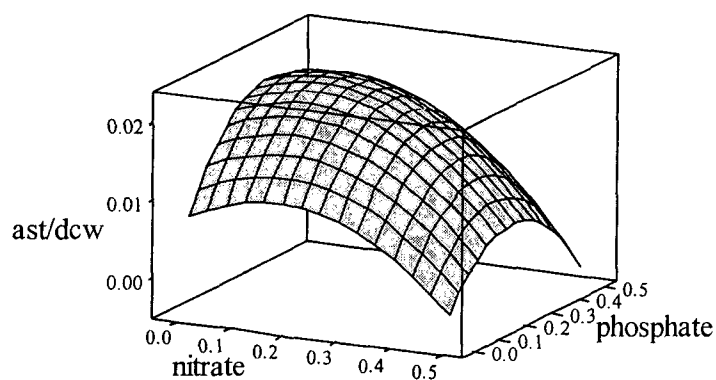
(b)



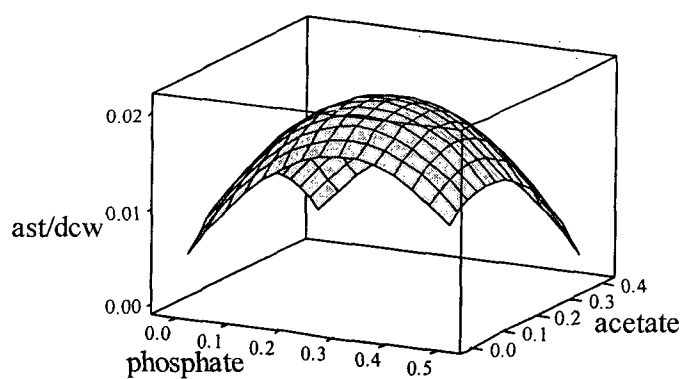
**Figure 8.** Response surface plot of astaxanthin accumulation: (a) light intensity ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) versus acetate (g/L) under constant concentration of nitrate (0.246 g/L) and phosphate (0.25 g/L) and (b) nitrate (g/L) versus acetate (g/L) under constant concentration of phosphate (0.25 g/L) and light intensity (540  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ).



(a)



(b)



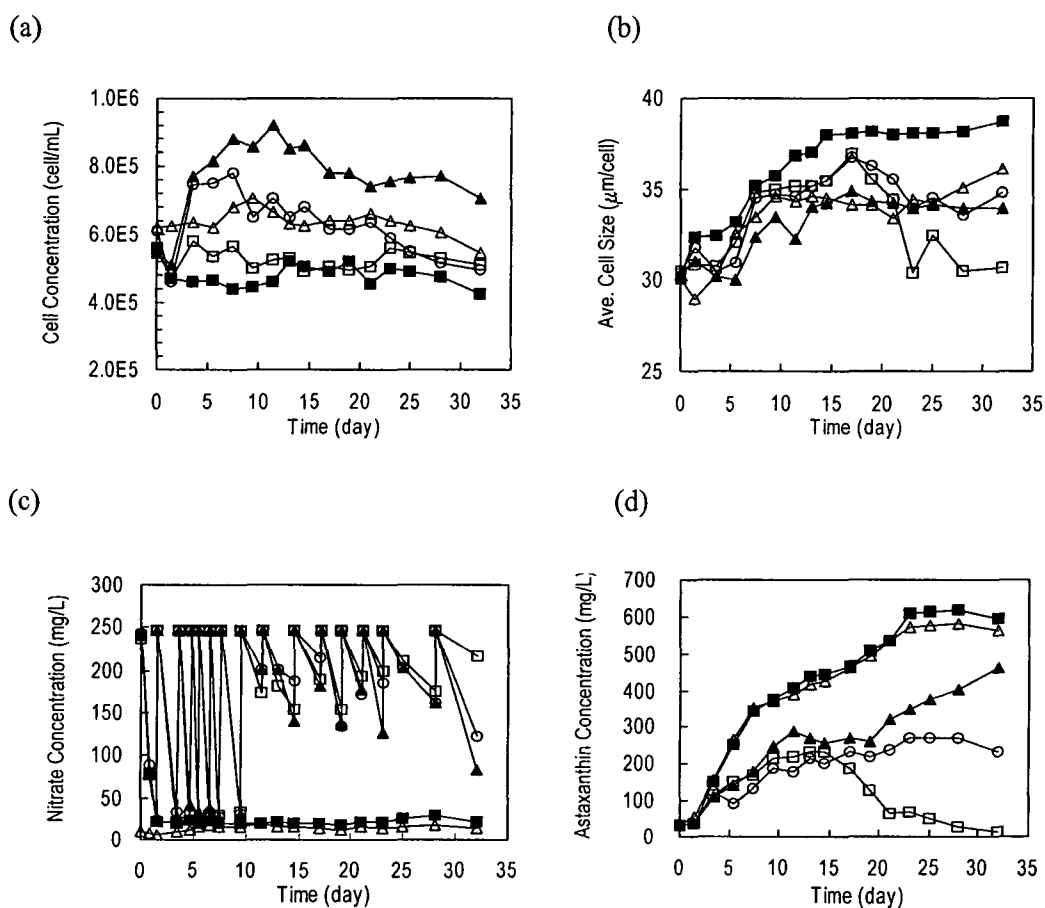
**Figure 9.** Response surface plot of astaxanthin accumulation: (a) nitrate (g/L) versus phosphate (g/L) under constant acetate concentration (0.2 g/L) and light condition ( $540 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) and (b) phosphate (g/L) versus acetate (g/L) under constant nitrate concentration (0.246 g/L) and light intensity ( $540 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ).

### 3. 세포내 astaxanthin의 고농도 축적 방법의 연구

#### 3.1. 영양성분의 feeding 방법에 따른 astaxanthin 축적 유도

균체내의 astaxanthin의 축적은 균체가 외부환경인자에 의하여 stress받는 조건에서 이루어지며, 이때 cell이 lysis되어 균체농도가 감소하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 균체를 고농도로 유지하면서 효과적으로 astaxanthin을 축적하기 위한 방법으로, 영양성분의 feeding전략에 관한 실험을 수행하였다. 초기상태를 nitrate deficiency조건으로 한 실험균과 fresh medium으로 하여 회분식 배양하거나 농축된 nitrate, nitrate-phosphate, total medium을 각각 feeding하여 주는 방법으로 bubble column 광생물반응기(400 mL working vol.)를 운전하면서 astaxanthin 축적을 유도하는 실험을 수행하였다. 이때  $6.5 \times 10^5$  cell/mL의 고농도로 세포를 접종하였으며 광도는  $350 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 을 유지하였다.

배양 결과는 Figure 10에 나타냈으며, nitrate를 feeding해 준 것이 nitrate를 고갈시킨 것보다 세포농도가 2배정도 많음을 확인하였다. 이를 통하여 astaxanthin이 축적되는 stress 조건에서도 고농도의 균체를 지속적으로 유지할 수 있었고, astaxanthin의 축적량은 nitrate deficiency 조건하에서 600 mg/L의 고농도 축적이 가능함을 확인하였다. 또한 고농도의 세포를 유지하면서 고농도의 astaxanthin을 축적하기 위해서는 적절한 nitrate의 feeding시점 즉 induction time을 결정하는 것이 필요함을 알 수 있었다. 반면에 농축된 nitrate-phosphate, total medium을 feeding하여 주는 실험균은 broth내에 영양성분들이 소비되지 못하고 과도하게 계속 축적됨으로 인하여 astaxanthin 축적에 좋지 않은 영향이 있음을 확인하였다.



**Figure 10.** Experimental results for astaxanthin induction by changing nutrient feeding (a) cell concentration (cell/mL), (b) average cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ), (c) nitrate concentration (mg/L), (d) astaxanthin concentration (mg/L).

*Symbols:* fresh medium(■), nitrate feeding(▲), nitrate -phosphate feeding(○), total medium feeding(□), nitrate deficiency(△).

### 3.2. 빛 조사량에 따른 astaxanthin 축적 연구

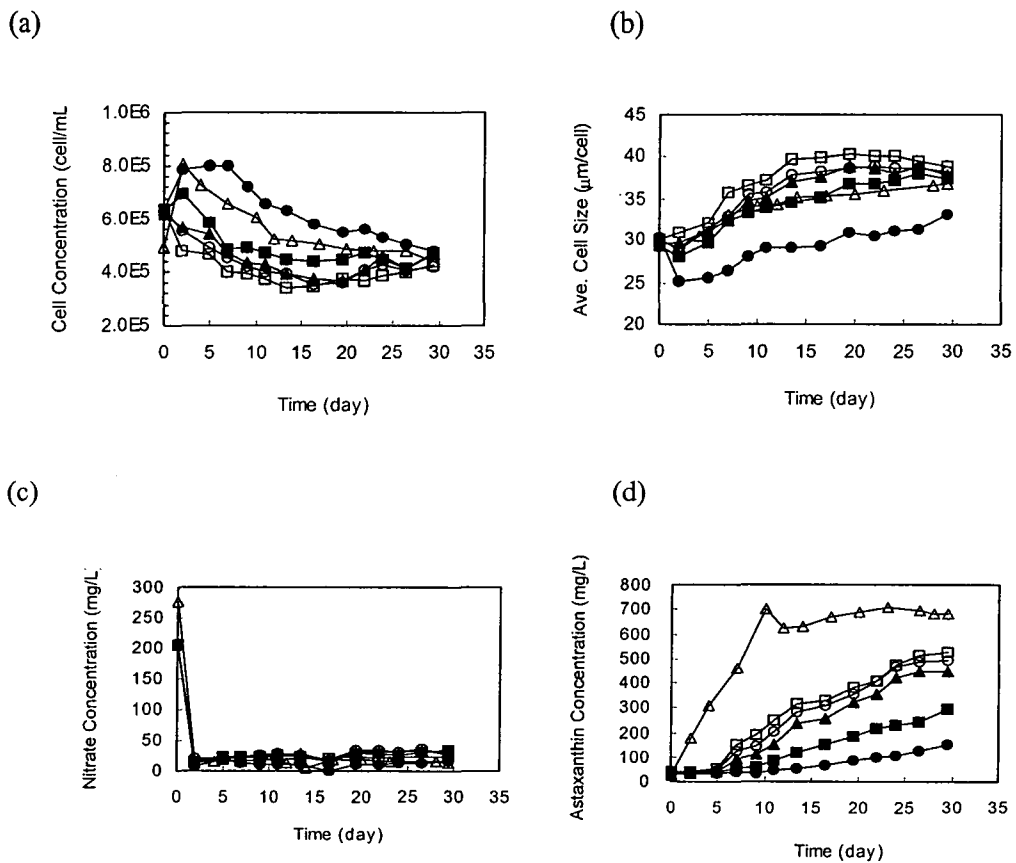
요인배치법을 사용하여 선정된 주요 astaxanthin 축적 유도인자인 high light intensity와 nitrate deficiency 조건을 활용하여 bubble column 광생물반응기 (400 mL working vol.)에서 실제적인 astaxanthin 축적 유도 실험을 수행하였다. 실험방법으로는  $6.5 \times 10^5$  cell/mL의 고농도 세포를 fresh medium에 접종하여 6가지 다른 광도 조건에서 astaxanthin 축적실험을 수행하였고, 광도는 형광등의 개수와 거리를 조절하는 방법으로 25~900  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  수준까지 변화시켰다. 이때 nitrate 농도는 Figure 11(c)에서 나타난 바와 같이 2일후에 거의 0 mg/L의 수준으로 완전히 고갈된 상태로 유지되었다.

실험 결과를 분석해 보면 900  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 의 조건으로 astaxanthin 축적을 유도한 것이 astaxanthin 농도 700 mg/L로 가장 높았고, 이것은 25  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 에 비해 7배정도로 축적량이 향상되었다(Figure 11(d)). 이를 통하여 astaxanthin 생산을 위해서는 nitrate가 결핍된 상태에서 과도한 빛에너지를 공급하는 방법이 효과적임을 알 수 있었으며, 균체 내부로 축적된 astaxanthin의 축적량은 광도가 높을수록 증가하는 비례적인 관계있음을 알 수 있었다.

### 3.3. Light Quality를 이용한 Astaxanthin 축적 유도

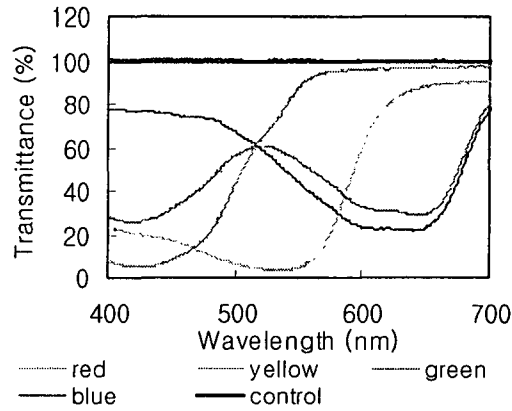
세포내 astaxanthin은 빛에너지의 흡수색소의 일종이므로 모든 파장의 빛을 조사하는 것보다 특정 파장의 빛을 지속적으로 공급받는 것이 astaxanthin의 축적면에서 효과적일 가능성이 있다. 본 연구에서는 일정 파장은 cellophane filter를 사용하여 일정한 파장의 빛을 세포에 조사하는 방법으로 빛 파장의 변화에 따른 astaxanthin의 축적정도를 실험하였다. 이때 Figure 12에 나타난 바와 같이 red, yellow, green, blue의 cellophane filter를 사용하여 빛을 cutting하는 방법으로 일정 영역의 파장으로 구성된 빛에너지를 공급하였다. 이 실험은 bubble column 광생물반응기(400 mL working vol.)에서 수행하였고, 각각의 표면광도를 150  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 로 맞추었으며,  $5.0 \times 10^5$  cell/mL의 고농도 세포를 fresh medium에 접종하였다.

Figure 13(c)에 나타난 배양결과와 같이 총 astaxanthin 축적량은 모든 파장의 빛을 조사하는 것과 red, blue의 cellophane filter를 사용하는 것이 비슷

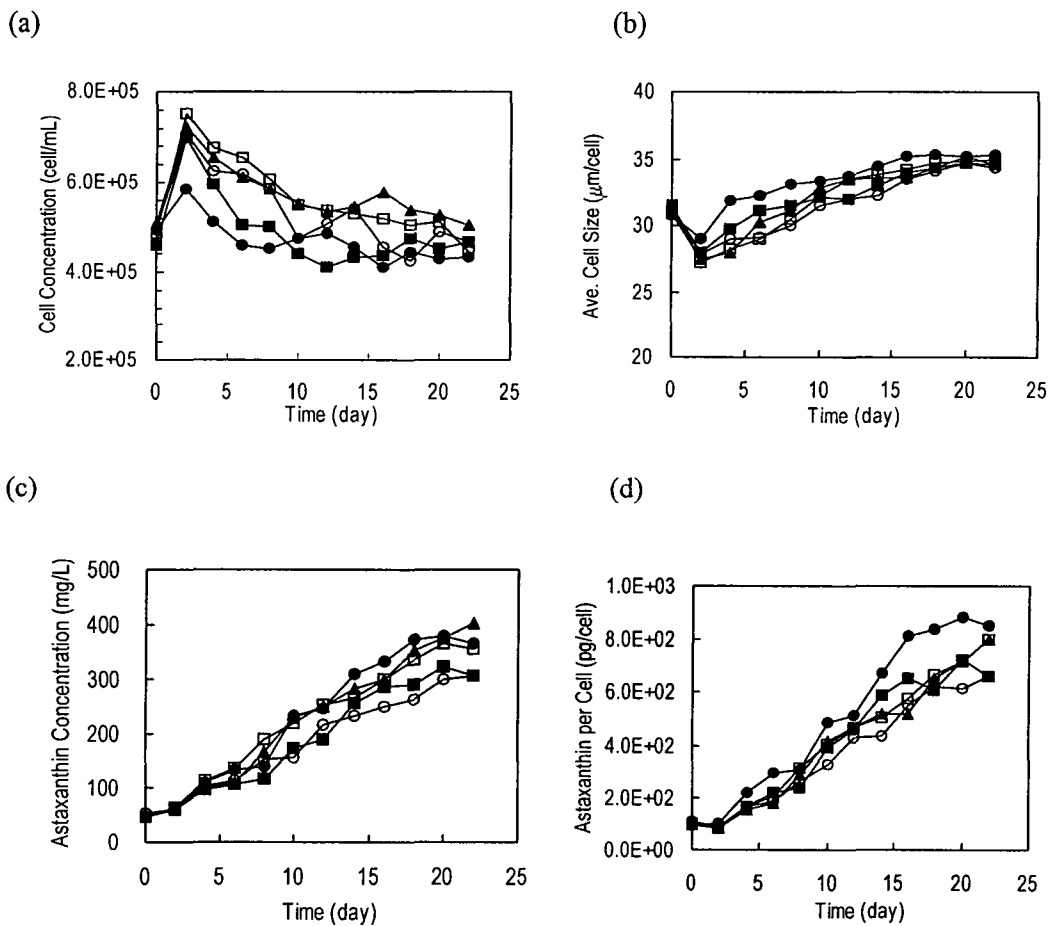


**Figure 11.** Experimental results for astaxanthin induction by changing irradiating light intensity: (a) cell concentration (cell/mL), (b) average cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ), (c) nitrate concentration (mg/L), (d) astaxanthin concentration (mg/L).

*Symbols:* 25  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (●), 55  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (■), 155  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (▲), 360  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (○), 550  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (□), 900  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (△).



**Figure 12.** Light transmittance of various cellophane filters.



**Figure 13.** Cultivation results for astaxanthin induction by high light passing through the cellophane filter: (a) cell concentration (cell/mL), (b) average cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ), (c) nitrate concentration (mg/L), (d) astaxanthin concentration (mg/L).

*Symbols:* red(●), green(■), blue(▲) and yellow(○) cellophane filters, and white-light(control, □).

한 수준을 보였으며, yellow, green의 cellophane filter보다 우수한 결과를 나타내었다. 반면 Figure 13(d)에 나타난 바와 같이 red filter로 파장을 cutting한 것이 모든 실험군 중 가장 세포당 astaxanthin 축적률이 높음을 알 수 있었다. 이러한 결과로써 red cellophane filter를 통하여 특정 파장을 선별적으로 공급하는 방법이 astaxanthin을 효과적으로 유도해 줄 수 있음을 확인하였다.

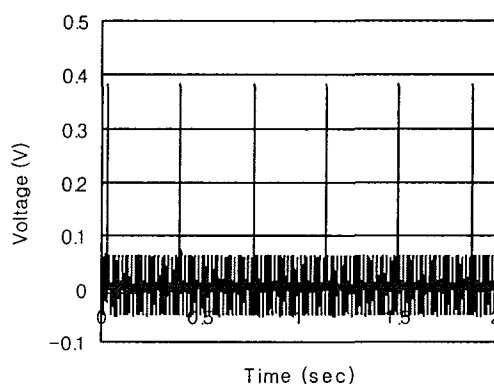
### 3.4. 다양한 광원을 이용한 astaxanthin 축적 유도

본 연구에서 사용하는 광생물반응기에서의 빛에너지 공급은 인공조명을 기본으로 이용하고 있으며, 이때 인공조명의 에너지 소모량을 극대화하는 방법으로 공정의 경제성 향상에 기여할 수 있다. 일반 형광등(fluorescence lamp)에 비해, 점멸광(flashing light)의 경우가 전력효율 및 빛의 효과적인 이용 면에서 장점이 있으므로, bubble column 광생물반응기(400 mL working vol.)를 이용하여 astaxanthin의 축적에 효과적으로 적용할 수 있는 방안을 강구하여 보았다.

이 실험은  $5.0 \times 10^5$  cell/mL의 고농도 세포를 fresh medium에 접종하여 3가지 실험군 - 연속적인 빛 공급(continuous light, CL), 연속적-점멸광 공급(continuous light + flashing light, CLFL) 과 점멸광 공급(flashing light, FL)으로 구성하여 수행하였다. 실험군 각각의 표면광도를  $155 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 로 맞추었으며 점멸광의 평균 표면광도는  $10 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 순간적으로는  $3900 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 에 달하는 고휘도를 공급하여 줄 수 있다 (Figure 14).

Figure 15에서 CL과 CLFL은 과도한 빛과 nitrate의 고갈로 세포의 성장과 astaxanthin 축적에 영향을 받았다. 그에 반하여 FL은 표면광도가  $10 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  정도밖에 되지 않기 때문에 배양 7일째까지 성장을 계속하다가, nitrate의 고갈이 이루어진 시점부터 급격히 astaxanthin을 축적하기 시작했다. Figure 15(d)에서 보듯이 astaxanthin농도는 CLFL 이 CL보다 1.2~1.4 배 더 높았는데 이것은 같은 광도 조건하에서 빛을 연속적으로 공급해주는 것보다 점멸광을 더해주는 것이 astaxanthin축적에 효과적임을 나타내는 결과이다. 하지만 점멸광 그 자체로는 순간적으로는 고휘도의 빛을 줄 수 있지만 그 조사시간이 매우 짧아서 비효과적이었다.

Table 4는 빛의 광량자당 astaxanthin의 농도를 나타낸 것으로, FL이 다른 비교군에 비해 8배 정도 높음을 알 수 있다. 이 결과는 flashing effect를 주는 것이 효율이 높다는 것을 알려주는 것이지만, 배양결과에서 보여주는 것처럼 flashing effect만 공급하여 주는 것은 astaxanthin축적에 유리하지 못하지만, 대신 부가적인 축적방법으로써는 효과적인 방법임을 알 수 있다.



**Figure 14.** Variation of voltage output induced from flashing light. The voltage was measured by osilloscope.

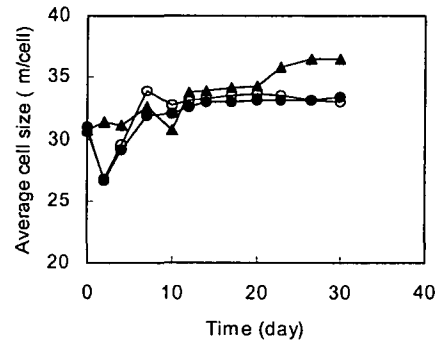
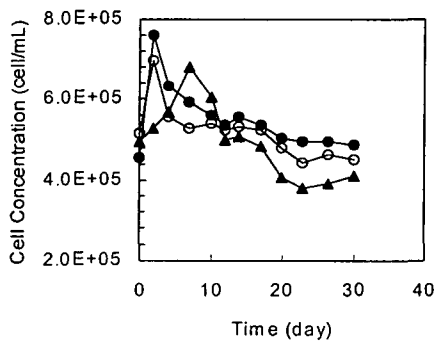
**Table 4.** Effects of continuous light and flashing light on astaxanthin concentration per photon.

	Astaxanthin concentration per photon $\left( \frac{mg / L}{\mu E / (m^2 \cdot s)} \right)$
Continuous Light (CL)	3.2
Continuous Light + Flashing Light (CLFL)	3.1
Flashing Light (FL)	24.1

(a)

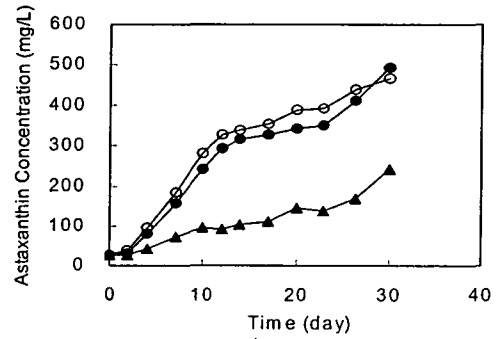
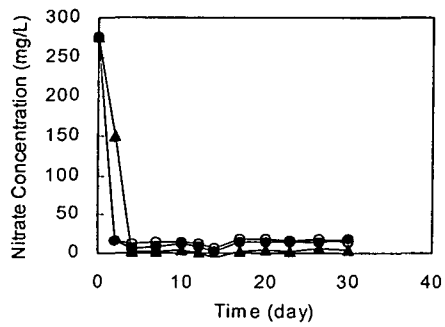
(b)





(c)

(d)



**Figure 15.** Changes of (a) cell concentration (cell/mL), (b) average cell size ( $\mu\text{m}$ /cell), (c) nitrate concentration (mg/L) and (d) astaxanthin concentration (mg/L) during the cultivation of *H. pluvialis* under flashing light and continuous light. Symbols: (-◆-) continuous light; (-○-) continuous light + flashing light; (-▲-) flashing light.

## 제 2 절 Astaxanthin 생산 생물공정의 최적화 연구

### 1. Lab scale 광생물 반응기의 최적 조건의 확립

#### 1.1. 10 L 광생물반응기에서 최적 표면광도( $I_0$ )에 대한 실험

본 연구진은 전년도 연구 결과를 통하여 0.4 L, 2 L, 10 L 크기의 bubble-column 형태의 광생물반응기를 설계 및 제작하였다. 당해연도에는 배양 부피 10 L 수준의 광생물반응기를 이용하여 *H. pluvialis*를 최적 배양하기 위하여, 균체성장 및 astaxanthin의 축적에 가장 중요한 환경인자인 빛공급 방법을 개발하기 위한 연구를 진행하였다. 첫 번째 실험으로 세가지 수준의 표면광도( $I_0 = 40, 90, \text{ and } 140 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )에 대하여 균체성장을 비교하는 실험을 수행하였다. 이때 배양조건은 MBBM 배지, 온도 25°C, pH 7±0.5, gas flow rate 0.2 L/min, CO<sub>2</sub> 5%로 설정하였으며, 이는 전년도의 0.4 L, 2 L bubble-column 광생물반응기 실험과 동일한 배양조건이었다.

Figure 16는 배양결과를 나타낸 것으로, 표면광도를 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 으로 유지한 경우의 균체성장이 다른 두 경우( $I_0 = 40, 140 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )와 비교하여 약 20%정도 향상된 결과를 얻을 수 있었다. (Figure 16(a)). 또한 균체중량(dry cell weight)면에서는 2.6 g/L의 최고 균체중량을 얻을 수 있었으며, 이는 다른 광도에 비해 약 40%의 증가를 보여주었다. 이를 통하여 40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 140  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  중에서 초기평균광도 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 로 공급하여 준 것이 균체성장에 좋다는 것을 알 수가 있었다(Figure 16(c)). Astaxanthin 농도는 균체성장시 inducitor 환경을 공급하여 주지 않았기 때문에 저농도의 수준을 유지하였고, astaxanthin의 축적량은 140  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 로 조사한 경우가 다소 높은 astaxanthin의 축적량을 보였다(Figure 16(d)).

균체농도가  $1 \times 10^5$  cell/mL 에 도달하기 전에는 표면평균광도를 40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 으로 일정하게 조사하여 준 배양의 균체성장속도가 다른 두 광도로 조사하여 배양한 것에 비해 높다는 것을 알 수가 있었고,  $1 \times 10^5$  cell/mL 이상의 균체농도에 있어서는 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 으로 조사하여 준 배양의 균체성장속도

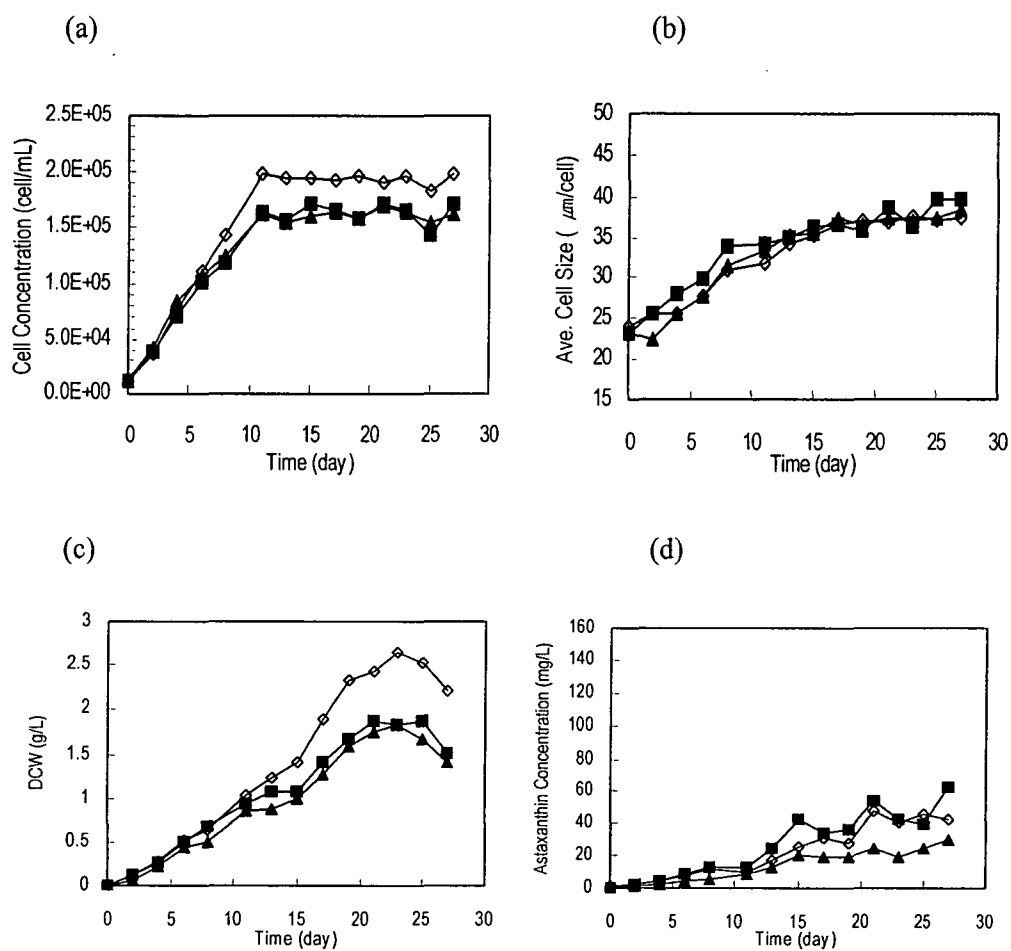
가 빠른 것을 알 수가 있었다. 이는 저농도일 때는  $40 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 으로 조사하는 것이 충분했던 빛에너지가 균체농도가 증가함에 따라 상대적으로 세포당 빛에너지가 부족해져서 균체성장속도가 떨어진 것이라 판단된다. 그리고 표면광도  $140 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  수준으로 빛에너지를 공급하는 경우에는 다른 두 광도로 조사하여 배양한 결과에 비해 균체성장속도가 낮았으며 평균세포크기가 다른 두 환경의 세포에 비해 증가한 것을 확인하였다.(Figure 16(b)) 이는 배양초기에 과도한 빛에너지의 공급으로 인한 stress로 균체성장이 저해 받음을 알 수 있으며, 이 결과로 균체는 적당량의 세포당 빛에너지를 유지시켜 주는 것이 필요하다는 것을 알 수가 있었다. 따라서 본 연구에서는 빛조건을 균체성장 또는 astaxanthin 축적에 적합하도록 유지하는 lumostat 배양방법을 도입을 하여 효과적인 배양방법을 개발하기 위하여 연구를 진행하였다.

## 1.2. 10 L 광생물반응기에서 lumostate 배양기법의 도입

모든 광합성 미생물은 성장초기에 과도한 빛공급으로 인하여 photoinhibition를 받거나, 균체가 고농도로 성장함에 따라 균체의 광합성에 필요한 빛에너지를 충분히 공급받지 못하는 light limitation을 보이게 되어 균체의 성장을 제한하게 한다. 이와 같은 현상은 대용량의 반응기에서 심각하게 나타나는 현상으로, 본 연구에서는 균체당 빛에너지 공급량을 일정한 수준으로 유지하는 lumostat 배양방법을 도입하여 대용량 광생물반응기의 효과적인 운전 방법을 개발하고자 하였다.

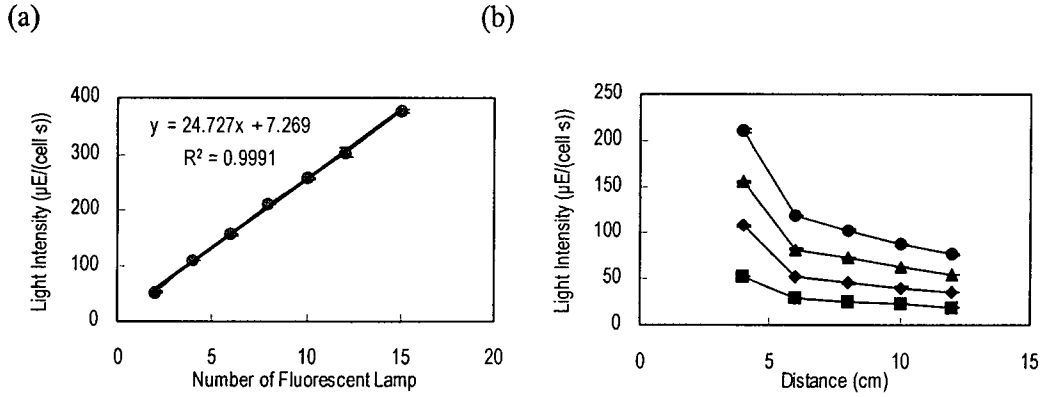
균체배양실험을 위하여 전년도에 설계, 시운전에 성공한 lab scale의 광생물반응기(10 L working vol.)를 추가 제작하였고, 외부광원의 등거리를 유지하기 위해 lamp frame를 제작하여 광원의 위치와 거리를 조절하였다. 광생물반응기로 공급되는 빛에너지 공급량은 광원의 개수와 광생물반응기로부터의 거리에 따른 표면광도의 변화를 측정하여 균체가 성장함에 따라 모자라는 빛에너지 공급량을 Figure 17에 나타난 방식으로 결정하였다.

Lumostate 배양을 위한 조절변수(control parameter)로 균체당 흡수광량(specific light uptake rate,  $q_e$ )을 선정하여, 반응기내 세포당 빛에너지 공급량을 일정하게 유지시켰다. 균체당 흡수광량은 다음과 같이 계산하였다.



**Figure 16.** Time course profiles when constant light energy is supplied : (a) cell concentration (cell/mL) (b) cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ) (c) dry cell weight (g/L) (d) astaxanthin concentration (mg/L).

*Symbols:* surface light intensity is 40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (▲), 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (◇), 140  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (■)



**Figure 17.** Change of light intensity by changing (a) the number and (b) the position of fluorescent lamps.

Symbols: two (■), four (◆), six (▲) and eight (●).

$$q_e = \frac{(E_{in} - E_{out})A}{V \cdot C}$$

위의 식은 광생물반응기의 빛에너지 공급량에서 투과량의 차이를 균체가 모두 흡수하였다고 가정하고 그 양을 세포당으로 계산한 값으로 이 때  $E$ 은 평균 광도( $\mu E/(m^2 \cdot s)$ ),  $A$ 는 표면적( $m^2$ ),  $V$ 는 배양부피(L),  $C$ 는 균체농도( $cell/mL$ )를 뜻한다.

이때 배지는 균체성장을 위해 최적화된 MBBM 배지를 사용하였고, 다른 환경조건은 온도  $25^\circ C$ , pH  $7 \pm 0.5$ , gas flow rate 0.2 L/min,  $CO_2$  5%를 유지하였다.

Figure 18은 배양결과를 나타낸 것으로, lumostat 운전을 위하여 균체당 흡수광량을( $q_e$ )을  $3 \times 10^{-8} \mu E/(cell \cdot s)$ 와  $6 \times 10^{-8} \mu E/(cell \cdot s)$  수준으로 정하고, 그 조절폭을  $\Delta q_e = 2 \times 10^{-8} \mu E/(cell \cdot s)$ 로 설정하였다. 빛의 조절은 배양초기의 광도를  $40 \mu E/(m^2 \cdot s)$ ,  $90 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 에서 시작을 하였고 균체농도가 증가함에 따라 균체당 흡수광량을  $3 \times 10^{-8} \mu E/(cell \cdot s)$ 와  $6 \times 10^{-8} \mu E/(cell \cdot s)$  수준으로 도달하였을 때부터 일정하게 유지시켜주어 조업하였다(Figure 18(d)). 이때 Figure 16의 예비실험결과를 통하여 초기표면광도  $90 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 로 공급하여 준 것이 가장 좋은 성장을 보였기 때문에, 이를 대조군으로 설정하여 lumostat 배양결

과와 비교하였다.

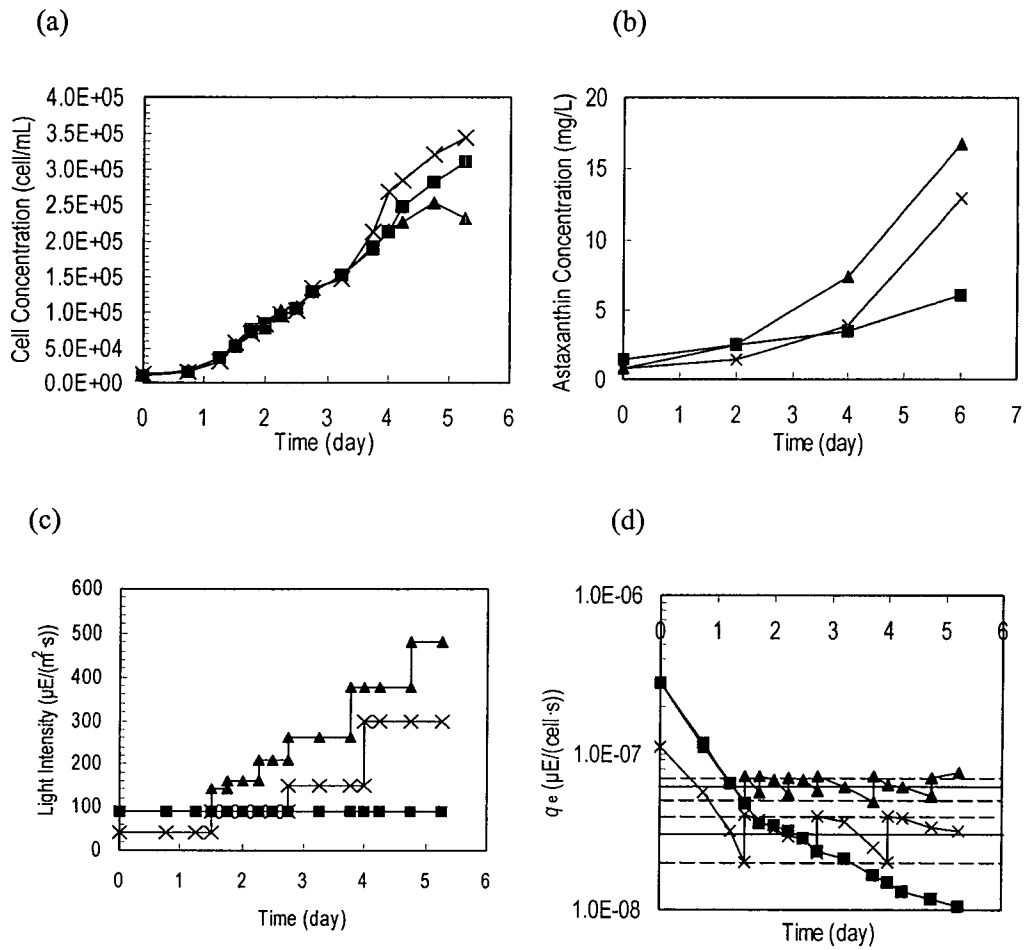
배양결과를 분석해 보면 균체당 빛에너지 공급량을  $3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 의 수준으로 lumostat 배양하는 방법이 균체성장속도, 최종 균체농도, 및 astaxanthin 축적량 면에서 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 또한  $6 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  수준으로 빛조건을 유지한 경우에는 대조군에 비하여 낮은 최종 균체농도를 보였지만, 단시간에 astaxanthin을 고농도로 축적시킬 수 있는 장점이 있었다. 이와 같은 배양결과를 통하여 균체당 흡수광량을  $3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 의 수준으로 lumostat 배양하는 방법이 균체성장속도, 최종 균체농도, 및 astaxanthin 축적량 면에서 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 또한  $6 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  수준으로 빛조건을 유지한 경우에는 대조군에 비하여 낮은 최종 균체농도를 보였지만, 단시간에 astaxanthin을 고농도로 축적시킬 수 있는 장점이 있었다.

이와 같은 배양결과를 통하여 일반적인 배양방법에 비하여 본 연구에서 개발된 lumostat 배양방법이 광합성 미생물의 배양에 효과적임을 확인할 수가 있었다. 그러나  $6 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  수준의 배양은 조절변수의 최적화가 이루어지지 않은 관계로 late linear growth phase에 과도한 광량의 공급으로 인해 세포의 성장에 저해를 초래하였다. 따라서 차기년도에는 lumostat 운전을 체계적으로 접근할 수 있도록 30 L 수준의 고성능 광생물반응기를 제작하여, 이를 이용한 조절변수의 최적화를 최적화를 통하여 고효율의 배양방법을 개발하는데 주력할 예정이다.

Figure 19는 lumostat 운전을 이용한 2차 실험으로 균체당 흡수광량을  $1.5 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ ,  $3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 와  $4.5 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  수준으로 정하고, 그 조절폭을  $\Delta q_e = 1 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 로 설정하였다. 빛의 조절은 배양초기의 광도를  $40 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,  $90 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 에서 시작을 하였던 지난 실험과 달리 배양 초기부터 세가지 수준의 균체당 흡수광량을 일정하게 유지시켜주었다. 대조군으로는 초기표면광도( $I_0$ )  $90 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 로 공급하여 준 것으로 설정하여 이를 lumostat 운전결과와 비교하였다.

Figure 19에 나타난 배양결과에서 알 수 있듯이  $3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ ,  $4.5 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  수준으로 유지하며 광생물반응기를 운전한 것이 대조실험에 비해 우수한 배양결과를 얻을 수 있었다. 즉 대조실험 경우 14일 동안의

배양결과 최대균체농도는  $2.4 \times 10^5$  cell/mL, astaxanthin의 농도는 24 mg/L이었다. 또한  $1.5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 의 수준으로 일정하게 유지시켜서 배양한 결과는 최대균체농도는  $1.1 \times 10^5$  cell/mL, astaxanthin의 농도는 8 mg/L 이었다. 이것은 대조실험에 비해서 낮은 성장 결과로, 세포가 성장하기에 필요한 빛에너지를 충분하게 공급하지 못한 것이라 판단된다. 반면에  $3 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 의 수준으로 일정하게 유지시켜서 배양한 결과는 최대균체농도는  $3.9 \times 10^5$  cell/mL, astaxanthin의 농도는 37 mg/L이었으며, 이는 대조군에 비해 약 1.5배 증가된 것이다. 그리고  $4.5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ 의 수준으로 일정하게 유지시켜서 배양한 결과는 최대균체농도는  $5.2 \times 10^5$  cell/mL, astaxanthin의 농도는 55 mg/L이었으며, 대조군에 비해 2배정도의 생산성 증가효과를 보여주었다. 이와 같은 실험 결과를 통하여 *H. pluvialis*의 고농도 배양을 위해서는 균체당 흡수광량을 조절 변수로 활용한 lumostat 운전방법이 효과적임을 알 수가 있었다.



**Figure 18.** Time course profiles of lumostatic operation: (a) cell concentration (cell/mL), (b) astaxanthin concentration (mg/L), (c) variation of light intensity ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) and (d) variation of light intensity per cell ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ).

*Symbols:*  $I_0 = 90 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (control, ■),  $q_e = 6 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  (▲),  $q_e = 3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  (×)



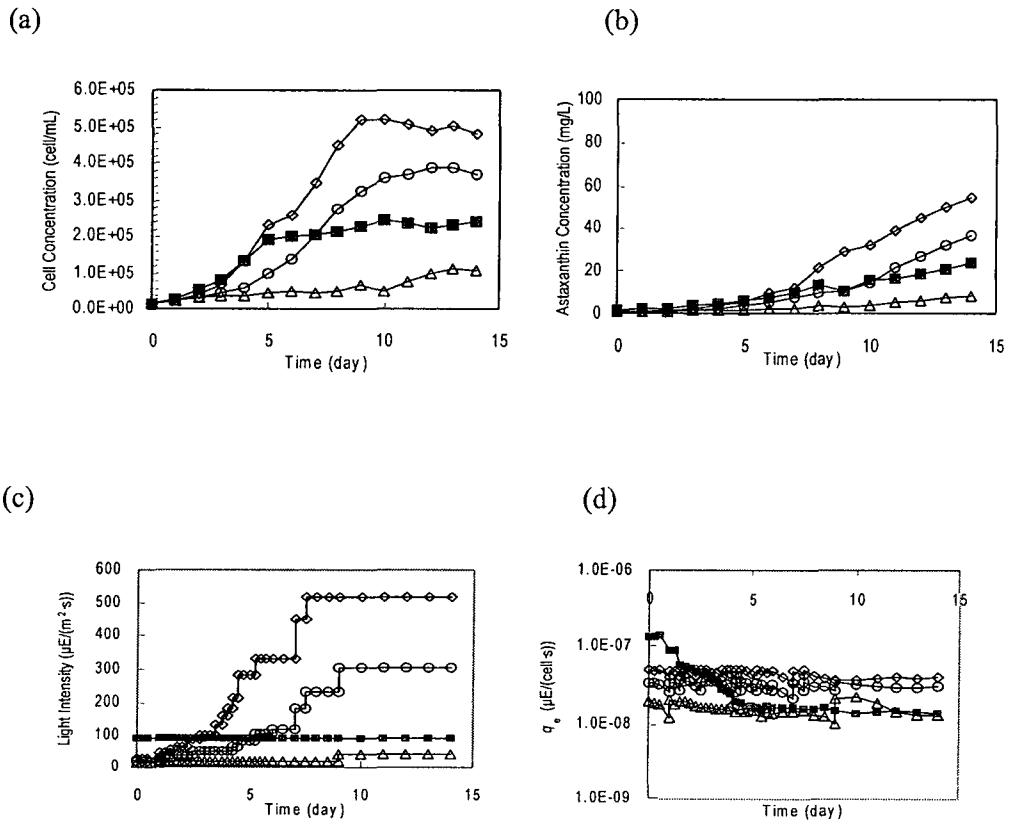
## 2. 2 단계 배양을 위한 연구 및 최적화 기법 개발

### 2.1. 2 단계 배양을 위한 induction point에 대한 실험

Astaxanthin의 상용생산에 있어서 *H. pluvialis* 균주의 성장조건과 astaxanthin을 축적조건이 현저하게 다르기 때문에, 각 조건을 최적화하기 위하여 2 stage 배양이 필수적이다. 즉 생물공정을 두 단계로 구분하여 첫번째 공정에서는 균주의 고농도 속성배양을 목적으로 배양조건 및 운전조건을 최적화하고, 이어서 두번째 공정에서는 이차대사물질인 astaxanthin의 고농도 축적을 유도하기 위하여 균주가 대사물질을 농축시킬 수 있는 배양조건으로 조절하게 된다. 이와 같은 2단계 생물공정을 효과적으로 조업하기 위해서는 첫번째 공정에서 두번째 공정으로 교환하는 시기를 결정할 필요가 있다.

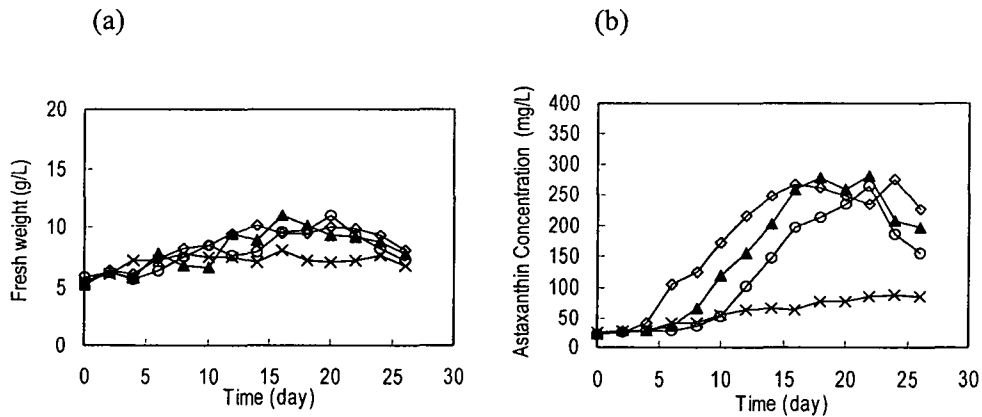
현재까지의 실험결과를 통하여 *H. pluvialis* 균주의 배양시 linear growth phase에서 stationary phase에 들어가면서 세포의 분열을 멈추고 세포의 크기가 증가하면서 astaxanthin의 축적이 시작되는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 균체수 면에서 성장이 멈춘 stationary phase에서 시간대별로 차이를 주어 astaxanthin의 농축 정도를 조사함으로써, 단기간에 astaxanthin을 축적시킬 수 있는 induction point를 결정하기 위한 실험을 진행하였다. 실험 배양 부피 0.4 L bubble-column 광생물반응기에서 수행하였고, stationary phase의 초반기의 세포를 harvest하여 fresh medium으로 교체한 후 접종하였다. 그리고 접종 후 2일, 6일, 10일이 되는 시점에서 고광도의 빛( $160 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )을 조사하는 방법으로 astaxanthin의 축적을 유도하였다. 이때 다른 환경조건은 MBBM 배지, 온도  $25^\circ\text{C}$ , pH  $7 \pm 0.5$ , gas flow rate 0.2 L/min,  $\text{CO}_2$  5%를 유지하였다.

Figure 20은 그 결과를 나타낸 것으로, fresh weight의 경우 induction의 영향으로 대조군에 비해 약간 증가하였으며(Figure 20(a)), induction 된 배지의 경우와 비슷한 결과를 보여주었다. Astaxanthin의 농도는 정지기에 들어간 후에 시간의 차이를 두어 induction을 시켰음에도 불구하고 최고 astaxanthin 농도와 astaxanthin 축적속도의 면에서 차이를 보이지 않았다(Figure 20(b)). 이를 통하여 추후 진행되는 2 stage 배양공정의 개발에 있어 균체수 면에서의 정지기에 들어간 직후를 induction point로 사용하는 것이 효과적이며, 전체 공정의 배양시간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대된다.



**Figure 19.** Variation of cell growth patterns with lumostatic operation: (a) cell concentration (cell/mL) (b) astaxanthin concentration (mg/L) (c) variation of light intensity ( $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) (d) variation of light intensity per cell ( $\mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$ ).

*Symbols:*  $I_0 = 90 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (control, ■)control (■),  $4.5 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  (◇),  $3 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  (○),  $1.5 \times 10^{-8} \mu\text{E}/(\text{cell} \cdot \text{s})$  (△).



**Figure 20.** Effect of different induction point in stationary phase: (a) fresh weight (g/L) (b) astaxanthin concentration (mg/L).

Symbols: control (x), 2 day (◇), 6 day (▲), 10 day (○).

## 2.2. 균체성장과 astaxanthin 축적이 동시에 가능한 신규공정의 개발

본 과제가 기존의 상용화된 생물공정상의 여러 특허권에 구애받지 않기 위해서는, 신규 astaxanthin 생산공정의 구현이 필수적이다. 종래의 기술은 *H. phuvialis* 균주가 비성장관련산물(nongrowth-associated product)로서 astaxanthin을 생산하기 때문에 균체성장용 배양조와 생산물 유도용 배양조로 구분된 2단계 배양기술을 사용하고 있다. 이는 선정 균체의 성장에 최적인 환경조건과 생산물 유도에 효과적인 환경조건이 서로 다르기 때문에, 1단계 배양조에서는 최적 균체성장조건(optimal growth condition)을 유지하고, 2단계 생산물 유도조에서는 astaxanthin의 축적에 효과적인 환경조건(stress condition)으로 조절하는 배양방법을 취하게 된다. 그러나 기존의 2단계 배양기술은 두개의 배양조를 각각 설치해야 하므로 지대(land cost)나 설치비 및 운전비가 증가하며, 높은 전력 소비량을 요구한다. 또한 전 공정이 장시간 운전되고 복잡한 조업을 요구하게 되어 고도로 숙련된 기술자의 노동력을 요구하게 된다.

따라서 본 연구에서는 균체성장과 astaxanthin의 축적을 동시에 구현할 수 있는 새로운 형태의 광생물반응기의 개발하였으며 자세한 내용은 특허출원 관계로 생략하고 차후년의 보고서에 포함시킬 계획이다.

### 3. Pilot scale의 생물공정 개발을 위한 설계 운전기법 개발

#### 3.1. Open system에서의 배양시 오염에 대한 영향 조사

상업적인 대용량의 배양을 위해서 고온고압 공정(autoclaving)을 통한 멸균과정을 대체할 수 있는 기술을 개발하는 것이 공정의 경제성 향상에 필수적이다. 전년도에 진행되었던 수돗물을 이용한 *H. pluvialis* 배양결과를 활용하여, 본 연구에서는 open system의 영향, 일반적인 고온고압 멸균 공정의 제거가 생물공정에 미치는 영향, 및 대규모 공정에서 고온고압 멸균공정을 대체할 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

실험방법으로는 배양부피 0.4 L bubble-column 광생물반응기를 이용하였고, 배양 조건으로 배지조성시에 증류수를 이용하여 만든 MBBM배지와 수돗물을 이용하여 만든 MBBM배지를 만들어 세포를 배양하였으며 광생물반응기의 장치와 배지의 멸균 여부에 따라 세포의 성장을 비교하였다. 전체공정을 멸균 상태로 유지하면서 배양한 것을 대조군으로 사용하였고, 나머지는 open system으로 배양되었다. 이 때 다른 환경조건은 온도 25℃, pH 7±0.5, gas flow rate 0.2 L/min, CO<sub>2</sub> 5%로 유지하였다.

Figure 23(a)의 결과에 나타난 바와 같이 대조군은  $3.81 \times 10^5$  cell/mL에서 정지기 상태에 들어갔고 open system으로 배양된 실험의 균체 성장에서는  $2.16 \times 10^5$  cell/mL에서 정지기 상태에 들어갔다. 이는 대조군의 최종균체농도의 약 57%의 수준에 해당하는 값이다. 세포 크기를 비교하면 대조군에 비해 open system에서 배양된 세포가 대체적으로 큰 것으로 측정되었으며, 이는 배양환경의 열악함으로 인해 세포의 크기가 대조군에 비해 더 빠르게 증가된 것으로 판단된다(Figure 23(b)). 세포당 astaxanthin concentration 양의 관점에서는 대조군에 비해 최소 50%이상 증가된 것을 알 수 있으며, 이 결과는 배양환경의 열악함을 뒷받침해 준다(Figure 23(c)). 또한 세포당 chlorophyll concentration의 관점에서 보면 세포의 크기에 따라 chlorophyll의 양이 비례하는 것을 알 수가 있다(Figure 23(d)). 본 연구는 open system에서의 배양 가능성을 검토한 실험이었고, 차기 년도에는 에탄올(70% EtOH), lysol, 및 hypochloride 등의 화합물을 이용한 세척을 통하여, 대용량의 배양에서 다른 오염균을 멸균(sterilization) 또

는 살균(disinfection) 할 수 있는 기술개발에 주력할 예정이다.

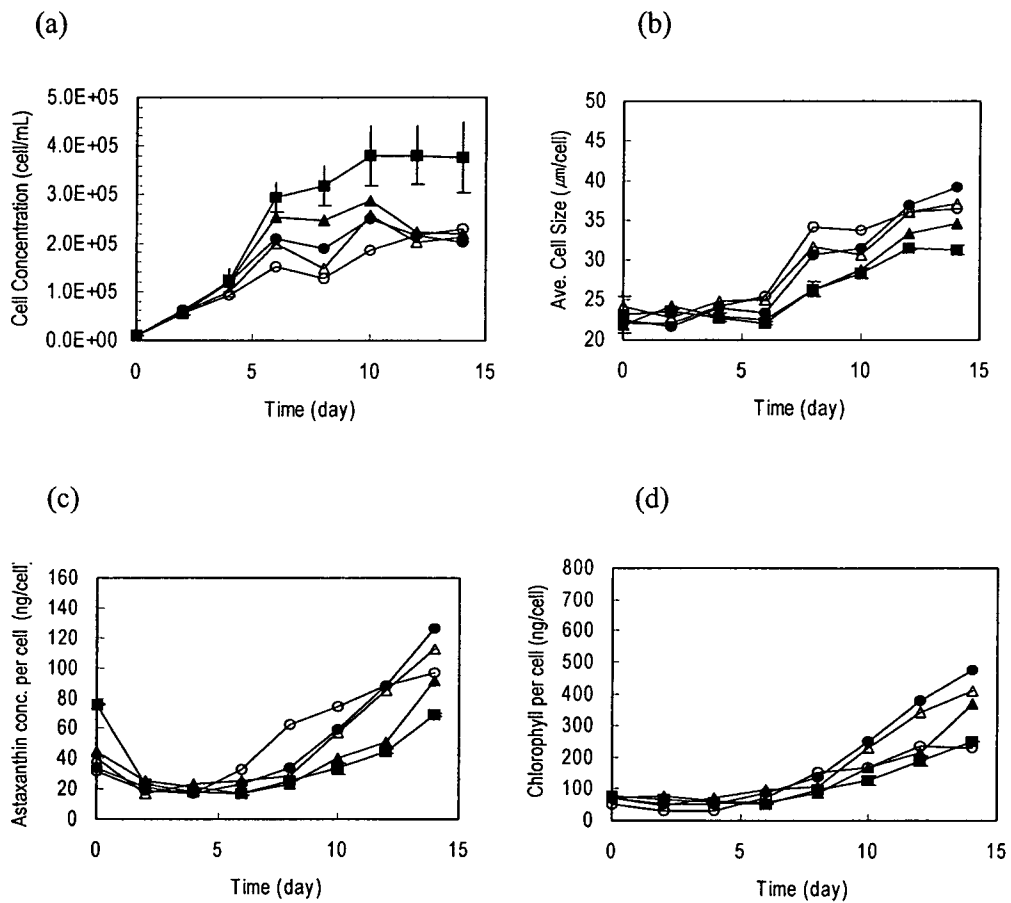
### 3.2. Open system에서 항생제의 효과 및 세포의 성장시 오염의 영향 조사

Open system에서 *H. pluvialis* 배양결과 오염원의 성장으로 세포의 성장이 억제(inhibition)되는 현상을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 open system 시 고온고압 멸균의 대체 방법의 하나로 항생제(antibiotics)의 첨가로 인한 세포 성장의 영향 및 박테리아와 같은 오염원의 효율적인 제거를 위한 기술을 개발하고자 한다.

실험방법으로는 배양부피 0.4 L bubble-column 광생물반응기를 이용하였고, 배양 조건으로는 배지조성시 증류수를 이용하여 만든 MBBM배지와 Cephalosporin, Griseofulvin, Amphotericin B, Ampicillin의 4가지 항생제를 각각 첨가한 MBBM배지를 만들어 균체를 배양하였고, 광생물반응기 및 배지의 멸균과정은 생략하였다. 이때 대조군(A,B)으로는 고온고압 멸균과정을 거쳐 배양된 것과 멸균과정을 거치지 않고 배양된 2종류를 사용하였고 나머지는 open system 으로 배양되었다. 이때 다른 환경조건은 온도 25°C, pH 7±0.5, gas flow rate 0.2 L/min, CO<sub>2</sub> 5%로 유지하였다.

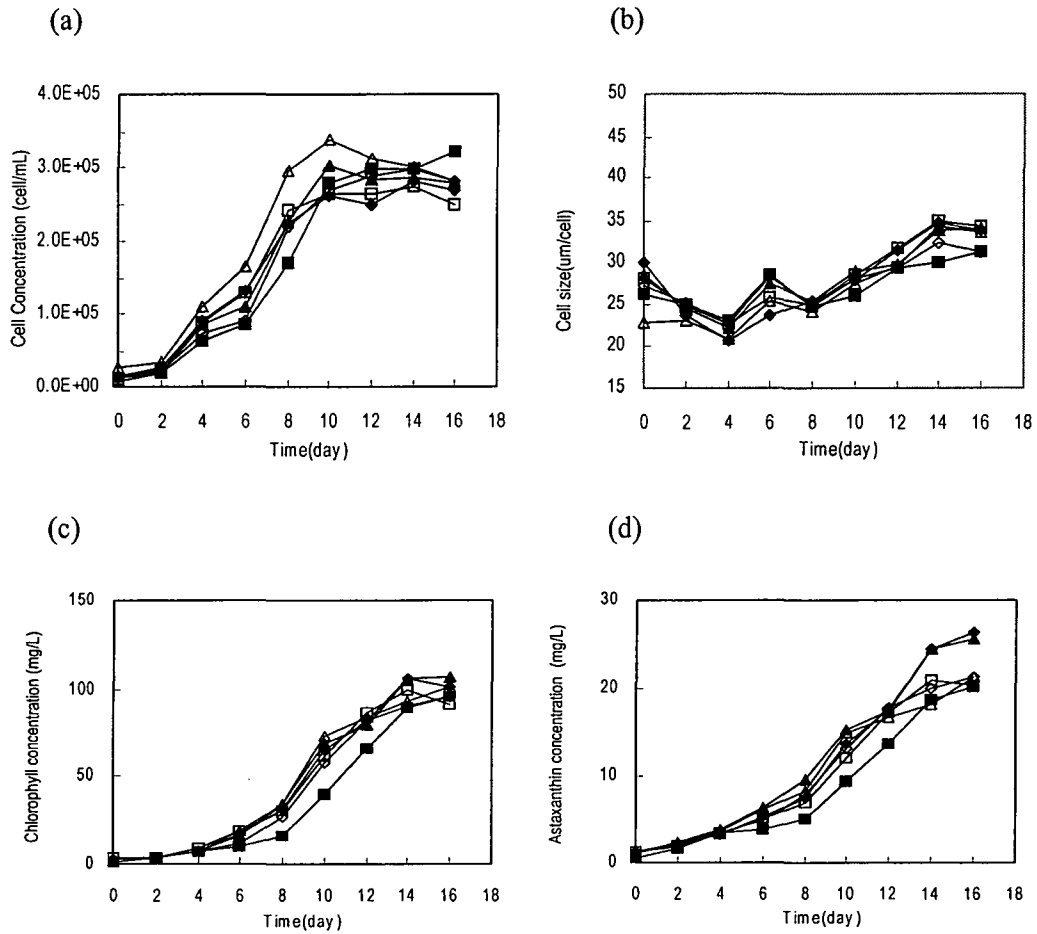
실험결과로는 대조군 A는  $3.23 \times 10^5$  cell/mL 에서 대조군 B는  $2.49 \times 10^5$  cell/mL 정지기 상태에 들어갔고, 각각의 항생제를 첨가한 open system으로 배양된 실험의 균체 성장에서는 (1)Control B + Cephalosporin의 경우 :  $2.79 \times 10^5$  cell/mL, (2)Control B + Griseofulvin의 경우 :  $2.80 \times 10^5$  cell/mL, (3)Control B + Amphotericin B의 경우 :  $2.67 \times 10^5$  cell/mL, (4)Control B + Ampicillin의 경우 :  $2.80 \times 10^5$  cell/mL등 4개 모두  $2.80 \times 10^5$  cell/mL 에서 정지기 상태에 들어가는 결과를 보였다. 항생제를 넣어 배양한 경우는 고온고압의 멸균과정을 거쳐 배양한 대조군 A 에 비하여 상대적으로 86.72%의 성장을 보였으며, 멸균하지 않고 open system과정을 거쳐 배양한 대조군 B와 비교하여 112.23%의 성장을 보였다. 또한 Griseofulvin을 첨가 시킨 경우 가장 높은 세포 성장을 보였지만 Griseofulvin은 상온 상태에서 잘 녹지 않는 성질 때문에, 같은 수의 세포를 접종한 경우 녹지 않은 항생제로 인하여 약 2배의 cell number를 보였지만 평균 cell size가 줄어들게 되어 비슷한 fresh weight을 나타내었다.

따라서 고온고압 멸균방법을 거치지 않고 항생제를 첨가하여 open system의 방법으로 배양하는 방법은 세포 성장면에서는 항생제를 넣은 경우와 넣지 않은 경우 모두에 비해 별 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 Figure 24에 나타낸 바와 같이 오염의 차이를 확인한 결과 항생제로 인해 박테리아와 같은 오염균들이 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.



**Figure 23.** Time course profiles of open cultivation system: (a) cell concentration (cell/mL), (b) cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ), (c) astaxanthin per cell (ng/cell), (d) chlorophyll per cell (ng/cell).

*Symbols:* control (■), open system cultivation using autoclaved distilled water (▲), open system cultivation using non-autoclaved distilled water (△), open system cultivation using autoclaved service water (◆), and open system cultivation using non-autoclaved service water (◇).



**Figure 24.** Time course profiles of open cultivation system : (a) cell concentration (cell/mL), (b) cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ ), (c) chlorophyll concentration (mg/L), (d) astaxanthin concentration (mg/L).

*Symbols:* control A - closed system after sterilization (■), control B - open system without sterilization (□), open system in addition of Cephalosporin without sterilization (▲), open system in addition of Griseofulvin without sterilization (△), open system in addition of Amphotericin B without sterilization (◆), open system in addition of Ampicillin without sterilization (◇)

#### 4. 광생물반응기의 설계기술 개발

고효율의 대용량 광생물반응기를 설계·제작할 경우 대두되는 중요한 engineering problem 중의 하나가 광생물반응기 내부로 빛에너지를 어떻게 공급할 것이냐 하는 점이다. 즉 광생물반응기에 설치되는 광원의 개수가 광생물반응기의 제작비용과 운전비용에 미치는 영향이 상당하므로, 몇 개의 광원을 어느 위치에 설치할 것인가에 관한 공학적인 설계기법의 개발이 필수적이다. 따라서 당해연도의 연구에서는 광생물반응기의 빛조건을 정량화할 수 있는 빛분포모델(light distribution model)을 유도하고, 이를 이용하여 광원의 위치와 개수에 따른 빛전달 효율에 관하여 고찰하였다. 이를 통하여 본과제의 2단계 연구의 핵심 과제인 pilot 규모의 광생물반응기의 제작에 필수적인 설계기법을 개발하고자 하였다.

본 연구에서 제안된 빛분포모델은 광원의 위치를 평행이동(parallel translation)의 개념을 도입하여 수식화하였다. 즉 광생물반응기에  $p$ 개의 내부조명이  $(r_{T,ilp}, \theta_{T,ilp})$  위치에 설치되고,  $q$ 개의 외부조명이  $(r_{T,jlq}, \theta_{T,jlq})$  위치에 설치된 경우, 임의의 지점( $r, \theta$ )에서의 광도( $I_n$ )는 균체농도( $X$ )의 배양액에서 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$I_n(X, r, \theta) = \sum_{i=1}^p \frac{r_0 \cdot I_0}{R_{i/p}} \cdot \exp\left[-\frac{\varepsilon_m \cdot X \cdot (R_{i/p} - r_0)}{(K_x + X)(K_r + r)}\right] + \sum_{j=1}^q \frac{r_0 \cdot I_0}{R_{j/q}} \cdot \exp\left[-\frac{\varepsilon'_m \cdot X \cdot (R_{j/q} - r_0)}{(K'_x + X)(K'_r + r)}\right]$$

$$R_{i/p} = \sqrt{r^2 + r_{i/p}^2 - 2r \cdot r_{i/p} \cos(\theta - \theta_{i/p})}$$

$$R_{j/q} = \sqrt{r^2 + r_{j/q}^2 - 2r \cdot r_{j/q} \cos(\theta - \theta_{j/q})}$$

$$n = p + q$$

이때  $R_{i/p}$ 와  $R_{j/q}$ 는 평행이동한 광원 중심으로부터 임의의 지점간의 거리를 의미하며,  $p, q, n$ 은 각각 내부광원, 외부광원, 전체광원의 개수를 나타낸다. 그리고  $\varepsilon_m, \varepsilon'_m, K_x, K'_x, K_r, K'_r$ 은 light attenuation을 설명하는 model parameter를 나타낸다.

배양액 내의 균체는 혼합(mixing)을 통하여 항상 움직이고 있기 때문에, 균체가 광합성에 사용되는 빛에너지는 광생물반응기 내부의 빛분포를 평



균한 평균광도(average light intensity,  $I_{n,av}$ )를 계산하여 빛조건을 정량화할 필요가 있다. 즉  $n$ 개의 광원이 설치된 광생물반응기의 평균광도는 균체농도  $X$ 인 배양액에 대하여 다음과 같이 수식적으로 표현할 수 있다.

$$I_{n,av}(X) = \frac{1}{A_p} \int_0^{2\pi} \int_0^{R_0} r \cdot I_n(X, r, \theta) dr d\theta$$

$$A_p = \pi(R_0^2 - p \cdot r_0^2)$$

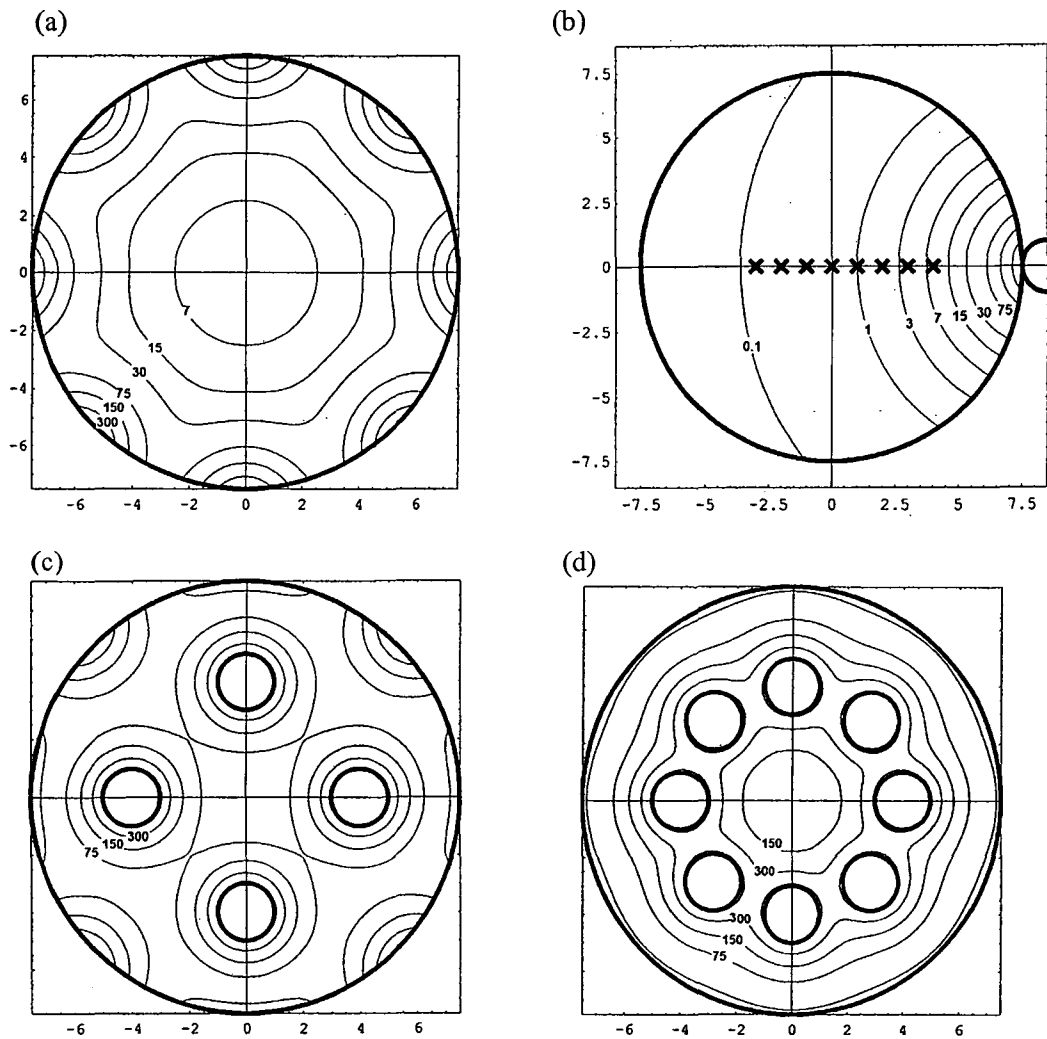
이때  $A_p$ 는 광생물반응기의 단면적을 의미하며, 내부광원에 해당하는 영역은 단면적 계산에서 제외하였다. 빛분포와 평균광도의 수치계산은 *Mathematica*<sup>®</sup> (Version 4.2, Wolfram Research, Inc.)를 이용하여 model simulation하였다.

Figure 25(a)는 균체농도 0.5 g/L의 배양액이 담겨있는 광생물반응기의 외부표면에 한개의 외부광원을 설치한 경우의 광도의 변화를 등고선 그림(contour plot)을 이용하여 도시한 것으로, 이때 광원의 표면광도는  $621 \pm 20 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 이었다. 모델의 정확성을 확인하기 위하여 실측치와 계산치를 비교한 결과 10% 정도의 오차범위 안에서 광생물반응기 내부 광도의 예측이 가능함을 확인하였다.

개발된 빛분포모델을 이용하여 8개의 광원이 설치된 위치에 따른 빛전달효율의 차이를 bubble column 광생물반응기에 대하여 비교 분석하였다. 즉 8개의 광원을 모두 외부 표면에 설치한 경우(8 external radiators)와 4개는 외부에 4개는 내부에 설치한 경우(4 external/4 internal radiators), 그리고 8개의 광원이 반응기 내부에 설치한 경우(8 internal radiators)에 대한 빛분포의 차이를 상대적으로 비교한 것이 각각 Figure 25(b), 25(c), 25(d)이다. 이때 균체농도 0.5 g/L에 대하여 광도  $75 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 에 해당하는 등고선의 변화를 살펴보면, 8개의 내부조명이 설치된 내부조사형 광생물반응기의 경우가 균등하게 광생물반응기에 분포가 되어 보다 효과적으로 빛전달이 이루어지고 있음을 알 수 있다. 또한 각각의 평균광도를 계산한 결과 8개의 내부광원이 설치된 경우의 평균광도가  $183.4 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 로 8개의 외부광원이 설치된 경우( $56.1 \mu E/(m^2 \cdot s)$ )의 3배이상 빛전달효율이 우수함을 확인할 수 있었다.

위의 설계기법을 방법을 통하여 현재 유도된 빛분포모델은 pilot 수준의 광생물반응기 설계시 빛전달 효율면에서 유리한 광원의 위치와 개수의 결

정하기 위한 engineering tool로서 효과적인 활용이 가능할 것으로 기대된다. 또한 차기년도에는 Clark-type O<sub>2</sub> electrode를 이용한 liquid-phase photosynthesis system을 이용하여, 광도의 변화에 따른 산소발생량(O<sub>2</sub> evolution rate)을 정밀하게 측정하여 선정 균체의 빛반응 특성(light response curve)을 규명하고, 이를 빛분포모델과 결합하여 보다 체계적인 광생물반응기 설계기법을 제시할 예정이다.



**Figure 25.** Light distribution profiles with different number and location of light radiators: (a) single external radiator, (b) eight external radiators, (c) eight internal radiators, and (d) four internal/four-external radiators. Contours (0.1, 1, 3, 7, 15, 30, 75, 150, 300, 600  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ) are obtained by model simulation at 0.5 g/L cell concentration.

## 제 3 절 Astaxanthin의 상품화기술 개발

### 1. 배양된 균체의 세포벽 파쇄 방법의 개발

#### 1.1. 세포벽 파쇄 방법의 결정

Lab scale 광생물반응기에서 지속적으로 공급되는 배양액에 고농도로 존재하는 *Haematococcus* 균체를 다양한 분쇄방법을 이용하여 세포벽을 파쇄하고, 세포내 물질을 추출하고자 연구를 수행하였다. 연구를 수행한 분쇄기로는 water bath sonicator, ultrasonicator, homogenizer, 믹서기, 고압력 세포파쇄기, attrition mill과 bead를 사용하였다.

#### 1.2. 건조된 *Haematococcus* 균체의 세포벽 파쇄

건조된 *Haematococcus* 균체의 세포벽을 파쇄하는 연구는 아래와 같은 6가지 방법으로 수행하였다. 막자사발로 분쇄한 것은 대조구로 사용하였으며, Process I 은 Mixer로 10분간 건식분쇄 하였고, Process II는 시료 5 g과 물 10 mL를 넣고 water bath sonicator로 4시간 분쇄하였다. 시료 5 g을 막자 사발로 분쇄 후 물 15 mL를 넣고 2시간 동안 초음파 분해 한 것을 Process III라고 한다. 또한, Process IV는 시료 5 g에 물 10 mL를 넣고, deep freezer에 넣어 급속 냉각한 다음, 80℃ water bath에 넣는 과정을 2회 반복하였으며, Process V은 시료 5 g을 막자 사발로 분쇄 후 물 15 mL를 넣고 homogenizer로 30분간 분쇄하였다. Process VI은 시료 5 g을 에탄올 15 mL를 넣고 homogenizer로 30분간 분쇄하였다. 세포벽 파쇄 유무는 위상차 현미경과 image analyer의 관찰을 통한 분석으로 판단하였다.

#### 1.3. 건조한 균체의 위상차 현미경 관찰

다양한 초미세 분쇄기로 세포벽을 파쇄 한 결과, homogenizer로 물을 넣고 30분 분쇄한 경우 (Process V)는 세포벽이 5~10%정도 파쇄된 것을 알

수 있었고, 에탄올을 넣고 30분 분쇄한 경우는 50~60%정도 세포벽이 파쇄되었다(Process VI). 급속냉각과 가온을 반복한 경우(Process IV)는 15~20% 파쇄된 것을 알 수 있었으며, 다른 process는 전혀 세포벽이 파쇄되지 않았음을 알 수 있었다(Process I ~ III). 따라서, 건조된 세포벽을 파쇄하는 가장 좋은 방법은 균체에 에탄올을 넣고 homogenizer로 분쇄하는 것임을 알 수 있었다(Figure 26).

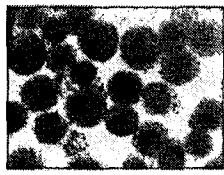
#### 1.4. Slurry 균체의 세포벽 파쇄

Slurry 상태의 균체는 아래와 같은 4가지 방법에 의해 세포벽을 파쇄하였다. 우선, 건조한 균체의 세포벽 파쇄 방법 중 세포벽이 많이 파쇄된 Process IV와 Process VI를 적용시켰다. 이때 slurry 상태 균체를 Process IV 방법에 적용한 경우를 Process VII이라 하고, Process VI에 적용시킨 것을 Process VIII이라 하며, slurry 균체를 동결건조한 후 Process IV에 적용한 경우를 Process IX라 한다.

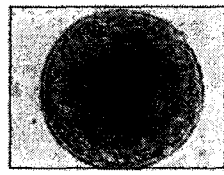
또한, 상업적으로 이용하기 위해서는 다량의 균체를 효과적으로 파쇄하는 것이 필요하므로 scale-up을 고려하여 고압력 세포파쇄기와 attrition mill로 세포벽을 파쇄하였다. 고압력세포파쇄기로 분쇄 한 경우를 Process X라 하고, attrition mill로 균체 50 g과 ball을 넣고 700~1000 rpm에서 1시간 동안 파쇄한 경우는 Process XI이라 한다.

#### 1.5. Slurry 균체의 위상차 현미경 관찰

세포벽 파쇄 유무는 위상차 현미경과 image analyzer의 관찰을 통한 분석으로 판단하였다. 건조한 균체의 세포벽을 파쇄할 때 효과적이었던 방법을 적용시킨 Process VII, VIII은 전혀 세포벽이 파쇄되지 않았다. 그래서, slurry 상태의 균체를 동결건조하여 건조된 균체로 만든 다음 Process IV를 적용시켰으나, 여전히 세포벽은 파쇄되지 않았다(Process IX). 또한, 고압력 세포파쇄기로 분쇄하면 90% 이상이 분쇄되었고, attrition mill로 분쇄한 경우(Process XI)는 50~60%가 분쇄되었음을 알 수 있었다(Figure 27).

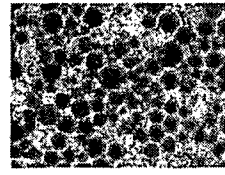


배율: 20×120

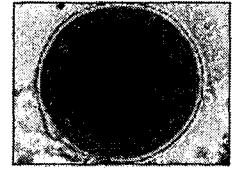


배율: 100 ×120

< 대조군 >

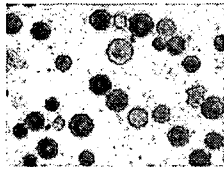


배율: 10×120

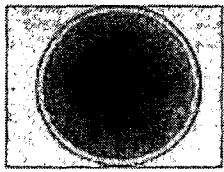


배율: 100 ×120

< Process I >

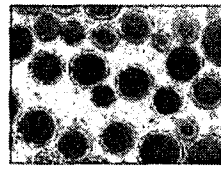


배율: 10 ×120

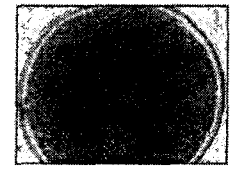


배율: 100 ×120

< Process II >

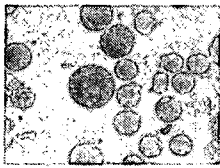


배율: 20 ×120

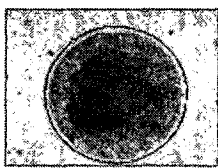


배율: 100 ×120

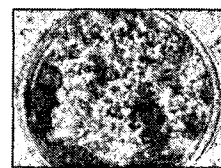
< Process III >



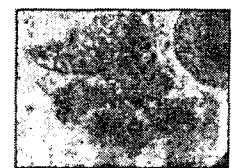
배율: 20 ×120



배율: 100 ×120

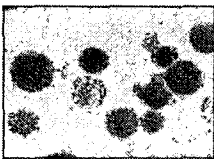


배율: 100 ×120

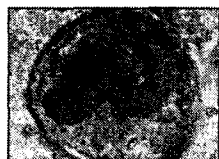


배율: 100 ×120

< Process IV >

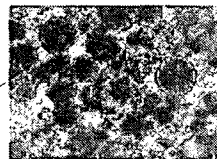


배율 : 20×120

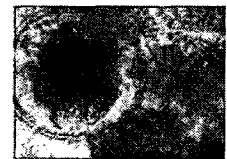


배율 : 100×120

< Process V >



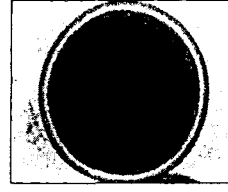
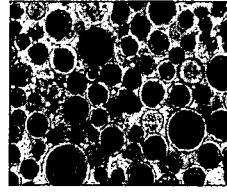
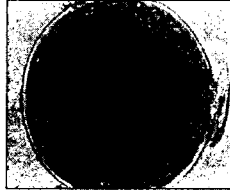
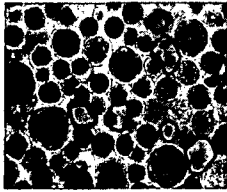
배율 : 20×120



배율 : 100×120

< Process VI >

Figure 26. 각 process에 따른 위상차 현미경 관찰

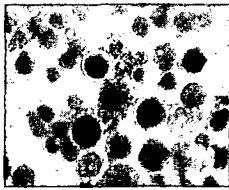


배율 : 20×120      배율 : 100×120

< Process VII >

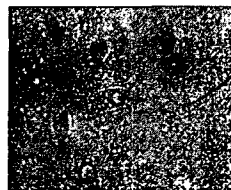
배율 : 20×120      배율 : 100×120

< Process VIII >



배율 : 20×120

< Process IX >



배율 : 40×120

< Process X >



배율 : 100×120



배율 : 20×120



배율 : 40×120

< Process XI >

Figure 27. 각 process에 따른 위상차 현미경 관찰

## 2. *Haematococcus* 균체로부터 최적의 carotenoid 추출 방법 결정

배양된 균체로부터 선택적으로 carotenoid를 추출하고자 용매와 교반시간을 변화하여 최적 추출방법을 결정하였다. 우선, 추출용매는 문헌에 보고된 용매인 아세톤과 식품용으로 사용할 수 있는 에탄올 (발효주정)을 사용하였고, 교반시간은 균체와 용매를 넣고 교반하면서 균체와 용매가 slurry 상태가 되는지 여부로 판단하였다(Table 5).

### 2.1 추출 용매 및 추출시간 결정

모든 실험은 4℃에서 진행하였고, 모든 초자기는 알루미늄 호일로 씌어 빛을 차단하였다.

대조군과 세포 파쇄 한 균체(Process I ~ VI) 각 250 mg과 아세톤, 에탄올 25 mL를 삼각플라스크에 넣고 균체가 slurry 상태가 될 때까지 교반하였다.

균체를 에탄올로 추출한 경우는 10분~1시간 교반하면 전처리 방법에 상관없이 slurry 상태가 되었으나(전처리 Process I ~ VI), 아세톤으로 추출하는 경우는 3~6시간이 소요되었다(Process I ~ IV). 그러나, homogenizer로 분쇄한 경우 (Process V, VI)는 추출용매에 상관없이 교반을 10분정도 교반하면 slurry 상태가 되었다.

따라서, homogenizer로 분쇄 (Process V, VI)하고, 에탄올이나 아세톤 용매하에서 10분 정도 교반하는 것이 적절함을 알 수 있었다.

### 2.2. 배양된 균체의 oil 함량 분석

전처리 한 균체내 oil 함량은 균체를 적절한 용매를 넣고 교반하고, 여과하여 잔여물을 제거하고 고액분리한 다음 액상을 진공농축하여 무게를 측정하여 분석할 수 있다.

전처리한 균체(Process I ~ VI, X ~ XI)에 아세톤 또는 에탄올 25 mL를 넣고 10분~6시간 동안 교반 한다음, pore size가 0.2  $\mu\text{m}$ 인 syringe prefilter로 여과하여 잔여물을 제거하였다. 얻은 용액을 감압농축하고, *n*-Hexane을 가해 용

해한 다음 증류수로 3회 세척하고, sodium sulfate anhydrous 약 1 g을 넣고 여과하여 잔류 수분을 제거하였다. 얻어진 액상을 rotory vacuum evaporator로 진공농축하고 무게를 측정하였으며, 추출된 oil 수율은 Figure 28에 기록하였다.

전처리한 균체 Process VII~IX는 세포벽이 전혀 파쇄되지 않았으므로, 위의 추출 과정을 수행하지 않았다.

실험 결과, 전처리 후 현미경관찰 결과 세포벽이 많이 파쇄된 경우일 수록 (Process X ,XI) 수율이 높음을 알 수 있으며, 대체로 아세톤으로 추출한 경우 에탄올로 추출한 경우보다 수율이 높음을 알 수 있었다.

### 2.3 Oil 내 carotenoid 함량 분석

Oil 내에 carotenoid의 함량은 UV-VIS spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 얻을 수 있다.

전처리 균체(Process I ~VI, X ~XI)로부터 얻은 oil을 아세톤 25 mL에 녹인다. 이 중 용액 1 mL를 취하고 아세톤 9 mL를 넣어 10배로 희석하여 흡광도를 측정하기 위한 시료를 준비한다. 최대 흡수 파장 474 nm에서 아세톤으로 blank test를 하고, 시료의 흡광도를 측정한다. 측정 한 각 시료의 흡광도와 얻어진 oil의 양 (mg)을 아래식에 대입하여 carotenoid 함량을 계산하였으며, Figure 29에 나타내었다.

$$\text{Carotenoid(mg/g)} = \frac{\text{흡광도} \times 25\text{ml 용매} \times \text{Dilution (10배)} \times 1000}{250 \text{ Sample wt (mg)}}$$

실험결과, 전처리 방법에 상관없이 아세톤으로 추출한 경우 오일중 carotenoid 수율이 높음을 알수 있었으며, 고압력 세포파쇄기와 attrition mill을 사용한 경우 용매에 상관없이 오일중 carotenoid 수율이 높았으며, 고압력 세포파쇄기로 세포벽을 분쇄하고, 아세톤으로 추출한 경우 가장 높은 값을 나타냈다 (Figure 30).



**Table 5.** 전처리 방법과 용매의 변화에 따른 추출 시간

전처리 방법	추출 용매	교반시간
대조군	아세톤	3일이상
Process I	아세톤	6시간
	에탄올	1시간
Process II	아세톤	5시간
	에탄올	1시간
Process III	아세톤	3시간
	에탄올	1시간
Process IV	아세톤	3시간
	에탄올	10분
Process V	아세톤	10분
	에탄올	10분
Process VI	아세톤	10분
	에탄올	10분

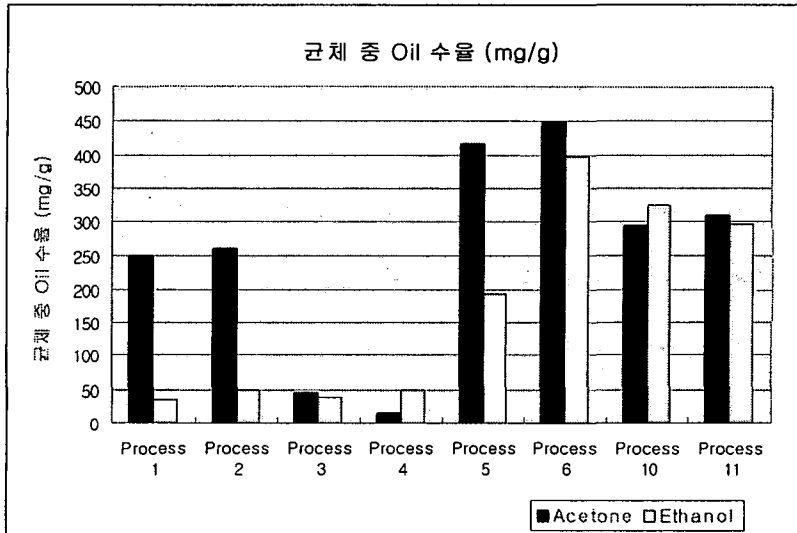


Figure 28. 배양된 균체 내 oil의 수율

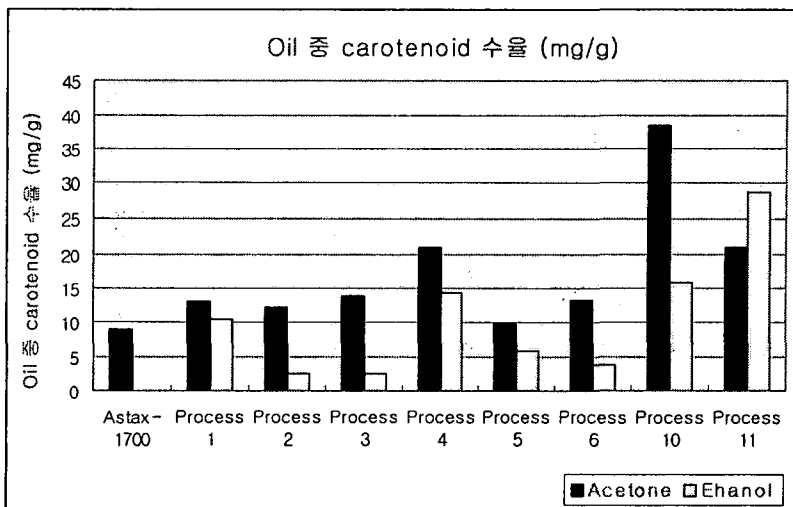


Figure 29. 다양한 전처리 방법과 추출 용매에 따른 carotenoid 함량 분석

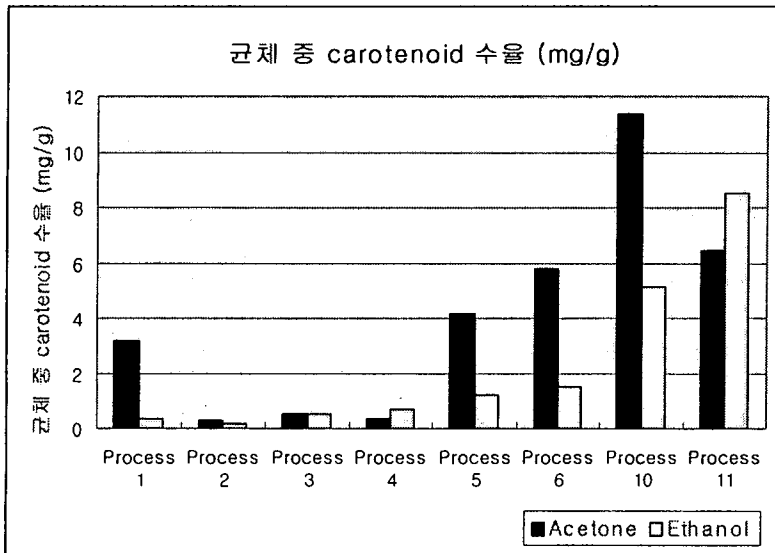


Figure 30. 배양된 균체 중 carotenoid 수율(mg/g)

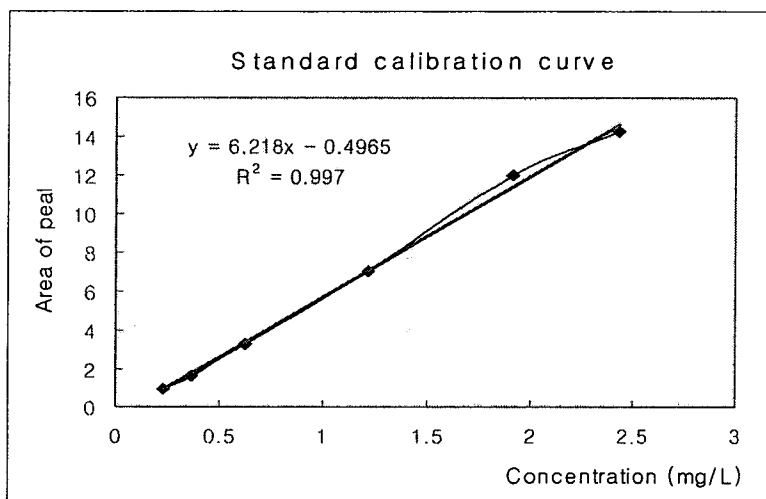


Figure 31. Astaxanthin standard의 정량곡선

### 3. Carotenoid로부터 astaxanthin의 선택적인 정량분석

*Haematococcus* 균체를 포함하는 carotenoid는 monoesters of astaxanthin 이 70%(astaxanthin의 3번 위치에 지방산이 하나 연결되어 있는 상태), di-, free astaxanthin이 각각 10%, 5%가 함유되어있다. 그런데, esterified astaxanthin을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)로 정확하게 분석하기 어렵기 때문에 astaxanthin을 hydrolysis 시킨 다음 분석해야한다. 가장 널리 이용되는 hydrolysis 방법은 enzyme을 이용한 것으로써 astaxanthin 분자를 산화시키지 않고 분석할 수 있다.

본 연구에서도 전처리 균체 (Process I ~ VI, X ~ XI)의 추출 및 농축 과정을 통해 얻어진 carotenoid와 enzyme을 hydrolysis 반응을 시킨 다음 HPLC 분석을 하였다.

#### 3.1. Enzyme을 이용한 Hydrolysis 반응

모든 과정은 저온실 (10°C 이하 유지)에서 수행하였고, 가능한 한 산소를 차단하고자 하였다. Hydrolysis에 사용한 enzyme은 Sigma에서 100 unit vial을 구입하여 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0 1 mL 당 3.4 unit가 되도록 stock solution을 제조하여 미리 보관해 두었다.

추출 농축한 carotenoid를 아세톤 30 mL를 넣어 희석하였다. 희석한 추출물 5 mL에 0.05 M Tris-buffer 2 mL를 넣고, enzyme stock solution 500  $\mu$ l를 넣고 37°C water bath에서 45분간 반응을 시켰다. 반응물에 sodium sulfate decahydrate 1 g과 petroleum ether 4 mL를 넣고, 원심분리기로 3500 rpm에서 5-10분간 원심분리 하였다. 상등액을 모으고, anhydrous sodium sulfate로 물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator로 진공 농축하였다. 농축액을 hexane/acetone = 82/18인 용액에 녹여 HPLC 분석을 위한 시료를 준비하였다.

## 3.2. 균체로부터 carotenoid의 HPLC 분석

### 3.2.1 Standard solution 제조 및 검량선 작성

검량선은 astaxanthin과 용매로 standard solution을 제조한 다음, 흡광도를 분석하여 standard의 정확한 농도를 계산하고, HPLC 분석을 통해 peak의 면적을 알아내어 농도 대 면적의 비율에 따른 최소자승법을 이용하여 작성할 수 있다.

100 mL volumetric flask에 astaxanthin standard 5 mg과 chloroform 10 mL를 넣고 표선까지 hexane으로 채운다. 이 용액을 stock solution이라 한다. Standard solution은 stock solution 1 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL를 취해 100 mL volumetric flask에 넣고 chloroform 4 mL를 넣은 후 표선까지 hexane을 채워서 제조한다.

본 실험에 column은 분석용으로 Luna 3  $\mu\text{m}$  analytical silica column (Phenomenex part # 00F-4162-E0)을 사용하였다. HPLC 이동상 조성은 HX/Acetone = 80/20 이며 유속은 1.2 mL/min, 주입량은 10  $\mu\text{L}$ 이고, 검출파장은 U.V. 474 nm, 오븐온도 40 $^{\circ}\text{C}$  조건하에서 분석하였다.

Astaxanthin standard 대 면적비율로 검량선을 작성한 결과  $y = 6.218 - 0.4965x$  ( $R = 0.997$ )을 얻을 수 있었다(Figure 31).

### 3.2.2. HPLC 분석을 통한 astaxanthin의 정량

검량선 작성에서 얻어진 일차 방정식으로부터 균체로부터의 astaxanthin 정량 결과를 table 6에 나타내었다.

## 4. Astaxanthin의 안정성 연구

### 4.1. Astaxanthin 유액 제조

Silk 용액과 물에서 astaxanthin oil을 유화하여 안정성(carotenoid 함량변화)을 비교하고자 하였다. 수상은 실크용액과 물을 사용하였고, 유화제는 탈지

대두레시틴, 첨가제로는 sodium alginate와 천연 다당체를 사용하였다. Entry 1은 Silk 용액에 탈지대두레시틴을 분산 하고, astaxanthin을 가한 다음 homogenizer로 10-30분간 유화하였다. Entry 2와 3은 entry 1과 같은 방법으로 유화하여 유액을 제조하고 sodium alginate 또는 xanthan gum을 첨가하고 용해하였다. 또한 entry 4는 1과 같은 방법으로 제조하였으며, silk 용액 대신 물을 사용하여 제조하였다. Entry 5와 6은 수상으로 물을 사용하였고, 유화는 entry 1과 같은 방법으로 유화하여 유액을 제조하고, sodium alginate 또는 xanthan gum을 첨가하고 용해하여 제조하였으며, 아래 Table 7에 요약하였다.

## 4.2. 안정성 연구

제조한 시료는 petri dish에 소분한 다음 받은 clean bench UV를 조사하고, 나머지는 40℃ incubator에 보관하면서 carotenoid 함량 변화를 측정하였다. 이때 astaxanthin oil을 대조군으로 사용하였다.

Carotenoid 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. UV 조사 시료와 40℃ incubator에 보관된 시료 약 200 mg 무게를 측정하여 centrifuge cell에 넣고, 아세톤 10 mL를 가해 푼히고, 이 시료를 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리한 다음 474 nm에서 흡광도를 측정하여 카로티노이드 함량을 구하였다. UV 조사한 경우와 40℃ incubator에 보관한 경우 carotenoid 함량 변화 (astaxanthin 잔재율을 %로 나타냄)를 Figure 32와 Figure 33에 나타내었다.

UV를 조사한 경우 대조군은 astaxanthin 잔재율이 20% 정도였고, 실크 용액은 잔재율이 60% 였다. 40℃에 보관한 경우도 대조군은 25% 정도 남아있었으며, 수상으로 실크용액을 사용한 경우 astaxanthin 잔재율은 65% 였다. 따라서, 실크용액과 astaxanthin oil로 만든 유액은 astaxanthin oil 보다 안정함을 알 수 있었다.

**Table 6.** 배양된 균체로부터 astaxanthin의 정량결과

전처리 방법	추출 용매	HPLC 분석 (mg/g)	균체 중 carotenoid 수율 (mg/g)
Process I	아세톤	3.13	3.2
	에탄올	0.31	0.34
Process II	아세톤	0.33	0.31
	에탄올	0.12	0.15
Process III	아세톤	0.52	0.55
	에탄올	0.55	0.53
Process IV	아세톤	0.37	0.34
	에탄올	0.66	0.69
Process V	아세톤	4.11	4.2
	에탄올	1.05	1.2
Process VI	아세톤	5.73	5.8
	에탄올	1.40	1.5
Process X	아세톤	11.06	11.39
	에탄올	5.01	5.15
Process XI	아세톤	6.22	6.46
	에탄올	8.33	8.52

**Table 7.** Astaxanthin 유액 제조 방법

Entry	수상 (g)	유화제 (g)	Astaxanthin(g)	첨가제 (g)
1	Silk 용액 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	-
2	Silk 용액 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	Na Alginate (1)
3	Silk 용액 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	천연 다당체 (1)
4	물 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	-
5	물 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	Na Alginate (1)
6	물 (54)	탈지대두레시틴 (0.6)	6	천연 다당체 (1)

(1) UV 보관에서의 함량 보관

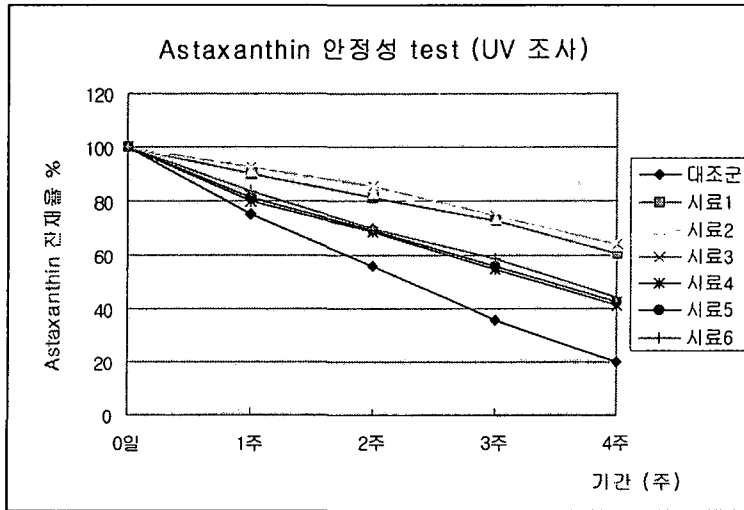


Figure 32. UV 조사 한 경우 astaxanthin 잔재율(%)

(2) 40°C incubator 보관에서의 함량 보관

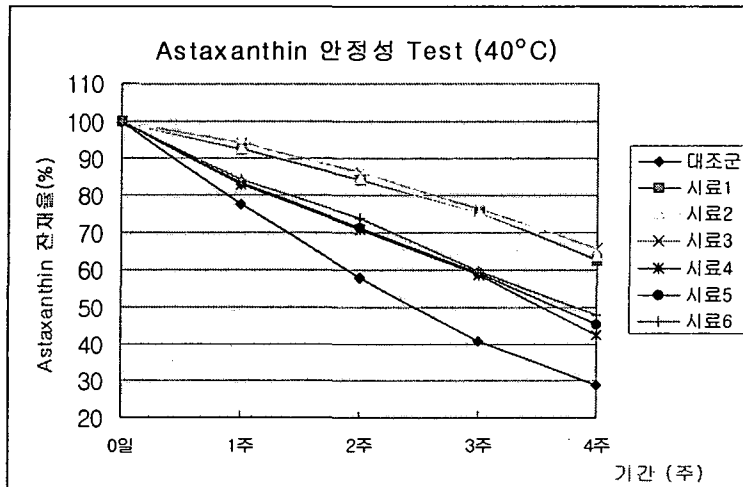
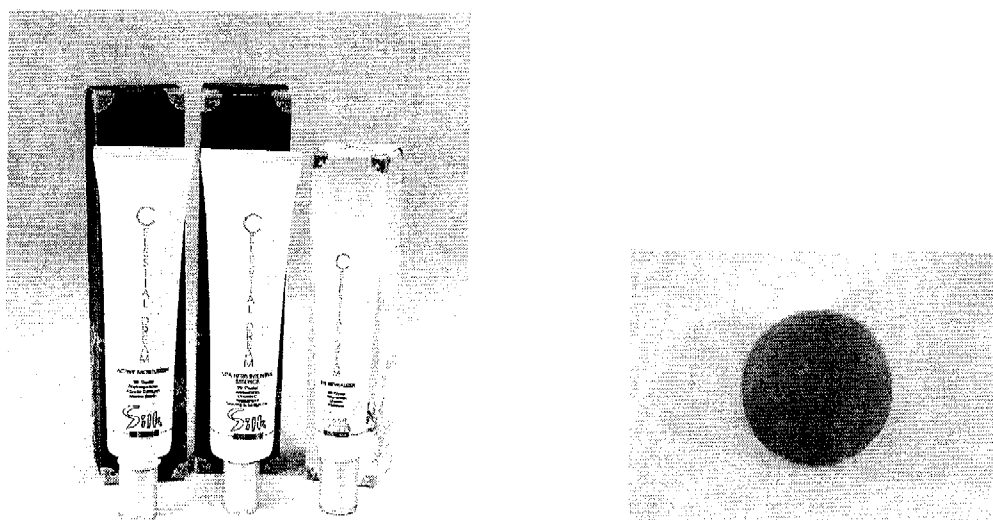


Figure 33. 40°C에서 보관한 경우 astaxanthin 잔재율(%)



## 5. 저순도의 시작품 개발

본 연구의 상품화 기술을 개발하기 위하여 astaxanthin이 함유된 기능성 화장품인 essence와 eye cream 및 비누를 제작하였다. 기능성 화장품인 essence와 eye cream은 전문 화장품 OEM 생산 업체에 의뢰하여 시작품을 제작하였으며, 비누는 실험실에서 제작하였다.(Figure 34)



**Figure 34.** (a) Astaxanthin을 이용한 기능성 화장품 및 (b) Astaxanthin 함유 비누의 시작품

## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

### 제 1 절 연구 개발 목표 달성도

당해연도의 연구는 lab scale의 astaxanthin 생산공정을 개발하고, 시작품을 생산하며, pilot scale의 생물공정을 확보하는 데 주력하였다. 주요 연구성과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 통계적 방법인 fractional factorial design(FFD)과 central composite design(CCD)을 이용하여 astaxanthin 축적량을 향상시킬 수 있는 최적환경을 규명하였다. Factorial design의 6가지 인자로서 과도한 빛조사, 질소원 고갈, 인성분 불충분, 아세테이트 첨가, 염 스트레스, 고온에 대해서 실험을 진행하였고, central composite design은 광도, 질소, 인, 아세테이트 등 네가지 변수를 가지고 5수준으로 진행을 하였다. 그 결과 고농도 astaxanthin의 최적 환경으로 광도는  $1040 \mu E/(m^2 \cdot s)$ , nitrate  $0.04 \text{ g/L}$ , phosphate  $0.31 \text{ g/L}$ , acetate  $0.05 \text{ g/L}$ 으로 확인이 되었고 특히 과도한 빛과 질소원 고갈이 astaxanthin 축적에 영향이 큰 것을 알 수가 있었다.

(2) Astaxanthin의 생산에서 빛에 대한 영향으로 빛 조사량의 영향, light quality의 영향, 점멸광의 영향을 조사하였다. 그 결과 광도는  $900 \mu E/(m^2 \cdot s)$ 에서 astaxanthin 농도  $700 \text{ mg/L}$  이상이 축적되었으며, 적색 파장의 조사로 인하여 축적율을 향상시킬 수 있으며, 지속적인 빛 에너지의 공급보다는 점멸광을 이용하는 것이 생산성 향상에 효과적임을 확인할 수 있었다.

(3) 기 연구를 통하여 선택균주의 배양에 유리한 것으로 규명된 기포탑 광생물반응기를 10 L(배양부피) 규모로 4기를 제작·운전하였다. 반응기는 삼단분리형으로 설계되었으며 직관형광등을 통하여 빛을 공급하는 방법으로 본 선택균주를 대량배양함으로써, 성공적인 선택균주의 배양이 가능함을 확인하였다. 본 연구결과를 토대로 현재 30 L의 기포탑 광생물반응기 1기가 제작 시운전중에 있다.

(4) 10 L 규모의 광생물반응기를 이용하여 선택균주의 생산성 향상을 위

한 루모스탯(lumostat) 배양 방법을 도입하였다. 광합성 세포의 성장에 중요한 인자인 빛에너지를 적정수준으로 일정하게 공급하여 줌으로써 고농도 배양을 유도하였다. 새로운 운전방법을 이용한 배양결과 약 100%의 생산성 증대 효과를 확인할 수 있었다.

(5) 선택균주의 효율적인 2단계 배양을 위하여 induction time을 찾는 실험을 수행을 하였다. 실험은 stationary phase 기간을 초기 중기 말기로 나누어 각각 induction을 진행하였고, 배양 결과 astaxanthin 축적속도가 동일하고 최고농도가 비슷한 결과가 나왔다. 이는 stationary phase초기에 induction을 시키는 것이 배양기간을 줄이고, 전력효율을 향상시킴으로써 공정의 경제성을 향상시킬 수 있었다.

(6) Open system 배양시 멸균 상태가 아닌 상태의 배양에서 항생제의 영향을 조사하였다. open system으로 인하여 오염이 된 상태로 배양이 진행되었지만 항생제의 사용으로 오염율의 감소를 확인할 수 있었다. 대용량 배양시 항생제의 사용을 통하여 오염의 정도를 낮출 수 있는 가능성을 확인하였다.

(7) Scale-up을 고려하여 고압력 파쇄기와 attrition mill로 세포벽을 분쇄한 결과 60~80%이상을 분쇄할 수 있었다. 추출 용매는 아세톤과 에탄올이 효과적이었고, 추출시간은 30분이 적당하다. HPLC 분석을 통해 선택적으로 carotenoid 분리하였다.

(8) Astaxanthin의 상품화를 위한 단계로써 유액 제조시 carotenoid 잔재율을 조사하였다. 오일을 대조군으로 하고, 천연 다당체 및 알긴산등을 첨가제로 한 astaxanthin 유액 제조하여 carotenoid 함량을 한달 동안 측정된 결과 대조군에 비해 잔재율이 40%이상 높게 나타났다.

(9) 상품화 기술을 개발하기 위하여 시제품으로 astaxanthin이 함유된 기능성 화장품인 essence와 eye cream 및 비누를 제작하였다.

당해연도의 가장 중요한 성과는 위와 같은 여러 가지 과정을 통해 균체 농도는 1차년도의 2.0 g/L에서 5.9 g/L로 3배정도 밖에 증가되지 않았지만, astaxanthin의 최고농도는 34.5 mg/L에서 무려 700 mg/L로 20배이상 증가시키는 우수한 성과를 얻었다. 다음의 표는 당해연도의 연구목표를 수치로 계량화하고, 이에대한 달성도를 정리한 것이다.

목 표	달성도 (%)	내 용
Astaxanthin 축적량의 극대화	140	astaxanthin 농도 > 700 mg/L
균체의 고농도 배양	70	최종 세포농도 > $6 \times 10^5$ cell/mL
Lab. 규모의 생물공정 개발	>100	생물반응기 = 10 L 규모(4기), 30 L 규모 (1기)
세포 파쇄 및 추출 선택적인 분리 농축	90	세포벽 파쇄 조건 및 추출용매와 추출 시간 결정
제품내 astaxanthin 안정성 향상	80	Astaxanthin 유액제조하여 carotenoid 함량 변화측정을 통한 안정성 연구
저순도 시작품 개발	>100	Astaxanthin 함유한 기능성 화장품 및 비누개발

## 제 2 절 대외 기여도

이제까지 많은 신물질이 미세조류에서 발견되었음에도 불구하고, 사업화가 되지 못한 이유는 고농도 미세조류의 배양기술이 축적되지 않았었기 때문이며, 본 사업이 추진되어감에 따라, 세계최고 수준의 고농도 미세조류의 대량 배양기술을 확보하게 될 것이다.

현재 astaxanthin의 용도는 순도가 낮은 경우에서 높은 경우까지 다양하며, 따라서 현재 계획대로라면, 약 30% 정도의 astaxanthin을 함유물을 astaxanthin의 항암, 항산화 효과를 이용한 기능성 화장품의 원료로 시판하는 것이 사업이 종료되기 전에 가능할 것으로 기대되며, 한가지 목적만을 가진 단일 의약품의 개발에 비해 상당히 높은 가능성과 경제적 가치를 가질 것으로 판단된다.

본 연구의 최종 목표는 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용 산물의 효율적이고도

경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도 배양기술의 개발을 시도하여 astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-4,4'-dione)을 생물공정을 이용한 기능성 화장품 소재 및 의약품의 원료로 실용화하고자 한다.

## ○ 기술적 측면

현재 세계적으로 미세조류의 산업적 생산규모에서의 고농도 배양기술이 확립된 바가 없기 때문에 이 분야의 기술개발 및 그 축적이 세계적인 경쟁력을 갖추는데 아주 중요하다고 할 수 있을 것이다. 또한 고농도 배양기술 뿐 아니라 산업적으로 실용화가 가능한 연속 배양, 2-stage 광생물반응기, size selective cell separator, 세포의 파쇄, 유용물질의 추출 및 정제 기술 등 미세조류를 이용한 유용물질의 생산에 있어서 확보 되어야할 기술들이 현재 각각 개별적으로 연구되고 있는 실정이므로 이를 하나의 공정으로 연결하는 전체적인 프로세스의 개발이 필요하며 본 연구진은 이러한 전체적인 공정의 포괄적인 연구를 수행함으로써 아직 확립되지 못한 이 분야의 기술적 knowhow를 갖게 될 것이다.

현재 astaxanthin은 microalgae인 *Haematococcus pluvialis*, Krill Shrimp, 그리고 Yeast인 *Phaffia rhodozyma*로부터 각각 추출되어 사용되고있다. 본과 연구 과제에서는 *Haematococcus pluvialis*로부터 경제성이 높고, 품질이 우수한 astaxanthin oil을 개발중이다. *Haematococcus*는 다른 미생물에 비하여 세포의 벽이 두껍고 단단하여 효율적인 추출방법이 아직 널리 알려져 있지 않으며, 현재 상업적인 방법으로는 초임계추출법, 용매법, 효소법 등이 단독 또는 혼합 사용되고 있다. 그러나 아직 적당한 추출방법이 개발되지 않아 추출효율이 낮고 공정의 단가가 높은 실정이다. 본 연구과제 에서는 세포의 벽이 두껍고 단단한 *Haematococcus pluvialis*로부터 astaxanthin을 효과적으로 추출, 정제하는 기술을 개발하고 얻어진 astaxanthin을 안정하고 다른 제품에 적용성이 좋도록 제제화하는 연구를 수행함으로써 천연물의 추출, 정제, 재제화 기술을 확보하고 아울러 astaxanthin이 첨가된 다양한 완제품을 개발한다

또한 astaxanthin과 같이 쉽게 degradation이 일어나는 물질들에 대하여 물리적, 화학적, 생물학적 처리를 함으로써 반감기를 늘려주는 기술에 대하여

도 연구함으로써 앞으로 발견될 불안정한 유용물질들의 안정화 기술을 얻게 될 것이다.

이러한 기술들의 축적은 아직 미개척 분야로서 거의 대부분의 해양미 세조류에 적용할 수 있으므로 새로운 유용물질의 발견 후 지체없이 이러한 대량생산 공정을 적용할 수 있어서 연구의 기술적 파급효과는 매우 클 것으로 기대된다.

### ○ 경제·산업적 측면

Astaxanthin은 토코페롤에 비하여 약 500배 이상 높은 항산화 효과, 면역 증강 효과, 항암효과를 가지는 유용한 물질임에도 불구하고 세계적으로 초기 시장단계이며, 국내에서도 거의 소개가 되고 있지 않다. Astaxanthin 세계적으로도 생산하는 업체가 극소수이며 이들 또한 추출, 정제 기술이 확립이 되지 않은 상태이므로 astaxanthin의 추출, 분리, 정제 그리고 응용제품 개발의 기술을 확보할시 시장을 선점할 수 있고 세계시장에서도 경쟁력이 크다 할 수 있다.

Astaxanthin은 의약품, 화장품, 건강식품, 사료 등으로 2000년에만 3억5천만 달러의 시장이 형성되어 있으며 매년 30%의 성장이 기대되며, 현재 다양한 방법들로 생산되어지고 있다. 화학합성으로 생산되는 8% 순도의 astaxanthin은 생체내의 흡수도와 활성도가 떨어지는 racemic mixture((3R,3'R) : meso- : (3S,3'S) = 1:2:1)이고 안정성이 떨어지는 free acid 형태이며 화학반응시의 부산물발생으로 인해 인체에 적용에 대한 허가가 나오지 않아 그 활용이 사료에만 한정되어 있어서 kg당 \$2,000의 낮은 수준에 판매되고 있다. 갑각류에서 추출한 것은 오직 (3R,3'R)형태로서 흡수도와 활성도는 화학합성품에 비해 더 떨어지나 10% 순도를 갖고 있고 생명체 유래의 생산 방법이므로 주로 기능성 화장품 첨가제로서 판매되어 kg당 \$8,000의 수준에 판매되고 있다.

소득이 증가하면서 식품, 생필품 등을 선택하는 기준이 점차 기능성이 부여된 제품을 선택하는 경향이 늘어나고 있는 추세이다. 따라서 astaxanthin과 같은 새로운 기능성 소재를 찾고자하는 노력이 최근 계속되고 있다. Astaxanthin은 항산화작용에 의한 피부노화 방지, 면역증강 작용, 항암 등으로

일반인의 관심을 끌기에 충분한 소재이며 의약품, 기능성 식품, 화장품 뿐만 아니라 최근 인기를 끌고 있는 먹는 화장품으로도 적당하여 본 과제가 성공시에 산업적 파급효과 뿐만 아니라 건강 증진 및 삶의 질 향상에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 개발하고자하는 미세조류에 의한 생산방법은 대부분(약 80% 이상)이 활성이 가장 우수하다고 알려진 (3*S*,3'*S*)형태의 enantiomer이며, 안정성도 가장 우수한 diester(C-18의 지방산이 두 개 붙어 안정성을 높인다.) 형태이다. 이러한 형태의 astaxanthin은 2.5% 이하의 낮은 순도에서도 kg당 \$10,000 이상의 고가로 팔리고 있다.

현재 구미 등지의 미세조류(*H. pluvialis*)에 의한 생산은 대형 개방형 연못(open ponds)에서 이루어지고 있어 낮은 함량과 생산성, 그리고 높은 오염확률을 갖고 있으나 본 연구진의 개발 목표인 소규모 폐쇄형 생물반응기(closed photobioreactors)에 의한 대량 생산은 30%의 높은 세포 내 astaxanthin 함량과, 대형 개방형 연못에서의 생산량과 같거나 더 높은 생산량을 얻을 수 있으며, 배양시간의 단축효과가 있으며, 거의 무균의 매우 낮은 오염확률을 갖고 있다. 그러므로 규모의 축소로 인한 설치비, 인건비 및 관리비용 절감의 효과가 있으며 높은 함량으로 인한 가격상승의 효과(kg당 \$30,000 이상 기대)가 있다. 또한 배양시간의 단축으로 발생하는 비용절감 효과가 있으며 낮은 오염확률은 분리, 정제의 비용을 감소시키며 의약품 또는 화장품용, 건강식품 등으로의 허가를 쉽게 얻을 수 있다.

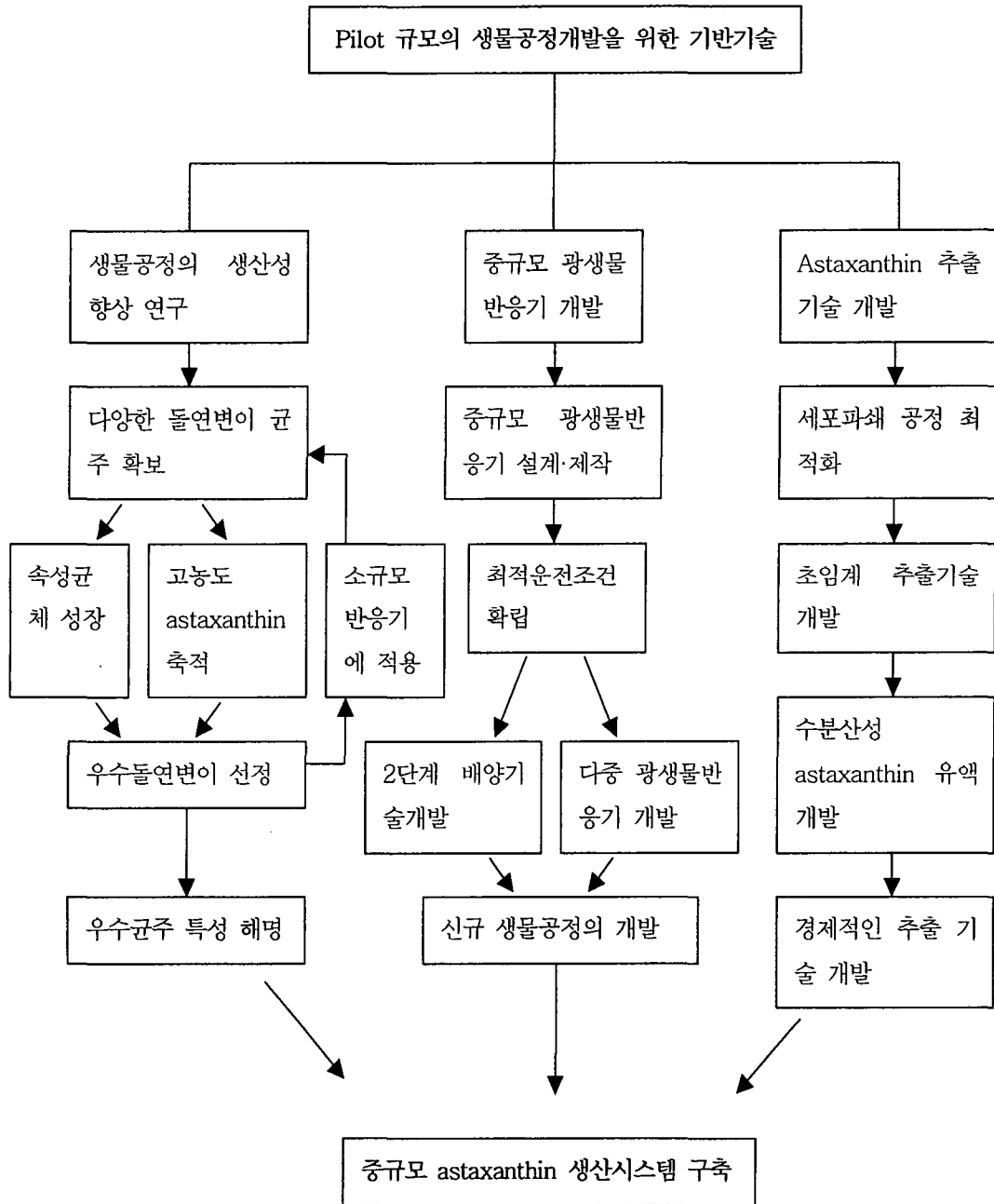
### 제 3 절 향후 계획 및 추진 전략

#### ○ 연구개발 목표 및 내용

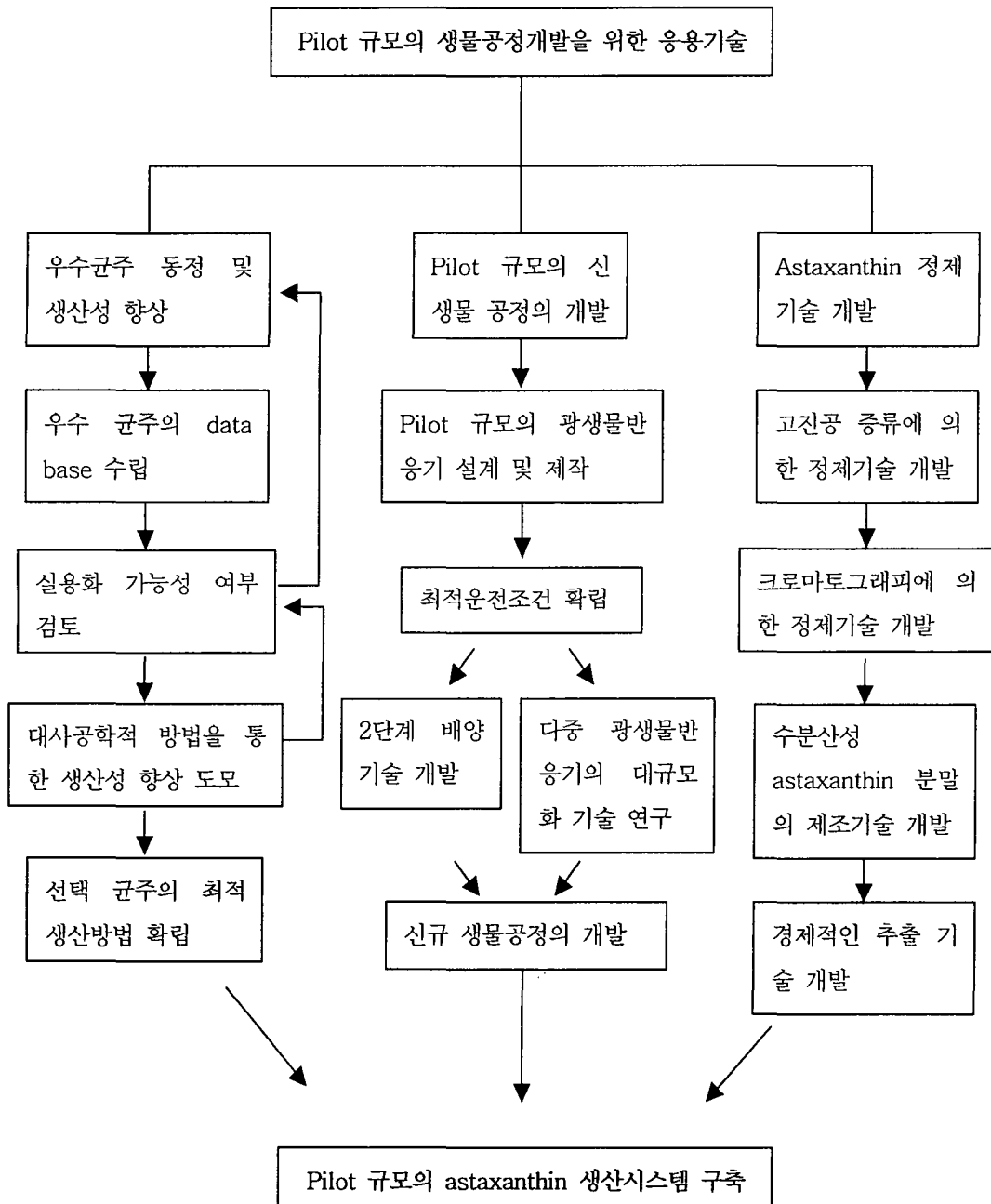
구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
4차 년도 (2003)	우수 균주 선별 및 생산성 향상 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다수의 확보된 돌연변이 균주 중 우수균주 선별</li> <li>○ 우수 균주의 특성 규명 및 배양방법 개발</li> <li>○ 반응기에서의 고농도 배양 및 astaxanthin 고농도 축적방법 개발</li> </ul>
	중규모 생물공정 운전 및 신생물공정의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 중규모(30L 규모, 4기) 광생물반응기 제작, 운전조건 확립</li> <li>○ 2단계 배양공정의 개발 및 운전기법 연구</li> <li>○ 다중 광생물반응기를 이용한 신생물공정의 개발</li> <li>○ Pilot 규모의 생물공정을 위한 선행기술 연구</li> </ul>
	Astaxanthin 추출기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot scale에서 세포파쇄에 의한 추출기술 확립</li> <li>○ 초임계 추출을 이용한 추출 기술 확립</li> <li>○ 수순산성 astaxanthin 유액의 제조기술 개발</li> </ul>
5차 년도 (2004)	선별된 우수 균주의 확인 및 생산성 향상 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선별한 우수균주의 16S RNA 서열 분석 등을 통하여, 사용균주가 특허 등 사업화에 제약을 받지 않음을 확인</li> <li>○ 필요시 대사공학적인 방법을 이용한 생산성의 향상을 시도</li> <li>○ 선택균주에 최적 생산방법 조정</li> </ul>
	Pilot 규모의 신생물공정의 제작 및 운전	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신생물공정의 최적 운전조건 확립</li> <li>○ 다중 광생물반응기의 대규모화 기술 연구</li> <li>○ 시험용 Pilot 규모의 광생물반응기 (100L, 1기) 설계, 제작, 시운전</li> </ul>
	Astaxanthin 정제기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot scale에서 고진공 증류에 의한 정제 기술 개발</li> <li>○ 크로마토그래피에 의한 정제기술 개발</li> <li>○ 수순산성 astaxanthin 분말의 제조기술 개발</li> </ul>
6차 년도 (2005)	산업화에 맞는 균주의 생산성 향상	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Scale-up 과정, 고농도 대량생산과정에서 혹시 생길지 모르는 새로운 문제의 해결</li> <li>○ Fine-tuning으로 최종 scale에서도 최종목표인 <math>10^6</math> cell/mL와 1 g/L 이상의 astaxanthin 생산량을 달성하도록 연구</li> <li>○ 국제 가격 경쟁력 분석</li> </ul>
	Pilot 규모의 신생물공정 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot 규모의 광생물반응기 개선 및 추가제작</li> <li>○ 광생물반응기의 체계적인 운전방법의 개발</li> <li>○ 전체 생물공정의 결합, 최적화 및 자동화</li> <li>○ 전체 공정의 안정성 및 경제성 향상 연구</li> </ul>
	Astaxanthin의 시제품 생산 및 상품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Astaxanthin oil 시제품 생산</li> <li>○ Astaxanthin 제제소재 시제품 생산</li> <li>○ Astaxanthin을 첨가한 완제품 개발 및 시제품 생산</li> </ul>



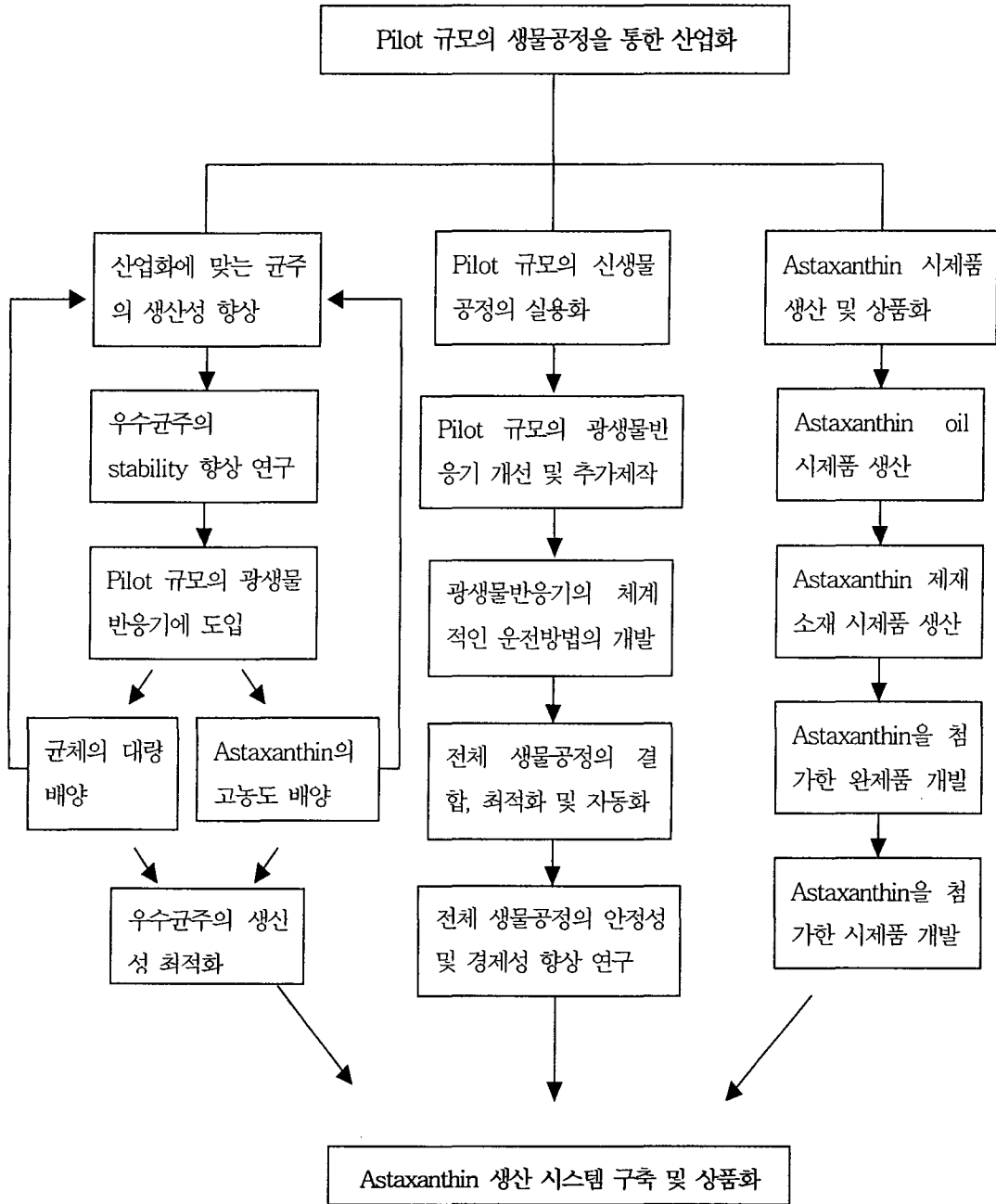
○ 4차년도(2003년) 추진체계



○ 5차년도(2004년) 추진체계



○ 6차년도(2005년) 추진체계



## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

- 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산은 세포당 astaxanthin의 축적이 높는데다, 의학적으로 가장 역가가 높은 (3S, 3'S)의 enantiomer를 생산할 수 있는 유일한 균주이며, 생산시 체제화에 유리한 ester형태로 축적할 수 있어, astaxanthin의 생산에 가장 유리한 방법이다.
- 화인코(주)는 현재 천연물에서 유용성분을 추출한 천연물 소재, 기능성 식품, 식품, 화장품 분야에서 사업을 진행하여 소재개발 뿐만 아니라 완제품 개발에도 많은 knowhow를 가지고 있으며, 새우와 미세조류에서 astaxanthin을 추출하여 생산하는 회사와 업무상 제휴를 맺고 있어 국내뿐만 아니라 해외에도 판매처가 확보되어 있는 상태이다.
- 또한 현재 기능성 식품, 기능성 식품 소재, 기능성 화장품, 기능성 화장품 소재 등의 분야에 대한 사업을 수행하여 국내외에서 판매를 하고 있는 상태이므로 본 과제 완료시 바로 사업화가 가능하다는 장점이 있다.
- 현재까지 연구된 1,000여종의 미세조류에서만도 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.
- 본 연구를 수행함에 있어서 축적될 새로운 2단계 배양방법 및 고농도 대량배양용 광생물반응기 등은, 현재 알려진 26,000종의 해양미세조류가 가지고 있을 고부가가치의 해양신물질의 사업화에 필수불가결한 귀중한 자료로서, 3면의 바다를 이용한 해양한국의 발전에 직·간접적으로 크게 이바지 할 것이다.
- 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.

## 제 6 장 참고문헌

1. Acien Fernandez, F. G., J. A. Sanchez Perez, J. M. Fernandez Sevilla, F. Garca Camacho, and E. M. Grima. 2000. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from phaeodactylum tricornutum cultures in tubular photobioreactors. effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 173-183.
2. 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.
3. Barbosa, M. J., R. Morais, and G. Choubert. 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **176**: 331-341.
4. Baumgarten, E., M. Nagel, and R. Tischner. 1999. Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 281-284.
5. Becker, E. W. 1994. Microalgae; Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 59
6. Bendich, A. 1990. Carotenoids and the Immune System. *In: Carotenoids Chemistry and Biology.* (ed.) N. I. Krinsky, Plenum Press, New York.
7. Bjerkeng, B. and G. M. Berge. 2000. Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin *E/Z*isomers in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and atlantic balibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **127**: 423-432.
8. Bon, J. A., T. D. Leathers and R. K. Jayaswal. 1997. Isolation of Astaxanthin-Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **19**:109-112.
9. Borowitzka, M. A., and L. J. Browitzka. 1988. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
10. Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds,

- tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. **70**:313-321
11. Borowitzka, M. A., J. M. Huisman, and A. Osborn. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* **3**: 295-304.
  12. Boussiba S., Vonshak A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* **32**:1077-1082
  13. 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
  14. Chaumont D, Thepenier C. 1995. Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle. *J. Appl. Phycol.* **7**:529-537
  15. 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.
  16. 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.
  17. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, H. Ishii, and N. Nishio. 1997c. Enzymatic Conversion of  $\beta$ -Carotene to Astaxanthin by Cell-Extracts of a Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **19**:443-446.8.
  18. Cordero, B., Otero, A., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different conditions. *Biotechnology Letters* **18**:213-218
  19. Cornet, J. F., Dussap, C. G., Gros, J. B. 1994. Conversion of radiant light energy in photobioreactors. *AIChE Journal* **40**:1055-1066
  20. Cornet, J. F., A. Marty, and J. B. Gros. 1997. Revised technique for the determination of mean incident light fluxes on photobioreactor. *Biotechnol. Prog.* **13**: 408-415.
  21. Csogor, Z., M. Herrenbauer, K. Schmidt, and C. Posten. 2001. Light

- distribution in a novel photobioreactor - modelling for optimization. *J. Appl. Phycol.* **13**: 325-333.
22. Degen, J., A. Uebele, A. Retze, U. Schmid-Staiger, and W. Trosch. 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *J. Biotechnol.* **92**: 89-94.
  23. Doran, P. M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, San Diego.
  24. Fabregas, J., A. Otero, A. Maseda, and A. Dominguez. 2001. Two-stage culture for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J. Biotechnol.* **89**: 65-71.
  25. 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
  26. Fan, L., Vonshak, A., Roussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis*(*chlorophyceae*) *Journal of Phycology* **30**:829-833
  27. 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.
  28. 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.
  29. Florencio, J.A., C. R. Soccol, L. F. Furlanetto, T. M. B. Bonfim, N. Krieger, M. Baron, and J. D. Fontana. 1998. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Bioprocess Eng.* **19**: 161-164.
  30. Garcia Camacho, F., A. Contreras Gomez, F. G. Acien Fernandez, J. Fernandez Sevilla, and E. Molina Grima. 1999. Use of concentric-tube airlift

- photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. *Enzyme Microb. Tech.* **24**: 164-172.
31. Gittelsohn, A., H. Quiuang, and A. Richmond. 1996. Photic volume in photobioreactors supporting ultrahigh population densities of the photoautotroph *Spirulina platensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1570-1573.
  32. Gong, X. and F. Chen. 1998. Influence of Medium Components on Astaxanthin Content and Production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochem.* **33**:385-391.
  33. Gradelet, S., A.-M. Le Bon, R. Berges, M. Suschetet and P. Astorg. 1998. Dietary Carotenoids Inhibit Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced Liver Preneoplastic Foci and DNA Damage in the Rat: Role of the Modulation of Aflatoxin B<sub>1</sub> Metabolism. *Carcinogenesis.* **19**:403-411.
  34. Grobbelaar, J. U. 2000. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* **12**: 201-206.
  35. Grünewald K., Hagen C., Braune W. 1997. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus laustris*. *Eur. J. Phycol.* **32**:387-392.
  36. Hai, T., H. Ahlers, V. Gorenflo, and S. A. 2000. Axenic cultivation of anoxygenic phototrophic bacteria, cyanobacteria, and microalgae in a new closed tubular glass photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 383-389.
  37. Harker, M., A. J. Tsavalos, and A. J. Young. 1995. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* **7**: 399-406.
  38. 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.
  39. 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.



40. Hata, N., J. C. Ogbonã, Y. Hasegawa, H. Taroda, and H. Tanaka. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J. Appl. Phycol.* **13**: 395-402.
41. Heijnen, j. j. and K. Van't riet. 1984. Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors. *Chem. Eng. J.* **28**: B21-B24.
42. Hirschberg, J. 1999. Production of high-value compounds : carotenoids and vitamin E. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 186-191.
43. Janssen, M., J. Tramper, L. R. Mur, and R. H. Wijffels. 2003. Enclosed outdoor photobioreactor: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 193-210.
44. Jinno, K., Lin, Y. 1995. Separation of Carotenoids by High- Performance Liquid Chromatography with Polymeric and Monomeric Octadecylsilica Stationary Phases *Chromatographia* **41**:311-317.
45. Joshi, J. B. 2001. Computational flow modelling and design of bubble column reactors. *Chem. Eng. Sci.* **56**: 5893-5933.
46. Kakizono, T., Kobayashi, M., Nagai, S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on Encystment accompanied with Astaxanthin formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* *J. Ferment. Bioeng.* **74** :403-405.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. 1993. Enhanced carotenoid

- biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:867-873.
51. 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.
  52. 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.
  53. 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.
  54. Kobayashi, M., Y. Todoroki, N. Hirai, Y. Kurimura, H. Ohgashi, and Y. Tsuji. 1998. Biological Activites of Abscisic Acid Analogs in the Morphological Change of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**:529-531.
  55. Kobayashi, M., Okada, T. 2000. Protective role of astaxanthin against u.v.-B irradiation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **22**:177-181.
  56. Kusdiyantini, E., P. Gaudin, G. Gona, and P. J. Blanc. 1998. Growth kinetic and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Lett.* **20**: 929-934.
  57. Lebeau, T., P. Gaudin, G.-A. Junter, L. Mignot, and J.-M. Rogert. 2000. Continuous marennin production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* using a tubular photobioreactor with internal illumination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 634-640.
  58. Lee, C.-G. and B. O. Palsson 1994. High-Density Algal Photobioreactors Using Light-Emitting Diodes. *Biotechnol. Bioeng.* **44**:1161-1167.
  59. 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.
60. Lee, C.-G. and B. O. Palsson. 1995b. Light Emitting Diode-Based Algal Photobioreactor with External Gas Exchange. *J. Ferment. Bioeng.* **79**:257-263.
  61. 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.
  62. Lee, C.-G. 1999. Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **4**:78-81.
  63. Lee YK., Ding SY. 1995 Effect of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **31**:922-924.
  64. Lee YK., Soh CW. 1991 Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **27**:575-577.
  65. 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.
  66. Margalith, P. Z. 1999. Production of Ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:431-438.
  67. Ma, R. Y. N. and F. Chen. 2001. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. *Biotechnol. Lett.* **23**: 519-523.
  68. Molina Grima, E., J. A. Sanchez Perez, F. Garcia Camacho, J. L. Garcia Sanchez, F. G. Acien Fernandez, and D. Lopez Alonso. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* **37**: 159-166.
  69. Morita, M., Y. Watanabe, and H. Saiki. 2000. Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* **69**: 693-698.
  70. Ogbonna, J. C. and H. Tanaka. 1997. Industrial-size photobioreactor.

- chemtech* **27**: 43-49.
71. Ogbonna, J. C. and H. Tanaka. 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation -development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **12**: 207-218.
  72. Ogbonna, J. C., H. Yada, and H. Tanaka. 1995. Light supply coefficient: a new engineering parameter for photobioreactor design. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 369-376.
  73. Okai, Y. and K. Higashi-Okai. 1996. Possible Immunomodulating Activities of Carotenoids *in vitro* Cell Culture Experiment. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**:753-758.
  74. Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **12**:499-506.
  75. Orosa, M., J. F. Valero, C. Herrero, and J. Abalde. 2001. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under *N*-starvation and high light conditions. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1079-1085.
  76. Park EK., Lee CG. 2001. A study on high yield astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and different wavelengths. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:1024-1030.
  77. Park EK., Seo MW., Lee CG. 2001. Effect of medium compositions for the growth and the astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:227-233.
  78. Pulz, O. 2001. Photobioreactor: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 287-293.
  79. Ramirez, J., H. Gutierrez, and A. Gschaedler. 2001. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *J. Biotechnol.* **88**: 259-268.
  80. Richmond, A. 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view *Journal of Applied Phycology* **12**:441-451

81. Richmond, A. and N. Zou. 1999. Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms. *J. Appl. Phycol.* **11**: 123-127.
82. Rorrer, G. L. and R. K. Mullikin. 1999. Modeling and simulation of a tubular recycle photobioreactor for macroalgal cell suspension cultures. *Chem. Eng. Sci.* **54**: 3153-3162.
83. Sanchez Miron, A., A. Contreras Gomez, F. Garcia Camacho, G. Emilio Molina, and Y. Chisti. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J. Biotechnol.* **70**: 249-270.
84. Sanchez, O. and J. Mas. 1996. Measurement of light absorption and determination of the specific rate of light uptake in cultures of phototrophic microorganism. *Appl. Environ. Microb.* **62**: 620-624.
85. Suh, I. S. and S. B. Lee. 2001. Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* **13**: 381-388.
86. Tahjono AE., Hayama Y., Kakizono T., Terada Y., Nishio N., Nagai S. 1994. Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* **16**:133-138
87. Tahjono AE., Kakizono T., Hayama Y., Nishio N., Nagai S. 1994. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *J. Ferment. Bioeng.* **77**:352-357.
88. 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.
89. Weissman, J. C. and R. P. Goebel. 1988. Photobioreactor design : mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 336-344.
90. Wu, X. and J. C. Merchuk. 2001. A model integrating fluid dynamics in

- photosynthesis and photoinhibition processes. *Chem. Eng. Sci.* **56**: 3527-3538.
91. Wu, X. and J. C. Merchuk. 2002. Simulation of algae growth in a bench-scale bubble column reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **80**: 156-168.
  92. Xylander M., Ch. Hagen and W. Braune. 1996. Mercury Increases Light Susceptibility in the Green Alga *Haematococcus lacustris*. *Bot. Acta.* **109**:222-228.
  93. Yong YYR., Lee YK. 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Phycologia* **30**:257-261.
  94. 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.
  95. 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.
  96. Zhang, K. and E. Kojima. 1998. Effect of light intensity on colony size of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 573-576.
  97. Zhang, XW., Gong, X-D., Chen, F. 1999. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis* *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* **23**:691-696.
  98. Zlotnik I., Sukenik A., Dubinsky Z. 1993. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *J. Phycol.* **29**:463-469.

## 해양수산연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업구분	해양생물로부터 유용신물질 연구개발			
과제명	미세조류 유래의 고부가가치 astaxanthin의 생산공정개발 및 실용화			
연구기관	인하대학교	연구책임자	이철균	
총연구기간	2002년. 3월. 일. ~ 2003년. 2월. 일. (12 개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	170,000	15,000	185,000	
기술분야				
참여기업	화인코(주)			
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용(해당 항목에(√) 표시)	1. 기업화( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용( )
	5. 선행 및 기초연구( )	6. 기타목적활용(교육, 연구)( )	7. 활용중단(미활용) ( )	8. 기타( )
<p style="text-align: center;">해양수산연구개발사업관리등에관한규정 제33조(연구개발결과의 보고) 제2항에 의하여 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.</p>				

[첨부1]

## 연구결과 활용계획서

### 1. 연구목표 및 내용

- 균주개량 및 생산성 향상 연구
  - 유전자 조작 또는 돌연변이에 의한 균주 개량
  - 인자요인실험을 통한 균체성장 극대화 및 astaxanthin의 축적량의 극대화
  - 세포내 astaxanthin의 고농도 축적방법의 연구
- 생물공정의 최적화 연구
  - Lab scale 광생물반응기의 최적 운전조건의 확립
  - 2단계 배양을 위한 연구 및 최적화 기법 개발
  - Pilot scale의 생물공정 개발을 위한 설계 및 운전기법 개발
- Astaxanthin의 상품화 연구
  - 세포의 파쇄, 추출, 분리, 농축을 포함한 downstream 공정 개발
  - Astaxanthin의 안정성을 향상시키기 위한 첨가제의 선별 및 가공방법 개발
  - 저순도의 시작품 생산

### 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
기포탑 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법	2002-57054	인하학원	한국	
광합성 미생물의 루모스택 배양방법	2002-57056	인하학원	한국	
세포내 색소량을 감소 시킴으로써 광합성 세포의 생산성을 높이는 방법	2002-85763	인하학원	한국	
다중 광생물반응기 및 이를 이용한 광합성 미생물의 배양방법	2003-00000	인하학원	한국	준비중

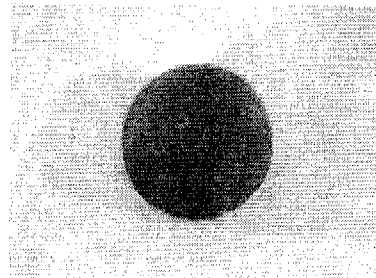


나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역



*Astaxanthin*을 이용한 기능성 화장품 및 *Astaxanthin* 함유 비누의 시작품

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문 게재 실적(필요시 별지 사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
<i>J Microbiol Biotech.</i>	A simple monodimensional model for linear growth rate of photosynthetic microorganisms in flat plate photobioreactors	2002년 월 일	6	The Korean Society for Applied Microbiology	Korea	SCI (IF=1.388)
계: 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지 사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
4th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference	High-density culture of <i>Haematococcus pluvialis</i> in bubble-column photobioreactors with CO <sub>2</sub> and nitrate supplements	2002. 4. 22-26	p. 56		USA
9th International Symposium on the Genetics of Industrial Biotechnology	Bubble column photobioreactors for mass cultivation of <i>Haematococcus pluvialis</i>	2002. 7. 1-5	p. 230		Korea
9th International Symposium on the Genetics of Industrial Biotechnology	Induction of astaxanthin accumulation in <i>Haematococcus pluvialis</i> cells using excessive irradiance and nitrate starvation	2002. 7. 1-5	p. 133		Korea
The Society for Bioscience and Bioengineering, 2002 Annual Meeting	Effects of light intensity and nitrate concentration on astaxanthin accumulation in <i>Haematococcus pluvialis</i> cells	2002.10. 28-30	p. 41		Japan
계: 건수					

3. 연구성과

○ 통계적 방법인 fractional factorial design(FFD)과 central composite design(CCD)을 이용하여 astaxanthin 축적량을 향상시킬 수 있는 최적환경을 규명하였다. Factorial design의 6가지 인자로서 과도한 빛조사, 질소원 고갈, 인성분 불충분, 아세테이트 첨가, 염 스트레스, 고온에 대해서 실험을 진행

하였고, central composite design은 광도, 질소, 인, 아세테이트 등 네가지 변수를 가지고 5수준으로 진행을 하였다. 그 결과 고농도 astaxanthin의 최적 환경으로 광도는  $1040 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , nitrate  $0.04 \text{ g/L}$ , phosphate  $0.31 \text{ g/L}$ , acetate  $0.05 \text{ g/L}$ 으로 확인이 되었고 특히 과도한 빛과 질소원 고갈이 astaxanthin 축적에 영향이 큰 것을 알 수가 있었다.

- Astaxanthin의 생산에서 빛에 대한 영향으로 빛 조사량의 영향, light quality의 영향, 점멸광의 영향을 조사하였다. 그 결과 광도는  $900 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 astaxanthin 농도  $700 \text{ mg/L}$  이상이 축적되었으며, 적색 파장의 조사로 인하여 축적율을 향상시킬 수 있으며, 지속적인 빛 에너지의 공급보다는 점멸광을 이용하는 것이 생산성 향상에 효과적임을 확인할 수 있었다.
- 기 연구를 통하여 선택균주의 배양에 유리한 것으로 규명된 기포탑 광생물 반응기를 10 L(배양부피) 규모로 4기를 제작·운전하였다. 반응기는 삼단 분리형으로 설계되었으며 직관형광등을 통하여 빛을 공급하는 방법으로 본 선택균주를 대량배양함으로써, 성공적인 선택균주의 배양이 가능함을 확인하였다. 본 연구결과를 토대로 현재 30 L의 기포탑 광생물반응기 1기가 제작 시운전중에 있다.
- 10 L 규모의 광생물반응기를 이용하여 선택균주의 생산성 향상을 위한 루모스탯(lumostat) 배양 방법을 도입하였다. 광합성 세포의 성장에 중요한 인자인 빛에너지를 적정수준으로 일정하게 공급하여 줌으로써 고농도 배양을 유도하였다. 새로운 운전방법을 이용한 배양결과 약 100%의 생산성 증대 효과를 확인할 수 있었다.
- 선택균주의 효율적인 2단계 배양을 위하여 induction time을 찾는 실험을 수행을 하였다. 실험은 stationary phase 기간을 초기 중기 말기로 나누어 각각 induction을 진행하였고, 배양 결과 astaxanthin 축적속도가 동일하고 최고 농도가 비슷한 결과가 나왔다. 이는 stationary phase초기에 induction을 시키는 것이 배양기간을 줄이고, 전력효율을 향상시킴으로써 공정의 경제성을 향상시킬 수 있었다.
- Open system 배양시 멸균 상태가 아닌 상태의 배양에서 항생제의 영향을 조사하였다. open system으로 인하여 오염이 된 상태로 배양이 진행되었지만 항생제의 사용으로 오염율의 감소를 확인할 수 있었다. 대용량 배양시

항생제의 사용을 통하여 오염의 정도를 낮출 수 있는 가능성을 확인하였다.

- Scale-up을 고려하여 고압력 파쇄기와 attrition mill로 세포벽을 분쇄한 결과 60~80%이상을 분쇄할 수 있었다. 추출 용매는 아세톤과 에탄올이 효과적이었고, 추출시간은 30분이 적당하다. HPLC 분석을 통해 선택적으로 carotenoid 분리하였다.
- Astaxanthin의 상품화를 위한 단계로써 유액 제조시 carotenoid 잔재율을 조사하였다. 오일을 대조군으로 하고, 천연 다당체 및 알긴산등을 첨가제로 한 astaxanthin 유액 제조하여 carotenoid 함량을 한달 동안 측정한 결과 대조군에 비해 잔재율이 40%이상 높게 나타났다.
- 상품화 기술을 개발하기 위하여 시제품으로 astaxanthin이 함유된 기능성 화장품인 essence와 eye cream 및 비누를 제작하였다.
- 가장 중요한 성과는 위와 같은 여러 가지 과정을 통해 균체농도는 1차년도 의 2.0 g/L에서 5.9 g/L로 3배정도 밖에 증가되지 않았지만, astaxanthin의 최고농도는 34.5 mg/L에서 무려 700 mg/L로 20배이상 증가시키는 우수한 성과를 얻었다.

#### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

- 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.
- 화인코(주)는 현재 천연물에서 유용성분을 추출한 천연물 소재, 기능성 식품, 식품, 화장품 분야에서 사업을 진행하여 소재개발 뿐만 아니라 완제품 개발에도 많은 knowhow를 가지고 있으며, 새우와 미세조류에서 astaxanthin을 추출하여 생산하는 회사와 업무상 제휴를 맺고 있어 국내뿐만 아니라 해외에도 판매처가 확보되어 있는 상태이다.
- 또한 현재 기능성 식품, 기능성 식품 소재, 기능성 화장품, 기능성 화장품 소재 등의 분야에 대한 사업을 수행하여 국내외에서 판매를 하고 있는 상태이므로 본 과제 완료시 바로 사업화가 가능하다는 장점이 있다.

- 현재까지 연구된 1,000여종의 미세조류에서만도 여러 종류의 항생제, 비타민, 생리활성물질 등의 의약품 및 건강 식품; carotenoids, biliprotein 등의 염료; bioflocculant, polyols, 탄수화물 등의 정제 화학 약품; 기름, 탄화수소 등의 대체 연료의 생산에 이르기까지 광범위한 물질이 생산될 수 있다.
- 본 연구를 수행함에 있어서 축적될 새로운 2단계 배양방법 및 고농도 대량 배양용 광생물반응기 등은, 현재 알려진 26,000종의 해양미세조류가 가지고 있을 고부가가치의 해양신물질의 사업화에 필수불가결한 귀중한 자료로서, 3면의 바다를 이용한 해양한국의 발전에 직·간접적으로 크게 이바지 할 것이다.
- 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.

## 5. 기대효과

### 가. 기술적 측면

현재 세계적으로 미세조류의 산업적 생산규모에서의 고농도 배양기술이 확립된 바가 없기 때문에 이 분야의 기술개발 및 그 축적이 세계적인 경쟁력을 갖추는데 아주 중요하다고 할 수 있을 것이다. 또한 고농도 배양기술 뿐 아니라 산업적으로 실용화가 가능한 연속 배양, 2-stage 광생물반응기, size selective cell separator, 세포의 파쇄, 유용물질의 추출 및 정제 기술 등 미세조류를 이용한 유용물질의 생산에 있어서 확보 되어야 할 기술들이 현재 각각 개별적으로 연구되고 있는 실정이므로 이를 하나의 공정으로 연결하는 전체적인 프로세스의 개발이 필요하며 본 연구진은 이러한 전체적인 공정의 포괄적인 연구를 수행함으로써 아직 확립되지 못한 이 분야의 기술적 knowhow를 갖게 될 것이다.

현재 astaxanthin은 microalgae인 *Haematococcus pluvialis*, Krill Shrimp, 그리고 Yeast인 *Phaffia rhodozyma*로부터 각각 추출되어 사용되고 있다. 본과 연구과제에서는 *Haematococcus pluvialis*로부터 경제성이 높고, 품질이 우수한 astaxanthin oil을 개발중이다. *Haematococcus*는 다른 미생물에 비하여 세포

의 벽이 두껍고 단단하여 효율적인 추출방법이 아직 널리 알려져 있지 않으며, 현재 상업적인 방법으로는 초임계추출법, 용매법, 효소법 등이 단독 또는 혼합사용되고 있다. 그러나 아직 적당한 추출방법이 개발되지 않아 추출효율이 낮고 공정의 단가가 높은 실정이다. 본 연구과제에서는 세포의 벽이 두껍고 단단한 *Haematococcus pluvialis*로부터 astaxanthin을 효과적으로 추출, 정제하는 기술을 개발하고 얻어진 astaxanthin을 안정하고 다른 제품에 적용성이 좋도록 제제화하는 연구를 수행함으로써 천연물의 추출, 정제, 재제화 기술을 확보하고 아울러 astaxanthin이 첨가된 다양한 완제품을 개발한다

또한 astaxanthin과 같이 쉽게 degradation이 일어나는 물질들에 대하여 물리적, 화학적, 생물학적 처리를 함으로서 반감기를 늘려주는 기술에 대하여도 연구함으로써 앞으로 발견될 불안정한 유용물질들의 안정화 기술을 얻게 될 것이다.

이러한 기술들의 축적은 아직 미개척 분야로서 거의 대부분의 해양미세조류에 적용할 수 있으므로 새로운 유용물질의 발견 후 지체없이 이러한 대량생산 공정을 적용할 수 있어서 연구의 기술적 파급효과는 매우 클 것으로 기대된다.

#### 나. 경제·산업적 측면

Astaxanthin은 토코페롤에 비하여 약 500배 이상 높은 항산화 효과, 면역증강 효과, 항암효과를 가지는 유용한 물질임에도 불구하고 세계적으로 초기 시장단계 이며, 국내에서도 거의 소개가 되고 있지 않다. Astaxanthin 세계적으로도 생산하는 업체가 극소수이며 이들 또한 추출, 정제 기술이 확립이 되지 않은 상태이므로 astaxanthin의 추출, 분리, 정제 그리고 응용제품 개발의 기술을 확보할시 시장을 선점할 수 있고 세계시장에서도 경쟁력이 크다 할 수 있다.

Astaxanthin은 의약품, 화장품, 건강식품, 사료 등으로 2000년에만 3억5천만 달러의 시장이 형성되어 있으며 매년 30%의 성장이 기대되며, 현재 다양한 방법들로 생산되어지고 있다. 화학합성으로 생산되는 8% 순도의 astaxanthin은 생체내의 흡수도와 활성도가 떨어지는 racemic mixture((3R,3'R) : meso- : (3S,3'S) = 1:2:1)이고 안정성이 떨어지는 free acid 형태이며 화학

반응시의 부산물발생으로 인해 인체에 적용에 대한 허가가 나오지 않아 그 활용이 사료에만 한정되어 있어서 kg당 \$2,000의 낮은 수준에 판매되고 있다. 감각류에서 추출한 것은 오직 (3R,3'R)형태로서 흡수도와 활성도는 화학 합성품에 비해 더 떨어지나 10% 순도를 갖고 있고 생명체 유래의 생산 방법이므로 주로 기능성 화장품 첨가제로서 판매되어 kg당 \$8,000의 수준에 판매되고 있다.

소득이 증가하면서 식품, 생필품 등을 선택하는 기준이 점차 기능성이 부여된 제품을 선택하는 경향이 늘어나고 있는 추세이다. 따라서 astaxanthin과 같은 새로운 기능성 소재를 찾고자하는 노력이 최근 계속되고 있다. Astaxanthin은 항산화작용에 의한 피부노화 방지, 면역증강 작용, 항암 등으로 일반인의 관심을 끌기에 충분한 소재이며 의약품, 기능성 식품, 화장품 뿐만 아니라 최근 인기를 끌고 있는 먹는 화장품으로도 적당하여 본 과제가 성공시에 산업적 파급효과 뿐만 아니라 건강 증진 및 삶의 질 향상에 효과도 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 개발하고자하는 미세조류에 의한 생산방법은 대부분(약 80% 이상)이 활성이 가장 우수하다고 알려진 (3S,3'S)형태의 enantiomer이며, 안정성도 가장 우수한 diester(C-18의 지방산이 두 개 붙어 안정성을 높인다.) 형태이다. 이러한 형태의 astaxanthin은 2.5% 이하의 낮은 순도에서도 kg당 \$10,000 이상의 고가로 팔리고 있다.

현재 구미 등지의 미세조류(*H. pluvialis*)에 의한 생산은 대형 개방형 연못(open ponds)에서 이루어지고 있어 낮은 함량과 생산성, 그리고 높은 오염확률을 갖고 있으나 본 연구진의 개발 목표인 소규모 폐쇄형 생물반응기(closed photobioreactors)에 의한 대량 생산은 30%의 높은 세포 내 astaxanthin 함량과, 대형 개방형 연못에서의 생산량과 같거나 더 높은 생산량을 얻을 수 있으며, 배양시간의 단축효과가 있으며, 거의 무균의 매우 낮은 오염확률을 갖고 있다. 그러므로 규모의 축소로 인한 설치비, 인건비 및 관리비용 절감의 효과가 있으며 높은 함량으로 인한 가격상승의 효과(kg당 \$30,000 이상 기대)가 있다. 또한 배양시간의 단축으로 발생하는 비용절감 효과가 있으며 낮은 오염확률은 분리, 정제의 비용을 감소시키며 의약품 또는 화장품용, 건강식품 등으로의 허가를 쉽게 얻을 수 있다.

시장규모 및 무역 수지 개선효과에 대하여는 아래 표에 기술하였다.

시 장 규 모					
현재 세계시장규모	4,000				억 원
예상 세계시장규모	2006	년	100,000		억 원
현재 한국시장규모	5				억 원
예상 한국시장규모	2006	년	100		억 원
주시장(국가 또는 지역)	한국, 일본, 북미, 유럽				
무역수지 개선효과					
년도	2006	(수입대체)억 원	2.5	(수출)억 원	2.5
년도	2007	(수입대체)억 원	5	(수출)억 원	5
년도	2008	(수입대체)억 원	10	(수출)억 원	15

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