

## 배지 조성이 *Haematococcus pluvialis*의 성장과 Astaxanthin 생산에 미치는 영향

박은경 · 서문원 · 이철균\*

인하대학교 공과대학 생물공학과/생물산업기술연구소

**Effects of Medium Compositions for the Growth and the Astaxanthin Production of *Haematococcus pluvialis*.** Park, Eun-Kyung, Mun-Won Seo, and Choul-Gyun Lee\*. Institute of Industrial Biotechnology, Department of Biological Engineering Inha University, Incheon 402-751, Korea – To maximize astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotene-4,4'-dione) production by high-density *Haematococcus pluvialis* cultures, various media were examined. Among tested media, Hong Kong Medium and Modified Bold's Basal Medium showed the best results for cell growth ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL) and for astaxanthin content per cell (9.7 mg astaxanthin/mg cell), respectively. Maximum astaxanthin concentration of 6.1 mg/L was obtained at pH 7.5, 20°C~25°C. Deficiencies of nitrogen source (NaNO<sub>3</sub> and proteose-peptone) found to stimulate astaxanthin formation. Relatively low light intensity of 60  $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  was suitable for vegetative cell growth, while higher light intensity was required for higher astaxanthin accumulation.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin production, nitrogen deficiency, light intensity

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 연료 생산에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 오염 토양의 정화 및 생물학적 비료로서의 사용 등 농업 분야까지 영역을 넓히고 있다[1,3-6,22,24,25,31,33,36]. 이러한 연구는 해양자원에 많은 관심을 가지고 투자를 진행중인 미국, 유럽, 일본, 이스라엘, 노르웨이, 독일 등 선진국에서 수행되어 오고 있으며, 중국, 동남아시아 등 나라에서도 높은 관심을 가지고 있다.

본 연구에서는 해양 미세조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 해양 미생물을 이용한 신물질 개발 중 37% 이상을 생산하는 미세조류의 개발 가능성을 최대한 높여 고부가가치 유용 산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세조류 고농도배양 기술 개발을 시도하고 astaxanthin(3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotene-4,4'-dione)을 생산하여 실용화하고자 한다. Astaxanthin은 자연계에 널리 분포되어 있는 ketocarotenoid로 polyisoprenoid와 oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring의 결합체이다[1,3,4,6]. Astaxanthin은 주황색 또는 붉은 색을 띠며 연어, 송어 또는 갑각류 등 다른 해양생물과 조류에 있어서 주요 색소 물질이며, 인류와 동물의 대사 기능을 향상시키고, virus, bacteria, fungi

에 의한 감염을 감소시키고, cytokine 유도 활성으로 인하여 면역기능을 활성화시키고[6,7,14,15,21,27,31,35-39,41], T-helper cell의 기능을 향상시키고, oxygen radical의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암과 간암 등 암의 예방[16-18]과 지방 조직을 peroxidation으로부터 보호하여 노화 방지의 효과가 있으며, 비타민 A의 전구체로 건강한 눈의 유지에 필수이며, 요즘 기능성 화장품의 원료로써 주름 제거에 효과가 있다는 레티놀의 전구체이기도 하다. 수산업이나 농축산업에서는 사료로 쓰여져 pigmentation, 제품 내 항산화 효과, 면역기능 등을 향상시킨다. 특히 astaxanthin은 종전에 항산화제로 쓰였던 수용성에서 불안정한 상태인 비타민 C나 지용성 비타민 E인  $\alpha$ -toco-pherol보다 500-1000배의 항산화 효과가 입증되어 의약적으로도 상당한 가치가 있다[8-10,19-21,23,26-28,39].

이와 같이 많은 장점들을 가진 astaxanthin을 생산하는 방법은 화학적 합성법, 추출법, 붉은 yeast(*Phaffia rhodozyma*)[29,30,32-34]와 미세조류를 이용한 생물공학적 방법[2,39,40,42,43] 등이 있다. 화학적 합성법은 비싼 단가와 낮은 생체 이용률과 안정성에 대한 문제가 있다. 새우나 게 등의 갑각질에서 유기용매 또는 초임계 유체를 이용해서 추출하는 방법은 비싼 효소 비용, 불안정한 원료 공급, 그리고 폐기물 처리 등이 문제가 된다. *P. rhodozyma*는 성장 속도는 빠르지만, 세포 당 astaxanthin의 함유량이 적고(3R, 3'R) form(Fig. 1a)만을 생산하므로 상업적 이용이 제한되고 있다[11-13]. 반면에 *Haematococcus pluvialis*는 세

\*Corresponding author  
Tel. 032-860-7518, Fax. 032-872-4046  
E-mail: leecg@inna.ac.kr

포 내 astaxanthin이 높은 농도로 존재함으로써 불필요한 성분의 과량제공이나 회분의 공급이 줄어들고, 같은 양을 공급했을 때 10배 정도의 효과가 가능하며, 1999년 8월에는 FDA에서 식품 첨가물, 기능성 화장품, 의약품 및 건강 보조 물질로의 안정성을 승인 받아 그 이용이 더욱 확대될 것이라고 기대되고 있다. 태양광과 같은 값싼 에너지를 이용, 생체 이용성이 높은 (3S, 3'S) isomer를 생산하므로 (Fig. 1) 고농도 미세조류 배양 기술의 확립은 astaxanthin의 상업화를 가능하게 한다. 본 연구에서는 astaxanthin 생

산에 가장 우수한 *H. pluvialis*의 최적 배양조건을 수립하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 계대 배양방법

실험에 사용된 균주는 진핵세포이며 단세포 녹조류의 일종인 *H. pluvialis*를 사용하였다. *H. pluvialis*는 The Culture Collection of Algae(UTEX, Austin, TX, U.S.A.)에서 구입하였고, 계대 배양배지는 NaNO<sub>3</sub> 250 mg/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 25 mg/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 150 mg/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75 mg/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 175 mg/L, NaCl 25 mg/L, Proteose-peptone 1g/L의 Proteose-peptone Medium(PPM)을 사용하였다. 배양조건을 온도는 20~25°C, 교반속도는 175 rpm로 하여 250 mL 플라스크(120 mL의 배양액)를 광진탕배양기에서 4일마다 계대 배양하였다.

#### 실험 배지 및 방법

Astaxanthin 생산 최적화를 위하여 녹조류 *H. pluvialis*의 고농도 배양을 수행하거나 세포 내 carotenoid의 농도를 높이는 방법을 수행하기 위하여 다양한 배지를 사용함으로써 배지 내 탄소원, 질소원과 미량원소 등이 세포의 성장과 astaxanthin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 배지는 Hongkong Medium(HKM), Modified Bold's Basal Medium(MBBM), Modified Bristol's Medium(MBM), Proteose-peptone Medium(PPM), BG-11 Medium(BG-11)으로 그 조성은 Table 1과 같다. 배양 방법은 250 mL 플라스크(배양액 120 mL)를 20°C, 175 rpm, 60 μE/(m<sup>2</sup>·s)인

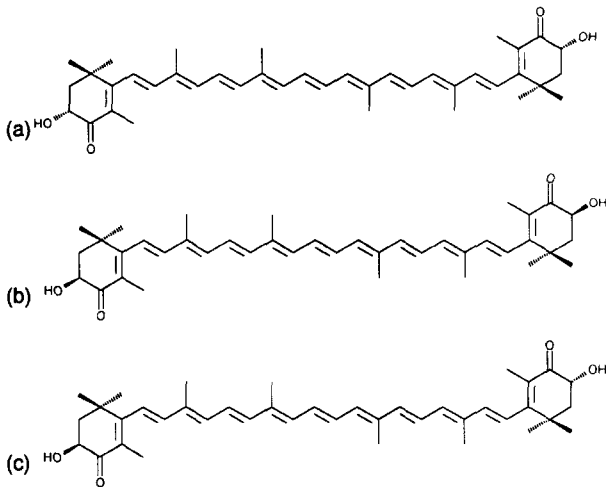


Fig. 1. Optical isomers of astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β'-carotene-4,4'-dione). (a) (3R, 3'R) form; (b) (3S, 3'S) form; (c) (3S, 3'R) meso form.

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

	Hongkong Medium	Modified Bold's Basal Medium	Proteose-peptone Medium	Modified Bristol's Medium	BG-11 Medium
<b>Major</b>			mg/ L		
NaNO <sub>3</sub>	220.0	246.5	25.0	1500.0	1500.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40.0	175.6	175.0	180.0	40.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	45.0	74.9	75.0	80.0	75.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24.6	70.0	75.0	80.0	36.0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73.0	25.0	25.0	30.0	15.9
NaCl	8.3	25.0	25.0	30.0	6.0
EDTA-FeNa	6.7	5.0		30.0	6.9
NaHCO <sub>3</sub>	1000.0	49.7			1.1
Proteose-peptone			1000.00		
<b>Trace element</b>			μg/ mL		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0	11130.1		2000.0	2860.0
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25.0	8828.5		1000.0	222.0
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	12.0	1572.6		1000.0	79.0
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	16.0	1444.7		1000.0	1810.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.0	1185.4		1000.0	390.0
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.7	494.6		1000.0	49.4

광도 조건에서 광진탕배양기를 이용하여 수행하였다.

세포 수, 세포 농도 및 세포 크기

단위 부피당 세포의 수(cells/mL)는 적절한 농도로 전해질 용액에 희석하여 Coulter Counter(model Z2, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.)를 이용하여 측정하였으며, 50~80,000 fL의 범위에서 3회 측정된 평균값을 이용하여 Accucomp(R) software로 분석하여 세포의 크기 분포도와 입자 수로 나타내어 세포 성장과 분화를 측정하였다. 이 결과를 이용하여, 전체 세포의 부피를 구할 수 있었으며, 세포의 평균비중을 이용하여, 세포의 농도(g/L, 건조질량)로 환산하였다.

색소 분석

세포벽이 두껍고 단단한 조직체인 *H. pluvialis*의 특성상 색소를 분석하기 위해서는 세포벽을 균질화하여 세포 안의 색소를 용매로 녹아나게 하여야 한다. 세포벽을 균질화 하기 위해, 자체적으로 제작한 homogenizer를 예비실험을 거쳐 재현성을 확인한 후 사용하였다.

미세 조류 내의 엽록소 a와 b는 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 homogenizer를 이용, 세포를 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계(model HP8453B, Hewlett Packard, Waldbronn,

Germany)를 이용하여 663 nm, 645 nm 파장에서 측정하여 chlorophyll a =  $(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$ , chlorophyll b =  $(22.9 \times A_{645}) - (4.64 \times A_{663})$  식에 의하여 계산하였다[1].

Carotenoids와 astaxanthin을 측정하기 위하여 세포를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 homogenizer로 세포가 흰색의 잔여물이 될 때까지 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 뒤 상층액을 분광광도계를 이용하여 475 nm 파장에서 측정한 후, 표준시료와 비교하여 농도를 측정하였다.

결 과

여러 배지에서의 세포 성장과 astaxanthin 생산 특성

*H. pluvialis*의 고농도 배양을 수행하기 위하여 최적 배지의 조성 확립이 필요하므로, 기존에 astaxanthin 생산을 위한 미세조류 배양에 쓰여졌던 HKM, MBBM, MBM, PPM, BG-11의 여러 배지를 사용하여 비교함으로써 배지 내 탄소원, 질소원과 미량원소 등이 세포의 성장과 astaxanthin 생산에 미치는 영향을 알 수 있다(Fig. 2). 세포 농도는 HKM, PPM, MBM, BG-11, MBBM의 순이고(Fig. 2), 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 MBBM, BG-11, MBM, HKM, PPM의 순으로 낮게 나왔다(Fig. 2d). 다른 배지에 비해 질소원이 5~6배정도 많은 BG-11과 MBBM은

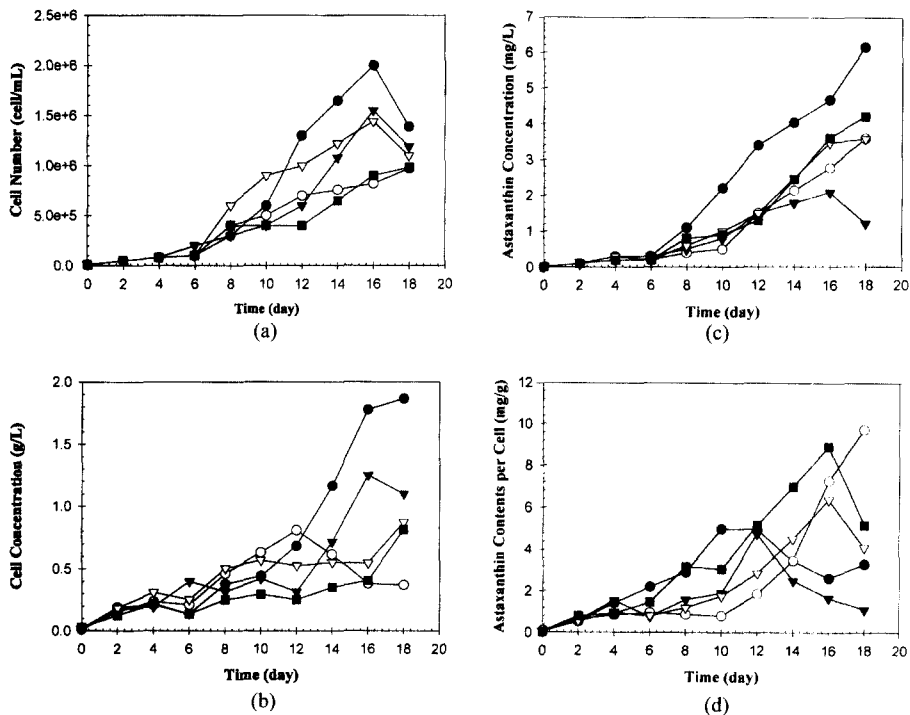


Fig. 2. Cell growth of *H. pluvialis* in various media. Time profiles of (a) cell number (cell/mL); (b) cell concentration (g/L); (c) astaxanthin concentration (mg/L); (d) astaxanthin concentration per cell (mg/g cell).

● - HKM; ○ - MBBM; ▼ - PPM; ▽ - MBM; ■ - BG-11.

세포 농도가 각각  $4.19 \times 10^5$ 와  $3.6 \times 10^5$  cells/mL로 낮으나, 세포 당 astaxanthin content는 8.9 mg/g cell, 9.7 mg/g cell로 높게 나타나는 경향을 보였고, 성장과정을 살펴보면 이 두 가지 배지에서 자라는 세포는 aggregation이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 질소원의 uptake를 저해한다는 것을 알 수 있었다. HKM은  $2.0 \times 10^6$  cells/mL의 세포 농도와 최고 6.14 mg/L의 astaxanthin 농도로 다른 배지 중 가장 높게 나타났으나, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 최고 4.9 mg/g cell에 지나지 않았다. 세포 농도를 높이기 위해서는 질소원이 220 mg/L인 HKM이 우수하고, 색소 형성을 촉진시키기 위해서는 aggregation이 일어나는 MBBM이 유효함을 알 수 있었다.

배양 온도의 영향

*H. pluvialis*의 최적 배양 온도를 선정하기 위하여 20°C, 25°C, 30°C 온도의 배양 조건을 수립하였으며, 온도에 따른 세포 성장 및 색소 형성에 미치는 결과에 대해 관찰하였다 (Fig. 3a). 30°C에서는 aplanospore의 형성은 촉진되나 세포의 생장이 매우 어렵고, 20°C와 25°C에서는 세포 성장과 색소 형성이 거의 비슷하게 나타나는 것을 관찰 할 수 있었으며, 최적의 pH, light 세기 조건과 배양에 적당한 20°C, 25°C에서 배양하다가 30°C로 24시간 배양하는 heating

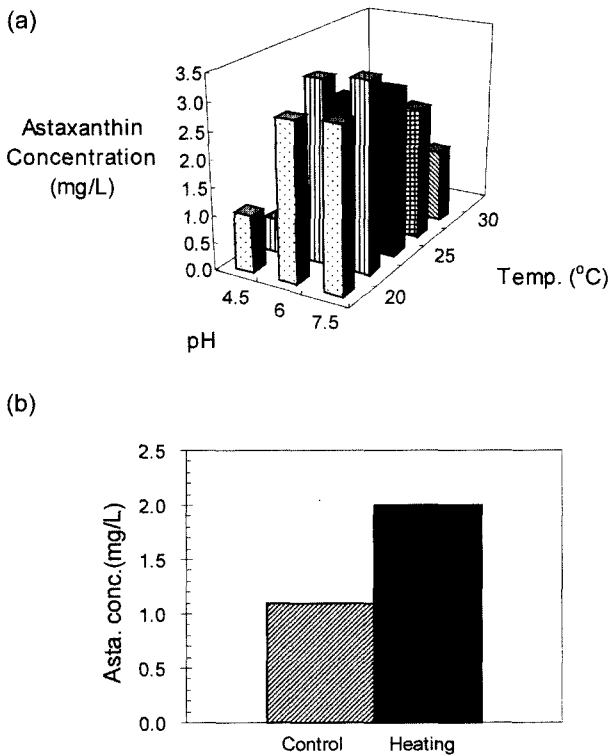


Fig. 3. The effect of temperature and pH on astaxanthin accumulation. (a) effect of temperature and pH; (b) heating effect.

효과를 주면 heating을 하지 않는 대조구에 비해 183% astaxanthin의 축적함을 보였고, 따라서 배양후기의 heating은 astaxanthin의 축적을 촉진하는데 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 3b). 온도에 의한 astaxanthin의 축적 촉진은 별도의 실험을 통하여 자세히 고찰할 필요가 있다.

초기 pH의 영향

배양 배지의 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 UTEX에서 분양 받은 균주의 배지인 PPM 배지의 초기 pH 6.3을 기초로 하여 pH 4.5, 6.0, 7.5의 범위의 조건과 광도  $30 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 에서 실험을 수행한 결과, Fig. 3a에서와 같이 pH 4.5의 범위에서는 세포의 성장과 색소의 생산이 저조하였고, pH 6.0과 7.5의 범위에서는 세포의 생장은 거의 비슷하나 단위 세포 당 색소의 생산이 pH 7.5에서 가장 우수하였기 때문에 이 조건을 최적의 초기 pH 조건으로 결정하였다.

배지 내 영양원의 고갈의 영향

PPM 내의 질소원과 proteose-peptone의 고갈시 세포의 성장의 특성과 astaxanthin 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 control medium,  $\text{NaNO}_3$ 가 없는 배지(w/o N), control medium에  $\text{NaNO}_3$ 가 10%만 들어간 배지(0.1 N), peptone이 없는 배지(w/o P), peptone의 농도가 원래의 10

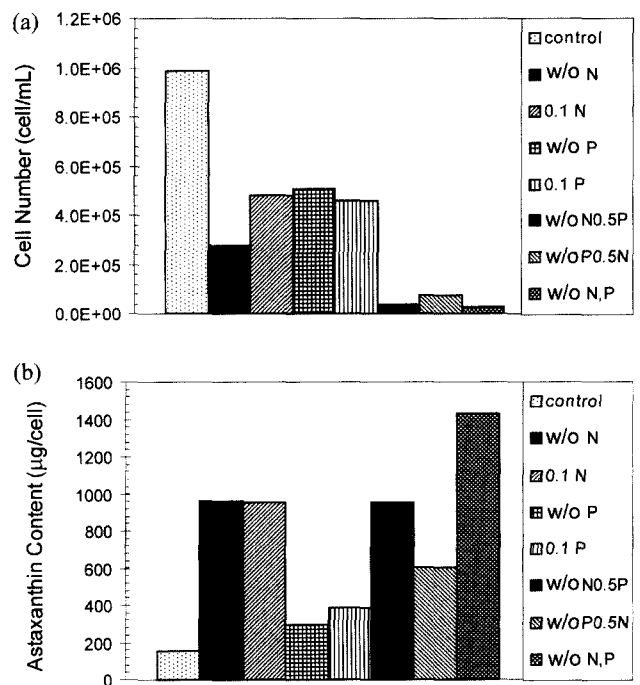


Fig. 4. Cell concentration and astaxanthin concentration in various media.

(a) cell concentration (cell/mL); (b) astaxanthin concentration (µg/cell)

%인 배지(0.1 P),  $\text{NaNO}_3$ 가 없고 peptone이 원래 농도의 반인 배지(w/o N0.5P), peptone이 없고  $\text{NaNO}_3$ 가 원래농도의 반인 배지(w/o P0.5N),  $\text{NaNO}_3$ 와 peptone이 둘 다 없는 배지(w/o N,P) 등을 이용하여, 광도  $30 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  조건에서 실험을 수행하였다(Fig. 4). Control 배지에서 세포 농도와 세포의 건조질량이 각각  $1.0 \times 10^6$  cells/mL와 1.7 g/L로 가장 높게 나왔으나 astaxanthin의 농도는 2.57 mg/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 1.5 mg/g cell이었다.  $\text{NaNO}_3$ 가 없는 배지에서는 세포 농도와 건조질량이 각각  $0.28 \times 10^6$  cells/mL와 0.2 g/L, astaxanthin의 농도는 1.92 mg/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 9.6 mg/g cell이었다. Peptone이 없는 배지에서는 세포 농도와 건조질량이 각각  $0.51 \times 10^6$  cells/mL와 0.7 g/L, astaxanthin의 농도는 1.99 mg/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 2.8 mg/g cell이었으며,  $\text{NaNO}_3$ 와 peptone이 둘 다 없는 배지에서는 세포 농도와 건조질량이  $0.26 \times 10^6$  cells/mL와 0.17 g/L, astaxanthin의 농도는 0.24 mg/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 1.4 mg/g cell로 나왔다. 질소가 고갈 된 배지에서는 세포가 성장함에 따라 세포의 크기가 큰 세포가 점차 증가하는 분포도를 보이며 색소가 형성되고 있음을 관찰할 수 있었다. 질소원과 peptone이 고갈되면 세포의 생장은 억제되나 astaxanthin의 생산은 촉진됨을 알 수 있었다.

#### 다양한 광도의 영향(Various Light Intensity)

*H. pluvialis*의 성장과 carotenoid 형성에 영향을 주는 인자 중의 하나인 광도의 영향을 알아보기 위하여 형광등의 수와 거리, 반사체의 이용 등을 통해 15, 30, 60, 75, 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 의 다양한 광도로 조절하였고, 고농도 세포 배양을 위한 여러 가지 배양 조건을 비교 고찰하였다. 세포의 농도를 증가시키는 1단계에서 6일 배양했을 때, 다양한 광도를 공급한 결과 세포의 농도는 각각 0.20 g/L, 0.41 g/L, 0.54 g/L, 0.50 g/L, 0.55 g/L로 나왔다(Fig. 5). 이는 15나 30  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 의 낮은 광도에서보다는 60, 75, 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

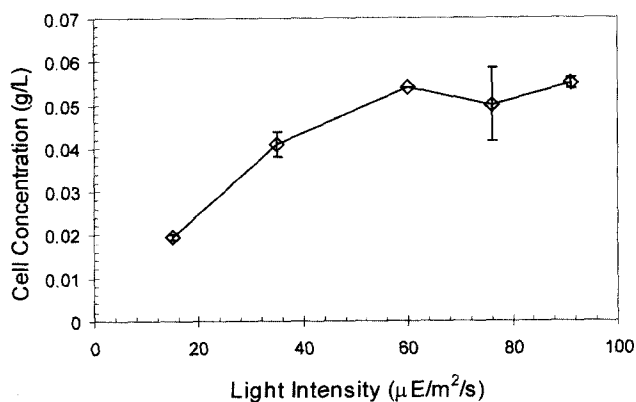


Fig. 5. Effect of light intensity on final cell concentration.

s)의 광도에서 세포가 더 잘 자라는 결과를 보여주고 있고, 60, 75, 90  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 의 세포 농도가 거의 비슷하므로 에너지의 효율면에서 세포 성장을 위한 최적의 광도는 60  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 임을 알 수 있었다.

## 고 찰

여러 배지 내에서의 *Haematococcus pluvialis*의 성장 특성

여러 배지를 사용하여 배지 내 탄소원, 질소원과 미량원소 등이 세포의 성장과 구조적 변화에 미치는 영향을 알아보았다. 다른 배지에 비해 질소원이 5~6배정도 많은 BG-11과 MBBM은 최종 세포농도가 각각  $9 \times 10^5$ ,  $8.18 \times 10^5$  cells/mL로 낮았으나, astaxanthin의 농도는 각각 8.9 mg/g cell, 9.7 mg/g cell로 높게 나타나는 경향을 보였고, 성장과정을 살펴보면 이 두 배지에서 자라는 세포는 vegetative 단계 후반에서부터 aggregation이 일어나고 이로 인해 영양원의 uptake를 저해 받아 aplanospore 세포의 형성이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었고 배지 내에 질소원이 고갈된 경우 aplanospore 세포의 크기가 control 배지의 aplanospore 세포의 크기보다 크고 붉은 색의 농도 또한 진한 것을 쉽게 관찰할 수 있었다.

#### *Haematococcus pluvialis*의 고농도 배양

유용한 천연 astaxanthin 생산에 가장 우수한 *H. pluvialis*의 고농도 배양을 수행하고자, 세포의 배양 조건의 최적화와 세포 내 색소 농도를 높이기 위해 다양한 종류의 배지의 이용, 온도와 pH를 조절한 최적의 배양 조건의 확립, 다양한 파장의 광원의 공급, 광도의 조절 그리고 배지 내 영양원의 고갈 실험을 수행하였다. 다른 종류의 배지를 사용한 결과 기존에  $1.2 \times 10^6$  cells/mL 수준에 머물렀던 세포의 농도를  $1.8 \times 10^6$  cells/mL 수준으로 올릴 수 있었고, 배양에 적합한 HKM 배지와 색소 형성을 촉진하는 MBBM 배지를 찾아 4.9 mg/L이던 세포 당 astaxanthin의 농도를 10 mg/L 수준으로 올렸다(Fig. 2). 보고된 연구 결과에 의하면 9 mg/L 농도의 astaxanthin을 얻었는데[39], 이에 반해 *H. pluvialis* 생장의 최적화를 광원과 광도, 배지 그리고 배양 조건에서 수립한 본 실험실에서는 25 mg/L의 astaxanthin 농도에 도달하였다.

## 요 약

고부가가치의 천연 astaxanthin의 생산을 위한 *H. pluvialis*의 고농도 배양을 수립하기 위하여 세포 농도를 증가시키는 방법과 세포 내 색소를 증가시키는 방법 두 가지에 초점을 맞춰 본 연구를 수행하였다. Hongkong Medium (HKM), Modified Bold's Basal Medium(MBBM), Modified

Bristol's Medium(MBM), Proteose-peptone Medium(PPM), BG-11 Medium의 여러 배지를 사용하여 비교함으로써 배지 내 탄소원, 질소원과 미량원소 등이 세포의 성장과 astaxanthin 생산에 미치는 영향을 보면 HKM은  $2.0 \times 10^6$  cells/mL의 세포 농도와 최고 6.14 mg/g cell의 astaxanthin content per cell로 다른 배지 중 가장 높게 나타나므로 세포 농도를 높이기 위해서는 질소원이 220 mg/L인 HKM이 적당하고, 색소 형성을 촉진시키기 위해서는 aggregation이 일어나 단위 세포당 astaxanthin 함량이 9.7 mg/g cell로 높게 나타나는 MBBM이 월등함을 알 수 있었다. *H. pluvialis*의 최적 배양 온도와 pH를 선정하기 위하여 20 °C, 25°C, 30°C 온도와 pH 4.5, 6.0, 7.5의 배양 조건을 수립한 결과 pH 7.5, 20°C와 25°C에서는 세포 성장과 색소 형성이 우수함을 관찰 할 수 있었고, 배양에 적당한 20, 25°C에서 배양하다가 30°C로 24시간 배양하여 heating 효과를 주면 astaxanthin 축적을 촉진시키는데 효과적임을 알 수 있었다. PPM 내의 질소원과 proteose-peptone의 고갈시 세포의 성장의 특성과 astaxanthin 생산에 미치는 영향은 control 배지에서 세포 농도와 세포의 건조질량이 각각  $0.98 \times 10^6$  cells/mL와 1.7 g/L로 가장 높게 나왔으나 astaxanthin의 농도는 2.57 g/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 1.5 mg/g cell 로,  $\text{NaNO}_3$ 가 없는 배지에서는 세포 농도와 건조 질량이 각각  $0.28 \times 10^6$  cells/mL와 0.2 g/L, astaxanthin의 농도는 1.92 mg/L, 단위 세포 당 astaxanthin의 농도는 9.6 mg/g cell로 관찰되었다. 결론적으로, 질소원과 peptone이 고갈되면 세포의 성장은 억제되거나 astaxanthin의 생산은 촉진됨을 알 수 있었으며, 세포 성장을 촉진하는 광도 60  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 와 HKM 배지 이용의 1단계와 높은 광도와 MBBM 배지를 이용한 색소 생산의 2단계 배양을 최적 조건으로 수립하였다.

### 감사의 말

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 신진교수과제 연구비(1998-003-E00529)에 의하여 지원되었습니다. 이에 감사 드립니다.

### REFERENCES

1. Becker, E. 1994. *Biotechnology and Microbiology* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
2. Bon, J. A., T. D. Leathers, and R. K. Jayaswal. 1997. Isolation of astaxanthin - overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.*, **19**: 109-112.
3. Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints *J. Appl. Phycol.*, **9**: 393-401.
4. Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters *J. Biotechnol.*, **70**: 313-321.
5. Borowitzka, M. A. 1999. Patents *J. Appl. Phycol.*, **11**: 399-403.
6. Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka. 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
7. Britton, G., R. J. Weesie, D. Askin, J. D. Warburton, L. Gallardo-Guerrero, F. J. Jansen, H. J. M. d. Groot, J. Lugtenburg, J.-P. Cornard, and J.-C. Merlin. 1997. Carotenoid blues: Structural studies on carotenoproteins *Pure Appl. Chem.*, **69**: 2075-2084.
8. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, T. Handa, and N. Nishio. 1997. Isolation and characterization of compactin resistant mutants of an astaxanthin synthesizing green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, **19**: 299-302.
9. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, H. Ishii, and N. Nishio. 1997. Enzymatic conversion of  $\beta$ -carotene to astaxanthin by cell-extracts of a green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, **19**: 443-446.
10. Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, S. Nagai, and N. Nishio. 1997. Increased Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Mutants Isolated as Resistant to Diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**: 429-434.
11. Fang, T. J. and T. -Y. Chiou. 1996. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FSS01. *J. Ind. Microbiol.*, **16**: 175-181.
12. Fontana, J. D., M. B. Chocial, M. Baron, M. F. Guimaraes, M. Maraschin, C. Ulhoa, J. A. Florencio, and T. M. B. Bonfim. 1997. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: Optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**: 305-314.
13. Fontana, J. D., M. F. Guimaraes, N. T. Martins, C. A. Fontana, and M. Baron. 1996. Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low -cost media. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**: 413-422.
14. Fraser, P. D., Y. Miura, and N. Misawa. 1997. *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes *J. Biol. Chem.*, **272**: 6128-6135.
15. Gradelet, S., Le, Bon AM, Berges, R, Suschetet, M and Astorg, P. 1998. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat; role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogen.*, **19**: 403-411.
16. Gradelet, S., A. M. Le Bon, R. Berges, M. Suschetet, and P. Astorg. 1998. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B-1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B-1 metabolism *Carcinogen.*, **19**: 403-411.
17. Grunewald, K., C. Hagen, and W. Braune. 1997. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris* *Eur. J. Phycol.*, **32**:387-392.
18. Guerrero, A., P. Partal, M. Berjano, and C. Gallegos. 1996. Linear and Non-linear Viscoelastic Behaviour of o/w Emulsions Containing Sulflower oil and A Food Emulsifier at *Proc. 12th Int. Congr. on Rheology* Quebec City, Chemical Engineering.

19. Harker, M., J. Hirschberg, and A. Oren. 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange Gram-negative coccus *Int. J. Sys. Bact.*, **48**:543–548.
20. Harker, M., A. J. Tsavalos, and A. J. Young. 1996. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor *J. Ferment. Bioeng.*, **82**: 113–118.
21. Harker, M., A. J. Tsavalos, and A. J. Young. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Biores. Technol.*, **55**: 207–214.
22. Jonas, R. and L. F. Farah. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degrad. Stab.*, **59**: 101–106.
23. Kajiwara, S., P. D. Fraser, K. Kondo, and N. Misawa. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **324**: 421–426.
24. Kawakami, T., M. Tsushima, Y. Katabami, M. Mine, A. Ishida, and T. Matsuno. 1998. Effect of beta, beta-carotene, beta-echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **226**: 165–174.
25. Kesava, S. S., G. H. An, C. H. Kim, S. K. Rhee, and E. S. Choi. 1998. An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *Bioproc. Eng.*, **19**: 165–170.
26. 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.
27. Kobayashi, M., T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimura, and Y. Tsuji. 1997. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**: 351–356.
28. Kobayashi, M., Y. Kurimura, and Y. Tsuji. 1997. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.*, **19**: 507–509.
29. Kucsera, J., I. Pfeiffer, and L. Ferenczy. 1998. Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) *Antonie Van Leeuwen. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **73**: 163–168.
30. Kusdiyantini, E., P. Gaudin, G. Goma, and P. J. Blanc. 1998. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Lett.*, **20**: 929–934.
31. Margalith, P. Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 431–438.
32. Martinez, C., G. Hermosilla, R. Leon, G. Pincheira, and V. Cifuentes. 1998. Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek International J. Gen. Mol. Microbiol.*, **73**: 147–153.
33. Miura, Y., K. Kondo, T. Saito, H. Shimada, P. D. Fraser, and N. Misawa. 1998. Production of the carotenoid lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 1226–1229.
34. Miura, Y., K. Kondo, T. Saito, H. Shimada, P. D. Fraser, and N. Misawa. 1998. Production of the Carotenoids lycopene,  $\beta$ -Carotene, and Astaxanthin in the Food Yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 1226–1229.
35. Nishino, H. 1998. Cancer prevention by carotenoids *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.*, **402**: 159–163.
36. Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.*, **12**: 499–506.
37. Storebakken, T., Foss, P. Schiedt, K. Austreng E, liae-Jensen, S and Manz, V. 1987. Carotenoids in diets for salmonids pigmentation of atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin *Aquaculture*, **65**: 279–292.
38. Stradi, R., J. Hudon, G. Celentano, and E. Pini. 1998. Carotenoids in bird plumage: the complement of yellow and red pigments in true woodpeckers (Picinae) *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, **120**: 223–230.
39. Terao, J. 1989. Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, **24**: 659–661.
40. 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.
41. Yanar, M., M. Kumlu, M. Celik, Y. Yanar, and N. Tekelioğlu. 1997. Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carotenoids from red pepper *Israeli J. Aquaculture-Bamid.*, **49**: 193–198.
42. Zhang, D. H. and Y. K. Lee. 1997. Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, **9**: 459–463.
43. 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.

(Received Jul. 10, 2001/ Accepted Sep. 14, 2001)