

## Bubble-column Photobioreactor에서의 Astaxanthin 유도배양의 연구

최수립, 서인수, 이철균

인하대학교 생물공학과, 생물산업기술 연구소

전화 (032) 865-7518, FAX (032) 872-4046

### Abstract

This study investigated a lab-scale inducing method for efficient astaxanthin accumulation. As a model system, *Haematococcus pluvialis* was cultivated in 2 liter bubble-column photobioreactors. The astaxanthin-inducing results using high light irradiation were compared with that of the control experiment under standard irradiation ( $40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ). After the late linear growth phase ( $> 20$  days), high light energy ( $230 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) was supplied to the culture broth for astaxanthin induction. As a result, the dry cell weight and the astaxanthin productivity were increased up to 68% and 215%, respectively, higher than those of the control experiment. This result indicates that bubble-column type photobioreactor is a good candidate for mass cultivation of *H. pluvialis* and high light irradiation is an efficient induction method for astaxanthin accumulation in lab-scale bubble-column photobioreactors.

Key Words: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin accumulation, bubble-column photobioreactor, light stress

### 서 론

Astaxanthin(3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta'$ -carotene-dione)은 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 고부가의 새로운 용도의 활용방법이 지속적으로 개발되고 있다.

최근 astaxanthin을 생산하는 새로운 기술들로서 *Haematococcus pluvialis* 균주를 고농도 대량배양하는 방법에 관한 연구가 활발하다. 현재 상용화되어 있는 기술은 태양광을 이용할 수 있는 옥외배양조(open pond)에서 대량배양된 바이오매스를 이용하여 저순도의 astaxanthin 상품을 생산하는 공정이 개발되어 있으며, 고부가 상

품의 판매를 목표로 고순도의 astaxanthin 상품을 생산하기 위한 고농도 순수배양 기술 개발이 진행 중에 있다.

본 연구는 실험실 규모의 bubble-column photobioreactor을 이용하여 고농도의 astaxanthin을 축적시키는 것으로 알려진 *Haematococcus pluvialis*를 배양하고 효과적으로 astaxanthin의 축적을 유도하기 위한 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

실험에 사용된 균주로는 *Haematococcus pluvialis* (UTEX 16)를 사용하였고, MBBM(Modified Bold's Basal Medium)<sup>1)</sup>를 이용하여 25℃의 shaking incubator에서 계대하였다. 초기 균체 농도는  $1 \times 10^4$  cell/mL으로 접종하였고, 2.5 L 규모의 bubble-column photobioreactor를 자체 제작하였으며, 배양부피를 2 L로 하여 배양하였다 (Table 1). 배양 방법은 25℃ 범위에서 온도를 유지하였고 외부 형광등을 이용 광도를 조절하였다. 초기광도는  $40 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 하였고 배양 후 20일에 astaxanthin의 축적을 위해 광도를  $230 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 올려주었다. 5% CO<sub>2</sub>를 0.2 VVM으로 주입함으로써 탄소원의 공급효과를 주었고, pH를  $7 \pm 0.5$ 로 유지하였다. 배양결과 분석은 세포 농도는 Coulter Counter (model Z2, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U. S. A.)를 이용하여 측정하고 Accucomp(R) software로 측정결과를 분석하였다. 이를 통하여 균체의 크기 분포도와 입자 수로 나타내어 세포 생장과 분화 등 성장 특징을 관찰하였다. Carotenoid의 농도는 균체를 획득한 후 고순도 아세톤을 넣고 자체 제작한 homogenizer를 이용 균질화한 후 분광광도계(model HP8453B, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany)를 이용하여 측정하였고,<sup>2)</sup> astaxanthin의 농도는 carotenoid의 농도의 90%로 정하였다.<sup>3)</sup>

### 결과 및 고찰

2L 규모의 bubble-column photobioreactor에서 *H. pluvialis*의 성장 상태를 확인하기 위하여 접종 후 2일, 17일, 30일 때의 균체크기 분포도(cell size distribution)를 확인하였다. 2일째는 분열이 진행중인 접종초기이기 때문에 균체크기는 크지않고 개체수도 많지 않으나, 17일째는 분열이 끝난 상태로 균체수가 접종초기보다 많아졌다. 배양 후반부인 30일째에는 균체크기가 전체적으로 커진 것을 확인할 수가 있는데 이 때는 균체가 aplanospore 형태로 있으며 astaxanthin을 축적시키는 상태임을 알 수 있다<sup>4)</sup>(Fig. 1).

그리고 Fig. 2(a)의 세포갯수의 변화를 보면, 배양 결과 8일까지는 급속한 분열을 하다가 그 이후 정지기에 들어갔고, 26일까지는 균체크기가 증가하였다. 20일에는 고광도의 빛에너지를 공급하여 astaxanthin의 축적을 유도하였으며, 그 결과 대조구에 비해 건조균체중량이 2.26 g/L 증가되는 효과와 astaxanthin의 축적량이 635.09

ng/cell 증가되는 효과가 나타났다. 이는 68%의 건조균체중량 증가와 215%의 astaxanthin 축적량의 향상을 유도한 것이다(Fig. 2). 그리고 건조균체중량당 astaxanthin의 축적량은 약 4%(w/w)가 되었다. 또한 최고 건조균체중량인 5.6 g은 세계수준의 값으로 실험실 규모의 bubble-column photobioreactor에서 고광도의 빛 조사를 통한 유도배양이 *H. pluvialis*의 배양에 유용함을 확인할 수 있었다.

### 요 약

본 연구에서는 자체 제작한 2L 규모의 bubble-column photobioreactor에서 *H. pluvialis*의 배양을 시도하였고 astaxanthin의 축적량 증가를 유도하기 위하여 배양 시작 20일 후에 light stress를 주었다. 이 방법을 통하여 대조구에 비하여 68%의 건조균체중량 증가와 215%의 astaxanthin 축적량 증가를 유도할 수가 있었고, bubble-column photobioreactor를 이용한 유도배양이 *H. pluvialis*의 배양에 적합함을 알 수가 있었다.

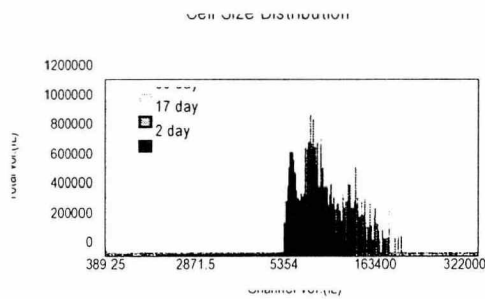
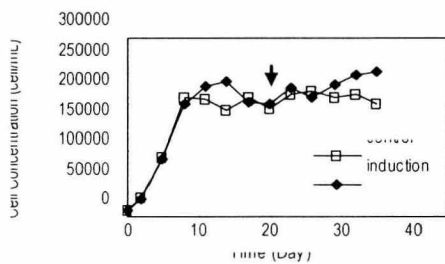


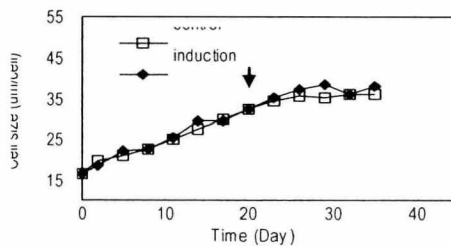
Figure 1. Cell size distribution at different sampling time



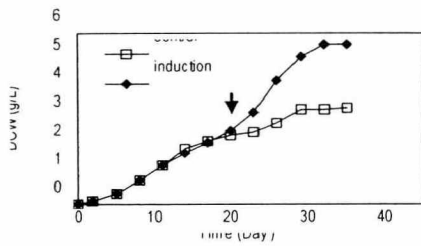
(a)

|                  |      |
|------------------|------|
| Total vol. (L)   | 2.5  |
| Working vol. (L) | 2    |
| Height (cm)      | 60   |
| Diameter (cm)    | 9    |
| H/D ratio        | 6.67 |
| S/V ratio        | 0.11 |

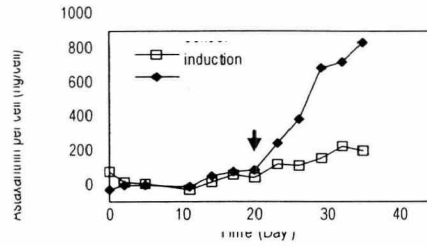
Table 1. Dimension bubble-column photobioreactor



(b)



(c)



(d)

Figure. 2. (a) Cell concentration (cell/mL) (b) Cell size ( $\mu\text{m}/\text{cell}$ )  
 (c) Dry cell weight (g/L) (d) Astaxanthin per cell (ng/cell)

Symbols: control: constant light supply

induction: high light irradiation for astaxanthin induction

#### 참고문헌

1. 박은경, 서문원, 이철균 (2001) "배지조성이 *Haematococcus pluvialis*의 생장과 Astaxanthin 생산에 미치는 영향" 산업미생물학회지 29(4):227-233
2. Park, E. K., Lee, C. G. (2001) "Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths" *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(6):1024-1030
3. Margalith, P. Z. (1999) "Production of ketocarotenoids by microalgae" *Appl Microbiol Biotechnol* 51:431-438
4. Lee, Y. K., Ding, S. Y. (1994) "Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris*" *J. Phycol.* 30:445-449