



공학석사학위논문

Two-stage cultivation system을 이용한 미세조류 성장 최적화 및

스트레스 조건별 고부가가치 물질의 축적 촉진



부경대학교 대학원

해양수산생명과학부 생물공학전공

김재근

공학석사학위논문

Two-stage cultivation system을 이용한 미세조류 성장 최적화 및

스트레스 조건별 고부가가치 물질의 축적 촉진

지도교수 정귀택

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2024년 2월

부경대학교 대학원

해양수산생명과학부 생물공학전공

김재근

김재근의 공학석사 학위논문을 인준함.

2024년 2월 16일



목	차
---	---

List of Figuresiii
Abstractv
1. 서론1
2. 재료 및 방법······7
2.1. 미세조류 및 배양조건7
2.2. 미세조류 배양에서의 광원8
2.3. One-stage 배양을 통한 미세조류 성장최적화10
2.4. Two-stage 배양을 통한 아스타잔틴 축적 유도10
2.5. 미세조류 바이오매스 성장 측정
2.6. 미세조류로부터 아스타잔틴 추출
2.7. HPLC 분석·····13
2.8. 통계 분석
3. 결과 및 고찰
3.1 One-stage 배양에서 배지 조성에 따른 미세조류 성장15
3.2. Two-stage 배양에서 N source 고갈 여부 및 파장에 따른 미세조류 내 아스타잔틴 축적 효과
3.3 Two-stage 배양에서 C source 공급 여부 및 광도에 따른 미세조류 내 아스타잔틴 축적 효과

내 아스타잔틴 죽적	대한 미세조류	염 스트레스에	e 배양에서	.4. Two-stage	3
				효과	
44			•••••	결론	4.
		•••••	• • • • • • • • • • • • • • • •	참고문헌	5.



List of Figures

- **Figure 1.** Molecular structure of astaxanthin (3,3)-dihydroxy- β - β -carotene-4,4)-dione).
- Figure 2. Utility of microalgae.
- Figure 3. Light source and wavelength for each stage of the two-stage cultivation system.
- Figure 4. Chlorella zofingiensis cells observed under an optical microscope.
- Figure 5. Effect of N source concentration on the growth of *C. zofingiensis*.
- Figure 6. Effect of P source concentration on the growth of C. zofingiensis.
- Figure 7. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance, N artificial depletion, and N natural depletion conditions.
- Figure 8. Cell growth and N source consumption under N source maintenance conditions during the second stage for each wavelength.
- Figure 9. Cell growth and N source consumption under N source artificial depletion conditions during the second stage for each wavelength.
- Figure 10. Cell growth and N source consumption under N source artificial depletion conditions during the second stage for each wavelength.
- Figure 11. Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by LED wavelength under second stage.
- Figure 12. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance, and N natural depletion conditions.
- **Figure 13.** Cell growth and N source consumption under N source maintained and C source (air) supplied conditions during the second stage for each light intensity.
- **Figure 14.** Cell growth and N source consumption according to each light intensity during the second stage under the condition of maintaining N source and not supplying C source (air).
- **Figure 15.** Cell growth and N source consumption under N source natural depletion and C source (air) supplied conditions during the second stage for each light intensity.

- **Figure 16.** Cell growth and N source consumption for each light intensity under conditions of natural depletion of the N source and no supply of the C source (air) in the second stage.
- **Figure 17.** Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by LED light intensity, N source each condition and, C source (air) depletion condition under second stage.
- Figure 18. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance conditions.
- Figure 19. Cell growth and N source consumption during second stage under each salinity stress conditions.
- Figure 20. Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by salinity stress under second stage.
- Figure 21. Accumulation of astaxanthin per gram of *C. zofingiensis* by salinity stress in the second stage.



Optimizing the growth of microalgae and promoting the accumulation of high value-added substances according to stress conditions using a two-stage cultivation system

Jaekeun Kim

School of Marine and Fisheries Life Science (Major in Biotechnology)

The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

Astaxanthin is famous as a super antioxidant, and is a substance with much higher antioxidant power compared to antioxidants such as various vitamins. Based on these useful properties, astaxanthin is being applied to various industries such as food, cosmetics, and pharmaceuticals. In the case of synthetic astaxanthin, there are reports that there is a risk that it may contain traces of residual solvents and chemical reagents, and it is unclear what effect it will have on the human body if consumed over a long period of time. Therefore, the demand for natural astaxanthin is rapidly increasing.

In the case of microalgae, it is a good raw material with fewer by-products and higher production of astaxanthin compared to other raw materials. Microalgae can be easily cultivated anywhere as long as the simple conditions of water, light, and carbon dioxide are met. Among microalgae, *Haematococcus pluvialis* is a good raw material with the highest content for the production of astaxanthin, but it has inherent disadvantages such as low growth rate. On the other hand, *Chlorella zofingiensis* is known to be easier to cultivate, including its high growth rate.

In this study, we optimized culture parameters for productivity of *Chlorella zofingiensis* and analyzed the accumulation of astaxanthin under stress conditions. Microalgae were applied to a two-stage cultivation system, and the first stage was optimized by controlling the N source and P source in the culture medium to maximize biomass production. In the second

stage, a stress environment was created to maximize the accumulation of astaxanthin, and the amount of astaxanthin accumulated was observed using wavelength and light intensity using LED and salt stress. In the first stage, the maximum biomass of 1.88 g dcw/L was produced at an N source concentration of 1.5 g/L, P source 20 mg/L, and fluorescent light intensity of 50 μ mol/m²/s. In the second stage, the maximum amount of astaxanthin was produced at 2.21 mg/L under the conditions of LED green wavelength (520 nm) light intensity of 200 μ mol/m²/s and N source. Compared to other conditions, the production of astaxanthin using *Chlorella zofingiensis* is also judged to be higher in a stress environment because the production of biomass is high under conditions where N source is sufficient.



1. 서론

아스타잔틴은 자연에 널리 분포되어 있는 카로티노이드이며, 일반적으로 식물, 조류 및 광합성 박테리아에서 발견되는 지용성 색소의 일종이다(Hui Ni 등 2008). 아스타잔틴은 항산화와 항암, 항당뇨병, 위, 간, 신경, 심혈관, 안구 활성과 같은 생체 활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(Yuan 등 2002; Yamashita 2012; Tanaka 등 2012). 아스타잔틴의 항산화력은 기존의 다른 항산화제보다 월등히 높은 것으로 알려져 있으며, 그 중 β-카로틴의 10배, 비타민 E의 100배 가량의 항산화 활성을 지닌다(Liu와 Osawa 2007; Shimidzu 등 1996). 또한, 막 인지질과 기타 지질을 과산화로부터 β-카로틴과 루테인보다 더 효과적으로 보호한다고 보고된 바 있다(Goto, S 등 2001; Santocono M. 등 2006). 이처럼 강력한 항산화 특성과 건강상의 이점으로 기능 식품 및 화장품에 많이 사용되며, 일부 국가에서는 식품의 영양성분 강화에 사용하고있다(B. Stachowiak와 P. Szulc 2021).

Grand View Research(Astaxanthin Market Size, Share, Growth & Trends Report 2030, 2020)에 따르면, 전 세계 아스타잔틴 시장 규모는 2019년 10억 달러로 추산되고 있다. 2023년부터 2030년까지 연평균 복합 성장률(CAGR) 17.2%로 확장할 것이며, 더해서 탁월한 효능 및 지속 가능성과 같은 장점으로 인해 예측 기간 동안 CAGR이 빠르게 성장할 것으로 예상된다. 아스타잔틴은 효용성에 대한 인식이 높아짐에 따라 2027년에는 시장 규모가 3억 3억 9,880만 달러에 이를 것으로 예상된다.

아스타잔틴은 천연 유래 제품과 대량 생산 가능한 합성 제품이 화학적 조성, 생체 이용률, 순도 등 품질 측면에서 차이점이 두드러진다. 심지어 합성 아스타잔틴은 장기간 섭취 시 인체 건강에 어떤 영향을 미칠 지 명확하지 않다고 보고되고 있다. 또한 미량의 잔류 용매 및 화학 시약을 포함할 수 있다는 위험성을 지니고 있다(Brendler와 Williamson 2019). 이런 이유로 식품에 비타민, 미네랄 및 기타 물질을 첨가하는 것에 관한 EU 규정(EC No. 1925/2006)에는 식품에 합성 아스타잔틴의 사용을 허용하지 않고 있다(Ausich, R.L 1997). 천연 아스타잔틴은 3 S ,3' S - 및 3 R ,3' R - 입체이성질체(Fig. 1)로 존재하며 유리 및 에스테르화된 형태로 존재한다.



Figure 1. Molecular structure of astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β - β -carotene-4,4'-dione).



Figure 2. Utility of microalgae.

이처럼 천연 아스타잔틴은 효능 및 안전성이 높아 제약, 화장품, 식품 산업에서 주로 사용하고 있다(Grand View Research, 2020). 이에 따라 합성 아스타잔틴보다 천연 아스타잔틴에 대한 수요가 증가하고 있다(Lim 등 2017).

천연 아스타잔틴의 공급원인 미세조류 Haematococcus pluvialis, Chlorella zofingiensis, 붉은 효모종인 Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma), 갑각류 부산물에 대한 관심 또한 높아지고 있다(H. Ciapara 등 2007).

미세조류는 햇빛과 이산화탄소 및 영양분을 바이오매스로 전환시키는 광합성 미생물이다. 토양이나 얼음, 호수, 강, 온천 및 바다와 같이 햇빛과 물이라는 조건만 일치한다면 거의 모든 생태계에서 발견되고 있다. 이러한 조건만 맞춰진다면, 농작물을 경작할 수 없는 척박한 땅에서도 간단한 시설을 이용해 미세조류를 배양할 수 있다(M. Gorgich 2021). 미세조류 바이오매스는 주로 탄수화물, 단백질, 지질로 구성되어 있다. 그 외에도 성장 환경에 영향을 받아 항생제, 카로티노이드, 스테로이드와 같은 희귀한 고부가가치 물질을 함유하는 등 다양한 화합물을 축적한다(M. Fung Pak Hang 2010). 이처럼 미세조류는 가격 대비 시장 규모가 거대하며, CO₂를 기반으로 고부가가치 물질을 생성함으로써 온실가스 배출 억제에 도움을 줄 수 있음과 동시에 재정적으로도 수익성이 있는 재료로 바이오 연료, 바이오 비료, 폐수 처리, 식품 산업 등 여러 산업(Fig. 2)에서 각광받고 있다(Ruoyu Chu 등 2021).

미세조류는 인간의 식량자원과 경쟁하지 않으며, 카로티노이드 생산에 대해 다른 원료들보다 상대적으로 부산물도 적게 발생한다. 이미 미세조류 기반 카로티노이드 생산은 최근 몇 년 동안 집중적으로 연구되고 있으며, 사료 및 식품 개발 분야에서 사용되고 있다. 예로 Dunaliella salina의 β-카로틴(βcarotene), Synechocystis의 제아잔틴(zeaxanthin), Chlorella protothecoides의 루테인(lutein), Haematococcus pluvialis 및 Chlorella zofingiensis의 아스타잔틴(astaxanthin) 등을 들 수 있다(O. Pulz와 W. Gross 2004; Jin Liu 등 2014).

현재 Haematococcus pluvialis와 Chlorella zofingiensis는 천연 아스타잔틴의 가장 유망한 생산 원료로 여겨지고 있다. 특히 H. pluvialis는 세포 내 아스타잔틴 함량이 가장 높고 현재 아스타잔틴의 우수한 생산자로 알려져

4

있다. 하지만 느린 성장, 낮은 바이오매스 수율 및 높은 빛 요구량과 같은 본질적인 단점을 지닌 것으로 보고되었다(Jin Liu 등 2014).

이전에는 바이오디젤 생산의 유망한 공급 원료로 연구되던 단세포 녹조류인 C. zofingiensis가 케토 카로티노이드를 합성할 수 있음이 밝혀지면서 주목할만한 카로티노이드 공급원으로 잠재력이 알려지고 있다(Guy A. Thompson Jr 1996). 특히 루테인, 아스타잔틴, 칸타잔틴(canthaxanthin) 및 제아잔틴 등의 다양한 원료원으로 주목되고 있다. 특히, 2차 케토 카로티노이드인 아스타잔틴은 특정 성장 조건에서 다량으로 축적된다(M. Gorgich 등 2021). 앞서 언급한 *H. pluvialis*와 대조적으로 *C. zofingiensis*는 광독립영양, 종속영양 및 혼합영양 등의 다양한 배양방식으로 빠르게 성장하며, 실내와 실외 모두에서 배양 및 규모 확장이 쉽고 초고밀도 세포 밀도를 얻을 수 있다. 이러한 특성으로 보아 *C. zofingiensis*가 *H. pluvialis* 보다 대량 아스타잔틴 생산에 더 적합할 수 있다(Jin Liu 등 2014).

C. zofingiensis는 엽록체에서 1차 카로티노이드(예: β-카로틴, 루테인 및 제아잔틴)를 합성하고 축적한다. 아스타잔틴, 칸타잔틴 및 아도니잔틴과 같은 2차 카로티노이드는 엽록체 외부의 지질체에 축적되는 것으로 밝혀졌다(Jin Liu 등 2014; M. Rise 등 1994). C. zofingiensis UTEX 32는 높은 복사조도와 질소 결핍 조건에서 칸타잔틴과 아스타잔틴을 축적하는 것으로 보고된 바 있다(M. Rise 등 1994; E. Bar 등 1995).

본 연구에서는 미세조류 C. zofingiensis를 사용하여 배양액의 영양성분 조성,

LED를 이용한 파장 및 광도, 그리고 염 스트레스에 따른 미세조류의 성장과 아스타잔틴의 축적에 대하여 연구하였다.



2. 재료 및 방법

2.1. 미세조류 및 배양조건

본 연구에 사용된 생물자원(*Chlorella zofingiensis*)은 생물자원센터(Korea Collection for Type Cultures; KCTC), 대한민국 전라북도 정읍시)로부터 제공받았다.

C. zofingiensis의 전배양은 멸균된 BG-11배지(M. M. Allen와 R. Y. Stanier 1968)를 이용하여 7일간 배양하여 사용하였다. BG-11 배지의 조성은 리터 당 NaNO₃ 1500 mg, K₂HPO₄ 40 mg, MgSO₄·7H₂O 75 mg, CaCl₂·2H₂O 36 mg, citric acid 6 mg, ammonium ferric citrate green 6 mg, Na₂EDTA 1 mg, Na₂CO₃ 20 mg, H₃BO₃ 2.86 mg, MnCl₂·4H₂O 1.81 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.22 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 mg, CuSO₄·5H₂O 0.08 mg, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05 mg으로 구성되어 있다.

본 연구에서 *C. zofingiensis*의 초기 접종 바이오매스 농도는 흡광도 0.4(680 nm)로 설정하였으며, 2 L 플라스크를 이용하여 working volume 1 L로 설정하여 실험을 수행하였다. 배양 환경으로는 배양 온도 25℃(±2)와 광원으로 형광등을 이용하였으며, 통기량은 pore size가 0.20 µm인 필터(Midisart 2000, Sartorius stedim biotech GmbH, Germany)를 사용하여 여과된 공기를 1 vvm의 유속으로 공급하면서 배양하였다.

2.2. 미세조류 배양에서의 광원

본 연구에서 미세조류 배양에 적용한 광 주기는 two-stage 모두 16:8으로 설정하였다. Seed culture와 One stage 배양에서는 일반적으로 미세조류 배양에 사용되며 흔히 구할 수 있는 형광등을 사용하였다. One stage 배양 단계에서 형광등을 이용하여 배양액의 조성을 달리하며 성장 최적화 조건을 탐색하였으며, 최적화된 조건을 적용하여 two-stage 배양 단계를 수행하였다.

Two-stage 배양 단계 중 first stage에 대한 광원으로는 one-stage에서 최적화된 조건을 고려하여 형광등을 사용하였으며, 이후 second stage에서는 LED바 (90 × 6 × 4 cm³; Ciel Light Co. Ltd., Korea)를 사용하였다. 36개의 발광 다이오드가 1 cm 간격 및 수평으로 배열되어 있는 LED바를 이용해 빨간색(625 nm), 초록색(520 nm), 파란색(465 nm)을 조사하여 빛의 파장에 따른 스트레스 환경을 조성하여, *C. zofingiensis*의 아스타잔틴 축적을 조사하였다. 빛의 파장에 대한 아스트잔틴의 축적의 1차 최적화의 결과에 따라 해당 파장의 광도를 150, 250, 350 μmol/m²/s으로 조절하여 아스타잔틴의 축적의 2차 최적화를 진행하였다.

형광등과 LED 바의 빛의 세기는 광도계(HD2102.2; Ohm S.R.L., Italy)를 사용하여 광원과 플라스크의 가장 가까운 부분을 측정하였다.

8



Figure 3. Light source and wavelength for each stage of the two-stage cultivation system. (A) Fluorescent lights were used as the light source in the first stage. (B), (C), (D) In the second stage, 36 light-emitting diodes with a size of $90 \times 6 \times 4$ cm³ were arranged at 1 cm intervals and horizontally, and each wavelength was irradiated with red (625 nm), green (520 nm), and blue (465 nm).

2.3. One-stage 배양을 통한 미세조류 성장최적화

One-stage 배양을 통해 미세조류의 성장 최적화를 진행하였다. 본 연구에서는 미세조류 배양액의 조성을 조절하였으며, 일반적으로 미세조류 성장에 영향을 주는 N source (NaNO₃)와 P source (K₂HPO₄)의 농도에 따른 미세조류의 성장 최적화 조건을 탐색하였다. 초기 N source의 농도는 1.0, 1.5(control), 2.0, 2.5 g/L로 설정하여 배양하였으며, 이 중 최대 바이오매스 생산량을 가지는 조건을 이용하여 P source 농도에 따른 성장 최적화 조건 탐색을 진행하였다. 초기 P source 농도는 20, 40 (control), 80, 160 mg/L로 설정하였으며, 최대 바이오매스 생산량을 가지는 조건으로 Two-stage 배양 시스템의 first stage 배양 조건으로 적용하였다.

One-stage 배양에서는 C. zofingiensis의 성장곡선을 확인하기 위해 24시간 단위로 시료를 채취하였으며, 채취한 시료는 cell의 농도, N source의 잔여량, P source의 잔여량을 측정하였다.

2.4. Two-stage 배양을 통한 아스타잔틴 축적 유도

Two-stage 배양으로 각 스트레스 환경에 따른 아스타잔틴의 축적을 관찰하였다. Two-stage 중 각각의 first stage에서는 이전 one-stage 배양에서 최적화된 배지 조성으로 *C. zofingiensis*의 바이오매스 생산량 수준을 높였으며, second stage에서 스트레스 환경을 조성함으로써 *C. zofingiensis*의 아스타잔틴 축적을 유도 및 최대 아스타잔틴 축적 조건을 탐색하였다. 1차 second stage에서는 LED를 이용한 빛의 파장(빨간색, 초록색, 파란색)파 N source의 고갈 여부(first stage의 잔여 N source를 임의 조작 없이 seocnd stage로 그대로 전환(N 유지 조건), 인위적인 세척 작업을 통한 N source 인위적 고갈(N 인위고갈 조건), first stage의 초기 N source 농도를 낮게 설정(N 자연고갈 조건))에 따른 아스타잔틴 축적량을 관찰하였으며, 최대 아스타잔틴 생산량을 가지는 빛의 파장을 선정하여 2차 second stage의 광도 및 C source (air)의 공급 여부에 대한 아스타잔틴 축적 유도를 수행하였다. 광도에 대한 변수는 150, 250, 350 µmol/m²/s으로 설정하였으며, 최대 아스타잔틴 생산을 가지는 광도 및 C source 공급 여부에 대한 결과를 적용하여 3차 아스타잔틴 축적 최적화를 진행하였다. 3차 second stage에서는 앞선 최적화 연구에서 가장 높은 아스타잔틴 축적량을 가지는 변수(N source, C source, 파장, 광도)들을 이용하여 염도 스트레스와 P source 추가 공급여부에 대한 아스타잔틴 축적량을 비교하였다. 염도 스트레스에 대한 변수로는 0 (control), 1, 2, 3.5, 5 %(w/v)으로 설정하였으며, P source의 추가 공급은 one-stage에서 최적화된 P source 농도를 설정하여 second stage 전환 직후 1회 공급하였다.

Two-stage 중 first stage에서는 48시간 마다 시료를 채취하였으며, 각 시료는 One-stage와 동일하게 cell의 농도, N source의 잔여량, P source의 잔여량을 분석하였다. Second stgae에서도 48시간 마다 시료를 채취하였으며, 각시료는 cell의 농도, N source의 잔여량, HPLC를 이용한 아스타잔틴 정량 분석을 실시하였다.

2.5. 미세조류 바이오매스 성장 측정

미세조류의 바이오매스 농도는 UV spectrophotometer (Ultrospec[™] 6300 Pro; Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 미세조류의 흡광도와 건조세포 농도를 바탕으로 표준곡선을 작성하여 *C*. *zofingiensis*의 건조세포중량을 측정하였다.

OD_{680nm}에서 *C. zofingiensis*의 건조세포중량에 대한 검량곡선(R²=0.99)은 식(1)과 같다.

Dry cell weight of C. zofingiensis (g DCW/L)

= 0.67 X OD₆₈₀

Eq.(1)

2.6. 미세조류로부터 아스타잔틴 추출

C. zofingiensis로부터 아스타잔틴의 추출은 각 용매별 전처리 및 추출에 대한 Dong et al.(2014)의 연구를 참고하여 수정 후 수행하였다.

Second stage 배양 단계에서 4일마다 미세조류 배양액을 2 mL 수취하여 증류수로 2번 세척 후 -20℃에서 동결시켰다. 동결시킨 미세조류는 4℃에서 해동하여 아스타잔틴 추출에 사용하였다.

미세조류로부터 아스타잔틴 추출 절차는 2단계로 진행되었으며, 먼저 해동된 미세조류에 4N HCl를 첨가하여 70℃, 2분 동안 처리하였다. 전처리된 시료는 원심분리를 통해 상층액 제거 및 바이오매스를 얻었으며, 잔존하는 HCl을 제거하기 위해 위의 방법과 동일하게 증류수로 2회 세척하였다. 세척이 완료된 바이오매스는 아세톤 1 mL에 재현탁하여 4℃에서 1시간 동안 추출하였다.

추출가능한 아스타잔틴의 정량을 위해 15000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하여 상층액을 HPLC를 이용한 분석에 사용하였으며, 모든 아스타잔틴의 추출단계는 빛의 노출을 최소화하여 수행하였다.

2.7. HPLC 분석

아스타잔틴 추출물은 high-perfomance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 아스타잔틴 정량 분석을 실시하다. C18 컬럼(YMC-Pack Pro C18(250 x 10.0 mm, 5µm))을 사용하였다. 이동상으로는 (A) 아세톤 및 (B) 메탄올: H₂0 (9:1, v/v)으로 하여 gradient 조건으로 분석을 진행하였으며, A와 B 사이의 농도 구배를 통해 40분 동안 분석하였다. B는 25분 동안 80%에서 25%로 점진적으로 감소하였고, 10분 동안 20% 및 5분동안 20%에서 80%로 증가시켰다. 유속은 0.8 mL/min 및 컬럼 오븐의 온도는 40℃에서 진행하였으며, 검출기로는 UV 검출기(SPD-10Avp, SHIMADZU, Japan)를 사용하여 474 nm의 파장에서 분석하여 아스타잔틴을 정량분석하였다.

아스타잔틴의 표준물질로는 Sigma사(Saint Louis, MO, USA)의 제품으로

순도 97% 이상의 것을 사용하였으며 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg/mL의 농도에 대한 HPLC 분석피크 면적을 이용하여 농도와 상관된 검량곡선(R²=0.999)을 작성하였다.

2.8. 통계 분석

각 실험은 2~4회 반복 수행하였다. 각 실험 결과의 통계처리는 SPSS 소프트웨어(ver. 27.0; SPSS Inc., Chicago, IL. USA)를 사용하여 일원분산분석(ANOVA) 및 Ducan의 다중 범위 테스트(P < 0.05)를 통해 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. One-stage 배양에서 배지 조성에 따른 미세조류 성장

C. zofingiensis는 담수에서 흔히 발견되는 크기 2~15 μm의 편모가 없는 단세포성 진핵 녹색 미세조류이다(Fig. 4)(Yu Zhang 등 2021). 생명주기는 growing, ripening and maturing, dividing으로 3단계로 주로 나누기도 한다(Y. Morimura 2021). *C. zofingiensis*는 높은 생산성과 여러 스트레스 환경에 대한 높은 저항성으로 *H. pluvialis*에 대한 대체 아스타잔틴 생산자로 주목받고 있다(AK Chowdhary 등 2022).

C. zofingiensis의 최적 성장조건 탐색을 위해 one-stage 배양을 수행하였으며, N source (NaNO₃)와 P source (K₂HPO₄)의 농도를 달리하여 각각 배양을 진행하였다.

배양액내 초기 N source의 농도에 따라 미세조류의 성장 최적화 배양에서는 초기 N source의 농도를 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L, 2.5 g/L으로 진행하였다. 배양시작 19일차에 N source 1.5 g/L의 농도 조건에서 1.72 g dcw/L의 최대 바이오매스 생산량을 보였다. Fig. 5에서 초기 N source의 농도를 2.0 g/L 및 2.5 g/L으로 증가시키면 오히려 바이오매스 생산량이 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 미세조류가 고농도의 질산염에서 질산염 환원효소의 활성을 증가시켜 아질산염과 암모니아 생산을 증가시킨다. 이때 축적된 아질산염과 암모니아는 미세조류의 성장을 억제시키는 것으로 보이며(J. Jeanfils 등 1993), 이는 Kim (2020)의 연구에서 *Pavlova lutheri, Chlorella vulgaris* 및 Porphyridium cruentum 좋에서도 배양액 내 고농도의 N source가 존재하게 되면 오히려 성장이 억제됨을 확인할 수 있다.

N source 농도를 조절하여 배양했을 때의 최대 바이오매스 생산량을 고려하여, 이후 배양에서는 배양액 내의 초기 N source 농도를 1.5 g/L로 설정하였다.

두번째 성장 최적화 조건 탐색에서는 P source 농도를 조절하여 진행하였으며, 초기 P source의 농도는 각각 20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L으로 설정하였다. First-stage 배양에서 21일 동안 배양했을 때, 초기 P source 농도가 20 mg/L 조건에서 최대 바이오매스 생산량 1.88 g dcw/L 및 0.090 g/L/day의 productivity를 나타내었다(Fig. 6). 40 mg/L에서 1.85 g dcw/L 및 0.088 g/L/day의 productivity를 보였으며, 이는 Feng 등 (2012)의 연구결과에서 P source 농도 10 mg/L와 40 mg/L에서 최대 비성장률을 가진다는 내용과 배양액 내의 초기 P source 농도가 10 mg/L 이상에서는 더 높아질수록 성장속도가 느리다는 결과와 유사하였다.



Figure 4. Chlorella zofingiensis cells observed under an optical microscope.



Figure 5. Effect of N source concentration on the growth of *C. zofingiensis*.



Figure 6. Effect of P source concentration on the growth of C. zofingiensis.

3.2. Two-stage 배양에서 N source 고갈 여부 및 파장에 따른 미세조류 내 아스타잔틴 축적 효과

First stage 배양에서 최대 바이오매스 생산량을 얻기 위해 N과 P source의 농도는 각각 1.5 g/L, 20 mg/L로 설정하였다. 최적 성장 조건에서 14일 동안 first stage 배양 후(Fig. 7, Fig. 12, Fig. 18), second stage에서 스트레스 환경을 조성하여 아스타잔틴의 축적을 유도하였다.

C. zofingiensis를 이용한 아스타잔틴의 축적 및 생산은 배양액 내의 N source의 고갈 또는 광 세기를 증가시켜 스트레스 환경을 조성하며, 이때 미세조류는 자기방어 기작으로 항산화 물질을 내부에 축적하게 된다. 본 연구에서는 첫번째 second stage 배양에서 N source의 고갈 여부와 LED 광원의 파장을 조합하여 아스타잔틴의 축적을 조사하였다.

Two-stage 중 first stage에서는 3가지 조건으로 배양하였으며, 각각의 조건은 다음과 같다(Fig. 7); (1) 성장 최적화 배지의 조성 조건(N 유지), (2) second stage에서 N source와 P source가 없는 fresh BG-11으로 인위적인 세척과정을 거친 조건(N 인위고갈) 및 (3) 초기 N source의 농도를 0.4 g/L로 낮춘 조건(N 자연고갈)으로 진행하였다. N 자연고갈 조건의 경우, one-stage 배양에서 14일 동안 *C. zofingiensis*의 N source 소모량을 고려하여 초기 농도를 0.4 g/L로 설정하였다.

Second stage에서는 LED 파장과 N source 고갈 여부에 따른 미세조류 성장 및 아스타잔틴의 축적 정도를 조사하였다. LED 파장은 200 μmol/m²/s의 광도로 빨간색(625 nm), 초록색(520 nm), 파란색(465 nm)을 조사하여 스트레스 환경을 조성하였다.

C. zofingiensis의 경우 질소원의 존재하에서 first stage의 광도 50 µmol/m²/s에서 second stage 광도 200 µmol/m²/s으로 증가할 경우, 초록색 파장, 15일차에서 바이오매스의 생산량이 최대 3.4 g dcw/L까지 증가하였다(Fig. 8). 또한, 3개의 파장에서 모두 바이오매스의 증가를 보였으며, 이는 스트레스 환경 조성을 위해 조정된 광도 200 µmol/m²/s까지의 증가는 *C. zofingiensis*에게 성장에 좋은 영향을 주는 것으로 판된되며, 바이오매스의 생산량이 증가함에 따라 N source의 소비 또한 first stage에서의 N source 소비 속도 및 소모량과 비교하여 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

성장 최적 조건(first stage)에서 배양 후 N source와 P source가 없는 fesh BG-11 배지로 세척한 후 second stage로 전환 한 경우, 배양액 내의 N source가 인위적으로 고갈되었음을 확인 할 수 있었다(Fig. 9). N source가 인위적으로 고갈됨에 따라, second stage 전환 후 *C. zofingiensis*의 성장은 억제되었다. N 자연 고갈 조건에서는 second stage 전환 후 4일차까지 자연적인 N source의 고갈을 관찰하였으며, N source가 고갈되어 바이오매스의 생산량 또한 N 유지 조건에 비해 현저히 낮은 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 10).

N 인위고갈 조건과 비교하여 N 자연고갈 조건에서 바이오매스의 농도가 최대 약 0.9 g dcw/L 더 증가하였다. 이는, 세척과정에 있어 미세조류의 손상이 발생했을 가능성을 의심해 볼 수 있다. Fig. 9과 Fig. 10에서 보듯이, N source의 고갈은 미세조류의 성장을 심각하게 저해시키는 것을 확인하였으며, 아스타잔틴의 축적량 또한 낮은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 아스타잔틴은 미세조류 내부에 축적되는데, 배양액 내 바이오매스의 농도가 N 유지 조건에서의 바이오매스 생산량보다 현저히 낮으므로 아스타잔틴의 축적량에서의 차이를 보이는 것으로 판단된다. 아스타잔틴의 축적 정도는 바이오매스의 농도가 높은 초록색 파장에서 second stage 16일차에 2.21 mg/L로 가장 높았다(Fig. 11). 16일까지는 시간이 지날 수록 아스타잔틴의 축적 정도가 증가하는 반면, 16일 이후로는 아스타잔틴의 축적정도가 감소하는 경향을 보이며, 스트레스 환경에 더 이상 버티지 못하며 사멸기(death phase)에 접어들어 미세조류가 사멸하고 있는 것으로 판단된다.

Second stage로 전환하기 위해 N source와 P source가 없는 fresh BG-11을 이용하여 인위적인 세척을 진행한 조건에서는 아스타잔틴의 축적량이 다른 조건들에 비해 현저히 낮았다. 이는 *C. zofingiensis*의 아스타잔틴의 축적을 위해서는 질소원의 고갈보다 다른 미량원소의 고갈이 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다..



Figure 7. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance, N artificial depletion, and N natural depletion conditions. (A) Cell growth according to each condition in the first stage of the two-stage, (B) N source consumption according to each condition in the first stage of the two-stage.



Figure 8. Cell growth and N source consumption under N source maintenance conditions during the second stage for each wavelength. (A) Biomass production of *C. zofingiensis* at each wavelength. As the light intensity of the first stage increased from 50 μ mol/m² /s to 200 μ mol/m² /s, the biomass production level of microalgae further increased. Maximum biomass production (3.4 g dcw/L) was obtained on the 15th day at green wavelength (520 nm), (B) N source consumption for each wavelength under N source maintenance conditions.



Figure 9. Cell growth and N source consumption under N source artificial depletion conditions during the second stage for each wavelength. (A) Biomass production of *C. zofingiensis* at each wavelength, (B) N source consumption for each wavelength under N source artificial depletion conditions. For N source artificial depletion conditions, it was washed with fresh BG-11 medium without N source, so the concentration of N source was not observed in the culture medium under N source artificial depletion conditions.



Figure 10. Cell growth and N source consumption under N source natural depletion conditions during the second stage for each wavelength. (A) Cell growth of *C. zofingiensis* at each wavelength, (B) N source consumption for each wavelength under N source natural depletion conditions. After first stage culture at an initial N source concentration of 0.4 g/L, N source was naturally depleted in the second stage.



Figure 11. Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by LED wavelength under second stage. R, G, B refer to the LED wavelength of the experimental group, and the numbers that follow indicate depletion of the N source (1; N source maintenance condition, 2; N source artificial depletion condition, 3; N source natural depletion condition).

3.3. Two-stage 배양에서 C source 공급 여부 및 광도에 따른 미세조류 내 아스타잔틴 축적 효과

1차 아스타잔틴 축적 최적화 second stage 배양에서 *C. zofingiensis*는 LED의 초록색 파장과 배양액 내의 N source가 충분할 때, 오히려 아스타잔틴의 축적량이 가장 높은 것으로 관찰되었다(Fig 10). 2차 아스타잔틴 축적 최적화 second stage 배양에서는 LED 초록색 파장의 광도를 150, 250, 350 µmol/m²/s으로 설정하였으며, 또한 각광도에서 N source 고갈여부(N 유지 조건, N 자연고갈 조건)와 C source (air)의 공급 여부에 따른 아스타잔틴의 축적 정도를 알아보았다.

C. zofingiensis는 1차 Two-stage 배양과 동일하게 성장최적화 조건(first stage)에서 14일간 배양 후(Fig. 12), 아스타잔틴 축적 최적화 배양(second stage)으로 전환하였다.

Fig. 13에서 볼 수 있듯이, *C. zofingiensis*는 초록색 파장, N source 및 C source의 존재하에 광도가 증가할수록 바이오매스 생산량이 다른 조건들에 비해 5.2배까지 높아지는 것을 볼 수 있으며, 광도 350 μmol/m²/s 조건에서 최대 5.96 g dcw/L의 바이오매스 생산량을 얻을 수 있었다. *C. zofingiensis*는 고광도에서 고농도의 바이오매스를 얻을 수 있으며, 고농도의 아스타잔틴 축적에도 유망함을 보인다.

C source가 공급되지 않으면 N source의 소비도 현저히 낮아지며 미세조류의 성장이 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 14, Fig. 16). 때문에, C source가

2 8

공급되지 않는 경우, N source가 0.18 g/L에서 0 g/L로 소모(N 자연고갈 및 C source 공급, Fig. 15)되는 N source의 자연적인 고갈 조건도 충족되지 않았으며, 약 0.1 ~ 0.2 g/L의 N source가 second stage 배양의 24일차까지 존재하였다(Fig. 16). 또한, C source가 공급 되지만 N source의 부족도 미세조류 성장에 악영향을 미치는데 이는, 미세조류 성장은 C source와 N source의 농도에 크게 의존하는 것으로 판단된다(Fig. 15).

2차 아스타잔틴 축적 최적화의 결과(Fig. 17), 높은 바이오매스 생산량을 얻을 수 있는 광도 350 µmol/m²/s, N source 유지 및 C source (air)의 공급 조건에서 아스타잔틴 또한 가장 높은 농도를 얻을 수 있었으며, 앞선 1차 아스타잔틴 축적 최적화 배양에서와 동일하게 16일차에서 6.24 mg/L의 최대 아스타잔틴 수율을 얻을 수 있었다.

Two-stage cultivation system의 second stage에서, 각 스트레스 조건의 12일차~16일차에서 아스타잔틴의 최대수율을 보였으나, *C. zofingiensis*는 16일 이후부터 스트레스 환경을 버티지 못하여 아스타잔틴의 축적 정도가 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 17). 앞선 1차 아스타잔틴 축적 최적화 배양(Fig. 11)에서도 16일차 이후부터 아스타잔틴의 축적 정도가 감소되었던 것과 비교해보았을 때, 기존 스트레스 환경 조건(광도 200 μmol/m²/s)보다 더 강화된 스트레스 환경 조건(광도 350 μmol/m²/s)에서도 동일하게 16일차 이후부터 아스타잔틴의 축적정도가 감소되는 것을 확인하였다. 이는 시간에 따른 아스타잔틴의 축적 경향에는 외부의 스트레스 환경보다 배양액 내부의

영양물질의 조성이 상대적으로 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그리고 아스타잔틴의 축적량에 대해서는 내부 환경보다 외부 스트레스 환경의 영향이 더 큰 것으로 판단된다.

또한, 2차 아스타잔틴 축적 최적화 배양에서는 C source (air)의 공급 여부에 따라 아스타잔틴의 축적 영향을 확인할 수 있다. C source (air)가 공급되지 않으면 cell의 성장에도 심각한 악영향을 미치지만, 아스타잔틴의 축적에도 악영향을 미치는 것을 관찰하였다. N source가 풍부하게 존재하더라도 C source (air)가 공급되지 않으면 현저하게 낮은 아스타잔틴의 축적정도를 관찰할 수 있으며, N source 조차 부족할 경우 cell 내부의 아스타잔틴은 더욱 낮게 축적되는 것을 알 수 있다.



Figure 12. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance, and N natural depletion conditions. (A) Cell growth according to each condition in the first stage of the two-stage, (B) N source consumption according to each condition in the first stage of the two-stage.



Figure 13. Cell growth and N source consumption under N source maintained and C source (air) supplied conditions during the second stage for each light intensity. (A) Biomass production, (B) N source consumption.



Figure 14. Cell growth and N source consumption according to each light intensity during the second stage under the condition of maintaining N source and not supplying C source (air). (A) Biomass production, (B)N source consumption.



Figure 15. Cell growth and N source consumption under N source natural depletion and C source (air) supplied conditions during the second stage for each light intensity. (A) Biomass production, (B) N source consumption.



Figure 16. Cell growth and N source consumption for each light intensity under conditions of natural depletion of the N source and no supply of the C source (air) in the second stage. (A) Biomass production, (B) N source consumption.



Figure 17. Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by LED light intensity, N source each condition and, C source (air) depletion condition under second stage. 150, 250, and 350 mean the intensity of each light of the green wavelength (520 nm) of the LED in the experimental group, and the letters a, b, c, and d that follow indicate whether the N source is depleted and the C source (air) is supplied (a; N source maintenance and air supply conditions, b; N source maintenance and air non-supply conditions, c; N source natural depletion and air supply conditions).

3.4. Two-stage 배양에서 염 스트레스에 대한 미세조류 내 아스타잔틴 축적 효과

앞선 1차와 2차 아스타잔틴 축적 최적화 배양의 결과를 바탕으로 염 스트레스에 대한 C. zofingiensis의 아스타잔틴 축적 정도를 관찰하였다.

염도 스트레스에 의한 아스타잔틴 축적 최적화 배양에서의 배양액 내 영양물질 조건으로는 N source 유지 조건 및 C source (air) 공급 조건으로 설정하였으며, 스트레스 조건으로는 LED 초록색 파장, 광도 350 µmol/m²/s을 바탕으로 NaCl의 농도를 0.0, 1.0, 2.0, 3.5, 5.0 %(w/v)으로 조절하여 아스타잔틴의 축적 정도를 알아보았다.

앞선 배양과 동일하게, *C. zofingiensis*는 성장최적화 배양(first stage)을 14일간 진행하였으며(Fig. 18), 이후 염도 스트레스에 따른 second stage배양을 실시하였다(Fig. 19). Second stage에서 *C. zofingiensis*는 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 cell의 성장률이 낮아짐을 확인할 수 있었다. NaCl 5.0 %(w/v) 농도에서 바이오매스의 생산량은 시간이 지날수록 오히려 줄어들어 0.35 g dcw/L의 최소 바이오매스 생산량을 얻을 수 있었으며 이에 반해, NaCl 0.0 %(w/v) 농도에서는 다른 조건들에 비해 최대 15.2배 높은 5.32 g dcw/L의 최대 바이오매스 생산량을 얻을 수 있었다. *C. zofingiensis*는 염(NaCl)의 농도 2.0 %(w/v) 조건까지는 조금씩 성장을 하는 반면, NaCl 3.5 %(w/v) 조건에서는 cell의 농도가 일정한 것을 관찰하였다.

염도 스트레스에 의한 아스타잔틴 축적 최적화의 결과(Fig. 20),

3 7

바이오매스의 생산량이 높을수록 더 많은 아스타잔틴의 수율을 얻을 수 있었다. NaCl의 농도 0.0 %(w/v) 조건의 16일차에 4.07 mg/L의 최대 아스타잔틴 생산량을 확인하였다. 기존의 연구(M. Harker 등 1996, J.A. Del Campo 등 2004)에서 염 스트레스는 *C. zofingiensis*의 아스타잔틴의 축적을 유도하는 것으로 알려져 있으나, 해당 결과는 반대의 결과를 나타낸다. 하지만 Fig. 21의 cell의 g 당 아스타잔틴의 축적량을 고려해보았을 때, 동일한 결과임을 알 수 있다.

염의 농도가 증가함에 따라, *C. zofingiensis* 내부에 축적되는 아스타잔틴의 농도는 증가하였으며 NaCl 3.5 %(w/v) 조건에서 최대 2.01 mg/g의 아스타잔틴 축적량을 관찰하였다(Fig. 21). 더 높은 염의 농도(NaCl 5.0 %(w/v))에서는 4일차부터 아스타잔틴의 축적량을 HPLC로 분석 및 측정할 수 없었으며, 고농도의 염에 의해 *C. zofingiensis*는 사멸함에 따라 cell 내부에서의 스트레스 환경에 대한 방어기작으로 축적하는 아스타잔틴의 생합성 또한 일어나지 않는 것으로 판단된다(Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21).

앞선 1차와 2차 second stage(아스타잔틴 축적 최적화) 배양에서는 16일차에서 가장 높은 아스타잔틴 수율을 얻을 수 있는 반면, *C. zofingiensis*에게 염 스트레스 환경을 부여하였을 때는 cell 내부의 아스타잔틴은 12일차에서 가장 높은 농도로 축적하는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 21). 이는 염 스트레스에 의해 cell 내부 아스타잔틴 축적의 촉진을 야기할 수 있는 것으로 판단되며, 본연구에서의 진행된 스트레스 환경 조건들을 시간적 순서를 조합하여 고농도의 아스타잔틴을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.





Figure 18. Cell growth and N source consumption during first stage under N maintenance conditions. (A) Cell growth, (B) N source consumption.



Figure 19. Cell growth and N source consumption during second stage under each salinity stress conditions. (A) Cell growth, (B) N source consumption.



Figure 20. Astaxanthin accumulation of *C. zofingiensis* by salinity stress under second stage.



Figure 21. Accumulation of astaxanthin per gram of *C. zofingiensis* by salinity stress in the second stage.

4. 결론

본 연구에서는 Two-stage cultivation system을 *C. zofingiensis* 의 바이오매스 생산량의 증가 및 아스타잔틴의 축적 증가를 위해 적용하였다.

C. zofingiensis의 one-stage 바이오매스의 생산 최적화 부분에서는 first stage에서 배양액 내 N source 1.5 g/L, P source 20 mg/L의 조성으로 1.88 g dcw/L의 최대 바이오매스 생산량을 보였으며, 이후 second stage에서 광도가 증가할수록 바이오매스 생산량도 증가하는 것을 확인하였다. Second stage로 전환 후, C. zofingiensis의 최대 바이오매스 생산 수준은 LED 초록색 파장(520 nm), 광도 350 µmol/m²/s의 조건 최대 바이오매스의 생산량이 5.96 g dcw/L으로 더욱 증가하였다.

아스타잔틴의 축적량 부분에 대해서는 먼저, 1차 아스타잔틴 최적화 배양(각 파장에 대한 아스타잔틴 축적 정도 관찰)에서 빨간색(625 nm), 파란색(465 nm) 파장보다 초록색 파장(520 nm)에서 2.21 mg/L으로 최대 아스타잔틴 축적량을 보였다. 2차 아스타잔틴 최적화 배양(광도에 대한 아스타잔틴 축적 정도 관찰)에서는 광도가 증가할수록 아스타잔틴의 축적량 또한 증가하였으며, 최대 6.24 mg/L의 아스타잔틴 축적량을 확인하였다. 3차 아스타잔틴 최적화 배양(염도 스트레스에 따른 아스타잔틴 축적 정도 관찰)에서는 염(NaCl)의 농도가 증가할수록 단위 부피당의 아스타잔틴 수율은 감소하였으나, *C. zofingiensis*의 단위 무게당 아스타잔틴의 수율은 증가하였다. 또한, 최대 아스타잔틴 축적량을 가지는 second stage 배양 시점이 평균 16일차인 것과 다르게 염도가 증가할수록 12일차에서 C. zofingiensis의 cell 내부 아스타잔틴 축적 정도가 최대인 것으로 관찰되었으며, 염 스트레스는 아스타잔틴의 축적을 촉진 시키는 것으로 판단된다.

C. zofingiensis는 고광도에서 고농도의 바이오매스를 얻을 수 있으며, 고농도의 바이오매스를 바탕으로 고농도의 아스타잔틴의 생산에도 유망함을 보인다.



5. 참고문헌

Hui Ni, Qi-he Chen, Guo-qing He, Guang-bin Wu & Yuan-fan Yang. (2008). Optimization of acidic extraction of astaxanthin from Phaffia rhodozyma. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 9, 51-59

Jian-Ping Yuan, Feng Chen, Xin Liu, Xian-Zhen Li. (2002). Carotenoid composition in the green microalga Chlorococcum. Food Chemistry, 76, 319-325

Eiji Yamashita. (2015) Let astaxanthin be thy medicine. PharmaNutrition, 3, 115-122

Takuji Tanaka, Masahito Shnimizu, Hisataka Moriwaki. (2012). Cancer Chemoprevention by Carotenoids. Molecules, 17(3), 3202-3242

Beatriz Alves Guerra, Rosemari Otton. (2011). Impact of the carotenoid astaxanthin on phagocytic capacity and ROS/RNS production of human neutrophils treated with free fatty acids and high glucose. International Immunopharmacology, 11(12), 2220-2226

Xuebo Liu, Toshihiko Osawa. (2007). Cis Astaxanthin and Especially 9-Cis Astaxanthin Exhibits a Higher Antioxidant Activity in Vitro Compared to the All-Trans Isomer. Biochemical and Biophysical Research Communications, 357(1), 187-193

Nobuyoshi Shimidzu, Masafumi Goto, Wataru Miki. (1996). Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms. Fisheries science, 62, 134-137 Goto, S.; Kogure, K.; Abe, K.; Kimata, Y.; Kitahama, K.; Yamashita, E.; Terada, H. (2001). Efficient Radical Trapping at the Surface and inside the Phospholipid Membrane Is Responsible for Highly Potent Antiperoxidative Activity of the Carotenoid Astaxanthin Biochicica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes, 1512(2), 251-258

Santocono, M.; Zurria, M.; Berrettini, M.; Fedeli, D.; Falcioni, G. (2006). Influence of Astaxanthin, Zeaxanthin and Lutein on DNA Damage and Repair in UVA-Irradiated Cells. J. Photochem. Photobiol. B Biol, 85, 205-215

Barbara Stachowiak & Piotr Szulc. (2021). Astaxanthin for the Food Industry, Molecules, 26(9), 2666

Grand View Research. (2023). Astaxanthin Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source, By Product (Dried Algae Meal, Oil, Softgel), By Application (Nutraceutical, Cosmetics, Aquaculture and Animal Feed), And Segment Forecasts, 2023–2030. Grand View Research, 120

Thomas Brendler & Elizabeth Mary Williamson. (2019). Astaxanthin: How much is too much? A safety review. Phytotherapy Research, 33(12), 3090-3111

Ausich, R.L. (1997) Commercial Opportunities for Carotenoid Production by Biotechnology. Pure Appl. Chem, 69, 2169-2174

Keng Chin Lim, Fatimah Md. Yusoff, Mohamed Shariff, Mohd Salleh Kamarudin. (2017). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. Reviews in Aquaculture, 10(2), 738-773 I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, F. M. Goycoolea. (2007). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46(12), 185-196

Malihe Gorgich, António A. Martins , Teresa M. Mata , Nídia S. Caetano. (2021). Composition, cultivation and potential applications of Chlorella zofingiensis – A comprehensive review. Algal Research, 60, 102508

M. Fung Pak Hang. (2010).Optimization of Photobioreactor for Astaxanthin Production in Chlorella zofingiensis. National University of Singapore

Ruoyu Chu, Shuangxi Li, Liandong Zhu, Zhihong Yin, Dan Hu, Chenchen Liu, Fan Mo. (2021). A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 139, 110689

Otto Pulz & Wolfgang Gross. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 635-648

Jin Liu, Zheng Sun Henri Gerken, Zheng Liu, Yue Jiang, Feng Chen. (2014). Chlorella zofingiensis as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: Biology and Industrial Potential. Marine Drugs, 12(6), 3487-3515

Guy A. Thompson Jr. (1996). Lipids and membrane function in green algae. Biochicica et Biophysica Acta(BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1302, 17-45 Moshe Rise, Ephraim Cohen, Marina Vishkautsan, Miriam Cojocaru, Hugo E. Gottlieb, Shoshana. (1994). Accumulation of Secondary Carotenoids in Chlorella zofingiensis. J. Plant Physiology, 144(3), 287-292

Etan Bar, Moshe Rise, Marina Vishkautsan, Shoshana. (1995). Pigment and Structural Changes in Chlorella zofingiensis upon Light and Nitrogen Stress. J. Plant Physiology, 146(4), 527-534

Mary Mennes Allen, R. Y. Stanier. (1968). Growth and Division of Some Unicellular Blue-green Algae. Microbiology, 51(2), 199-202

Anita Kirroliaa, Narsi R. Bishnoia, Rajesh Singh. (2012). Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae Chlorococcum sp. J. Algal Biomass Utilization, 3(3), 46-53

Supriya Pandey, Ishvarya Narayanan, Ramesh Vinayagam, Raja Selvaraj, Thivah aran Varadavenkatesan, Arivalagan Pugazhendhi. (2023). A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production. Jurnal of Environmental Chemical Engineering, 11(3), 109984

Shengzhao Dong, Yi Huang, Rui Zhang, Shihui Wang, Yun Liu. (2014). Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green AlgaHaematococcus pluvialis. The Scientific World Journal, 2014, 694305

Yu Zhang, Ying Ye, Fan Bai, Jin Liu. (2021). The oleaginous astaxanthin-producing alga Chromochloris zofingiensis: potential from production to an emerging model for

studying lipid metabolism and carotenogenesis. Biotechnology for Biofuels, 14, 119

Yuji Morimura. (1959).Synchronous culture of chorella: I . Kinetic analysis of the life cycle of chlorella ellipsoidea as affected by changes of temperature and light intensity. Plant and Cell Physiology, 1(1), 49-62

Anupreet Kaur Chowdhary, Masatoshi Kishi, Tatsuki Toda. (2022). Enhanced growth of Chromochloris zofingiensis through the transition of nutritional modes. Algal Research, 65, 102723

J. Jeanfils, M-F. Canisius, N. Burlion. (1993). Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized Chlorella vulgaris cells. J. Appl. Phycol., 5, 369-374

S. H. Kim (2020) Enhancement of unsaturated fatty acidproductivity from three microalgae undervarious light emitting diodes stress conditions. MS thesis, pukyong National University.

Pingzhong Feng, Zhongyang Deng, Lu Fan, Zhengyu Hu. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. Journal of Bioscience and Bioengineering, 114(4), 405-410

Mark Harker, Alex J. Tsavalos, Andrew J. Young. (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of Haematococcus pluvialis in a 30 liter air-lift photobioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering. 82(2), 113-118

J. A. Del Campo, H. Rofriguez, J. Moreno, M. A. Vargas, J. Rivas & M. G.

Guerrero, Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis*(Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology. 64, 848-854

