

광합성 녹색 미세조류 *Haematococcus pluvialis*를 이용한 이산화탄소 고정화 및 항산화성 카로티노이드 생산

강창덕* · 박태현* · 심상준†

성균관대학교 화학공학과
440-746 경기도 수원시 장안구 천천동 300
*서울대학교 화학생물공학부
151-742 서울시 관악구 신림동 산56-1
(2005년 11월 29일 접수, 2005년 12월 28일 채택)

Biological CO₂ Fixation to Antioxidant Carotenoids by Photosynthesis Using the Green Microalga *Haematococcus pluvialis*

Chang Duk Kang*, Tai Hyun Park* and Sang Jun Sim†

Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, 300, Cheoncheon-dong, Jangan-gu, Suwon 440-746, Korea
*School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, San 56-1, Shilim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
(Received 29 November 2005; accepted 28 December 2005)

요 약

광합성 미생물을 이용하여 CO₂를 항산화성 카로티노이드를 다량 함유하고 있는 바이오매스로 전환하는 새로운 방법의 생물학적 CO₂ 저감 기술이 제시되었다. 본 연구에서 담수 녹색 미세 조류인 *Haematococcus pluvialis*가 광합성 미생물로 사용되었으며, 이 균주는 녹색의 성장 세포에서 적색의 포낭 세포로 전환될 때 2차 카로티노이드인 astaxanthin을 세포 내에 다량 축적하는 것으로 알려졌다. 균주의 이러한 특성을 이용하여 CO₂가 연속적으로 공급되는 광 반응기에서 자가 영양 배양 방식으로 CO₂ 고정화 및 그것을 통한 astaxanthin 생산 연구가 수행되었다. 녹색 성장 세포의 성장은 5% CO₂ 공급 환경 및 기본 NIES-C 배지에서 최대로 이루어졌다. 적색 포낭 세포로 효과적인 전환을 위해 5% CO₂ 주입과 강한 빛 조사로 이루어진 자가 영양 유도법을 적용하였으며, 이 공정을 통해 9.6 mg/L·day의 astaxanthin 생산성을 획득하였다. 이때 astaxanthin으로 전환되는 CO₂의 균주 내 고정화 속도는 27.8 mg/L·day로 나타났다. 본 연구를 통해 제시된 *H. pluvialis*를 이용한 자가 영양 배양, 유도 공정은 CO₂ 고정화뿐만 아니라 고부가 생리 물질 생산 기능을 겸비하여 새로운 CO₂ 저감기술로 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract – As one of the CO₂ reduction strategies, a biological method was proposed to convert CO₂ to useful biomass with antioxidant carotenoids by photosynthetic microorganisms. One of the photoautotrophs, *Haematococcus pluvialis* is a freshwater green microalga and accumulates the secondary carotenoid astaxanthin during induction of green vegetative cells to red cyst cells. In this study, CO₂ fixation and astaxanthin production using *H. pluvialis* was conducted by photoautotrophic culture in the CO₂ supplemented photo-incubator. Maximum growth rate of *H. pluvialis* was obtained at a 5% CO₂ environment on basic N and P conditions of NIES-C medium. The photoautotrophic induction consisted of 5% CO₂ supply and high light illumination promoted astaxanthin synthesis in *H. pluvialis*, yielding an astaxanthin productivity of 9.6 mg/L·day and a CO₂ conversion rate of 27.8 mg/L·day to astaxanthin. From the results the sequential photoautotrophic culture and induction process using *H. pluvialis* is expecting an alternative CO₂ reduction technology with a function of valuable biosubstance production.

Key words: CO₂ Fixation, *Haematococcus pluvialis*, Carotenoid, Astaxanthin, Antioxidant

1. 서 론

근래에 들어 급증하고 있는 대기 중의 이산화탄소(CO₂) 농도는 지구 온난화의 주범으로 지목되어 CO₂ 처리 및 저감기술에 대한 사

회적 관심이 대두하고 있으며, 그것과 관련된 연구가 CO₂의 분리, 회수, 저장, 재활용 등의 여러 분야에서 활발히 진행되고 있다[1]. 다양한 CO₂ 처리 기술 중에서 광합성 기작을 지닌 생물체를 사용하는 생물학적인 CO₂ 처리법은 대기 중의 CO₂를 섭취하여 생물체 내의 바이오매스로 고정화시키는 방법으로서, 동시에 축적된 바이오매스를 유용하게 활용하는 고부가 가치적 방법이라 할 수 있다[2,3]. 또한,

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: simsj@skku.edu

고부가 생리활성물질을 다량 축적하는 광합성 미생물을 CO₂ 고정화에 적용함으로써 단순히 바이오매스 활용뿐만 아니라 유용 물질 생산을 동시에 실현할 수 있으므로 CO₂ 처리 공정의 가치를 보다 극대화할 수 있다.

광합성 미생물 중의 하나인 *Haematococcus pluvialis*는 녹색 단세포 조류(unicellular green algae)로 최근에 각광을 받고 있는 ketocarotenoid 계통의 astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione)을 다량 축적할 수 있어서 주목되고 있는 조류이다. 붉은 ketocarotenoid인 astaxanthin은 엽황소(xanthophyll) 계열의 카로티노이드 물질 중의 하나이지만 구조적 특이성으로 인해 같은 계열의 β -carotene 또는 lutein 등에 비해 수십 배 이상의 높은 항산화 효과가 있는 것으로 알려졌다. 이러한 고 항산화성 기능으로 인해 astaxanthin은 다양한 생물학적 응용 잠재성이 증가하고 있고, 특히 의약품, 식품 첨가제 및 동물과 치어의 사료 첨가제로 이미 사용되고 있다[4-6].

*H. pluvialis*는 외부 성장 환경에 따라 크게 두 가지 형태, 즉 두 개의 편모를 가지고 유평하는 녹색의 성장 세포 형태(green vegetative cells)와 이동성이 없는 적색의 휴면 포낭 세포 형태(red cyst cells)로 나뉜다. 우호적 환경에서 녹색의 성장 세포가 안정적으로 성장하다가 여러 가지 외부 환경 조건 변화에 따라 발생하는 비우호적 환경에 노출 시 녹색의 세포들은 자기 보호 기작에 따라 적색의 포낭 세포로 전환하며, 이러한 적색의 휴면단계에서 astaxanthin을 다량 축적한다[5, 7-9]. 효과적인 astaxanthin 축적을 위한 녹색 성장 *Haematococcus* 세포의 적색 포낭 세포로의 유도(induction) 방법에는 질소원 고갈, 고 광도 조사, 아세테이트(CH₃COO⁻) 첨가, 높은 온도 충격, 염의 추가, 세포분열 억제제 첨가 등이 있다[10-15].

이러한 다양한 유도 방법들 중에서 특히 *Haematococcus* 배양액에 아세테이트 첨가를 통한 상대적 질소원 고갈법은 그 효과가 매우 큰 것으로 보고되고 있다. 이 방법은 인위적 탄소원 투입에 의한 배양액 내 C/N 비율의 급증에 따른 질소원 고갈 효과를 통해 신속한 세포의 형태 변화를 유도할 뿐만 아니라 astaxanthin 합성을 포함한 적색 포낭 세포의 대사에 필요한 탄소원까지 동시에 제공하는 장점이 있어 다른 유도법에 비해 높은 astaxanthin 축적을 보인다[16-19]. 그러나 장기적인 적색 포낭 세포배양 시 아세테이트 첨가법은 사용된 유기 탄소원으로 인해 고 성장 특성이 있는 타 미생물에 의한 배양액의 오염 위험성이 잠재하여 공정상 적용, 특히 옥외 개방형 공정에는 큰 단점으로 작용할 수 있다[15].

따라서 본 연구에서는 아세테이트를 대신하여 무기 탄소원인 CO₂를 사용하여 상대적 질소원 고갈법에 의한 *H. pluvialis*의 induction을 시도하였다. CO₂를 녹색의 *Haematococcus* 성장 세포들의 배양 공정뿐만 아니라 유도 공정에서도 탄소원으로 사용함으로써 유기 탄소원 배제를 통한 공정의 안정성을 실현하였으며, 더 나아가 추가적인 CO₂ 고정화를 통해 축적된 적색 포낭 세포들의 astaxanthin 함유 거대 바이오매스를 확보하였다. 녹색 *Haematococcus* 세포의 효과적인 성장을 위해 배양 단계에서 세포 성장에 대한 주요 기질, 즉 CO₂, N, P의 효과를 각각 살펴보았다. 또한, 안정적으로 배양된 녹색 성장 세포의 고농도 astaxanthin 함유 적색 포낭세포로의 유도를 위해 강한 조사 광과 CO₂를 이용한 자가 영양 광 유도법(photoautotrophic induction)을 적용하여 그 효과를 살펴보았다. 이때 적색 포낭 *Haematococcus* 세포에 의한 astaxanthin으로의 CO₂ 고정화율도 조사되었다.

Table 1. Composition of NIES-C medium [15]

Component	Dose
Ca(NO ₃) ₂	0.15 g/L
KNO ₃	0.10 g/L
Na ₂ glycerophosphate·5H ₂ O	0.05 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g/L
Tris-aminomethane	0.50 g/L
Thiamine	0.01 g/L
Biotin	0.10 g/L
Vitamin B ₁₂	0.10 g/L
PIV metal solution	3 g/L
(/L)	Na ₂ EDTA; 1 g, FeCl ₃ ·6H ₂ O; 0.196 g, MnCl ₂ ·4H ₂ O; 0.036 g, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.022 g, CoCl ₂ ·6H ₂ O; 4 mg, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O; 2.5 mg

2. 실험

2-1. 균주 및 배지

광합성을 통한 CO₂ 고정 및 카로티노이드 물질 축적을 위한 고 효율 배양을 위해 광합성 녹색 미세 조류인 *H. pluvialis* NIES-144 균주 (National institute for environmental studies, 일본)를 확보하였으며, 표준 배양 배지로 NIES-C 배지를 선정하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같으며, 배지의 pH를 7.5로 적정한 후 고압증기 멸균을 거쳐 배양에 사용하였다.

Astaxanthin 생산을 위한 빛 유도(light induction) 단계에서는 *Haematococcus* 세포들의 효과적인 유도를 위해 NIES-C 배지로부터 질소원을 제거한 NIES-N 배지를 사용하였다. NIES-N 배지는 NIES-C 배지에서 Ca(NO₃)₂와 KNO₃를 CaCl₂·2H₂O 0.13 g/L 및 KCl 0.07 g/L로 각각 대체하여 제조하였으며, 배지의 pH는 NIES-C 배지와 같은 pH 7.5로 고정하였다.

2-2. *H. pluvialis*의 성장

광 배양 시 효율적인 CO₂ 공급 및 용이한 배양 조건 제어를 위해 자체 제작된 CO₂ 혼합 가스 주입 광 배양기(CO₂ fed photo-incubator, Fig. 1)에서 *H. pluvialis* 균주를 150 rpm의 속도로 23 °C에서 진탕 배양하였다. 균주 배양은 CO₂ 혼합가스가 연속적으로 공급되는 각각의 250 mL Erlenmeyer 플라스크에서 130 mL의 배양 부피로 실시하였으며, 이때 공급되는 혼합가스의 유속은 65 mL/min로 유지하였다. 반응기 내의 광 조사는 형광등을 이용하여 12시간 명/암 주기(synchronized illumination)로 이루어졌으며, 광도는 50 μ mol photon/m²s 이었다. 본 연구에서 모든 광도는 LI-250 quantum photometer(Lambda Instrument Corp., 미국)를 이용하여 플라스크 표면에서 측정하였다.

세포 성장은 UV-Vis spectrophotometer(Hitachi, 일본)를 이용하여 측정된 680 nm에서 흡광도를 통하여 간접적으로 관찰하였다. 이때 흡광도와 세포의 건조 질량과는 직선적인 비례관계가 성립하였으며, 그 1차 비례식은 다음과 같다.

$$\text{Dry cell weight (g/L)} = 0.668 \times \text{OD}_{680}$$

세포의 건조 질량은 GF/C 여과지(Whatman, 영국)를 이용하여 여과된 균체들을 80 °C에서 24 시간 동안 건조 후 그 질량을 측정함으로써 얻을 수 있었다.

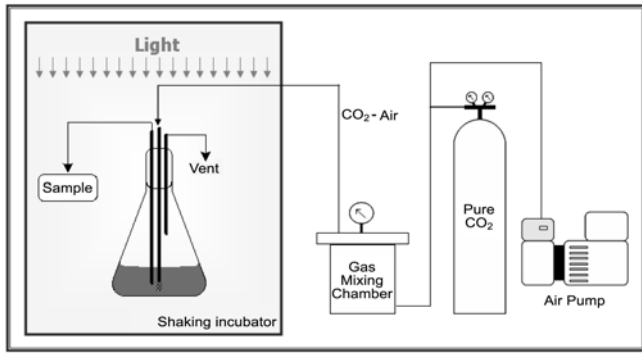


Fig. 1. Schematic diagram of CO₂ fed photo-incubator for culture of *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production.

2-3. 빛 유도 공정

카로티노이드 생산을 위한 적색 포낭 세포 단계로의 빠른 전환을 위해 10일 배양된 녹색 *Haematococcus* 세포들을 원심 분리를 이용하여 수확한 뒤 질소원이 배제된 NIES-N 배지에 재 현탁하였다. 원심 분리는 2,000 g의 속도로 5분간 실시하였으며, 질소원 결핍 배지에 현탁 시 세포의 농도를 0.33 g/L (OD₆₈₀ = 0.5)로 적정한 뒤 CO₂ 혼합가스가 연속적으로 공급되는 환경에서 추가 배양하였다. 이때 *H. pluvialis*의 induction을 위한 광 배양 조건은 광 조사 조건을 제외하고 모두 균주의 성장 조건과 같게 하였다. 반응기 내 광 조사 조건은 연속 조사 방식(unsynchronized illumination)으로 전환하였으며, 광도는 추가적인 형광등을 이용하여 200 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 로 증가시켰다.

2-4. 카로티노이드 추출

세포내 축적된 카로티노이드를 분리하기 위해 우선 8,000 g에서 10분간의 원심 분리를 통하여 세포들을 수확하였다. 수확된 세포들은 증류수로 한번 세척 후 dichloromethane과 methanol의 혼합 용매(1:3, v/v)에서 초음파 분쇄기(Sonic and Materials, Inc., 미국)를 이용하여 파쇄하였다. 이때 세포 내부에 축적된 카로티노이드 성분들이 용매 상으로 추출되며, 이 과정은 세포 내에 카로티노이드 성분이 완전히 추출될 때까지, 즉 세포의 탈색이 완전히 이루어질 때까지 반복 시행하였다. 용매상의 추출물은 10,000 g에서 10분간의 재 원심분리를 통하여 고-액 분리가 완전히 이루어진 상태로 획득되었다[20, 21].

2-5. 카로티노이드 분석

유도된 붉은색의 *H. pluvialis* 세포들로부터 추출된 카로티노이드 성분들은 카로티노이드 물질 중에서도 특히 astaxanthin 성분을 주 성분으로 축적하는데, 세포 내의 astaxanthin 축적 특성상 대부분 ester-형태의 astaxanthin을 축적할 뿐만 아니라 그 ester의 종류도 다양하게 발견되므로 HPLC 분석 시 수많은 peak이 공존하게 된다. 따라서 HPLC 분석 전에 HPLC peak들의 개수를 줄여 peak 해석 및 분석을 쉽게 하기 위한 추출물의 전처리가 필수적이다. 본 연구에서는 methanol에 용해한 0.01 M NaOH를 이용한 Yuan과 Chen의 가수 분해법(saponification)을 통하여 astaxanthin-ester 형태들을 free-astaxanthin 형태로 전환하였다[21].

가수분해반응이 완료된 free-astaxanthin 추출물들은 Simadzu

HPLC 시스템(Simadzu, 일본)을 이용하여 정성 및 정량화하였다. 본 HPLC 시스템은 두 개의 LC-10AD 펌프와 SPD-10A UV-Vis detector로 이루어졌으며, 분리용 칼럼으로 250×4.6 mm HS-303 hydrosphere C₁₈ column(YMC Inc., 일본)을 사용하였다. 이동상은 추출 카로티노이드 성분들의 더욱 효과적인 분리를 위해 이상 구배 시스템(two phase gradient system)을 적용하였다. 이동상 A의 성분은 dichloromethane: methanol: acetonitrile: water, 5.0: 85.0: 5.5: 4.5(v/v)이며, 이동상 B는 dichloromethane: methanol: acetonitrile: water, 22.0: 28.0: 45.5: 4.5(v/v)로 이루어졌다. 두 이동상은 선형 구배 시스템(linear gradient system)에 의해 구동되었으며, 이동상 B 기준으로 0~8분 동안 0%, 8~20분 동안 0~100% 선형적 증가, 20~70분 동안 100%의 비율로 각각 자동 주입되었다. HPLC 시스템의 전체 유속은 1.0 mL/min으로 제어되었으며, 분리 peak들은 480 nm에서 측정되었다[22].

3. 결과 및 고찰

3-1. *H. pluvialis*의 성장에 대한 CO₂ 농도의 영향

광합성 균주 배양을 통한 효율적인 CO₂ 고정화를 위해 유기 탄소원이 배제된 성장 배지에서 기체 형태의 CO₂ 공급을 통한 자가 영양 배양(autotrophic culture) 방식으로 *H. pluvialis* 균주를 배양하였다. CO₂ 공급은 순수 CO₂ 기체와 공기의 혼합으로 만들어진 다양한 농도의 CO₂ 혼합 기체를 통하여 이루어졌으며, 그 혼합 기체의 CO₂ 농도는 각각 0, 3, 5, 10%로 달리하였다. 광합성을 위한 광 조사는 50 $\mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 의 광도로 12시간 명/암 주기(synchronized illumination)로 이루어졌다. 0% CO₂ 공급(공기만 주입)에서는 균주의 성장이 매우 느리게 나타났으며, CO₂ 농도가 증가함에 따라 균주의 성장 속도가 점점 높아져 5% CO₂ 주입 환경에서 가장 높은 성장 속도를 보였다(Fig. 2). 반면에 10% CO₂ 환경에서는 높은 CO₂ 농도로 인한 세포에 대한 저해 효과로 균주의 성장이 둔화하였다(Fig. 2). 따라서 *H. pluvialis* NIES-144 균주의 자가 영양 배양 시 5% CO₂ 환경이 균주의 효과적인 성장을 위한 최적의 탄소원 공급 조건임을 판단할 수 있다. 일반적으로 녹색 미세조류는 1~3%의 낮

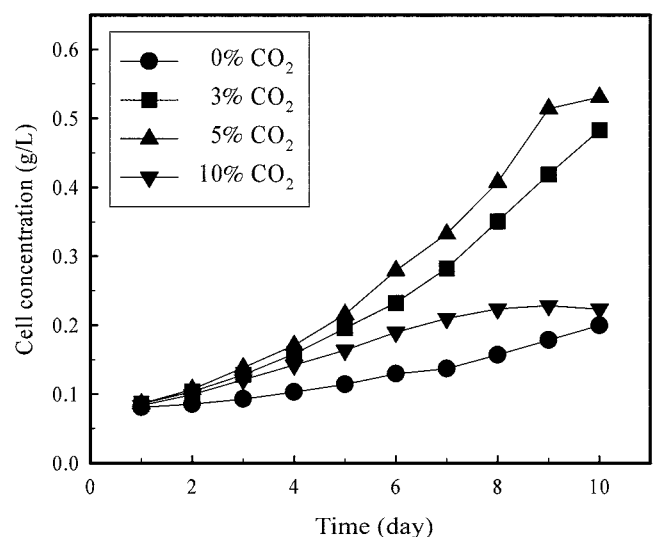


Fig. 2. Effect of CO₂ concentrations on growth of green vegetative *H. pluvialis* on NIES-C medium. 0% CO₂ means supply of air only.

은 농도의 CO_2 환경에서 높은 성장성을 나타내고 심지어 순수 대기 조건에서도 안정된 성장을 보이기도 한다. 이러한 관점에서 볼 때, *H. pluvialis* NIES 144 균주는 CO_2 농도에 매우 민감한 성장 특성을 지닌 녹색 미세 조류임을 확인할 수 있고, 또한, 5% CO_2 환경에서 가장 좋은 성장을 나타내는 것으로 볼 때 다른 녹색 미세 조류에 비해 CO_2 에 대한 내성도 우수한 것으로 판단된다.

3-2. *H. pluvialis*의 배양에서 초기 N, P 농도의 최적화

본 균주의 최적 성장을 위해 광합성 미세 조류의 배양 배지에서 가장 기본적인 영양원으로 사용되는 질소와 인 성분에 대해 균주의 성장 속도에 대한 그 효과를 살펴보았다. 균주에 따라 황산염(sulfate)이 녹색 미세 조류 성장에 영향을 주는 경우도 있지만 본 실험에 사용된 균주의 성장에는 그 효과가 미미하여 본 실험에서 제외하였다. 기본 배양 배지로 사용된 NIES-C 배지에 질소원은 질산염(nitrate, NO_3^-) 형태로, 인원은 인산염(phosphate, PO_4^{3-}) 형태로 각각 포함되어 있다. 따라서 NIES-C 배지 내에 질산염 및 인산염의 농도를 각각 변화시키면서 N과 P 조건의 최적화를 위한 *H. pluvialis* NIES-144 균주의 배양 실험을 실행하였다. 질산염 및 인산염은 각각 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 와 $\text{Na}_2\text{glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 기본 배지 성분의 2배, 5배, 10배의 농도로 첨가되었으며, 5% CO_2 및 $50 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 의 빛이 공급되는 자가 영양 환경에서 배양되었다. 각각의 조건에서 배양된 균주와 기본 배지에서 배양된 균주의 평균 비 성장 속도를 조사하였으며, 그 결과를 Table 2에서 비교하였다. 본 연구에 사용된 NIES-144 균주는 기본 배지의 질산염 및 인산염 농도에서 가장 높은 성장 속도를 보였으나, 질산염과 인산염 모두 2배의 농도로 첨가된 경우에서도 기본 배지와 비슷한 성장 속도를 보였다. 그러나 배지내의 질산염 및 인산염 농도가 5배 이상으로 증가 시 세포 성장에 대한 저해 효과가 나타나 기본 배지에 비해 비 성장 속도가 점차 감소하였다. 특히 10배의 질산염과 인산염이 투입된 고농도의 N과 P 환경에서 세포의 성장에 대한 그 저해효과가 높게 나타났다. 이러한 결과로부터 본 *Haematococcus* 세포의 고농도 배양은 고농도 배지를 이용한 유가식 배양 공정 개발을 통해 배양기 내에 균주 성장의 최적 N, P 환경을 제공함으로써 실현할 수 있을 것으로 사료된다.

3-3. 빛 유도법(light induction)에 의한 포낭 세포로의 고효율 전환 및 CO_2 고정화를 통한 고농도 astaxanthin 생산

CO_2 고정화를 통한 고농도 astaxanthin 생산을 위해 NIES-C 배

지에서 성장한 녹색 *Haematococcus* 세포를 수확하여 NIES-N 배지를 이용하여 질소원이 배제된 배지 환경으로 전환한 뒤, 강한 조사광과 CO_2 를 이용한 자가 영양 광 유도법(photoautotrophic induction)을 적용하여 고농도 astaxanthin 함유 적색 포낭세포로의 유도를 시도하였다. 자가 영양 광 유도 시 광도 조건은 $200 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ 세기의 빛을 이용한 연속 조사(unsynchronized illumination)이었으며, CO_2 는 5%의 농도로 연속적으로 공급하였다. 현미경 관찰을 통하여, 광 유도 시간이 경과함에 따라 녹색 성장 세포들이 비대해진 적색 포낭세포들로 효과적으로 유도됨을 확인하였다(Fig. 3). 또한, astaxanthin 축적에 대한 자가 영양 광 유도 공정의 효과를 알아보기 위해 강한 조사환경이 적용되지 않고 질소원 결핍만을 이용한 유도 공정을 통하여 적색 포낭 세포로의 유도 및 astaxanthin 생산을 하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 비교하여 함께 나타내었다. 질소원 결핍 유도에서 포낭 세포에 의한 astaxanthin 축적은 매우 느린 속도로 진행되었으며, 평균 astaxanthin 생산 속도는 $1.14 \text{ mg/L} \cdot \text{day}$ 로 나타났다. 이해 비해 자가 영양 광 유도 공정에서 포낭 세포에 의한 astaxanthin 축적은 시간에 따라 급격히 증가하였으며, 18일 동

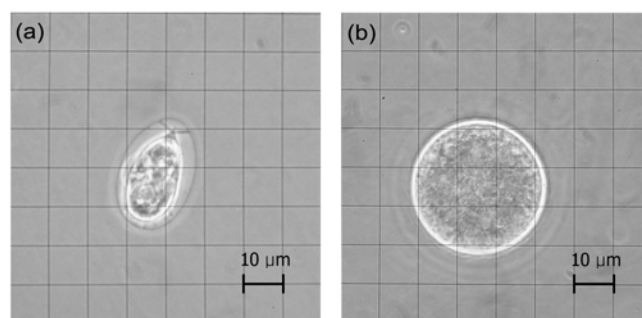


Fig. 3. Microscope photographs of *H. pluvialis* NIES-144; (a) Green vegetative form, (b) Red cyst form.

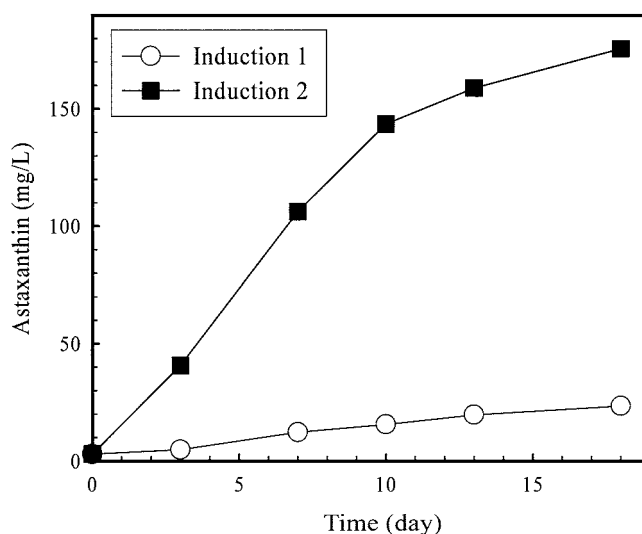


Fig. 4. Comparison of astaxanthin production by *H. pluvialis* under different inductive conditions; Induction 1: Nitrate deprivation under $50 \mu\text{mol photon/m}^2$ of light, Induction 2: Nitrate deprivation and high light illumination with $200 \mu\text{mol photon/m}^2$ of light (photoautotrophic induction).

Table 2. Average specific growth rate of *Haematococcus pluvialis* NIES-144 under various initial concentration of nitrate and phosphate; 1x concentration of nitrate and phosphate means each concentration in NIES-C medium

Nutrient	Concentration (mg/L)	μ_{avg} (/day)
Nitrate (NO_3^-)	1x	0.232
	2x	0.222
	5x	0.196
	10x	0.184
Phosphate (PO_4^{3-})	1x	0.232
	2x	0.218
	5x	0.185
	10x	0.168

Table 3. Astaxanthin productivity and CO₂ fixation rate to astaxanthin by induced *H. pluvialis* cyst cells

Period	*Conversion factor (g CO ₂ /g astaxanthin)	Astaxanthin productivity (mg/L·day)	CO ₂ fixation rate to astaxanthin (mg/L·day)
Photoautotrophic induction	2.9	9.6	27.8

*In calculation for conversion factor, molecular weight of CO₂ and astaxanthin (C₄₀H₅₂O₄) was 44 and 597 g/mol, respectively.

안의 자가 영양 광 유도를 통하여 9.60 mg/L·day의 생산 속도로 최대 175 mg/L의 astaxanthin을 생산하였다(Fig. 4). 이것은 질소원 결핍이 녹색 성장 세포의 포낭 세포로의 유도를 위한 기본 조건임이 분명하나 포낭 세포에서 astaxanthin 축적에는 그 영향이 없음을 의미한다. Wang과 Zarka[23]의 연구에 따르면 *H. pluvialis*는 적색 포낭 세포 상태에서도 광합성 기작의 활성을 그대로 유지하여 CO₂를 이용한 탄소 동화 작용을 지속하는 것으로 알려졌다. 따라서 astaxanthin의 합성도 광합성을 통한 탄소 동화 작용을 기반으로 이루어지므로, 자가 영양 광 유도 공정에서 강한 조사에 의한 광합성 효율 촉진이 빠른 CO₂ 고정화 및 더 나아가 높은 astaxanthin 생산 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

18일 동안의 자가 영양 광 유도 공정에서 *H. pluvialis*에 의한 CO₂의 astaxanthin으로의 전환 정도가 적색 포낭 세포의 astaxanthin 생산 속도를 근거로 하여 평가되었다(Table 3). 이때 적색 포낭 *Haematococcus* 세포에 의해 27.8 mg/L·day의 속도로 CO₂가 유용항산화 물질인 astaxanthin으로 전환되는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 적용된 자가 영양 광 유도 공정은 astaxanthin 생산성 향상과 동시에 추가적인 CO₂ 고정화 증대 효과를 얻을 수 있는 공정으로 평가된다.

4. 결 론

광합성 미세 조류 *H. pluvialis*를 이용하여 생물학적 CO₂ 고정화 및 항산화성 카로티노이드 물질의 동시 생산을 수행하였다. 먼저 *H. pluvialis*의 성장에 대한 CO₂, 질산염, 인산염에 대한 효과가 자가 영양 배양 환경에서 각각 조사되었다. CO₂ 혼합 기체가 5% 농도로 주입될 때 녹색 성장 *Haematococcus* 세포가 가장 좋은 성장을 나타냈으며, 초기 질산염과 인염의 농도는 기본 배지(NIES-C) 조건일 때 가장 높은 비 성장 속도를 보였다. 항산화성 카로티노이드 astaxanthin 생산을 위한 녹색 성장 세포의 적색 포낭 세포로의 유도는 200 µmol photon/m²s 빛의 조사(unsynchronized illumination)와 동시에 5% CO₂를 연속 공급하는 자가 영양 광 유도 공정(photoautotrophic induction)을 통해 이루어졌으며, 효과적인 유도를 위해 질소원 결핍 환경에 있는 녹색 성장 세포에 이 공정을 적용하였다. 이때 적색 포낭 *H. pluvialis*에 의한 astaxanthin 생산성은 9.6 mg/L·day이었으며, astaxanthin으로 전환되는 세포 내 CO₂ 고정화 속도는 27.8 mg/L·day로 나타났다.

본 연구에서 광합성 미세조류를 이용한 바이오매스로의 CO₂ 고정화 및 더 나아가 CO₂ 전환을 통하여 항산화 기능의 카로티노이드 물질을 생산할 수 있는 새로운 생물학적 CO₂ 고정화 기술을 제시하였다. 이 기술은 단순히 CO₂ 제거를 위한 기존의 환경 공정에서 탈피하여 고부가 생리 활성 물질 생산의 생물공정 기능을 부여함으로써 CO₂ 처리용 현장 기술로 기존의 화학 공정보다 적합할 것으로 판단된다. 특히 본 연구에 적용된 *H. pluvialis* NIES-144 균주

는 타 미세조류에 비해 높은 CO₂ 적응성 또는 내성이 존재하므로 산업체 배출 CO₂의 처리에 직접 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 과학기술부의 21세기 프론티어 연구개발사업인 이산화탄소 저감 및 처리 기술개발 사업단의 연구비 지원(DG2-201)으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. http://www.cdrs.re.kr/research_develop/outline.htm
2. Kodama, M., Ikemoto, H. and Miyachi, S., "A New Species of Highly CO₂ Tolerant Fast Growing Marine Microalga Suitable for High Density Culture," *J. Mar. Biotechnol.*, **1**, 21-25(1993).
3. Zhang, K., Miyachi, S. and Kurano, N., "Photosynthetic Performance of a Cyanobacterium in a Vertical Flat-Plate Photobioreactor for Outdoor Microalgal Production and Fixation of CO₂," *Biotechnol. Lett.*, **23**, 21-26(2001).
4. Kobayashi, M. and Sakamoto, Y., "Singlet Oxygen Quenching Ability of Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*," *Biotechnol. Lett.*, **21**, 265-269(1999).
5. Margalith, P. Z., "Production of Ketocarotenoids by Microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 431-438(1999).
6. Guerin, M., Huntley, M. E. and Olaizola, M., "Haematococcus Astaxanthin; Applications for Human Health and Nutrition," *Trends Biotechnol.*, **21**(5), 210-216(2003).
7. Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S., "Astaxanthin Production by a Green Alga, *Haematococcus pluvialis* Accompanied with Morphological Changes in Acetate Media," *J. Ferment. Bioeng.*, **71**(5), 335-339(1991).
8. Boussiba, S., "Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response," *Physiol. Plant*, **108**, 111-117(2000).
9. Fábregas, J., Domínguez, A., Maseda, A. and Otero, A., "Interactions Between Irradiance and Nutrient Availability During Astaxanthin Accumulation and Degradation in *Haematococcus pluvialis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 545-551(2003).
10. Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S., "Enhanced Carotenoids Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), 867-873(1993).
11. Kobayashi, M., Kurimura, Y. and Tsuji, Y., "Light Independent, Astaxanthin Production by the Green Microalga *Haematococcus pluvialis* Under Salt Stress," *Biotechnol. Lett.*, **19**(6), 507-509(1997).
12. Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G. A., "Influence of Stress on Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* Grown Under Different Culture Conditions," *Process Biochem.*, **37**, 623-627(2002).

13. Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D. C., Lamela, T. and Otero, A., "Induction of Astaxanthin Accumulation by Nitrogen and Magnesium Deficiencies in *Haematococcus pluvialis*," *Biotechnol. Lett.*, **20**(6), 623-626(1998).
14. Fábregas, J., Otero, A., Maseda, A. and Domínguez, A., "Two Stage Cultures for the Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*," *J. Biotechnol.*, **89**, 65-71(2001).
15. Hata, N., Ogonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H. and Tanaka, H., "Production of Astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a Sequential Heterotrophic-Photoautotrophic Culture," *J. Appl. Phycol.*, **13**, 395-402(2001).
16. Kakizono, T., Kobayashi, M. and Nagai, S., "Effect of Carbon/nitrogen Ratio on Encystment Accompanied with Astaxanthin Formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis*," *J. Ferment. Bioeng.*, **74**(6), 403-405(1992).
17. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J., "Carotenoid Accumulation in *Haematococcus pluvialis* in Mixotrophic Growth," *Biotechnol. Lett.*, **23**, 373-378(2001).
18. Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. and Abalde, J., "Analysis and Enhancement of Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis*," *Bioresour. Technol.*, **96**, 373-378(2005).
19. Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jeronimo, F. M. and Campocoso, A. T., "Influence of Environmental and Nutritional Factors in the Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*," *Bioresour. Technol.*, **92**, 209-214(2004).
20. Wellburn, A. R., "The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution," *J. Plant Physiol.*, **144**, 307-313(1994).
21. Yuan, J. P. and Chen, F., "Purification of Trans-Astaxanthin from a High-Yielding Astaxanthin Ester-Producing Strain of the Microalga *Haematococcus pluvialis*," *Food Chem.*, **68**, 443-448(2000).
22. Yuan, J. P. and Chen, F., "Chromatographic Separation and Purification of Trans-Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*," *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3371-3375(1998).
23. Wang, B. and Zarka, A., "Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an Active Protective Process Under High Irradiance," *J. Phycol.*, **39**, 1116-1124(2003).